

УДК 576.535

«ГОЛЬ НА ВЫДУМКИ ХИТРА», ИЛИ ДЕШЕВЫЙ, НАДЕЖНЫЙ И ВОСПРОИЗВОДИМЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНОИДОВ

© 2019 А.В. Еремеев*, Е.А. Воловиков, Л.Д. Шувалова, А.В. Давиденко,
Е.А. Хомякова, М.Е. Богомякова, О.С. Лебедева, О.А. Зубкова,
М.А. Лагарькова*

Федеральный научно-клинический центр физико-химической
медицины ФМБА России, 119435 Москва, Россия,
электронная почта: lagar@rcpct.org, art-eremeev@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.11.2018

После доработки 07.12.2018

Принята к публикации 07.12.2018

Органоиды представляют собой трехмерные (3D) культуры клеток, которые повторяют некоторые из ключевых особенностей морфологии, пространственной архитектуры и функций определенного органа. Органоиды можно получать и из региональных, и из плюрипотентных стволовых клеток (ПСК), а также создавать сложные органоиды, комбинируя разные типы клеток, в т.ч. дифференцированных. Способность производных ПСК к самоорганизации в органотипические структуры, содержащие несколько специфичных для того или иного органа клеточных подтипов, была использована для создания органоидов мозга, глаза, почки, кишечника и других органов. Несмотря на преимущества использования ПСК для получения органоидов, существенным недостатком, мешающим их широкому применению, до сих пор являлся низкий выход при их получении из монослойной культуры ПСК, большая вариация по размерам, что приводило к большой гетерогенности при дальнейшей дифференцировке. В этой статье мы описали собственный протокол получения стандартизованных органоидов с акцентом на метод получения органоидов мозга, который позволяет масштабировать и значительно удешевить и упростить их культивирование.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дифференцировка, культура клеток, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, органоиды, биореактор.

DOI: 10.1134/S032097251903014X

Исследования последних лет, связанные с созданием 3D-органовидов из плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) — эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), — существенно облегчили исследования в области моделирования органогенеза человека *in vitro* и стали мощным инструментом для исследования механизмов развития различных патологий сложных органов, равно как и разработки новых подходов к их терапии. В течение нескольких последних лет были сделаны достаточно успеш-

ные попытки создания многоклеточных органоидов мозга человека [1–5], толстой кишки [6–8], почек [9–10], сетчатки [11–13], печени [14, 15]. Разумеется, пока 3D-модели многоклеточных органов на основе 2D-культур имеют свои ограничения и лишь слабо имитируют их сложную архитектуру [16]. Тем не менее органоиды все активнее используются в биомедицине. Например, с помощью органоидов, дифференцированных из ИПСК, уже были сделаны интересные выводы о механизмах наследственных заболеваний мозга [1, 17–19], а на органоидах мозга и кишечника проводят тестирование кандидатных лекарственных препаратов для лечения муковисцидоза, а также лихорадки, вызванной вирусом Зика [20–22].

Сейчас исследователями предлагается множество вариантов протоколов для получения органоидов, состоящих из нескольких типов клеток головного мозга, или же клеток определенных зон. Добавление факторов морфогенеза позволяет получать органоиды различных регио-

Принятые сокращения: ПСК — плюрипотентные стволовые клетки; ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; bFGF — основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor); DAPI — 4',6-диамино-2-фенилиндолил дигидрохлорид; PBS — фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline); FBS — эмбриональная бычья сыворотка (fetal bovine serum); DMEM — среда Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium); SR — заменитель сыворотки (serum replacement).

* Адресат для корреспонденции.

нальных подтипов мозга [23–25]: коры головного мозга [1, 4, 26], мозжечка [27], среднего мозга, переднего мозга, гипоталамуса [28–30], гиппокампа [31]. Между тем, все протоколы можно разделить на две большие группы по способу получения агрегатов и дальнейшему их культивированию с дифференцировкой. Первая группа – это различные модификации протокола Ланкастер (2014) или схожие по технологии схемы дифференцировки [32, 33], различающиеся между собой сроками культивирования и индукторами дифференцировки с последующим вызреванием органоидов на шейкере в специальных низкоадгезионных приспособлениях по типу микропробирок или планшетов [23]. Вторая группа протоколов подразумевает использование специальных биореакторов [30]. Так, Krefft et al. (2018) показали возможность получения органоидов мозга за четыре этапа [34]. Этот протокол включал в себя следующие этапы: получение агрегатов ИПСК (предварительно клетки культивировали до состояния монослоя); индукцию передней нейроэктодермы; инкапсуляцию нейроэктодермальных агрегатов в матрицу (экстракт базальной мембраны); дифференцировку мозгоподобных органоидов, характерных для переднего мозга. Данный протокол позволил получить стандартные по размеру органоиды, но в небольшом количестве, по причине большой технической трудоемкости, связанной с иммобилизацией каждого отдельного органоида в капле матрицы. Более того, использование условно стерильных приспособлений типа «parafilm» для иммобилизации в геле несет высокие риски контаминации и делает невозможным использование этого протокола для разработки большого количества органоидов, например, для скрининговых исследований. В протоколе, предложенном Qian et al. (2018), были разработаны высокотехнологичные механические лопастные планшетные миниореакторы, позволяющие регулировать частоту вращения лопаток роторов во всех лунках [30]. Однако, несмотря на высокую эффективность предложенного способа получения органоидов, при масштабировании стоимость таких реакторов будет существенной составляющей в исследованиях. К тому же большое количество механических элементов в таких реакторах будет затруднять его деконтаминацию и снизит надежность при длительной эксплуатации.

