

University of Groningen

Ex vivo fibrosis research: 5 mm closer to human studies

Bigaeva, Emiliia

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Bigaeva, E. (2019). *Ex vivo fibrosis research: 5 mm closer to human studies*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



SUMMARY
(ENGLISH, DUTCH AND
RUSSIAN)

9

ENGLISH SUMMARY

Excessive scarring, a pathological condition known as *fibrosis*, is a direct consequence of dysregulated wound healing. Chronic or repetitive injury inevitably leads to the uncontrollable accumulation of extracellular matrix (ECM) components, such as collagens – building blocks of scar tissue. Fibrosis can affect virtually any human organ; it compromises normal tissue architecture and ultimately results in a loss of organ function. Fibrotic diseases are characterized by high morbidity and mortality, yet, despite the high prevalence and serious healthcare burden, effective therapies that can prevent or reverse fibrosis do not currently exist.

Decades of research significantly advanced our understanding of the cellular and molecular mechanisms underlying the progression of organ fibrosis. A multitude of antifibrotic strategies appeared promising in preclinical experimental models, and yet, failed to show efficacy in human clinical trials. Low clinical success underlines poor translational efficiency of basic biomedical research, which largely relies on conventional *in vitro* culture systems and *in vivo* animal models. Currently, reliable human-based models are lacking, further emphasizing the need for new, alternative preclinical research tools.

In search for predictive and translational preclinical models, precision-cut tissue slices (PCTS), a functional *ex vivo* 3D organ model, has recently caught the attention of biomedical research. The basis of the PCTS method is obtaining thin organ slices, only 5 mm in diameter, that contain all cell types and acellular components of the whole organ in their original environment, while preserving the intercellular and cell-matrix interactions. In other words, PCTS are miniaturized organs that retain native tissue architecture and intact cellular environment. The most invaluable advantage of PCTS is the ability to use human tissue, which is considered to be more predictive for human responses than animal experiments. This not only increases the predictive capacity of the model, but also eliminates the need for animal-to-human extrapolation. The studies presented in this thesis underline the great potential that the (human) PCTS model holds for advancing the field of fibrosis research and facilitating preclinical drug development.

Despite the extensive number of applications of the PCTS model, its recognition in preclinical research is limited because of the current lack of convincing molecular characterization. **Part I** of this thesis addresses this issue through detailed studies on the molecular processes that take place in PCTS during culture in order to broaden our understanding of this *ex vivo* system.

In **Chapter 2**, we aimed to elucidate whether the fibrotic response upon culture and treatment varied between PCTS prepared from different murine organs. We demonstrated that although liver, kidney and intestinal PCTS displayed substantial differences in the expression of ECM-related genes directly after slicing, the process of culturing triggered common mechanisms of fibrogenesis in all PCTS, regardless of the organ of origin. These common mechanisms were associated with pronounced inflammatory response to culture, extensive ECM remodelling and active transforming growth factor

beta (TGF β) signalling. We further demonstrated that PCTS also reflected organ-specific features of culture-induced fibrogenic processes, and as a consequence, showed diverse responses to the treatment with galunisertib, a TGF β receptor I kinase inhibitor. We provided evidence that despite the many common features of fibrotic diseases, each organ responds differently to injury and, thus may not have similar susceptibility to antifibrotic therapy, even though it targets a core fibrosis pathway.

We continued unravelling the molecular mechanisms involved in PCTS culture by performing whole transcriptome sequencing. **Chapter 3** largely details the dynamic transcriptional changes that murine and human PCTS, originating from liver, kidney and gut, undergo during culture. We observed that culturing impacts all types of PCTS (*i.e.*, regardless of species or organ of origin) in a universal way: on one hand, culture induces inflammatory responses and fibrosis-associated ECM remodelling, and on the other hand, dysregulates enzymatic and metabolic activity of PCTS. We identified main modulators of culture-induced dynamic changes as well as significantly regulated biological pathways across murine and human PCTS. Furthermore, we reported species- and organ-differences in culture effects, illustrating that each type of PCTS develops an individualized response to culture.

