

Культуры реснитчатых клеток для диагностики первичной цилиарной дискинезии

А.Г.Демченко , С.А.Смирнихина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: 115522, Москва, Россия, ул. Москворечье, 1

Резюме

Первичная цилиарная дискинезия (ПЦД) — наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, которое приводит к дефекту ультраструктуры ресничек эпителия. На сегодняшний день нет единого метода диагностики ПЦД, поэтому диагноз устанавливается по результатам нескольких анализов, таких как ДНК-диагностика, оценка уровня назального оксида азота, частота биения ресничек (ЧБР) по данным назальной биопсии, ультраструктура ресничек и др. Диагностика ПЦД может быть затруднена из-за вторичных повреждений респираторного эпителия, при этом результат может оказаться отрицательным или ложноположительным. **Целью** работы явился обзор исследований, посвященных культивированию назальных эпителиальных клеток человека, с последующей дифференцировкой в реснитчатые клетки для диагностики ПЦД. **Заключение.** Цилиогенез *in vitro* помогает при установлении правильного диагноза у пациентов с ПЦД, избегая при этом проблем с ложноположительным диагнозом. Существуют 3 различных метода цилиогенеза *in vitro*: суспензионная культура, ALI-культура и культура органоидов. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки. Метод ALI-культуры является наиболее распространенным, при котором образуется достаточное для диагностики количество реснитчатых клеток, способных длительно поддерживаться в культуре. Полученные культуры реснитчатых клеток назального эпителия позволяют проводить анализы ультраструктуры ресничек, оценивать ЧБР и локализацию цилиарных белков, что помогает при диагностике ПЦД. **Ключевые слова:** первичная цилиарная дискинезия, реснитчатые клетки, диагностика.

Конфликт интересов. Конфликт интересов авторами не заявлен.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования.

© Демченко А.Г., Смирнихина С.А., 2023

Для цитирования: Демченко А.Г., Смирнихина С.А. Культуры реснитчатых клеток для диагностики первичной цилиарной дискинезии. *Пульмонология*. 2023; 33 (2): 210–215. DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-210-215

Ciliated cell cultures for diagnosis of primary ciliary dyskinesia

Anna G. Demchenko , Svetlana A. Smirnikhina

Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation: ul. Moskvorechye 1, Moscow, 115522, Russia

Abstract

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a hereditary autosomal recessive disease that results in a defect in the ultrastructure of epithelial cilia. To date, there is no single diagnostic test for PCD, so the diagnosis is based on the results of multiple tests, such as DNA diagnostics, assessment of nasal nitric oxide levels, ciliary beat frequency (CBF) in nasal biopsy, ciliary ultrastructure, etc. Diagnosis of PCD can be difficult due to secondary damage to the airway epithelium, leading to undiagnosed or false positive cases. **The aim** of this work was to review studies on the cultivation of human nasal epithelial cells and subsequent differentiation into ciliated cells for the diagnosis of PCD. **Conclusion.** In vitro ciliogenesis helps to make a correct diagnosis of PCD while avoiding false positives. There are three different methods of ciliogenesis in vitro: the suspension culture method, the ALI culture method, and the organoid culture method. Each method of ciliogenesis has its own advantages and disadvantages. The ALI culture method is the most widely used. It produces a sufficient number of ciliated cells for diagnosis, which can be maintained in culture for a long time. The obtained cultures of nasal epithelial ciliated cells allow to analyze the ultrastructure of cilia, to evaluate CBF and localization of ciliary proteins, which helps in the diagnosis of PCD.

Key words: primary ciliary dyskinesia, ciliated cells, diagnostic.

Conflict of interests. The authors did not declare any conflicts of interests.