Анализ всевозможных протоколов указывает на необходимость культивирования органоидов в условиях циркулирующей питательной среды [1–4, 6]. Между тем, отсутствие простых и дешевых систем для получения стандартных по морфологии и размерам органоидов диктует необхо-

димость разработки приспособлений, позволяющих масштабировать этот процесс. В этой работе мы описали методику получения и испытания простых и недорогих микробиореакторов, позволяющих получать органоиды высокого качества в большом количестве.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры плюрипотентных стволовых клеток. Линии ИПСК (IPSHD76.4L, IPSHUV4.5S, IPSRG6L) или эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) (hESM01) культивировали на чашках Петри диаметром 6 см, предварительно покрытых матригелем («Corning», США), в среде mTESR1 («Stemcell technologies», Канада), как описано в инструкции производителя.

Индукция дифференцировки в нейрональном направлении. Дифференцировку начинали при достижении 80–85%-ной конфлюэнтной плотности монослоя. Для этого на первые 2 дня клетки переводили на среду Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)/среда Фишера (F12) с добавлением 1% заменителя сыворотки (serum replacement, SR) («Gibco», США), 1% N₂ и 2% Нейромакса («ПанЭко», Россия), 0,1 мкМ LDN-193189 («MACS Miltenyi Biotec», Германия), 3 мкМ дорсоморфина («MACS Miltenyi Biotec», Германия), 10 мкМ SB431542 («MACS Miltenyi Biotec», Германия), 1% GlutaMAX («Gibco», США), 50 ед/мл смеси пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 50 мМ β-меркаптоэтанола («Gibco», США). Через день клетки переводили на среду без добавления SR, все остальные добавки оставляли без изменений. Далее в течение двух недель среду меняли регулярно через день. Когда начиналась кластеризация нейроэпителиальных клеток-предшественников в 2D-культуре (розеткообразование), переходили к этапу получения сфероидов с помощью микролуночного планшета Aggrewell 400 («Stemcell technologies», Канада).

Подготовка чашек Петри для культивирования органоидов. Схема минибиореактора приведена на рис. 1, а. В центр чашки Петри с низкой адгезией (ultra low adhesion, «Corning», США) прикрепляли пластиковое кольцо. Кольца высотой 7–8 мм вырезали из стерильных 15-мл пробирок («Greiner», «Falcon», США, «SPL Life Sciences», Ю. Корея) и автоклавировали. Из чашек Петри для микробиологической работы наламывали пластиковую крошку, которую растворяли в хлороформе в течение 16 ч для получения вязкой однородной массы из расчета 1 г пластиковой крошки на 10 мл хлороформа. После этого проводили клейку

колец по центру чашки Петри диаметром 6 см (ultra low adhesion, «Corning», США, или микробиологической чашки, предварительно проверенной на отсутствие токсичности для культуры клеток эукариот) с помощью полученного пластикового клея в ламинарном шкафу (рис. 1, б). Чашки оставляли открытыми до полного высыхания в ламинарном шкафу. После высыхания чашки дополнительно обрабатывали в ламинаре ультрафиолетовым светом в течение 15 мин. Для большого числа органоидов (>400) использова-

ли чашку Петри диаметром 90–100 мм, в середину которой клеивали чашку диаметром 35 мм (рис. 1, в). В таком случае в эту чашку можно добавить 2 мл воды для дополнительного увлажнения атмосферы в миниреакторе. Собранные по несколько штук в большие чашки Петри или другие стерильные контейнеры-миниреакторы могут быть расположены ярусами на полках CO₂-инкубатора (рис. 1, д) для масштабирования работы.

Получение культуры сфероидов из нейроэпителиальных клеток-предшественников. Через 14–15 су-