In **chapter 4**, we focused solely on human PCTS. Using next generation sequencing, we characterized human fibrotic liver, kidney and ileum PCTS in culture, and showed that diseased PCTS undergo extensive transcriptional changes, beyond their initial pathology. Next, we compared the molecular processes that unfold during culture in fibrotic slices to those that occur in PCTS from healthy tissues, in order to define the role of culture, organ of origin and pre-existing pathology. We demonstrated that culturing of the slices induces a common, inflammation- and fibrosis-driven condition with limited transcriptional differences between healthy and fibrotic PCTS. Despite these converging effects of culture, the diseased phenotype of human PCTS still impacts the biological processes in the tissue (*e.g.* cytokine release), highlighting the importance of using diseased, patient-derived PCTS for preclinical research. This study reinforces the application of human PCTS as an *ex vivo* fibrosis model, and lays the foundation for future studies aimed at validating its use as a preclinical tool for drug development.

Part II of this thesis includes studies that aimed to demonstrate the predictive value of PCTS as a screening platform for antifibrotic drugs and raise awareness of how challenging cross-species translation is.

Activation of tyrosine kinase receptors (RTKs) after injury plays an important role in organ fibrosis. While inhibition of RTKs has already been studied in various models of renal fibrosis, **Chapter 5** demonstrated that this therapeutic strategy can be evaluated *ex vivo* in murine and human PCTS. We showed that nintedanib, an inhibitor of several RTKs, such as platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors, attenuated renal fibrosis not only in murine, but also in human PCTS. Human PCTS, in this case, largely contribute to the validation of RTKs as clinically relevant therapeutic targets in renal fibrosis. Furthermore, we

characterized the phenotype of fibrotic kidney PCTS and demonstrated that the antifibrotic potency of nintedanib diminishes when it comes to the reversal of established fibrosis, which reflects a major challenge in the treatment of end-stage renal disease.

Subsequently, in **chapter 6**, we tried to establish how well PCTS can predict antifibrotic drug efficacy in animal studies or possibly even in human clinical trials. Murine and human kidney PCTS, as well as human renal fibroblasts were exposed to the TGF β or PDGF pathway inhibitors with established antifibrotic efficacy – pirfenidone, galunisertib and imatinib. We compared the data obtained with kidney PCTS with published studies that investigated these compounds in animal models of renal fibrosis. We showed that changes in key fibrosis end-points evaluated in animal studies after pharmacological treatment (such as reduced collagen type I expression and interstitial accumulation, inhibited TGF β and/or PDGF signalling and anti-inflammatory activity) were largely detected in murine PCTS. In turn, human PCTS can be used to predict drug efficacy in clinical trials. For instance, the lack of clinical efficacy of pirfenidone in patients with kidney disease was reflected in human kidney PCTS. This study showcases the predictive capacity of the PCTS model for antifibrotic drug screening and highlights the importance of using human tissue for target and therapy validation.

Part III of this thesis addresses one of the current shortcomings of the PCTS model – limited longevity of the slices during culture, which precludes the investigation of long-term drug toxicity and efficacy. **Chapter 7** describes a strategy of optimisation of the current culture conditions of intestinal PCTS to accommodate long-term tissue viability. Murine and rat intestinal PCTS were cultured in medium enriched with growth factors that are necessary to support intestinal cell function. We showed that the composition of the culture medium directly influences intestinal tissue viability and morphological integrity. Furthermore, our results emphasize the importance of medium selection for intestinal slices originating from different species.

In conclusion, this thesis provides an extensive characterization of the *ex vivo* PCTS culture system, shows its suitability for preclinical drug screening as a translational model with high predictivity and clinical relevance, and explores optimization of culture conditions to improve tissue longevity. Our work emphasizes the value of using human tissue for advancing the field of organ fibrosis research and drug development. Thin tissue slices, precisely 5 mm in diameter, have the power to bring us closer to human studies, and at the same time save the lives of laboratory animals!

