

УДК 576.08

ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ ОРГАНОИДЫ: МОДЕЛЬ РАЗВИТИЯ МОЗГА© 2020 г. К. К. Сухинич^а, *, М. А. Александрова^а^аФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия*e-mail: transpl@hotmail.com

Поступила в редакцию 01.03.2020 г.

После доработки 30.03.2020 г.

Принята к публикации 31.03.2020 г.

На данный момент развитие человеческого мозга в норме и при патологии не может быть полностью воспроизведено на животных моделях, что ведет к необходимости поиска альтернативных решений. За последние годы были достигнуты значительные успехи в разработке методов культивирования церебральных органоидов мозга человека. Церебральные органоиды представляют собой 3D культуры, в которых развиваются специфичные для мозга типы клеток, полученные из эмбриональных или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В церебральных органоидах, благодаря самоорганизации нервной ткани, воспроизводятся уникальные особенности развития человеческого мозга, которые отсутствуют в развивающемся мозге грызунов. Однако они не являются точной копией, поэтому преодоление ряда ограничений в будущем расширит наши возможности исследовать развитие и нарушения мозга человека. Очевидно, что уже в настоящее время моделирование церебральных органоидов открывает перспективы как для фундаментальных, так и клинических исследований. В настоящем обзоре мы обсуждаем методы культивирования нервной ткани, способы получения церебральных органоидов, особенности их самоорганизации, моделирование в них процессов нормального развития и патологии мозга.

Ключевые слова: церебральные органоиды, 3D культуры, развитие мозга, нейрогенез, радиальная глия человека

DOI: 10.31857/S0475145020040072

ВВЕДЕНИЕ. ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ АДЕКВАТНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РАЗВИТИЯ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА И РОЛЬ 3D ОРГАНОИДОВ

Изучение развития мозга в норме и при патологии является одной из ключевых задач нейробиологии. Формирование мозга человека представляет собой особую проблему, решение которой ограничивается не только сложностью его морфо-функциональной организации, отличающейся от приматов и грызунов, но и набором доступных методов и животных модельных систем для его исследования (Fietz, Huttner, 2011; Taverna et al., 2014; Florio et al., 2018).

Среди экспериментальных млекопитающих широко используют лабораторных грызунов, в частности мышей, на которых установлены базовые механизмы ранних этапов развития мозга. Генетические манипуляции с геномом мыши в последние годы стали очень эффективными и сложными, но во многих случаях прямой анализ человеческих тканей оказывается предпочтительнее, чем изучение модели на грызунах, поскольку, несмотря на эволюционную консервативность, развитие мозга мышей отличается от человека

(Lui et al., 2011). Так, в развивающейся коре мозга человека формируется обширная внешняя субвентрикулярная зона (вСВЗ), которая отсутствует у мышей (Hansen et al., 2010). В этой зоне расположены клетки внешней радиальной глии (вРГ), отличные от других клеток радиальной глии по поведению и экспрессии ряда специфических для человека генов (Taverna et al., 2014; Pollen et al., 2015; Florio et al., 2015, 2018). Клетки вРГ из вСВЗ генерируют огромный пул нейронов, за счет которого значительно увеличиваются размеры коры и обеспечивается ее гирификация (Sousa et al., 2017; Bershteyn et al., 2017). Они имеют характерные особенности в пролиферации (Nommet al., 2015), а их клеточный цикл может регулироваться уникальными для приматов микроРНК, участвующими в контроле уровня пролиферации (Nowakowski et al., 2018; Prodromidou, Matsas, 2019). Кроме структурно-морфологических различий, известно, что эволюционно наиболее новая фронтальная область коры мозга человека претерпела существенные изменения, затрагивающие более 5% ее транскриптома в сравнении с близкими приматами, не говоря уже о грызунах (He et al., 2017). В дополнение к этому, в мозге человека типы астроци-

тарных клеток морфологически и функционально намного сложнее, чем у грызунов (Oberheim et al., 2009). Эти фундаментальные отличия ставят вопрос о поиске адекватных моделей для изучения механизмов раннего развития мозга человека и его заболеваний. Новые модели необходимы и для клинически направленных исследований лекарственных препаратов, потому что использование в доклинических анализах экспериментальных животных, зачастую не позволяет адекватно спрогнозировать, какие препараты и методы будут эффективны, так как около 80% новых лекарственных средств, прошедших испытания на животных, у человека терпят неудачу (Perrin, 2014; Mak et al., 2014).