Funding. The work was carried under the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

© Demchenko A.G., Smirnikhina S.A., 2023

For citation: Demchenko A.G., Smirnikhina S.A. Ciliated cell cultures for diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Pul'monologiya*. 2023; 33 (2): 210–215 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-210-215

Первичная цилиарная дискинезия (ПЦД) является наследственным аутосомно-рецессивным заболеванием, при котором нарушается ультраструктура ресничек эпителия респираторного тракта, жгутиков сперматозоидов, ворсинок фаллопиевых труб, эпендимы желудочков и др. [1]. Основными проявлениями болезни у пациентов с ПЦД являются хронические воспалительные заболевания верхних и нижних дыхательных путей, поражение ЛОР-органов, мужское бесплодие и транспозиция внутренних органов [1–3]. На сегодняшний день известно > 40 генов, мутации в которых приводят к ПЦД [4], при этом $2/3$ случаев ПЦД могут быть подтверждены путем выявления биаллельных мутаций в одном из таких генов [5]. Помимо генетических анализов, к методам диагностики относятся оценка уровня назального оксида азота (nNO), высокоскоростной видеомикроскопический анализ (ВВА) частоты биения ресничек (ЧБР), полученных при назальной биопсии, трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) ультраструктуры ресничек, иммунофлуоресцентное (ИФ) окрашивание цилиарных белков [2].

В настоящее время единый метод — «золотой стандарт» диагностики ПЦД отсутствует [6]. Диагноз ПЦД устанавливается на основании характерной клинической картины в сочетании с результатами упомянутых исследований. Однако диагностика заболевания усложняется тем, что при различных мутациях возникают различные клинические и патологические паттерны [7]. Помимо этого, диагностика ПЦД может быть затруднена из-за вторичных повреждений респираторного эпителия в результате инфекции или воспаления, таким образом, при этом результат может оказаться ложноположительным. Для исключения ложноположительных диагнозов, установленных вследствие вторичного повреждения респираторного эпителия, руководством Европейского респираторного общества при диагностике ПЦД предлагается культивирование клеток, выделенных при назальной биопсии, с последующей дифференцировкой в реснитчатые клетки (цилиогенез) для повторного проведения ТЭМ и ВВА [7]. Отсутствие скоординированной активности ресничек после цилиогенеза в культуре клеток является чувствительным и специфичным параметром и позволяет диагностировать ПЦД в случае редких мутаций [8].

На сегодняшний день существуют 3 принципиально разных метода цилиогенеза — метод суспензионной культуры, метод культуры клеток на границе раздела воздух-жидкость (*Air-Liquid Interface cell culture* — ALI) и метод культуры органоидов. Основу всех методов составляет дифференцировка клеток, выделенных при назальной биопсии, в реснитчатые клетки.

Целью обзора является исследование методов цилиогенеза *in vitro* для диагностики ПЦД, анализ их различий, преимуществ и недостатков.

Метод суспензионной культуры

Первые работы по цилиогенезу назальных эпителиальных клеток *in vitro* для диагностики ПЦД появи-

лись в 2000-х гг. [8–11]. Однако методы суспензионного культивирования эпителиальных клеток при назальной биопсии с получением ресничек разрабатывались и ранее [12]. Позднее назальная биопсия заменена на менее болезненную браш-биопсию, которая не вызывает носовое кровотечение, в отличие от стандартной биопсии; при этом более щадящие методы — смывы и соскобы — применяются редко, поскольку дают недостаточное количество биоматериала [13, 14]. Технология суспензионной культуры, которая применяется в течение десятилетий, является одной из самых простых, поскольку для поддержания роста и дифференцировки клеток не требуется специфических внеклеточных матриц или мембранных вставок. Показано (1995), что реснички, образованные *in vitro* методом суспензионной культуры, соответствуют нативным ресничкам как конструктивно, так и функционально [15]. У пациентов без ПЦД цилиогенез суспензионным методом в 100 % случаев координирует цилиарную активность и ЧБР в пределах нормы, при этом у пациентов с ПЦД скоординированная цилиарная активность никогда не наблюдалась после цилиогенеза *in vitro* [8]. Однако в 20–29 % случаев бывает невозможно получить клеточную культуру из биопсии из-за инфицирования или недостаточного количества материала [8, 13, 14]. В связи с этим рекомендуется брать биопсию у пациентов без обострений респираторных заболеваний как минимум последние 6 нед., проверять биоптат с помощью светового микроскопа для оценки его количества и помещать биоптат в раствор с антибактериальным препаратом для подавления роста бактериальной флоры [16]. Для реализации цилиогенеза в суспензионной культуре назальный биоптат помещается в раствор фермента (чаще всего применяется раствор проназы) для расщепления биоматериала и получения единичных клеток, которые затем помещаются на культуральный пластик, предварительно покрытый 1%-ным коллагеновым гелем, в питательной среде для роста эпителиальных клеток (см. рисунок, А). Затем коллагеновый гель расщепляется и клетки помещаются во вращающуюся на роторе культуральную колбу для образования сфероидов. На 14–21-е сутки проводится анализ ресничек, которые образуются на апикальной мембране, обращенной во внешнюю среду [13, 17]. Сфероиды, содержащие реснитчатые клетки, могут сохраняться в культуре > 5 мес. [15]. *M. Jorissen et al.* проведен цилиогенез методом суспензионной культуры [8]. Показано, что при анализе 642 биоптатов от доноров без ПЦД, проведенном до культивирования, в 20 % случаев наблюдалась нескоординированная цилиарная активность, однако после культивирования в 100 % случаев визуализировалась скоординированная цилиарная активность [8]. Недостатком суспензионного метода является небольшое количество образованных ресничек в культуре, что не позволяет проводить ТЭМ, которая является важным тестом при диагностике ПЦД, а сфероиды могут не содержать базальные прогениторные клетки, а значит, не способны самообновляться в культуре [9, 18]. Для оценки цилиарной активности в сфероиде *M. Pifferi et al.* разрабо-