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Overtollige littekenvorming, een pathologisch verschijnsel ook wel *fibrose* genoemd, wordt veroorzaakt door ontregelde bindweefselvorming. Hierbij wordt te veel extracellulaire matrix (ECM), zoals collagenen, aangemaakt. Fibrose wordt veroorzaakt door chronische of herhaaldelijke schade en komt voor in alle organen. Bij chronische ziekte leidt overproductie van bindweefsel in de organen tot een verlies van orgaanfunctie. Dit laatste gaat gepaard met een hoge morbiditeit en mortaliteit. Helaas zijn er tot op heden nog geen effectieve therapieën op de markt die gericht zijn op het voorkomen of remmen van fibrose zodat orgaanfunctieverlies tegen wordt gegaan.

Kennis over de cellulaire en moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan fibrose is in de afgelopen decennia sterk toegenomen. Waar verschillende antifibrotische strategieën veelbelovend leken in preklinisch onderzoek, bleken deze niet succesvol in klinisch onderzoek. Dit gebrek aan klinisch succes benadrukt de slechte vertaalbaarheid van biomedisch onderzoek, dat vooral gebaseerd is op conventionele *in vitro* kweeksystemen en *in vivo* dierproeven. Op dit moment zijn er te weinig voorspellende menselijke modelsystemen, en nieuwe, preklinische modellen zijn daarom echt noodzakelijk.

In de zoektocht naar translationele modellen die de effecten in de mens beter kunnen voorspellen trekt precision-cut tissue slices (PCTS), een functioneel *ex vivo* 3D orgaanmodel, steeds vaker de aandacht. PCTS zijn zeer dunne plakjes van organen met een diameter van 5mm, en behouden alle componenten en celinteracties van het orgaan. In andere woorden, PCTS zijn een miniaturversie van organen. Hierbij is het grootste voordeel de mogelijkheid om humaan weefsel te gebruiken, waardoor PCTS een betere voorspellende waarde hebben dan dierproeven. Dit verbetert niet alleen de voorspellende waarde van het model, maar elimineert ook de noodzakelijkheid om te extrapoleren van dier naar mens. Dit proefschrift presenteert meerdere studies die de verschillende voordelen van (humane) PCTS beschrijven en hoe dit model gebruikt kan worden voor fibrose-onderzoek en geneesmiddelontwikkeling.

Ondanks de vele toepassingen van het PCTS model, wordt het maar weinig gebruikt voor preklinisch onderzoek. Dit wordt veroorzaakt door het gebrek aan karakterisatie van moleculaire processen die optreden tijdens het kweken van PCTS. **Deel I** van dit proefschrift beschrijft de moleculaire processen tijdens de incubatie van PCTS, om de kennis over dit *ex vivo* systeem verder uit te breiden.

Het doel van **hoofdstuk 2** was het bestuderen van de eventuele verschillen in het ontstaan van de fibrotische processen tijdens kweek van PCTS van verschillende muisorganen. Er werd aangetoond dat weefsel van lever, nieren en darmen een sterk verschillend expressiepatroon van ECM-genen lieten zien direct na het vervaardigen van PCTS. Echter werden in PCTS van alle organen gemeenschappelijke fibrosemechanismen geactiveerd door weefselkweek. Deze mechanismen waren geassocieerd met ontstekingsreactie, hermodellering van ECM en activiteit in de transforming growth factor beta

(TGF β) signaaltransductieroute. Tevens werden orgaan-specifieke eigenschappen van fibrose gezien. Dit kan de verschillende effecten van behandeling met galunisertib, een TGF β receptor I kinase remmer, verklaren. In het hoofdstuk wordt bewijs geleverd dat ondanks overeenkomsten in fibrose in de verschillende organen, elk orgaan anders reageert op letsel en daarom niet met dezelfde therapie behandeld kan worden, zelfs niet als deze gericht is op een van de belangrijkste mechanismen die fibrose veroorzaken.