Одним из подходов к решению комплексной проблемы моделирования развития мозга человека может быть применение методов культивирования клеток. На данный момент широко распространенным методом является двумерное (2D), адгезивное культивирование клеток, которое имеет преимущества в том, что культура легко масштабируется; клетки обеспечиваются равномерным доступом к факторам среды, сохраняется относительно однородная популяция клеток, что позволяет проводить экспериментальные воздействия, анализировать клетки и визуализировать их в реальном времени (Koo et al., 2019). Однако такая система имеет и ряд недостатков, ограничивающих изучение развития нервной ткани (Hong, Do, 2019; Pacitti et al., 2019). При 2D культивировании не достаточно реализуются специфические взаимодействия между разными типами клеток и клетками и внеклеточным матриксом, которые определяют и регулируют важные морфогенетические этапы развития *in vivo*. Например, в этой системе отсутствует пространственный градиент факторов, имеющих решающее значение для региональной спецификации мозга; нарушаются характерная клеточная полярность и миграция клеток. Но главное, что в 2D культуре не формируется трехмерная организация нервных и глиальных клеток и специфические пространственные межклеточные взаимодействия характерные для развивающегося мозга *in vivo*. Из сказанного следует, что необходимо искать пути для пространственного воспроизведения процессов развития и организации нервной ткани в условиях трехмерного микроокружения. И здесь интересным может быть создание трехмерных органоидов в системе 3D культивирования, где, как правило, клетки имеют более высокую скорость пролиферации, чем в монослойных культурах, и их дифференцировка более близка к той, что наблюдается *in situ*. Церебральные органоиды часто определяют, как органоидоподобные 3D культуры, состоящие из специфичных для мозга типов клеток, полученных из плюрипотентных стволовых клеток (Lancaster, Knoblich, 2014; Qian et al., 2019).

Однако нужно обратить внимание, что термин “органOID” до сих пор не имеет четкого определения и его трактовка различается в зависимости от экспериментального контекста. Одни исследователи называют органоидами структуры “напоминающие органы”, возникающие при агрегации клеток, другие, – клеточные комплексы, образующиеся из коммитированных эмбриональных стволовых клеток при реализации эндогенной генетической программы (Simian, Bissell, 2017). По мнению Сасаи, органOID должен иметь: трехмерную структуру из клеток, которые устанавливают или сохраняют морфологическую идентичность моделируемого органа; разнообразие типов клеток, как в самом органе, проявляющих некоторые специализированные функции органа и, наконец, самоорганизация органоида должна соответствовать тем же внутренним организационным принципам, что и в самом органе (Sasai, 2013).

В настоящем обзоре мы суммировали данные по методам культивирования нервной ткани, их возможности и ограничения; способы получения церебральных органоидов из стволовых клеток и особенности их самоорганизации, клеточные характеристики церебральных органоидов и моделирование в них процессов нормального развития и патологии мозга, структурные и молекулярные свойства разных нейральных органоидов *in vitro* и *in vivo*, и перспективы их использования *in vivo*.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ: ОТ 2D К 3D КУЛЬТУРАМ

История культивирования нейральных тканей насчитывает уже более 100 лет. Первая культура была получена в 1907 году Харрисоном (Harrison, 1907), который обнаружил рост нейритов нервных клеток от кусочков нервной трубки лягушек, сохраненных в капле лимфы на протяжении 4 недель. Фрагменты тканей нервной системы человека научились культивировать значительно позднее, в 40-е годы, используя хорошо зарекомендовавший себя метод висячей капли и новый метод роллерного культивирования (Hogue, 1946). Через 10 лет удалось получить первую монослойную культуру энзиматически диссоциированных клеток из спинного мозга эмбриона цыпленка (Cavanaugh, 1955). Затем Москона вырастил агрегационную культуру клеток из ткани эмбрионов мышей, где было показано, что диссоциированные клетки способны реагрегировать и образовывать тканеподобные структуры (Moscona, 1961).

Одновременно с этими исследованиями в нейробиологии произошло принципиально важное открытие, не замеченное в то время, но имевшее чрезвычайно важные последствия. В середине 60-х годов прошлого века Дж. Альтман и Г. Дас обнаружили возникновение новых нервных клеток в мозге у взрослых грызунов (Altman, Das,

1965). Несмотря на доказательство (методом автордиографии) нейрогенеза в субвентрикулярной зоне (СВЗ) боковых желудочков и субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа (Altman, Das, 1965; Altman, 1969), их открытие не было востребованным вплоть до 90-х годов, до момента, когда клетки нейрогенных зон поместили в культуру. Работа с культурой привела к пониманию того, что нейрогенез в мозге поддерживается за счет особых нейральных стволовых клеток (НСК), способных к самоподдержанию и дифференцировке во все основные типы клеток нервной системы (Reynolds, Weiss, 1996). Исследование показало, что клетки из СВЗ мышей (в среде без сыворотки, с добавками bFGF и EGF) образуют в культуре свободноплавающие округлые агрегаты – нейросферы. Их клетки могли, как формировать новые нейросферы, так и дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты, что доказывало их стволовые свойства (Reynolds, Weiss, 1996). Суммарно, способность клеток к формированию нейросфер, самоподдержанию и дифференцировке была положена в определение термина – нейральная стволовая клетка.