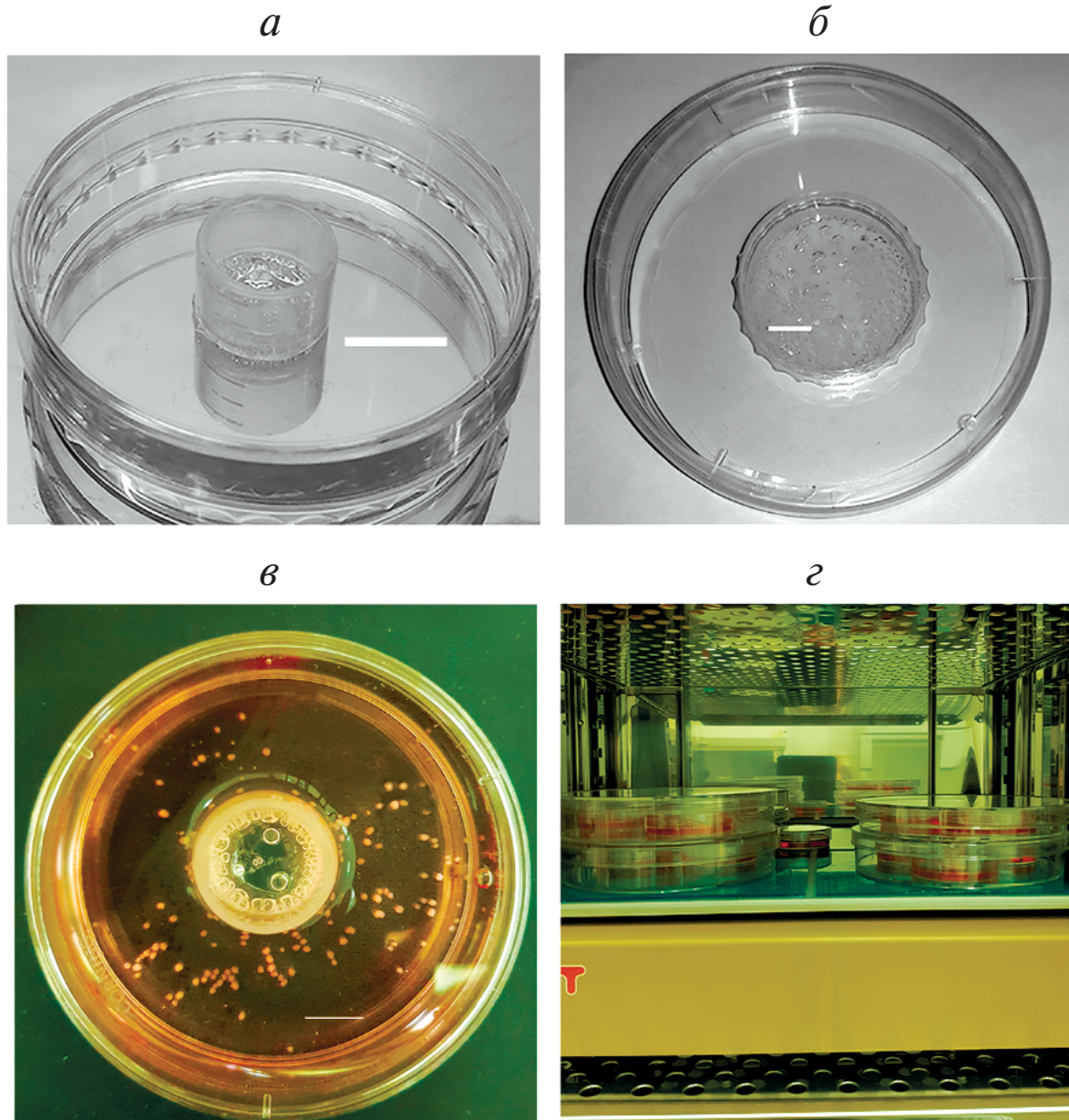


Рис. 1. Минибioreакторы, приготовленные из чашек Петри с низкой адгезией. а, б – Внешний вид чашек Петри с вклеенным по центру цилиндром; в – внешний вид минибioreактора с культивируемыми в нем органоидами, полученными из клеток линии IPSHUV4.5S; г – установка минибioreакторов в CO₂-инкубаторе на орбитальном шейкере (показана возможность многоярусной установки минибioreакторов друг на друга). Масштабная линейка – 1 см. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

ток с момента перевода культур плюрипотентных клеток на индуцирующую в нейрональном направлении среду клетки снимали с чашек Петри с помощью раствора Версена («ПанЭко», Россия). После отмывки путем центрифугирования при 200 g в течение 5 мин в чистой среде DMEM/F12 («Gibco», США) с 10% SR («Gibco», Германия) при комнатной температуре клетки переводили на AggreWell™ 400, которую предварительно подготавливали с помощью центрифугирования со средой культивирования для удаления пузырьков согласно инструкции производителя. Затем сфероиды помещали в среду DMEM/F12 с добавлением 0,1 мкМ LDN-193189 («MACS Miltenyi Biotec», Германия), 5 мкМ дорсоморфина («MACS Miltenyi Biotec», Германия), 10 мкМ SB431542 («MACS Miltenyi Biotec», Германия), 5 мкМ Y-27632 («MACS Miltenyi Biotec», Германия), 50 мкМ β-меркаптоэтанола.

Получение и культивирование органоидов. Через один день образовавшиеся сфероиды (будущие органоиды) аккуратно собирали из лунок серологической пипеткой объемом 2–5 мл в пробирку на 15 мл, отстаивали 2–3 мин, затем супернатант отбирали. Органоиды, которые под действием силы тяжести опускались на дно пробирки, помещали сначала в только что размороженный при 4 °С неразведенный матригель («Corning», США), через 30 мин отмывали от него путем пассивной седиментации в пробирке объемом 15 мл или мягким центрифугированием в течение 1 мин при 100 g, затем органоиды перемещали в описанные выше минибиореакторы, которые размещали на орбитальном шейкере («Inforse» Швейцария) в CO₂-инкубаторе. Дальнейшее культивирование органоидов проводили при 37 °С, в атмосфере 5% CO₂, 80%-ной влажности, при частоте вращения 60–70 г/мин. Кольца не давали сфероидам концентрироваться в центре чашки, что позволяло избежать образования агрегатов и адгезии клеток на чашке. Через сутки среду меняли на DMEM/F12 с добавлением 1× N-2 и 1× NeuroMax («ПанЭко», Россия), 100× GlutaMAX, 50 ед/мл смеси пенициллина и стрептомицина, 3 мкМ пурморфина («MACS Miltenyi Biotec», Германия) и 50 мкМ β-меркаптоэтанола и основного фактора роста фибробластов (bFGF) в концентрации 10 нг/мл. Дальнейшую смену среды проводили через 4–6 дней без центрифугирования за счет оседания органоидов под действием силы тяжести в пробирке объемом 15 мл с последующей аспирацией надосадочной жидкости. В пробирку добавляли объем среды, равный удаленному, после чего органоиды возвращали в миниуреакторы.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для иммунофлуоресцентного окрашивания органо-

иды промывали 1× фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали 30 мин при комнатной температуре в 4%-ном параформальдегиде/PBS, затем заливали жидкостью для заморозки ткани («Leica», Германия), замораживали в парах жидкого азота в течение 5 мин, затем делали срезы толщиной 5–10 мкм на криотоме Leica. Срезы фиксировали на предметном стекле, охлажденном до –20 °С ацетоном в течение 5 мин, промывали дважды по 5 мин PBS и инкубировали в блокирующем буфере с первичными антителами в течение ночи во влажной камере при 4 °С. Первичные антитела наносили в разведениях, рекомендованных производителем, в PBS с 0,1% Tween 20, содержащем 5% эмбриональной бычьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS) и 2% сыворотки козы, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем отмывали 3 раза по 5 мин в PBS с 0,1% Tween 20. Вторичные антитела («Invitrogen», США), конъюгированные с флуоресцентными метками (Alexa 488, Alexa 555), наносили в разведениях, рекомендованных производителем, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте, отмывали 3 раза по 5 мин в PBS с 0,1% Tween 20. Затем препараты инкубировали в течение 10 мин с 4',6-диамино-2-фенилиндолом дигидрохлоридом (DAPI) в концентрации 0,1 мкг/мл в PBS для визуализации ядер, отмывали 2 раза PBS. Полученные препараты исследовали под флуоресцентным микроскопом Olympus.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе культивирования в индуцирующей нейрональную дифференцировку среде, начиная с 6–7 дня, наблюдалось образование кластеров («розеток»), будущих участков морфогенеза нервной ткани (рис. 2, *а*). После снятия «розеток» с чашек Петри на десятый день и перевода их в лунки микролуночного планшета AggreWell™ в течение суток происходило образование сфероидов: в каждой лунке наблюдалось образование клеточных агрегатов в количестве, равнозначном числу микролунок в одной ячейке планшета (рис. 2, *б* и *в*). При этом все сфероиды были одинакового размера. После переноса в микроуреакторы и дальнейшего культивирования их размеры увеличивались в равных пропорциях (рис. 2, *г*, *ж* и *з*), равно как и морфогенез проходил у всех органоидов морфологически одинаково (рис. 2, *ж* и *з*) с четким выделением зон дифференцировки. Между тем, при культивировании в лунках планшета с низкой адгезивностью без качания (рис. 2, *д*) или в обычной чашке Петри с низкой адгезией (рис. 2, *е*) сферо-