Vervolgens werd in **hoofdstuk 3** in detail de moleculaire achtergrond van muis en humane PCTS tijdens kweek beschreven door het hele transcriptoom in kaart te brengen. Dit werd onderzocht in lever, nier en darm PCTS, afkomstig van mensen en muizen. Er werd aangetoond dat incubatie op dezelfde manier effect heeft op alle soorten PCTS, onafhankelijk van orgaan of diersoort. Aan de ene kant induceert weefselkweek een ontstekingsreactie en fibrosegerelateerde ECM hermodellering, aan de andere kant veroorzaakt het enzymatische en metabolische disregulatie. De belangrijkste spelers en signaaltransductieroutes voor deze veranderingen werden geïdentificeerd. Tevens werden verschillen tussen organen en diersoorten tijdens weefselkweek beschreven, en werd duidelijk dat PCTS van verschillende origine een unieke reactie hebben op weefselkweek.

In **hoofdstuk 4** werd gekeken naar humane PCTS. Door het in kaart brengen van het transcriptoom werden PCTS van fibrotische organen (lever, nier, ileum) tijdens weefselkweek gekarakteriseerd. Hierbij bleek dat PCTS van fibrotische organen een grote transcriptionele verandering ondergaan. Vervolgens werden de moleculaire processen die ontstaan tijdens weefselkweek van fibrotische PCTS vergeleken met met de processen in gezonde PCTS. Hiermee werd de rol van weefselkweek, orgaansoort en ziekte in de processen gedefinieerd. Hier werd duidelijk dat weefselkweek een verandering veroorzaakt die werd gedreven door ontsteking en fibrose. Er waren daarbij geringe verschillen zichtbaar tussen gezonde en fibrotische PCTS. Ondanks deze convergerende effecten van kweek, beïnvloed het fenotype van zieke PCTS nog steeds de biologische processen in het weefsel (zoals cytokine-afgifte). Dit benadrukt het belang van ziek (van patiënt afkomstig) weefsel tijdens preklinisch onderzoek. Dit onderzoek laat het nut zien van PCTS vervaardigd van menselijk weefsel, en legt de basis voor toekomstige studies gericht op validatie van PCTS voor preklinisch geneesmiddelenonderzoek.

Deel 2 van dit proefschrift onderzoekt de voorspellende waarde van PCTS als een screening platform voor antifibrotische medicijnen en beschrijft hoe moeilijk de translatie tussen diersoorten is.

Activatie van tyrosine kinase receptoren (RTK) na letsel speelt een belangrijk rol bij het ontstaan van fibrose. Hoewel remming van RTK's reeds is bestudeerd in verschillende modellen voor renale fibrose, toonde **hoofdstuk 5** aan dat deze therapeutische strategie *ex vivo* kan worden geëvalueerd in PCTS van muizen en mensen. Deze studies laten zien dat nierfibrose in muis en humane PCTS wordt verminderd door nintedanib, een remmer van verscheidene RTKs waaronder platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) receptoren.

Humane nier PCTS dragen bij aan de validatie van RTKs als klinisch relevante therapeutisch doelwitten in nierfibrose. Het fenotype van fibrotische nier PCTS werd gekarakteriseerd en de anti-fibrotische potentie van nintedanib werd in deze PCTS bestudeerd. Hieruit bleek dat nintedanib niet in staat is reeds bestaande fibrose ongedaan te maken.