тан компьютерный анализ, основанный на вращении и миграции сфероидов, способности ресничек удалять дебрис и скоординировано двигаться [9]. С помощью данной программы всего через 5 дней культивирования можно установить диагноз, положительная прогностическая ценность которого составляет > 98,5 %.

Метод ALI-культуры

Альтернативой методу суспензионной культуры является метод цилиогенеза эпителиальных клеток на разделе фаз воздух-жидкость, или ALI-культивирование [19]. Получение реснитчатых клеток в ALI-культуре заключается в дифференцировке базальных эпителиальных клеток на пористых мембранных вставках, покрытых коллагеном, где клетки поляризуются за счет контакта базальной стороны клеток с питательной средой, а апикальной, где в результате образуются реснички, — с воздухом (см. рисунок, В). Базальные клетки являются прогениторными клетками эпителия дыхательных путей, который также содержит бокаловидные, крупные секреторные и реснитчатые клетки, ионоциты, а также нейроэндокринные и пучковые клетки [20]. На сегодняшний день для цилиогенеза базальных клеток в ALI-культуре существуют различные коммерческие среды. Существует проблема воспроизводимости ци-

лиогенеза, особенно при использовании сред разных производителей. Так, например, *D.D.H.Lee et al.* проведено исследование влияния 4 коммерческих сред, таких как BEGM (*Lonza*), AECGM (*PromoCell*), LHC-8 (*Gibco*) и *PneumaCult-ALI medium* (*Stemcell Technologies*), на характеристики полученных реснитчатых клеток [21]. По результатам анализа ЧБР у здоровых доноров показано, что несмотря на то, что показатели ЧБР находились в пределах биологической нормы, статистически более низкая ЧБР отмечена у культуры клеток, полученных на среде *PneumaCult-ALI medium*, по сравнению с таковой, полученной на средах AECGM ($p < 0,01$) или LHC-8 ($p < 0,001$). По данным ИФ-анализа и анализа вестерн-блотт показано, что культуры клеток, полученные на среде *PneumaCult-ALI medium*, содержали больше мукосекреторных клеток (MUC5AC + клетки), чем реснитчатых (b-тубулин + клетки). Отмечено, что подробный состав среды доступен только для 1 (LHC-8) из 4 сред, а неизвестные компоненты 3 сред могут представлять сложности для интерпретации результатов экспериментов [16, 21].

При ALI-культивировании базальных клеток изменяется фенотип ресничек относительно нативных, что в некоторых случаях облегчает диагностику ПЦД. Длительность цилиогенеза в ALI-культуре в среднем составляет 21 день, с возможностью культивировать реснитчатые клетки до 8 нед. [3, 16, 21].