иды образовывали слипшиеся скопления разной морфологии и размеров, со временем превращаясь в бесформенные мегаагрегаты. Высокоадгезивные свойства органоидов друг к другу или к пластику можно объяснить природой клеток, составляющих органоид, и их способностью к спонтанной агрегации [35], а также наличием иммобилизованного в нем матригеля, обладающего высокими адгезивными свойствами. Образование таких структур приводит к значительному ухудшению снабжения нутриентами и газами мегаорганоида, приводя к некротической гибели значительной части клеток и его

последующему распаду [36]. Кроме того, слипание органоидов друг с другом может привести к нарушению поляризации, и, как следствие, дальнейший морфогенез может нарушаться [37].

Постепенное увеличение размера органоидов наблюдалось в течение первых трех месяцев, затем этот рост прекратился, скорее всего, из-за невозможности дальнейшего поступления питательных веществ и выведения продуктов метаболизма. Максимальный размер органоидов, полученных для органоидов мозга, культивированных в течение 6 месяцев, составил 6 мм (рис. 2, *и*). Им-

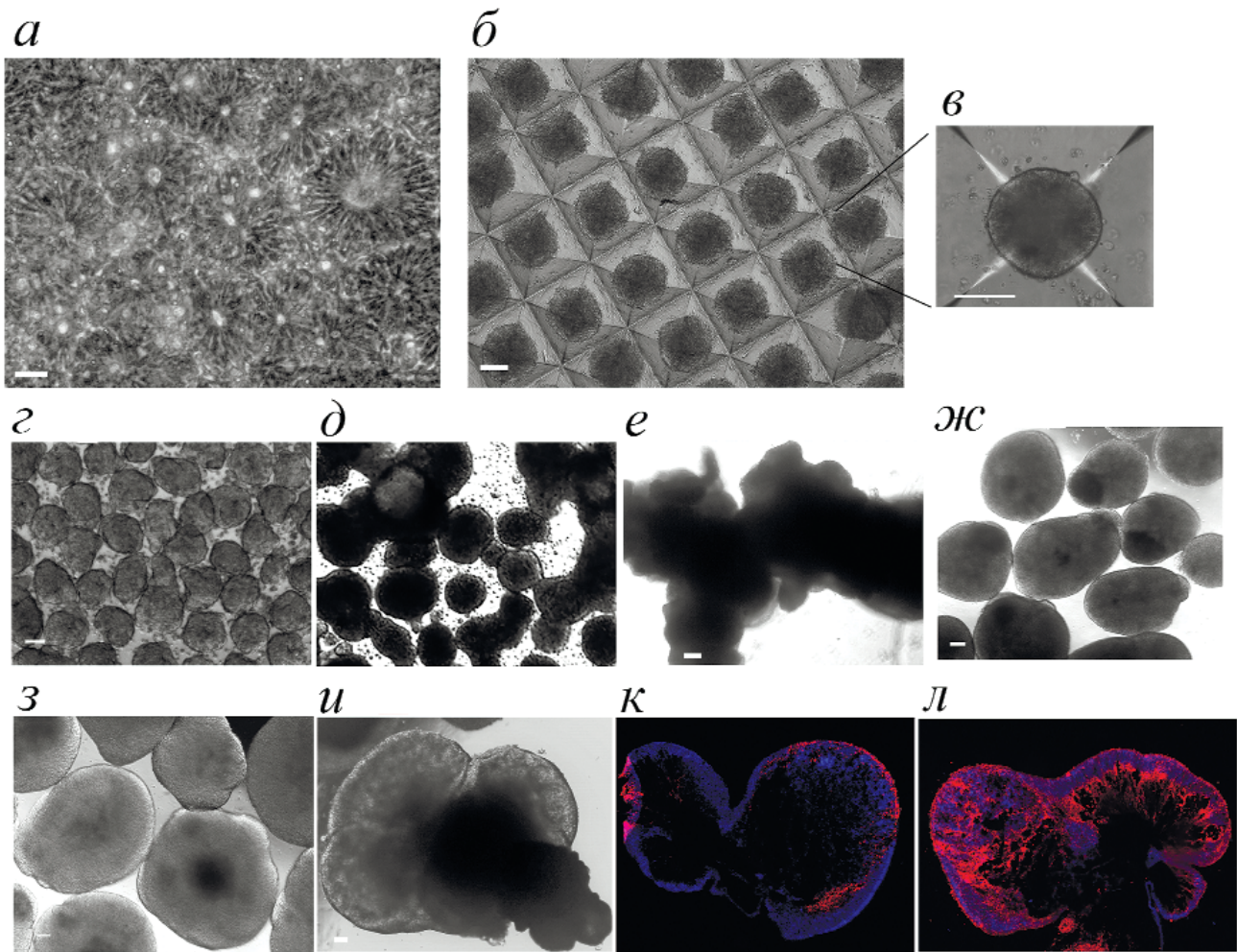


Рис. 2. Приготовление органоидов мозга. Показаны репрезентативные микрофотографии органоидов линий hESM01 и IPSRG06L. *a* – Образование нейроэпителиальных розеток; *б* – образование сфероидов в микролунках AggreWell™ 400; *в* – морфология сфероида, будущего органоида; *г* – органоиды в первый день культивирования; *д* – слипшиеся кластеры органоидов после культивирования в среде для дифференцировки без перемешивания; *е* – образование мегаагрегатов неправильной формы при культивировании в течение 21 дня в обычных чашках Петри с низкой адгезией; *ж* – органоиды мозга с зонами морфогенеза после культивирования в среде для дифференцировки в миниреакторах в течение 21 дня; *з* – органоиды мозга с зонами морфогенеза после культивирования в среде для дифференцировки в миниреакторах в течение 45 дней; *и* – органоид мозга после 200 дней культивирования в минибиореакторе; *а–и* – фазовый контраст; *к, л* – иммуногистохимический анализ криосрезов органоида мозга, изображенного на фотографии *и*; *к* – окрашивание антителами на нестин (красный); *л* – окрашивание антителами на βIII-тубулин (красный). Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабная линейка на всех микрофотографиях – 100 мкм.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

муногистохимический анализ криосрезов органоидов мозга показал наличие морфологически детерминированных структур, положительных по маркерам нейрогенеза нестину и микротубулин-связанному протеину 2 (Microtubule-associated protein 2, Map 2) (рис. 2, *к, л*), характерных для образования глии (GFAP, данные не приведены). Нужно отметить, что нейральные клетки в органоидах в течение нескольких месяцев сохраняли свою жизнеспособность и после обработки органоидов аккьютазой могли быть выделены для дальнейшего культивирования в 2D-культуре (рис. 3).