Vervolgens wordt in **hoofdstuk 6** gekeken naar de voorspellende waarde van PCTS voor werkzaamheid van antifibrotische geneesmiddelen. PCTS van nieren afkomstig van muizen en mensen, en ook menselijke nierfibroblasten, werden blootgesteld aan pirfenidon, galunisertib en imatinib. Dit zijn TGF β - of PDGF-sigtaaltransductierouteremmers met een bewezen antifibrotische werking. De verkregen gegevens werden vergeleken met gepubliceerde studies die deze remmers in diermodellen van renale fibrose hebben onderzocht. Er werd aangetoond dat veranderingen in belangrijke fibrose-eindpunten (waaronder vermindering in collageen type 1, ontsteking en TGF β /PDGF signalering), zoals vastgesteld in dierproeven, grotendeels werden gedetecteerd in PCTS. Waar PCTS van muizen voorspellend bleken voor dierproeven, kunnen PCTS van menselijk weefsel worden gebruikt om klinische onderzoeken te voorspellen. Het gebrek aan werkzaamheid van pirfenidon in nierpatiënten wordt duidelijk weerspiegeld in PCTS. Dit hoofdstuk benadrukt het belang van gebruik van menselijk weefsel voor het valideren van de therapie.

Deel III van dit proefschrift behandelt een van de huidige tekortkomingen van het PCTS model – de gelimiteerde levensduur van de slices tijdens weefselkweek, wat onderzoek naar langdurige toxiciteit en werkzaamheid van geneesmiddelen uitsluit. **Hoofdstuk 7** beschrijft een strategie voor de optimalisatie van de huidige kweekomstandigheden van darm-PCTS om de levensduur te verlengen. PCTS vervaardigd van muizen en de ratten werden gekweekt in medium verrijkt met groeifactoren die nodig zijn om de functie van darmcellen te ondersteunen. Er werd aangetoond dat de levensvatbaarheid van de darmweefsels en de morfologische integriteit rechtstreeks wordt beïnvloed door de samenstelling van het kweekmedium. Bovendien benadrukken deze resultaten het belang van medium selectie voor darmslices afkomstig van verschillende diersoorten.

Concluderend levert dit proefschrift een uitgebreide karakterisatie van het *ex vivo* PCTS-kweekstelsel, toont het de geschiktheid, translationele en voorspellende waarde van PCTS voor preklinische screening van geneesmiddelen, en onderzoekt het de optimalisatie van kweekomstandigheden om de levensduur van weefsel te verbeteren. Dit werk benadrukt de waarde van het gebruik van menselijk weefsel om fibroseonderzoek en geneesmiddelontwikkeling vooruit te brengen. Dunne weefselslices, precies 5 mm in diameter, hebben de kracht om ons dichterbij humane studies te brengen en redden tegelijkertijd de levens van proefdieren!

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ

Чрезмерное разрастание соединительной ткани – патологическое состояние известное как фиброз (лат. *fibrosis*) – является прямым последствием нарушения естественных процессов заживления. Повторяющееся хроническое повреждение клеток внутренних органов неизбежно приводит к неконтролируемому накоплению внеклеточного матрикса¹ (ВКМ), в основном состоящего из коллагенов, что способствует образованию рубцовой ткани. Фиброз может поражать практически любой орган человека; при этом происходит замещение нормальной ткани органа фиброзной (рубцовой) тканью, что приводит к деформации органа, и, конечном итоге, к полной потере его функции. Фиброзные заболевания характеризуются высокой заболеваемостью и смертностью. Однако, несмотря на широкую распространенность и серьезные последствия для здоровья, в настоящее время эффективные методы лечения или предотвращения развития фиброза не существуют.

Десятилетия научных исследований значительно расширили наше понимание клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе возникновения и прогрессирования фиброза внутренних органов. Тем не менее, множество антифибротических терапий, которые казались многообещающими на этапе доклинических² исследований, не смогли продемонстрировать эффективность в клинических испытаниях на людях. Низкий уровень успеха клинических испытаний указывает на недостаточный трансляционный потенциал³ биомедицинских исследований, которые в значительной степени опираются на традиционные тест-системы *in vitro*⁴ и *in vivo*⁵. Отсутствие надежных экспериментальных моделей, основанных на работе с человеческим материалом, еще больше подчеркивает необходимость в новых, альтернативных инструментах доклинических исследований.