Первые мультипотентные НСК человека были получены из мозга эмбриона 10.5 недель развития в 1999 году (Vescovi et al., 1999). Способные к самообновлению и длительному сохранению в культуре НСК дали возможность исследовать определенные этапы развития мозга и моделировать некоторые заболевания *in vitro* (Carpenter et al., 1999). Здесь интересно вспомнить о наших работах проведенных ранее. Анализируя морфологию и клеточный состав нейросфер из НСК от эмбрионов человека *in vitro* и после их трансплантации в мозг крыс, в ряде случаев мы обнаружили, что внутри сфер формировались четко организованные розетки клеток, напоминающие нейроэпителиальные структуры, о которых речь пойдет ниже (Podgorny et al., 2005; Aleksandrova et al., 2006).

Несмотря на интерес исследователей к анализу нейросфер, их редко используют для изучения ранних этапов развития мозга человека, что главным образом, связано с этическими требованиями, и особенностями их культивирования. Нейросферы трудно длительное время сохранять в культуре, они адгезируют, а их клетки хаотично мигрируют и не образуют упорядоченной структуры (Eiraku et al., 2008; Lancaster, Knoblich, 2014).

Методологические изменения произошли в конце 90-х, когда в дополнение к эмбриональным стволовым клеткам мыши (мЭСК) были получены эмбриональные стволовые клетки человека (чЭСК), способные генерировать клетки всех зародышевых листков (Evans, Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998). Направление ЭСК по нейральному пути развития происходит при подавлении индуктивных сигналов для альтернативных

дифференцировок (Ying et al., 2003; Chambers et al., 2016) или, например, при использовании noggin для блокирования BMP4 (Itsykson et al., 2005; Gerrard et al., 2005; Eiraku et al., 2008). Наряду с этим, многие авторы отмечают интересный и важный факт, что ЭСК мыши и человека в культуре могут пойти по нейральному пути развития даже в отсутствие внешних сигналов (Tropere et al., 2001; Muñoz-Sanjuán, Brivanlou, 2002; Smukler et al., 2006). Естественно возникает вопрос, за счет каких факторов происходит нейрализация клеток? Частично ответ на него был найден при изучении ключевых для развития нервной ткани морфогенов (Vertacchi et al., 2015). Оказалось, что мЭСК нейрализуются и самостоятельно паттернируются за счет эндогенного повышения экспрессии WNT, FGF и BMP (дорзо-каудальная ось), и низкого уровня экспрессии лигандов Activin/Nodal и Shh (вентральная ось). Можно предположить, что благодаря градиенту морфогенов, нейральные клетки самоорганизуются и формируют округлые структуры из полярных нейроэпителиальных клеток, которые при адгезии на пластике образуют нейроэпителиальные розетки (Zhang et al., 2001; Gerrard et al., 2005; Elkabetz, Studer, 2008). Розетки формируются клетками с четкой апикально-базальной ориентацией, которые располагаются апикальным концом с ресничкой внутрь центральной полости, а базальным концом наружу, что в целом напоминает фронтальный срез нервной трубки с желудочком посередине. Как и при нормальном развитии, нейроэпителиальные клетки из ЭСК пролиферируют, формируют подобие вентрикулярной и субвентрикулярной зоны, где они дифференцируются в радиальную глию (РГ). Для нее характерно плотное близко друг к другу расположение клеточных тел, имеющих радиально отходящий длинный базальный отросток, растущий по мере увеличения мозга. Радиальная глия генерирует практически все нейроны и глию мозга, одновременно играя роль стволовых клеток (материнских) и рельсов, направляющих миграцию новорожденных клеток (Zhang et al., 2001; Campbell, Götz, 2002; Fietz, Huttner, 2011; Taverna et al., 2014). В органоидах митозы РГ происходят в апикальной части клетки, куда опускается ядро при делении, при этом материнская клетка сохраняет длинный отросток, а дочерняя клетка мигрирует вдоль отростка. Этот алгоритм точно повторяет нормальное развитие эмбриона (Curchoe et al., 2012; Ziller et al., 2015; Edri et al., 2015). На ЭСК были отработаны основные методические приемы получения церебральных органоидов, и многие исследования подтвердили, что *in vitro* можно создавать модели ранних этапов развития мозга человека. Однако этические споры о возможности использования эмбриональных стволовых клеток, а главное получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

(ИПСК) сместили интересы исследователей в сторону ИПСК (Takahashi et al., 2007). Хорошо известно, что данный тип клеток может быть получен как от здорового человека, так и больного пациента, что открывает путь к изучению множества заболеваний и персонализированной медицине (Avior et al., 2016). Пионерские работы (Eiraku et al., 2008; Mariani et al., 2012; Lancaster et al., 2013), в которых были получены церебральные органоиды из разных ИПСК человека в 3D культуре, выделили эти исследования в особое перспективное направление.

ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ И ИХ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Изначально ЭСК или ИПСК культивируют для получения эмбрионидных тел, которые представляют собой многоклеточный агрегат, имеющий ряд характеристик, аналогичных внутренней клеточной массе на стадии перед гаструляцией, с потенциалом развития клеток в три зародышевых слоя: энтодерму, эктодерму и мезодерму (Zhang et al., 2001). Затем клетки эмбрионидных тел комитируют в нейральном направлении путем дополнения среды для культивирования специфическими факторами роста и/или ингибиторами. Благодаря самоорганизующей способности, нейральные клеточные агрегаты развиваются в органоиды, состоящие из разных нейрональных подтипов и макроглии, образующих специализированные области ЦНС (такие как кора, гиппокамп, сетчатка, спинной мозг – Eiraku et al., 2011; Mariani et al., 2012; Lancaster et al., 2013; Todd et al., 2013; Chichagova et al., 2019; Winanto et al., 2019). В органоиде химитирующих структуры переднего мозга, хорошо воспроизводятся основные особенности развивающейся коры: апикально-базальная поляриность нейроэпителлия, интеркинетическая миграция ядер в нем и РГ, способы деления РГ и характер миграции нейронов (Mariani et al., 2012). Важная особенность церебральных органоидов человека в том, что в них формируется увеличенная СВЗ, которая является основной пролиферативной зоной у приматов, но не у мышей.

В литературе выделяют две методологии для получения органоидов мозга, которые подразделяют на “направленную” и “ненаправленную”, что с нашей точки зрения очень условно, поскольку есть множество разных протоколов для получения органоидов. “Ненаправленные” методы, главным образом, опираются на способность к спонтанному, генетически детерминированному морфогенезу и внутренней дифференцировке в агрегатах ЭСК и ИПСК (рис. 1). Минимальные добавки в композицию среды культивирования дают стволовым клеткам наибольшую свободу

для самоорганизации. “Направленные” методы, наоборот, основаны на изначальном использовании внешних регуляторных факторов, чтобы направить клетки дифференцироваться в желаемых нейральных направлениях (Qian et al., 2019; Koo et al., 2019).

В основе одного из “направленных” базовых протоколов культивирования мЭСК и чЭСК лежит метод SFEBq (serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation) (Watanabe et al., 2005). Клетки культивируют с использованием среды с ингибиторами SMAD, подавляя развитие мезодермы и энтодермы (Chambers et al., 2009), после чего нейральная дифференцировка продолжается автономно (Eiraku et al., 2008). Общие принципы протокола заключались в следующем. Диссоциированные мЭСК (или чЭСК) культивировали в 96 луночном низко адгезивном планшете с U-образными лунками, где через несколько часов образовывались клеточные агрегаты, подобные эмбрионидным телам, но в которых уже около 70% клеток были положительны к *bf1* (*Foxg1*) – раннему маркеру клеток конечного мозга эмбрионов (Watanabe et al., 2005). В течение 5 сут клетки в агрегатах формировали непрерывный, поляризованный по апико-базальной оси нейроэпителлий, что подтверждалось позитивным иммуногистохимическим окрашиванием клеток на *N-cadherin+*. На 7 сут культуру переводили на среду DMEM/F12 с добавкой N2, где к 10 сут образовывалось множество круглых кластеров (дающих при адгезии розетки) из поляризованных нейроэпителлиальных клеток с базальным отростком и единственной ресничкой на апикальном конце, которые имели большое сходство с нейроэпителием и радиальной глией в нормальном эмбриональном развитии. Клетки в розетках делились симметрично и асимметрично, а митотические ядра располагались ближе к апикальной части клеток, как при интеркинетическом движении ядер в нормальном эмбриогенезе (рис. 2). Нейрогенез в мЭСК органоидах имел сходство с эмбриональным по времени рождения специфических типов клеток из радиальной глии. Последовательно появлялись клетки, несущие маркеры будущих слоев коры: *Reelin+* (слой I), *Tbr1+/Bf1+* (слой VI), *Stip2+/Emx1+* (слой V), и *Brn2+/Tuj1+* (слой II/III), а время рождения нейронов приходилось на 8–10, 9–10, 10–11, и 12–13 сутки соответственно. Хотя, в отличие от нормы, в органоидах из мЭСК могла наблюдаться либо инверсия слоев, либо смешанное расположение клеток всех слоев, их функциональные исследования свидетельствовали об активировании специфических Ca^{2+} волн, характерных для неонатальных кортикальных тканей. Как пишут авторы, они обнаружили интригующую разницу между кортикальными тканями, происходящими от мЭСК и чЭСК. Так, при развитии коры из