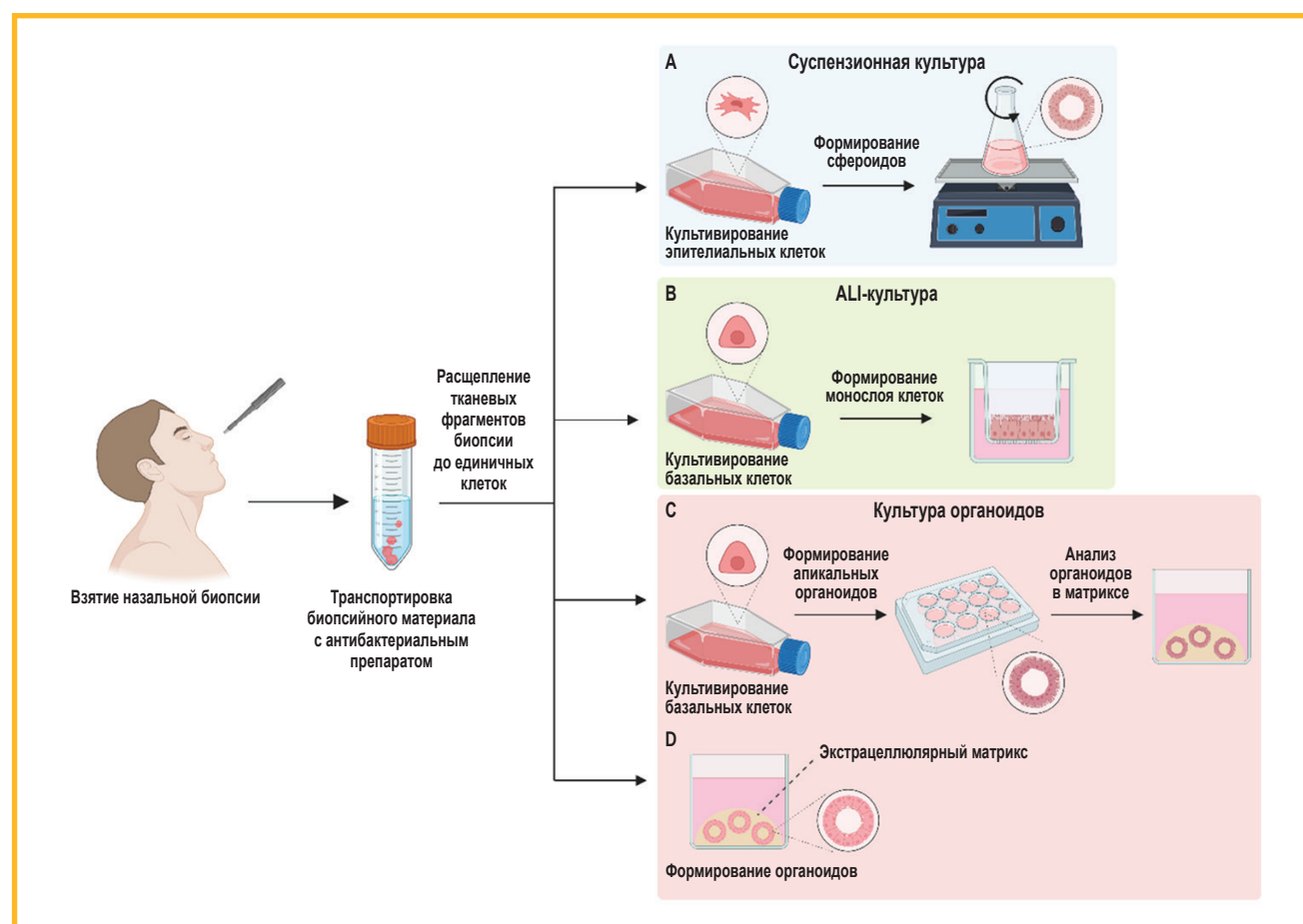


Рисунок. Схематическое представление основных методов цилиогенеза *in vitro*

Figure. Schematic representation of the main methods of *in vitro* ciliogenesis

Разницы во времени цилиогенеза между культурами с ПЦД и без ПЦД нет [3]. Эффективность получения по данным разных работ различается от 54 до 95,5 %, а количество ресничек — от 5 до 50 % на мембранную вставку [3, 16].