Поиск прогностических и трансляционных доклинических лабораторных тест-систем привел к разработке и использованию живых тканевых срезов (с англ. *precision-cut tissue slices (PCTS)*, что дословно означает «точно-выполненные тканевые срезы»), представляющие собой трехмерную функциональную модель органа, из которых они выполнены. Основой данного лабораторного метода является получение очень тонких срезов изолированных органов животного или человеческого происхождения, выполненных с высокой точностью. Техника изготовления тканевых срезов схематично изображена на стр. 22 рис. 5. Изолированный орган (или цилиндрический кусочек органа) помещается в металлический слайсер, заполненный холодным солевым раствором для презервации тканей. С помощью тонкого лезвия, совершающего возвратные движения с высокой скоростью, слайсер с точностью нарезает орган на тонкие срезы. Далее, полученные тканевые срезы культивируются в специальной ростовой среде в пластиковых 12- или 24-луночных планшетах, которые помещают в инкубатор

1 англ. *ECM*

2 т.е. при тестировании с использованием экспериментальных моделей или тест-систем

3 т.е. возможность экстраполировать результаты лабораторных экспериментов «на пациента»

4 лат. «в стекле», исследования вне живого организма с использованием клеточных культур

5 лат. «на живом», эксперименты на животных

с постоянной температурой 37°C. Каждый срез, диаметром всего 5 мм, содержит все типы клеток, а также неклеточные компоненты тканей органа в их исходной конфигурации, сохраняя все межклеточные и клеточно-матричные взаимодействия. Другими словами, тканевые срезы (или *PCTS*) — это живые органы в миниатюре, сохранившие естественную структуру ткани и клеточный состав. Главное преимущество культуры срезов состоит в возможности использовать ткани органов человека для лабораторных исследований, что которые считаются более показательными, чем эксперименты на животных. Использование человеческих тканей не только увеличивает прогнозирующую способность данной экспериментальной модели, но также устраняет необходимость экстраполяции полученных результатов от животного к человеку. Исследования, представленные в этой диссертации, подтверждают важную роль культуры живых срезов тканей (человека), в качестве экспериментальной тест-системы, для развития области исследований фиброза внутренних органов и доклинической разработки лекарств.

Несмотря на большое количество преимуществ культуры тканевых срезов, их применение в доклинических исследованиях до сих пор ограничено из-за отсутствия основательной молекулярной характеристики. **Первая часть** данной диссертации способствует решению этой проблемы, так как описывает подробное изучение молекулярных процессов, которые происходят в тканевых срезах во время культивирования, расширяя наше понимание этой тест-системы.

Во **второй главе** мы поставили цель выяснить, различаются ли фиброзные изменения, возникающие во время культивирования, а также изменения после антифиброзной терапии между тканевыми срезами, полученными из разных мышечных органов. В этом научном исследовании мы продемонстрировали, что несмотря на то что срезы печени, почек и кишечника существенно различаются в экспрессии генов связанных с ВКМ непосредственно после их изготовления, процесс культивирования запускает общие механизмы развития фиброза во всех тканевых срезах, независимо от органа их происхождения. В частности, культивирование связано с выраженным воспалительным процессом, интенсивным ремоделированием ВКМ и задействованным сигнальным путем трансформирующего фактора роста бета (TGFβ), играющего центральную роль в патогенезе фиброза. Мы также продемонстрировали, что тканевые срезы отражают органо-специфические особенности фиброгенных процессов, вызванных культивированием, и, как следствие, по-разному реагируют на действие препарата галунисертиб (англ. *galunisertib*), который является киназным ингибитором рецептора TGFβ. Данное исследование показало, что в то время как различные фиброзные заболевания имеют много общих признаков, каждый орган по-разному реагирует на повреждение и, следовательно, имеет свою особенную восприимчивость к антифиброзной терапии, даже если она нацелена на один из центральных медиаторов фиброза.