Таким образом, генерация сфероидов одинакового размера с дальнейшим их культивированием и последующей организацией в органоиды является критическим моментом для получения стандартных по размерам, способных к образованию равнозначных и стандартных по морфогенезу (паттернингу) структур, что успешно достигнуто в условиях миниреакторов. Максимальное время, в течение которого мы культивировали органоиды мозга, составило 200 дней, т.е. ~7 месяцев (рис. 2, *и, к, л*). Органоиды получают стандартными по размеру, морфологии и могут быть использованы для дальнейших исследований.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно определению, органоид – это продукт самоорганизации клеток. Органоиды, способные к выполнению хотя бы части физиологической функции органа, состоят из нескольких типов клеток. Органоиды могут «собираться» не только из плюрипотентных клеток, но и из взрослых стволовых клеток, и даже из дифференцированных клеток [21, 38–41]. Существует несколько препятствий, которые затрудняют широкое использование органоидов для скрининга лекарственных средств, изучения молекулярных механизмов заболеваний и других задач клеточной биологии, биологии развития и биомедицины. Во-первых, методами, представляющими собой модификации протокола Ланкастер, трудно получить сфероиды одинакового размера. Кроме того, минимальный объем, в котором работает большинство биореакторов, в т.ч. одноразовый биореактор Corning Costar (каталожный номер #3152), составляет ≥ 75 мл, что делает культивирование очень дорогим и, поскольку требует магнитной мешалки, не позволяет использовать много биореакторов одновременно. При большом количестве культур, из которых нужно получить органоиды (например, нужно сравнить органоиды, полученные из нескольких мутантных ИПСК и ИПСК дикого ти-

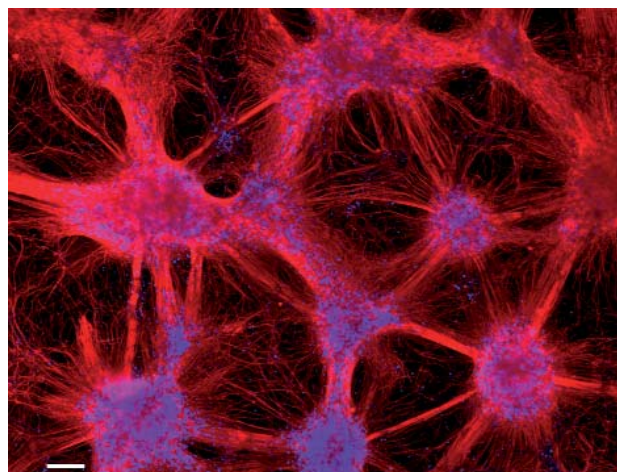


Рис. 3. Иммунофлуоресцентный анализ клеток, выделенных из органоида мозга линии клеток IPSHD76.4L через 120 дней и затем культивированных на подложке из матрицеля в течение 2 недель. Окрашивание антителами к Map 2 (красный), ядра окрашены DAPI (синий). Хорошо видны длинные нейриты нейронов, образовавших разветвленную нейрональную сеть. Масштабная линейка – 100 мкм. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

па), существует проблема нехватки места в CO_2 -инкубаторе. В нашей системе эта проблема решается легко, т.к. чашки и даже плашки с вклеенными кольцами можно ставить друг на друга. Таким образом, на платформе, аналогичной платформе Inforce для CO_2 -инкубаторов, можно культивировать до 30 миниреакторов с органоидами (рис. 1, *д*). В отсутствие перемешивания органоиды могут слипаться, а также может наблюдаться локальное закисление среды и снижение газообмена. Получение органоидов большего размера с помощью биореакторов (в нашем случае предельные размеры органоидов мозга достигали ≤ 6 мм) на сегодняшний день является пока еще не решенной задачей, поскольку простая диффузия нутриентов и кислорода накладывает ограничения на дальнейший рост. Однако проблему, вероятно, можно преодолеть с помощью комбинированных подходов, улучшающих трофику растущих тканей, например, индукция сосудообразования или сочетанная иммобилизация клеток сосудистого эндотелия вместе с нейрональными предшественниками в комплексе с микроперфузионными системами с последующим переходом на перфузионное культивирование по мере роста органоида [42].