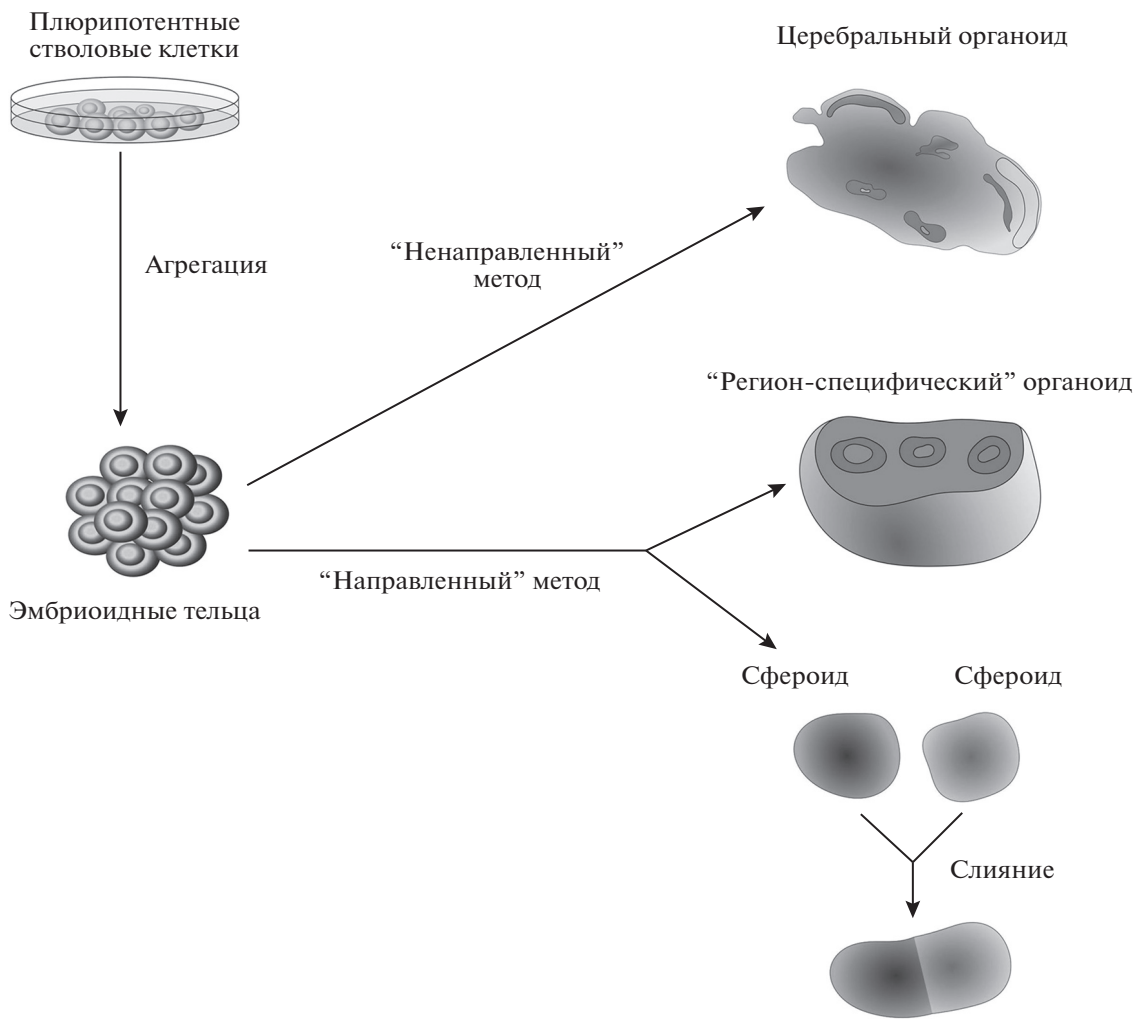


Рис. 1. Технологии получения церебральных органоидов. Из плюрипотентных стволовых клеток человека получают эмбрионидные тельца. Затем, в основном за счет самоорганизации идет образование церебральных органоидов (“ненаправленный метод”) либо с помощью регуляторных факторов идет формирование “регион-специфических” органоидов (“направленный метод”). Сфероиды, представляющие собой разные “регион-специфические” области мозга могут быть объединены в “асемблоид”.

мЭСК непрерывный нейроэпителий образует несколько розеток начиная с 7-го дня культивирования, которые дезорганизовались после 12-го дня по мере уменьшения митозов нейрональных предшественников. В отличие от этого, ткани из чЭСК сохраняли непрерывную нейроэпителиальную структуру без розеток даже на 46 сут, что с нашей точки зрения совершенно очевидно, поскольку нейрогенез в переднем мозгу человека длится более 175 сут, а у мышей только 7 сут. Однако авторы связывали это с различиями в балансе дифференцировки и самообновления клеток мЭСК и чЭСК, и с возможным различием в механических свойствах клеток между видами (Eiraku et al., 2008).