Для оценки цилиарной функции и ультраструктуры ресничек после ALI-культивирования применяются ВВА, ТЭМ и ИФ-окрашивание цилиарных белков. Для регистрации мерцательной активности ресничек с помощью ВВА требуется наличие инвертированного микроскопа с объективом $\times 100$ и высокоскоростной камеры со скоростью съемки ≥ 500 кадров в секунду. ПЦД определяется как аномальный паттерн сокращения ресничек, который включает нескоординированное или асинхронное сокращение ресничек, уменьшенную амплитуду сокращения, гиперчастоту, подергивание или статичность ресничек [3]. Так, *R.A. Hirst et al.* исследовались 158 образцов, полученных при биопсии у пациентов с подозрением на ПЦД [3]. Перед применением ALI-культивирования у большинства пациентов выявлены функциональные цилиарные аномалии, однако после культивирования нормальная картина биения ресничек наблюдалась у всех пациентов без ПЦД, в то время как у пациентов с ПЦД картина биения ресничек была однородно аномальной. Также ALI-культивирование позволяет получать реснитчатые клетки из базальных клеток, замороженных в жидком азоте. Данный метод может быть полезным при необходимости повторных анализов, без вызова пациентов и повторного взятия биопсии. *J.L. Coles et al.* продемонстрирована возможность криохранения с последующим ALI-культивированием 39 образцов, 100 % которых образовали культуры реснитчатых клеток [16]. Однако перед применением данной технологии рекомендуется установить базовый уровень ЧБР ALI-культур, полученных из криосохраненных клеток.

Таким образом, в результате ALI-культивирования базальных клеток при назальной биопсии образуются долгоживущие реснички, количества которых достаточно для последующих анализов, в отличие от метода суспензионной культуры. Однако ограничениями ALI-культивирования являются зависимость от коммерческих питательных сред и нераскрытая природа их компонентов, что может создавать затруднения при интерпретации результатов.

Культуры органоидов

В последнее время органоиды широко используются для моделирования заболеваний, скрининга лекарств, регенеративной медицины и изучения межклеточных взаимодействий [22]. В частности, органоиды дыхательных путей применяются для персонализированного скрининга лекарственных препаратов [23], моделирования легочных заболеваний [24] и разработки новых способов их лечения [25]. Однако применение культуры органоидов в диагностике ПЦД на сегодняшний день является малоизученной, но активно развивающейся темой [26–29].

Для диагностики ПЦД существуют несколько протоколов цилиогенеза эпителиальных органоидов

дыхательных путей. Принципиальным отличием протоколов является способ формирования органоидов — с применением экстрацеллюлярных матриц, таких как *Matrigel* (Corning), *Cultrex* (Trevigen) и др. или без таковых. Для получения органоидов из назальной браш-биопсии *J. Van der Vaart et al.* ферментативно изолировались эпителиальные клетки и помещались в *Matrigel* для формирования органоидов (см. рисунок, D) [26]. Дифференцировка эпителиальных клеток в реснитчатые занимала 14–21 сутки, после чего органоиды можно поддерживать в культуре > 1 года. Площадь, покрытая ресничками, на апикальной поверхности, направленной во внутреннюю полость органоида, составляла 35 % от общей площади. В органоидах, полученных от здоровых доноров, с помощью ВВА наблюдалось направленное вращение слизистой оболочки благодаря скоординированному биению ресничек, в то время как органоиды с мутациями в генах *DNAI2* и *DNAH11* не демонстрировали биения ресничек, при этом вращение слизистой оболочки отсутствовало. Данный метод культуры назальных органоидов может предоставить важную информацию для диагностики ПЦД, а также дополнительный биоматериал для дальнейших исследований.