В этой работе мы представили очень простой способ изготовления органоидов, который состоит из двух основных стадий:

1) стадии образования 3D-структур из одного или нескольких типов клеток; при этом ис-

пользование плашек Aggrewell позволяет получить сфероиды одного размера и одинакового клеточного состава;

2) стадии культивирования при постоянном перемешивании; кольцеобразная форма культуральной посуды не позволяет сфероидам перемещаться в середину и слипаться.

Движение органоида и окружающей его среды в минибиореакторе подчиняется законам механики и гидродинамики и зависит от ряда параметров: скорости орбитального вращения платформы, геометрии минибиореактора, высоты уровня жидкости, ее вязкости, размера и плотности органоидов и т.д. Моделированию и анализу динамики жидкости, расчету распределения векторов скоростей различных частей среды, а также исследованию других параметров при орбитальном вращении жидкости в цилиндрическом объеме специально посвящены отдельные исследования [43]. В этих работах приведены системы дифференциальных уравнений для описания поведения как жидкости, так и различных модельных частиц в ней, а также представлены численные решения таких систем уравнений, подтвержденные экспериментальными данными. В нашей работе, в которой моделирование поведения органоидов в культуральной среде при орбитальном вращении микробиореактора не является предметом исследования, условия перемешивания подобраны эмпирически, но могут быть легко воспроизведены, т.к. для изготовления миниреакторов и всех дальнейших процедур используются общеупотребительные приборы и среды для культивирования, а также культуральная посуда.

Кроме вышеперечисленных технических решений, критическим моментом в получении органоидов мозга является использование культур ПСК высокого качества. Важно, чтобы ПСК не содержали участков дифференцированных клеток до начала направленной дифференцировки в нейральном направлении. Следует использовать только культуры, которые представляют собой однородный монослой недифференцированных клеток в исходной популяции. Кроме того, поскольку для приготовления агрегатов используются не ПСК, а дифференцированные из них нейроэктодермальные предшественники, эти дифференцировки тоже должны быть высокоэффективными ($\geq 90\%$). Качество клеток можно проверить по соответствующим маркерам ранней дифференцировки (Pax 6, NSAM). После формирования агрегатов (на 1-й или 2-й день) клеточные сфероиды должны иметь гладкие края (рис. 2, *a* и *b*). В этот момент клеточные

агрегаты должны быть условно оптически прозрачны, только такие следует отбирать для иммобилизации в матригеле. При строгом соблюдении протокола будут получаться стандартизированные партии органоидов с однородностью $\geq 90\%$ в поляризованном свете. В ходе всего культивирования не требуется добавления сложного коктейля рекомбинантных факторов роста и морфогенеза, кроме bFGF, вся основная дифференцировка, по-видимому, происходит за счет малых молекул дорсоморфина и SB431542 (ингибиторы BMP/TGF β) и агониста Shh – пурморфамина, а также за счет аутокринных процессов, протекающих в самом органоиде.

Варьируя среды и типы клеток, составляющие основу сфероида, мы испытали нашу систему для нескольких видов органоидов: органоидов мозга, сетчатки, комбинированных органоидов из клеток карциномы печени и мезенхимальных стволовых клеток (МСК), комбинированных органоидов из гепатобластов, МСК и кроветворных стволовых клеток, дифференцированных из ИПСК, органоидов кишечника (данные не приведены).

Мы предполагаем, что, варьируя изначальный состав клеток в сфероиде, факторы дифференцировки, культуральные среды, матриксы, а также, возможно, состав газовой смеси, скорость вращения платформы и другие параметры, с помощью предложенных в нашей работе минибиореакторов можно получать органоиды одинаковой формы, размера и морфологии, моделирующие различные органы и ткани.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-15-00930).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