Дальнейшее развитие этой технологий позволило усовершенствовать методы получения кортикальных органоидов (Kadoshima et al., 2013). В

новом протоколе в определенные моменты культивирования, авторы использовали Rho kinase ингибитор, повышенный уровень кислорода, Матригель и разные добавки к среде. В результате, растущий нейроэпителий самопроизвольно сформировал полярность дорсо-каудальной и вентро-ростральной оси, прошел специфичный морфогенез и образовал полусферическую структуру с толстой вентрикулярной зоной из Pax6+ и Sox2+ клеток, где больше делящихся клеток было в апикальной части ближе к вентрикулярной полости, как *in vivo*. За пределами вентрикулярной зоны в базальной части располагались TuJ1+ нейроны, несущие маркеры ранних нейронов кортикальной пластинки Stip2+, Tbr1+ (Molyneaux et al., 2007; Hébert, Fishell, 2008). К 70 сут культивирования в органоиде уже можно четко различить маргинальную зону с Reelin+ клетками Кахаля-Пет-

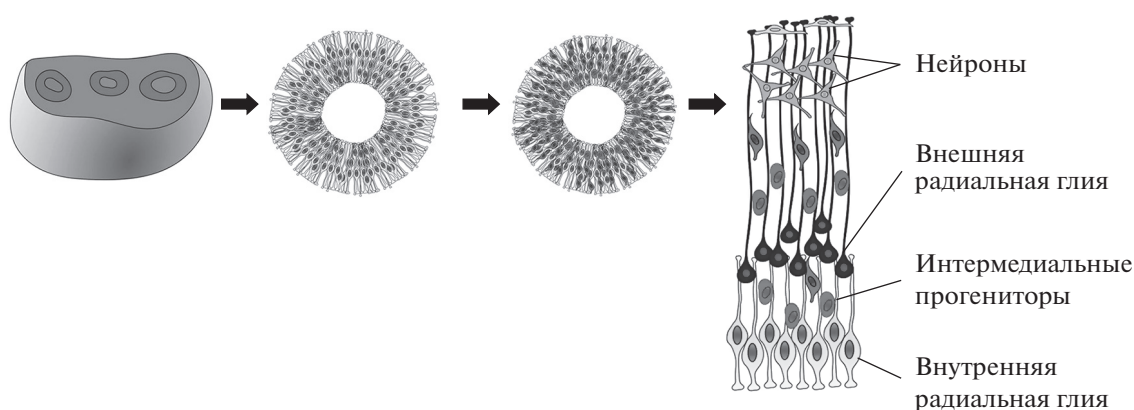


Рис. 2. Формирование ламинарной структуры неокортекса в церебральных органоидах, полученных из ИПСК человека. В начальный период в органоиде образуются 3D розетки, состоящие из клеток нейроэпителия. Далее структура розеток значительно усложняется из-за пролиферации и миграции клеток, появляются внутренний и внешний слой радиальной глии, интермедиальные прогениторы, а также слои, состоящие из нейронов.

циуса, нейроны глубоких слоев *Stip2+*, *Tbr1+*, а между кортикальной пластинкой (КП) и СВЗ выделялась интермедиальная (промежуточная) зона с малым количеством клеток и большим числом нейритов. Непосредственно под кортикальной пластинкой располагались *Calretinin+* клетки с *MAP2+* отростками, которые были сходны с нейронами субпластинки. Важно, что в течение всего времени стволовые клетки сохраняли правильную апикально-базальную ориентацию, подобно радиальной глие в нормальном развитии (Campbell, Götz, 2002). К 90 сут культивирования образовывались нейроны верхних слоев с маркерами *Satb2+* и *Brn2+* и кортикальная пластинка становилась значительно толще. Авторы подчеркивают удивительную самоорганизацию чЭСК, отмечая, что нейроэпителий самостоятельно (без участия экзогенных морфогенов) образует три нейрональные зоны (субпластинку, кортикальную пластинку и зону клеток Кахала-Ретциуса), и три прогениторные зоны (желудочковую, субвентрикулярную и промежуточную зону) в том же апикально-базальном порядке, что и в коре человека в начале второго триместра. В органоиде воспроизводится и следующий этап кортикогенеза, характерный для второго триместра, а именно появление на 91-й день (13 нед.) предшественников *Sox2+* *Tbr2+* клеток внешней радиальной глии внешней СВЗ (которая характерна для человека, но отсутствует у мышей). Отмечается, что скорость развития кортикальных структур в органоиде в культуре примерно сравнима с таковой в мозге плода человека (Kadoshima et al., 2013).

Есть представление, что в “направленных” культурах возникают разные типы клеток в относительно постоянной пропорции с меньшей вариабельностью между партиями органоидов и исходными клеточными линиями. В тоже время, “направленные” органоиды обычно содержат от-

носительно небольшие нейроэпителиальные комплексы, и их цитоархитектура зачастую не является четко определенной, что может быть следствием неадекватных условий культивирования.