Другим методом получения культуры органоидов для диагностики ПЦД является метод формирования органоидов на низкоадгезивном пластике (со сниженной способностью прикрепления клеток) без использования экстрацеллюлярных матриц, поскольку их применения сопряжено с рядом ограничений. Так, например, *Matrigel* (Corning) и *Cultrex* (Trevigen) являются продуктами ксеногенного происхождения (белковая смесь из раковых клеток мыши), из-за чего имеют сложный, до конца не изученный состав, различающийся от партии к партии, что может привести к невоспроизводимости экспериментов [30, 31]. *P. Wijesekara et al.* описан способ получения апикальных эпителиальных органоидов дыхательных путей, отличительной особенностью которых являются реснички, направленные во внешнюю среду, в отличие от органоидной культуры, описанной выше, где реснички направлены во внутреннюю полость органоида [27]. Для получения апикальных органоидов базальные эпителиальные клетки помещаются на низкоадгезивный пластик, где формируются органоиды, с последующей дифференцировкой в реснитчатые клетки (см. рисунок, B). На 21-е сутки культивирования содержание ресничек составляло 76 % от общей площади и оставалось стабильным до 28 суток [27]. Количество ресничек на поверхности органоидов у здоровых доноров и пациентов с ПЦД не различалось (мутация в гене *CCDC39*). Благодаря движению ресничек на внешней поверхности органоидов, полученных от здоровых доноров, можно наблюдать вращение органоида, а также оценивать ЧБР. Для стабилизации вращения органоидов при оценке ЧБР органоиды переносились в экстрацеллюлярный матрикс. При использовании алгоритмов компьютерного зрения рассчитывалась угловая скорость вращения органоидов, которая коррелировала с измерением подвижности ресничек. У органоидов, полученных

от пациентов с ПЦД, вращение отсутствовало, в то время как органоидами от здоровых доноров продемонстрировано стабильное вращательное движение. Стоит отметить, что пока данный метод описан только для базальных клеток легкого.

Таким образом, культуры органоидов могут использоваться при диагностике заболевания, с их помощью возможно не только сохранить биоматериал на длительный период для последующих исследований, но и использовать их в качестве модели для применения при разработке новых способов лечения ПЦД.

Заключение

Цилиогенез в культуре клеток помогает при установлении правильного диагноза у пациентов с ПЦД, избегая при этом проблем с ложноположительным диагнозом при вторичных повреждениях респираторного эпителия. По результатам анализа экспериментальных работ сделан вывод о том, что отсутствие скоординированной цилиарной активности после цилиогенеза *in vitro* является чувствительным и специфичным параметром для диагностики ПЦД. Однако для точного анализа необходимо помнить о создании референтных диапазонов ЧБР, характере сокращений и ультраструктуры, поскольку они различаются у пациентов разного возраста и популяции [32]. Каждый метод цилиогенеза *in vitro* имеет свои преимущества и недостатки. На сегодняшний день ALI-культура является основным методом, при котором образуется больше реснитчатых клеток в сравнении с суспензионной культурой. Однако цилиогенез в ALI-культуре значительно более долгий, а продолжительность поддержания в культуре уступает методу органоидов. Методы ALI-культуры и органоидов позволяют проводить повторные анализы ультраструктуры ресничек и ЧБР, что помогает при диагностике ПЦД. Таким образом, клеточные модели реснитчатых клеток имеют хороший потенциал стать инструментом для получения диагностической и терапевтической информации о ПЦД и других заболеваниях, связанных с реснитчатыми клетками.