Благодарности

Авторы благодарны н.с. Д.В. Басманову (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России) за обсуждение результатов при подготовке рукописи к печати.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurler, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly, *Nature*, **501**, 373–379, doi: 10.1038/nature12517.
- Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014) Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies, *Science*, **345**, 124–125, doi: 10.1126/science.1247125.
- Pasca, A.M., Sloan, S.A., Clarke, L.E., Tian, Y., Makinson, C.D., Huber, N., Kim, C.H., Park, J.Y., O'Rourke, N.A., Nguyen, K.D., Smith, S.J., Huguenard, J.R., Geschwind, D.H., Barres, B.A., and Pasca, S.P. (2015) Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture, *Nat. Methods*, **12**, 671–678, doi: 10.1038/nmeth.3415.
- Kadoshima, T., Sakaguchi, H., Nakano, T., Soen, M., Ando, S., Eiraku, M., and Sasai, Y. (2013) Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 20284–20289, doi: 10.1073/pnas.1315710110.
- Renner, M., Lancaster, M.A., Bian, S., Choi, H., Ku, T., Peer, A., Chung, K., and Knoblich, J.A. (2017) Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids, *EMBO J.*, **36**, 1316–1329, doi: 10.15252/embj.201694700.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., and Clevers, H. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche, *Nature*, **459**, 262–265, doi: 10.1038/nature07935.
- Wells, J.M., and Spence, J.R. (2014) How to make an intestine, *Development*, **141**, 752–760, doi: 10.1242/dev.097386.
- Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., Shroyer, N.F., and Wells, J.M. (2011) Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*, *Nature*, **470**, 105–109, doi: 10.1038/nature09691.
- Takasato, M., Er, P.X., Chiu, H.S., Maier, B., Baillie, G.J., Ferguson, C., Parton, R.G., Wolvetang, E.J., Roost, M.S., Chuva de Sousa Lopes, S.M., and Little, M.H. (2015) Kidney organoids from human iPSC cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis, *Nature*, **526**, 564–568, doi: 10.1038/nature15695.
- Takasato, M., Er, P.X., Becroft, M., Vanslambrouck, J.M., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., and Little M.H. (2014) Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney, *Nat. Cell Biol.*, **16**, 118–26, doi: 10.1038/ncb2894.
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M., and Sasai, Y. (2012) Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs, *Cell Stem Cell*, **10**, 771–785, doi: 10.1016/j.stem.2012.05.009.
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., and Sasai, Y. (2011) Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture, *Nature*, **472**, 51–56, doi: 10.1038/nature09941.
- Quadrato, G., Nguyen, T., Macosko, E.Z., Sherwood, J.L., Min Yang, S., Berger, D.R., Maria, N., Scholvin, J., Goldman, M., Kinney, J.P., Boyden, E.S., Lichtman, J.W., Williams, Z.M., McCarroll, S.A., and Arlotta, P. (2017) Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids, *Nature*, **545**, 48–53, doi: 10.1038/nature22047.
- Huch, M., Gehart, H., van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Versteegen, M.M., Ellis, E., van Wenum, M., Fuchs, S.A., de Ligt, J., van de Wetering, M., Sasaki, N., Boers, S.J., Kemperman, H., de Jonge, J., Ijzermans, J.N., Nieuwenhuis, E.E., Hoekstra, R., Strom, S., Vries, R.R., van der Laan, L.J., Cuppen, E., and Clevers, H. (2015) Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver, *Cell*, **160**, 299–312, doi: 10.1016/j.cell.2014.11.050.
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.R., Ueno, Y., Zheng, Y.W., Koike, N., Aoyama, S., Adachi, Y., and Taniguchi, H. (2013) Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, *Nature*, **499**, 481–484, doi: 10.1038/nature12271.
- Giandomenico, S.L., and Lancaster, M.A. (2017) Probing human brain evolution and development in organoids, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **44**, 36–43, doi: 10.1016/j.ceb.2017.01.001.
- Conforti, P., Besusso, D., Bocchi, V.D., Faedo, A., Cesana, E., Rossetti, G., Ranzani, V., Svendsen, C.N., Thompson, L.M., Toselli, M., Biella, G., Pagani, M., and Cattaneo, E. (2018) Faulty neuronal determination and cell polarization are reverted by modulating HD early phenotypes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E762–E771, doi: 10.1073/pnas.1715865115.
- Lebedeva, O.S., and Lagarkova, M.A. (2018) Pluripotent stem cells for modelling and cell therapy of Parkinson's disease, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1046–1056, doi: 10.1134/S0006297918090067.
- Clevers, H. (2016) Modeling development and disease with organoids, *Cell*, **165**, 1586–97, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.082.
- Dang, J., Tiwari, S.K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V.S., Eroshkin, A.M., and Rana, T.M. (2016) Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3, *Cell Stem Cell*, **19**, 258–265, doi: 10.1016/j.stem.2016.04.014.
- Chen, K.G., Mallon, B.S., Park, K., Robey, P.G., McKay, R.D.G., Gottesman, M.M., and Zheng, W. (2018) Pluripotent stem cell platforms for drug discovery, *Trends Mol. Med.*, **24**, 805–820, doi: 10.1016/j.molmed.2018.06.009.
- Qian, X., Nguyen, H.N., Jacob, F., Song, H., and Ming, G.L. (2017) Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly, *Development*, **144**, 952–957, doi: 10.1242/dev.140707.
- Kelava, I., and Lancaster, M.A. (2016) Stem cell models of human brain development, *Cell Stem Cell*, **18**, 736–748, doi: 10.1016/j.stem.2016.05.022.
- Di Lullo, E., and Kriegstein, A.R. (2017) The use of brain organoids to investigate neural development and disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 573–584, doi: 10.1038/nrn.2017.107.
- Camp, J.G., Badsha, F., Florio, M., Kanton, S., Gerber, T., Wilsch-Brauninger, M., Lewitus, E., Sykes, A., Hevers, W., Lancaster, M., Knoblich, J.A., Lachmann, R., Paabo, S., Huttner, W.B., and Treutlein, B. (2015) Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 15672–15677, doi: 10.1073/pnas.1520760112.
- Xiang, Y., Tanaka, Y., Patterson, B., Kang, Y.J., Govindaiah, G., Roselaar, N., Cakir, B., Kim, K.Y., Lombroso, A.P., Hwang, S.M., Zhong, M., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., Naegele, J.R., Lee, S.H., Weissman, S.M.,