“Ненаправленный” метод получения нейральных органоидов из ИПСК человека, который использовала М. Ланкастер, включает модификацию среды, использование матригеля и биореактора для поддержания самоорганизации клеток (Lancaster et al., 2013; Lancaster, Knoblich, 2014). В отличие от протоколов “направленной” дифференцировки, где активировали нейроэктодерму подавляя развитие мезодермы и энтодермы ингибиторами SMAD (Chambers et al., 2009), М. Ланкастер инициировала образование церебральных органоидов в среде для эмбриональных стволовых клеток с низким уровнем основного фактора роста фибробластов (bFGF), после чего трехмерные агрегаты переводили на среду для нейральной индукции (с добавками N2 и B27). Общий принцип создания органоидов такой: сначала из ИПСК человека формируют эмбриоидные тела с нейроэктодермой, затем добавляют Матригель для формирования 3D структуры и помещают в биореактор, который обеспечивает перемешивание среды, улучшает диффузию и трофику органоидов. Далее авторы воздействовали на нейроэктодерму малыми молекулами CHIR99021 (CHIR) (GSK3 beta inhibitor) в течение 3 сут для активации сигнального пути WNT/ β -catenin; в итоге удалось получить только структуры переднего мозга, где почти не было клеток с маркерами среднего, заднего мозга и мозжечка. Добавление в среду Матригеля создавало подобие внеклеточного матрикса и базальной мембраны, которая обеспечивала механические свойства, необходимые для апико-базальной паттернизации нейроэпителия и формирования кортикальной пластинки, более похожей на ту, которая наблюдает-

ся *in vivo* (Ranga et al., 2016). Разработанный метод позволил М. Ланкастер получить органоид, названный “мини-мозгом”, содержащий сразу ряд областей, включая разные отделы коры, гиппокамп и сетчатку. Важно, что в органоидах переднего мозга последовательно образуются структуры коры с четко выраженными слоями, которые на структурном, клеточном и молекулярном уровнях подобны вентрикулярной зоне, внешней и внутренней субвентрикулярной зоне и кортикальной пластинке *in vivo*. В последующем исследователи применили еще одно технологическое усовершенствование, которое заключалось в использовании нити (филамента) для удлинения эмбрионидных тел и нервной трубки (Lancaster et al., 2017). Авторы добавляли в культуру отдельные волокна poly (lactide-co-glycolide) copolymer (PLGA) микрометрового размера, вокруг которых формировалась ткань с большой поверхностью, сохраняя плотные межклеточные контакты и самоорганизацию. В результате, в инженерных церебральных органоидах (enCOR) усиливалось развитие нейроэктодермы, улучшалось формирование коры, и в целом полученные структуры уже очень напоминали формирующийся мозг человека на стадиях 8–9 недель эмбриогенеза. Церебральные органоиды росли не менее одного–двух месяцев, и имели разные размеры, в среднем около 4 мм, а те которые достигали крупного размера ~1 см всегда в центре имели зоны некроза. Отдельные органоиды удавалось поддерживать в культуре около года, что дало возможность изучать последовательные этапы дифференцировки отдельных клеток (Lancaster, Knoblich, 2014). Важным аргументом в пользу органоидов из клеток человека была демонстрация того, что в них повторяются уникальные особенности развития мозга человека, которые отсутствуют в развивающемся мозге грызунов (Lancaster et al., 2013, 2017; Bershteyn, Kriegstein, 2013; Pamies et al., 2014; Lancaster, Knoblich, 2014; Otani et al., 2016).

Морфологию нервных клеток в наиболее зрелых органоидах исследовали, используя метод электропорации GFP. Анализ показал, что клетки правильно ориентированы, имеют развитое дендритное древо с ведущим дендритом и общей морфологией, характерной для пирамидных кортикальных нейронов (Lancaster, Knoblich, 2014; Lancaster et al., 2017). Наряду с этим, в ряде исследований обращено внимание на то, что в органоидах формируется большое разнообразие нейронов, которое не регулярно повторяется от органоида к органоиду, что ставит вопрос о стандартизации методов культивирования (Quadrato et al., 2017). Помимо нервных клеток в органоидах развиваются астроциты (Paşca et al., 2015; Sloan et al., 2017; Qian et al., 2018), но редко встречаются олигодендрциты (Monzel et al., 2017). Это привело к отработке отдельного метода индукции клеток с ис-

пользованием PDGF-AA, IGF-1 и тиреоидного гормона, и созданию “олигокортикальных” сфероидов (Madhavan et al., 2018). На переживающих срезах с органоидов с помощью кальциевого имиджинга и микроэлектродного отведения было показано, что нейроны физиологически функциональны (Jo et al., 2016; Lancaster et al., 2017; Birey et al., 2017; Yakoub., 2019) и формируют зрелые синапсы (Sakaguchi et al., 2015). Специально для изучения синапсов в органоидах методами иммунофлуоресценции были усовершенствованы и оптимизированы методы визуализации (Yakoub, Sadek, 2018, 2019). Тот факт, что физиологическая активность возбуждающих и тормозных нейронов в кортикальных органоидах показывает их функциональность, хотя еще и менее зрелую по сравнению с взрослыми нейронами (Pasca et al., 2015; Birey et al., 2017; Qian et al., 2018; Durens et al., 2020), свидетельствует, что нейроны, образующиеся в органоидах, могут отражать развитие и созревание нейрональных функций на эмбриональных стадиях *in vivo*.