Мы продолжили изучать молекулярные механизмы, задействованные в культуре тканевых срезов, и для этого использовали метод секвенирования нового поколения – РНК-Seq, с помощью которого измеряют уровень экспрессии всех генов, присутствующих в клетке на момент проведения данного анализа (совокупность всех генов называется *транскриптом*). **Третья глава** этой диссертации содержит подробное описание динамических транскрипционных изменений, происходящих со срезами печени, почек и кишечника мыши и человека во время культивирования. По данным нашего исследования, культивирование воздействует на все типы тканевых срезов универсальным образом (т.е. независимо от биологического вида или органа происхождения): с одной стороны, культивирование вызывает воспалительные реакции и ремоделирование ВКМ, связанное с фиброзом, а с другой стороны, нарушает регуляцию ферментативной и метаболической активности живых срезов тканей. Мы определили основные модуляторы вызванных процессом культивирования динамических изменений, а также претерпевшие существенные изменения сигнальные пути в тестируемых срезах тканей мыши и человека. Кроме того, мы подтвердили наличие видовых и органных различий в воздействии культивирования на тканевые срезы.

В **четвертой главе** мы сфокусировали нашу научную работу исключительно на тканевых срезах человеческого происхождения. В отличие от предыдущей главы, где мы использовали срезы только здоровых тканей, данное исследование также включает тестирование срезов, изготовленных из фиброзных тканей органов больных с клинически диагностированным фиброзом. При помощи секвенирования нового поколения, мы охарактеризовали транскриптом срезов фиброзных тканей печени, почек и подвздошной кишки человека в культуре и показали, что срезы фиброзных тканей, так же как и здоровых тканей, претерпевают обширные транскрипционные изменения в процессе культивирования, и развивают состояние за рамками их первоначальной патологии. Чтобы определить роль таких факторов, как время культивирования, орган происхождения срезов и наличие патологии, в данной тест-системе, мы сравнили молекулярные процессы, действующие в срезах фиброзных тканей человека с теми, что происходят в срезах здоровых тканей. Мы продемонстрировали, что во время культивирования тканевые срезы здоровых и фиброзных органов развивают похожее состояние, характеризующееся воспалительными и фиброзными процессами, а также ограниченными транскрипционными различиями между ними. Несмотря на подобное слияние признаков тканей под воздействием культивирования, наличие патологии (в данном случае, фиброза) в тканевых срезах все еще влияет на биологические процессы в ткани (например, высвобождение цитокинов), подчеркивая важность использования срезов не только здоровых, а также фиброзных тканей органов человека в доклинических исследованиях. Данная работа не только утвердила применение культуры срезов человеческих тканей в качестве экспериментальной модели фиброза, но и заложила основу для будущих исследований, направленных на валидацию использования этой тест-системы как инструмента для доклинической разработки лекарств.

Вторая часть диссертации включает в себя исследования, имевшие цель продемонстрировать прогностическую ценность тканевых срезов как платформы для скрининга антифиброзных препаратов и повысить осведомленность о том, насколько сложной является трансляция научных выводов между экспериментами на животных и человеком.

Известно, что активация тирозинкиназных рецепторов (англ. *tyrosine kinase receptors, RTKs*) в результате повреждения тканей играет важную роль в развитии фиброза. Несмотря на то, что ингибирование тирозинкиназных рецепторов было уже изучено с помощью различных экспериментальных моделей фиброза почек, мы в **пятой главе** продемонстрировали, что мышинные и человеческие тканевые срезы также позволяют оценить эффективность данной терапевтической стратегии. В нашем исследовании мы использовали недавно разработанный препарат нинтеданиб (англ. *nintedanib*) – тройной ингибитор рецепторов тирозинкиназ, таких как рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора роста фибробластов (FGF) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Мы показали, что нинтеданиб эффективно противодействует развитию фиброза почек не только в тканях мышей, но и человека. В этом случае, использование срезов почек человеческого происхождения в значительной степени подтверждает клиническую значимость тирозинкиназных рецепторов как мишеней для лечения фиброза почек. Мы также охарактеризовали фенотип тканевых срезов, полученных из фиброзных почек человека, и продемонстрировали, что антифибротическая активность нинтеданиба значительно снижена в этих срезах и недостаточна для замедления или остановки тяжелых стадий (запущенного) фиброза. Это отражает клиническую реальность, в которой терминальная стадия почечной недостаточности все еще неизлечима.