Литература / References

- Кондратьева Е.И., Авдеев, С.Н., Мизерницкий Ю.Л. и др. Первичная цилиарная дискинезия: обзор проекта клинических рекомендаций 2022 года. *Пульмонология*. 2022; 32 (4): 517–538. DOI: 10.18093/0869-0189-2022-32-4-517-538. / Kondratyeva E.I., Avdeev, S.N., Mizernitskiy Yu.L. et al. [Primary ciliary dyskinesia: review of the draft clinical guidelines, 2022]. *Pul'monologiya*. 2022; 32 (4): 517–538. DOI: 10.18093/0869-0189-2022-32-4-517-538 (in Russian).
- Damseh N., Quercia N., Rumman N. et al. Primary ciliary dyskinesia: mechanisms and management. *Appl. Clin. Genet*. 2017; 10: 67–74. DOI: 10.2147/TACG.S127129.
- Hirst R.A., Jackson C.L., Coles J.L. et al. Culture of primary ciliary dyskinesia epithelial cells at air-liquid interface can alter ciliary phenotype but remains a robust and informative diagnostic aid. *PLoS One*. 2014; 9 (2): e89675. DOI: 10.1371/journal.pone.0089675.
- Leigh M.W., Horani A., Kinghorn B. et al. Primary ciliary dyskinesia (PCD): a genetic disorder of motile cilia. *Transl. Sci. Rare Dis*. 2019; 4 (1–2): 51–75. DOI: 10.3233/TRD-190036.
- Knowles M.R., Daniels L.A., Davis S.D. et al. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2013; 188 (8): 913–922. DOI: 10.1164/rccm.201301-0059CI.
- Lucas J.S., Leigh M.W. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: searching for a gold standard. *Eur. Respir. J*. 2014; 44 (6): 1418–1422. DOI: 10.1183/09031936.00175614.
- Lucas J.S., Barbato A., Collins S.A. et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J*. 2017; 49 (1): 1601090. DOI: 10.1183/13993003.01090-2016.
- Jorissen M., Willems T., van der Schueren B. Ciliary function analysis for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia: advantages of cilio-genesis in culture. *Acta Otolaryngol*. 2000; 120 (2): 291–295. DOI: 10.1080/000164800750001116.
- Pifferi M., Bush A., Montemurro F. et al. Rapid diagnosis of primary ciliary dyskinesia: cell culture and soft computing analysis. *Eur. Respir. J*. 2013; 41 (4): 960–965. DOI: 10.1183/09031936.00039412.
- Gamarra F., Bergner A., Stauss E. et al. Rotation frequency of human bronchial and nasal epithelial spheroids as an indicator of mucociliary function. *Respiration*. 2006; 73 (5): 664–672. DOI: 10.1159/000092672.
- Willems T., Jorissen M. Sequential monolayer-suspension culture of human airway epithelial cells. *J. Cyst. Fibrosis*. 2004; 3 (Suppl. 2): 53–54. DOI: 10.1016/j.jcf.2004.05.011.
- Jorissen M., van der Schueren B., van den Berghe H., Cassiman J.J. The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro. *Arch. Otorhinolaryngol*. 1989; 246 (5): 308–314. DOI: 10.1007/BF00463582.
- Pifferi M., Montemurro F., Cangiotti A.M. et al. Simplified cell culture method for the diagnosis of atypical primary ciliary dyskinesia. *Thorax*. 2009; 64 (12): 1077–1081. DOI: 10.1136/thx.2008.110940.
- Marthin J.K., Stevens E.M., Larsen L.A. et al. Patient-specific three-dimensional explant spheroids derived from human nasal airway epithelium: a simple methodological approach for ex vivo studies of primary ciliary dyskinesia. *Cilia*. 2017; 6: 3. DOI: 10.1186/s13630-017-0049-5.
- Jorissen M., Bessems A. Normal ciliary beat frequency after cilio-genesis in nasal epithelial cells cultured sequentially as monolayer and in suspension. *Acta Otolaryngol*. 1995; 115 (1): 66–70. DOI: 10.3109/00016489509133349.
- Coles J.L., Thompson J., Horton K.L. et al. A Revised protocol for culture of airway epithelial cells as a diagnostic tool for primary ciliary dyskinesia. *J. Clin. Med*. 2020; 9 (11): 3753. DOI: 10.3390/jcm9113753.
- Neugebauer P., Endepols H., Mickenhagen A., Walger M. Cilio-genesis in submersion and suspension cultures of human nasal epithelial cells. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol*. 200; 260 (6): 325–330. DOI: 10.1007/s00405-002-0562-y.
- Bukowy-Bieryło Z. Long-term differentiating primary human airway epithelial cell cultures: how far are we? *Cell Commun. Signal*. 2021; 19 (1): 63. DOI: 10.1186/s12964-021-00740-z.
- Bukowy-Bieryło Z., Dąca-Rozak P., Jurczak J. et al. In vitro differentiation of ciliated cells in ALI-cultured human airway epithelium – the framework for functional studies on airway differentiation in ciliopathies. *Eur. J. Cell Biol*. 2022; 101 (1): 151189. DOI: 10.1016/j.ejcb.2021.151189.
- Hong K.U., Reynolds S.D., Watkins S. et al. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am. J. Pathol*. 2004; 164 (2): 577–588. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63147-1.
- Lee D.D.H., Petris A., Hynds R.E., O'Callaghan C. Ciliated epithelial cell differentiation at air-liquid interface using commercially available culture media. *Methods Mol. Biol*. 2020; 2109: 275–291. DOI: 10.1007/978-1-4939-9929-9_269.
- Shankaran A., Prasad K., Chaudhari S. et al. Advances in development and application of human organoids. *Biotech*. 2021; 11 (6): 257. DOI: 10.1007/s13205-021-02815-7.
- Rossi R., de Angelis M.L., Xhelili E. et al. Lung cancer organoids: the rough path to personalized medicine. *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (15): 3703. DOI: 10.3390/cancers14153703.
- Lu T., Cao Y., Zhao P. et al. Organoid: a powerful tool to study lung regeneration and disease. *Cell Regeneration*. 2021; 10 (1): 21. DOI: 10.1186/s13619-021-00082-8.