- and Park, I.H. (2017) Fusion of regionally specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration, *Cell Stem Cell*, **21**, 383–398, doi: 10.1016/j.stem.2017.07.007.
27. Muguruma, K., Nishiyama, A., Kawakami, H., Hashimoto, K., and Sasai, Y. (2015) Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells, *Cell Rep.*, **10**, 537–550, doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.051.
 28. Jo, J., Xiao, Y., Sun, A.X., Cukuroglu, E., Tran, H.D., Goke, J., Tan, Z.Y., Saw, T.Y., Tan, C.P., Lokman, H., Lee, Y., Kim, D., Ko, H.S., Kim, S.O., Park, J.H., Cho, N.J., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Shin, J.H., Weinberger, D.R., Tan, E.K., Je, H.S., and Ng, H.H. (2016) Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons, *Cell Stem Cell*, **19**, 248–257, doi: 10.1016/j.stem.2016.07.005.
 29. Qian, X., Nguyen, H.N., Song, M.M., Hadiono, C., Ogden, S.C., Hammack, C., Yao, B., Hamersky, G.R., Jacob, F., Zhong, C., Yoon, K.J., Jeang, W., Lin, L., Li, Y., Thakor, J., Berg, D.A., Zhang, C., Kang, E., Chickering, M., Nauen, D., Ho, C.Y., Wen, Z., Christian, K.M., Shi, P.Y., Maher, B.J., Wu, H., Jin, P., Tang, H., Song, H., and Ming, G.L. (2016) Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure, *Cell*, **165**, 1238–1254, doi: 10.1016/j.cell.2016.04.032.
 30. Qian, X., Jacob, F., Song, M.M., Nguyen, H.N., Song, H., and Ming, G.L. (2018) Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor, *Nat. Protoc.*, **13**, 565–580, doi: 10.1038/nprot.2017.152.
 31. Sakaguchi, H., Kadoshima, T., Soen, M., Narii, N., Ishida, Y., Ohgushi, M., Takahashi, J., Eiraku, M., and Sasai, Y. (2015) Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue, *Nat. Commun.*, **6**, 8896, doi: 10.1038/ncomms9896.
 32. Nasr, B., Chatterton, R., Yong, J.H.M., Jamshidi, P., D'Abaco, G.M., Bjorksten, A.R., Kavehei, O., Chana, G., Dottori, M., and Skafidas, E. (2018) Self-organized nanostructure modified microelectrode for sensitive electrochemical glutamate detection in stem cells-derived brain organoids, *Biosensors (Basel)*, **8**, E14, doi: 10.3390/bios8010014.
 33. Yakoub, A.M., and Sadek, M. (2018) Development and characterization of human cerebral organoids: an optimized protocol, *Cell Transplant.*, **27**, 393–406, doi: 10.1177/0963689717752946.
 34. Krefft, O., Jabali, A., Iefremova, V., Koch, P., and Ladewig, J. (2018) Generation of standardized and reproducible forebrain-type cerebral organoids from human induced pluripotent stem cells, *J. Vis. Exp.*, **131**, 56768–56776, doi: 10.3791/56768.
 35. Zweigerdt, R., Olmer, R., Singh, H., Haverich, A., and Martin, U. (2011) Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture, *Nat. Protoc.*, **6**, 689–700, doi: 10.1038/nprot.2011.318.
 36. Eldred, M.K., Charlton-Perkins, M., Muresan, L., and Harris, W.A. (2017) Self-organising aggregates of zebrafish retinal cells for investigating mechanisms of neural lamination, *Development*, **144**, 1097–1106, doi: 10.1242/dev.142760.
 37. Raja, W.K., Mungenast, A.E., Lin, Y.T., Ko, T., Abdurrob, F., Seo, J., and Tsai, L.H. (2016) Self-organizing 3D human neural tissue derived from induced pluripotent stem cells recapitulate Alzheimer's disease phenotypes, *PLoS One*, **11**, e0161969, doi: 10.1371/journal.pone.0161969.
 38. Eiraku, M., and Sasai, Y. (2012) Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of ES cells, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **22**, 768–777, doi: 10.1016/j.conb.2012.02.005.
 39. Belair, D.G., Wolf, C.J., Moorefield, S.D., Wood, C., Becker, C., and Abbott, B.D. (2018) A three-dimensional organoid culture model to assess the influence of chemicals on morphogenetic fusion, *Toxicol. Sci.*, **166**, 394–408, doi: 10.1093/toxsci/kfy207.
 40. Liu, S., Xie, B., Song, X., Zheng, D., He, L., Li, G., Gao, G., Peng, F., Yu, M., Ge, J., and Zhong, X. (2018) Self-formation of RPE spheroids facilitates enrichment and expansion of hiPSC-derived RPE generated on retinal organoid induction platform, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **59**, 5659–5669, doi: 10.1167/iovs.17-23613.
 41. Linxweiler, J., Hammer, M., Muhs, S., Kohn, M., Pryalukhin, A., Veith, C., Bohle, R.M., Stockle, M., Junker, K., and Saar, M. (2018) Patient-derived, three-dimensional spheroid cultures provide a versatile translational model for the study of organ-confined prostate cancer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, doi: 10.1007/s00432-018-2803-5.
 42. Flint, J.J., Menon, K., Hansen, B., Forder, J., and Blackburn, S.J. (2015) A microperfusion and in-bore oxygenator system designed for magnetic resonance microscopy studies on living tissue explants, *Sci. Rep.*, **5**, 18095, doi: 10.1038/srep18095.
 43. Salek, M.M., Sattari, P., and Martinuzzi, R.J. (2012) Analysis of fluid flow and wall shear stress patterns inside partially filled agitated culture well plates, *Ann. Biomed. Eng.*, **40**, 707–728, doi: 10.1007/s10439-011-0444-9.

«NECESSITY IS THE MOTHER OF INVENTION», OR CHEAP, RELIABLE AND REPRODUCIBLE PROTOCOL OF GENERATING ORGANIDS

A. V. Ereemeev*, E. A. Volovikov, L. D. Shuvalova, A. V. Davidenko, E. A. Khomyakova, M. E. Bogomiakova, O. S. Lebedeva, O. A. Zubkova, and M. A. Lagarkova*

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of Russia, 119435 Moscow, Russia; E-mail: lagar@rcpcm.org, art-eremeev@yandex.ru

Received November 5, 2018

Revised December 7, 2018

Accepted December 7, 2018

Organoids are three-dimensional (3D) cell cultures that replicate some of the key features of morphology, spatial architecture, and functions of a particular organ. Organoids can be generated from both adult and pluripotent stem cells (PSCs), and also complex organoids can be established by combining different cell types, including differentiated cells. The ability of pluripotent cells to self-organize into organotypic structures containing several cell subtypes specific for a particular organ is being used to create organoids of brain, eye, kidney, intestine, and other organs. Alongside the benefits of using PSCs for obtaining organoids, significant disadvantages that prevent their widespread use so far have been a low yield in their obtaining from a pluripotent cell's monolayer culture and a large variation in size that leads to great heterogeneity in further differentiation. In this article, we describe our own protocol of generating standardized organoids, with an emphasis on the method of generating brain organoids, which allows scaling-up experiments and makes organoid generation less expensive and easier.

Keywords: differentiation, cell culture, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, organoids, bioreactor