В следующей, **шестой главе** мы попытались установить, насколько точно тканевые срезы могут предсказать эффективность антифибротических препаратов в сравнении с исследованиями на животных и, даже возможно, клиническими испытаниями на людях. В данном исследовании, мышинные и человеческие срезы почек, а также культура клеток (фибробластов) почек человека, подвергались воздействию препаратов, таких как пирфенидон (англ. *pirfenidone*), галунисертиб (англ. *galunisertib*) и иматиниб (англ. *imatinib*), являющимися ингибиторами сигнальных каскадов TGF β или PDGF с доказанной антифибротической активностью. Мы сравнили данные, полученные с помощью срезов почек, с данными ранее опубликованных исследований, которые тестировали данные препараты на лабораторных мышах. Эти ранее проведенные испытания на животных установили, что пирфенидон, галунисертиб и иматиниб, введенные мышам с развитым фиброзом почек, понижают экспрессию гена коллагена, предотвращают накопление коллагена в интерстициальном пространстве, блокируют пути передачи сигналов от факторов роста TGF β и/или PDGF, а также уменьшают воспалительные процессы в почках. Результаты наших опытов показали, что эксперименты с тканевыми срезами также способны выявить все перечисленные изменения в тканях мышинных почек. В свою очередь, человеческие срезы почек можно использовать для прогнозирования эффективности лекарственных средств в последующих клинических испытаниях. Так, например, клиническая неэффективность

терапии пирфенидоном у пациентов с фиброзным заболеванием почек была отражена в экспериментах с культурой срезов почек человека. Наше исследование продемонстрировало прогностическую ценность тканевых срезов, которая позволяет их использование для скрининга антифибротических препаратов, и подчеркивает важность внедрения работы с человеческими тканями на стадии доклинических испытаний.

Третья часть диссертации посвящена одному из главных недостатков тканевых срезов – их ограниченной жизнеспособности во время культивирования, исключающей возможность проведения длительных исследований токсичности и эффективности лекарственных средств.

Седьмая глава описывает стратегию оптимизации условий культивирования тканевых срезов кишечника, которая позволит увеличить их жизнеспособность. В данном случае, мы исследовали влияние искусственной питательной среды, обогащенной факторами роста необходимыми для поддержания функции клеток кишечника, на жизнеспособность срезов тонкой кишки мыши и крысы. Мы показали, что состав культуральной среды напрямую влияет на жизнеспособность ткани кишечника и ее морфологическую целостность. Более того, наши результаты указывают на важность выбора питательной среды для культивирования срезов тонкой, происходящих от разных биологических видов.

В заключение, в представленной научной работе выполнен глубокий транскриптомный анализ тканевых срезов животного и человеческого происхождения, на котором основана приведенная полная базовая характеристика данной экспериментальной модели. Выявлены основные молекулярные регуляторы и биологические процессы, вовлеченные в транскрипционные изменения срезов тканей во время культивирования. Приведены научные обоснования, что тканевые срезы представляют собой прогностическую тест-систему с высокой трансляционной и клинической значимостью, и поэтому рекомендованы к внедрению в доклиническую разработку лекарственных средств. Оптимизированы условия культивирования тканевых срезов для с целью продления их жизнеспособности. Представленная научная работа подчеркивает важность и необходимость использования человеческих тканей для дальнейшего развития области исследований фиброза, а также разработки новых терапий.

Тонкие срезы тканей, всего 5 миллиметров в диаметре, способны не только сократить разрыв в трансляции от лаборатории до пациента, но и значительно уменьшить число используемых в биомедицине лабораторных животных.