25. Liu Z., Anderson J.D., Deng L. et al. Human nasal epithelial organoids for therapeutic development in cystic fibrosis. *Genes (Basel)*. 2020; 11 (6): 603. DOI: 10.3390/genes11060603.
26. van der Vaart J., Böttinger L., Geurts M.H. et al. Modelling of primary ciliary dyskinesia using patient-derived airway organoids. *EMBO Rep.* 2021; 22 (12): e52058. DOI: 10.15252/embr.202052058.
27. Wijesekara P., Yadav P., Perkins L.A. et al. Engineering rotating apical-out airway organoid for assessing respiratory cilia motility. *iScience*. 2022; 25 (8): 104730. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104730.
28. Zheng R., Yang W., Wen Y. et al. Dnah9 mutant mice and organoid models recapitulate the clinical features of patients with PCD and provide an excellent platform for drug screening. *Cell Death Dis.* 2022; 13 (6): 559. DOI: 10.1038/s41419-022-05010-5.
29. Allan K.M., Wong S.L., Fawcett L.K. et al. Collection, expansion, and differentiation of primary human nasal epithelial cell models for quantification of cilia beat frequency. *J. Vis. Exp.* 2021; (177): e63090. DOI: 10.3791/63090.
30. Hughes C.S., Postovit L.M., Lajoie G.A. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*. 2010; 10 (9): 1886–1890. DOI: 10.1002/pmic.200900758.
31. Aisenbrey E.A., Murphy W.L. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat. Rev. Mater.* 2020; 5 (7): 539–551. DOI: 10.1038/s41578-020-0199-8.
32. Lee S.L., O'Callaghan C., Lau Y.L., Lee C.W.D. Functional analysis and evaluation of respiratory cilia in healthy Chinese children. *Respir. Res.* 2020; 21 (1): 259. DOI: 10.1186/s12931-020-01506-w.

Поступила: 30.11.22

Принята к печати: 26.12.22

Received: November 30, 2022

Accepted for publication: December 26, 2022

Информация об авторах / Authors Information

Демченко Анна Григорьевна — научный сотрудник лаборатории редактирования генома Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (499) 324-35-79; email: demchenkoanna@yandex.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4460-7627>)

Anna G. Demchenko, Researcher, Laboratory of Genome Editing, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Centre for Medical Genetics", Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (499) 324-35-79; e-mail: demchenkoanna@med-gen.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4460-7627>)

Смирнихина Светлана Анатольевна — к. м. н., заведующая лабораторией редактирования генома Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (499) 324-35-79; e-mail: smirnikhinas@gmail.com (ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1558-3048>)

Svetlana A. Smirnikhina, Candidate of Medicine, Head of the Laboratory of Genome Editing, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Centre for Medical Genetics", Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (499) 324-35-79; e-mail: smirnikhinas@gmail.com (ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1558-3048>)

Участие авторов

Демченко А.Г. — сбор и обработка материала, написание текста
Смирнихина С.А. — концепция исследования, редактирование текста
 Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации, несут ответственность за целостность всех частей статьи.

Authors Contribution

Demchenko A.G. — collection and processing of material, writing text
Smirnikhina S.A. — research concept, text editing
 All authors made a significant contribution to the search, analysis, and preparation of the article, read and approved the final version before publication, and accepted responsibility for the integrity of all parts of the article.