Одно из первых исследований генетических характеристик органоидов было проведено Дж. Мариани с коллегами (Mariani et al., 2012). Она, следуя протоколу (Eiraku et al., 2008) для получения органоидов переднего мозга из ИПСК, продемонстрировала согласованную активацию дорсальных теленцефальных генов в органоиде, и отсутствие молекул характерных для каудальных областей. Проведя глобальное сравнение между транскриптомами органоидов и образцами эмбрионального мозга человека на нескольких этапах развития, автор выявила поразительное соответствие в экспрессии генов между теленцефальными органоидами в 50 сут и корой головного мозга на 8–10 нед. развития. В последние годы, уже методами полногеномного бисульфитного секвенирования (scRNA-seq) церебральных органоидов и фетальных тканей коры плода мозга человека было показано, что кортикальные клетки в органоидах используют программы экспрессии генов, очень похожие на те, что реализуются при развитии в ткани мозга плода человека (Camp et al., 2015). Дополняют это данные транскриптомного анализа, которые показали, что его динамика точно моделирует траектории экспрессии генов в мозге плода человека в начальной и средней стадии развития (Luo et al., 2016). В работах подчеркивается, что в органоидах повторяются многие характерные особенности развития мозга человека, и что на этих моделях можно исследовать и изменения хроматина и генетические механизмы развития мозга человека (Kanton et al., 2019; Trevino et al., 2020). Эти результаты дополняются протеомными исследованиями, в которых методами протеомного анализа (label-free shotgun proteomics) проводили сравнение церебральных органоидов с мозгом плода человека

(Nascimento et al., 2019). Авторы выявили более трех тысяч белков, связанных со стадиями дифференцировки нейронов, астроцитов и олигодендроцитов. Базовые группы этих белков существенны для развития коры мозга, они участвуют в нейрогенезе, направленном росте аксонов и синаптогенезе, а белки глиальных клеток ответственны за поддержание клеток, энергетический обмен, межклеточные связи и передачу сигналов. Профиль изученных белков в органоидах в значительной степени повторял таковой при нормальном развитии мозга плода человека.

Фундаментальное значение имеют исследования церебральных органоидов человека с позиции эволюции мозга, поскольку их сравнение с органоидами других приматов может выявить молекулярные пути, лежащие в основе уникальных специализаций человеческого мозга. Пионерские работы, проведенные в этом направлении, выявили в органоидах человека более двухсот дифференциально экспрессируемых генов, обогащенных недавней дубликацией генов и включающих множественные регуляторы сигнальных путей PI3K-AKT-mTOR, что отличает их от органоидов мозга шимпанзе и коры макака (Pollen et al., 2019). Это важное направление требует выработки стратегии для определения эволюционных различий между человеком и другими приматами, в основу которой может быть положен анализ молекулярных изменений, способствовавших эволюции человеческого мозга, проявляющихся в церебральных органоидах (Giandomenico, Lancaster, 2017; Heide et al., 2018; Pollen et al., 2019; Mostajir-Radji et al., 2019; Muotri, 2019).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ ИЗ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ

Авторы признают, что церебральные органоиды не полностью моделируют организацию мозга. В них достаточно случайным образом формируются разные клеточные комплексы, без нормального их взаимодействия, дающего взаимоподчиненные структуры в норме. В отличие от нормального развития, где из единственной нейроэпителиальной трубки развивается вся центральная нервная система, в органоидах возникает несколько нейроэпителиальных комплексов (объемных розеток), каждый из которых действует как независимый центр морфогенеза. Эти особенности морфогенеза ставят вопрос об усовершенствовании методов культивирования органоидов с целью получения более стандартизированных структур. Поэтому в многих лабораториях ведется разработка новых методов и технологических подходов, направленных на решение этих задач (Knight et al., 2018; Yakoub, Sadek, 2018; Qian et al., 2018; Eremeev et al., 2019).

Хотя современные методы позволяют получать ткани, напоминающие различные взаимодействующие между собой области мозга, их пропорция и пространственная организация весьма неоднородны и непредсказуемы. Чтобы улучшить моделирование межрегиональных взаимодействий, несколько групп исследователей одновременно разработали оригинальный подход. Сначала из плюрипотентных стволовых клеток, по отдельности, получают органоиды определенных областей мозга, которые затем соединяют вместе (Bagley et al., 2017; Birey et al., 2017; Xiang et al., 2017). Например, при ассоциации органоидов дорсального и вентрального переднего мозга формируются “асемблоид” с двумя отличными доменами (рис. 1) (Birey et al., 2017), между которыми возникают определенные клеточные взаимодействия. Так, рожденные в вентральном домене тормозные ГАМК-ергические интернейроны мигрировали преимущественно в направлении дорсального домена, где доминируют возбуждающие глутаматергические нейроны. Поведение клеток имитировало тангенциальную миграцию интернейронов в нормально развивающейся коре мозга *in vivo* (Anderson et al., 2001). Можно полагать, что получаемые на основе плюрипотентных стволовых клеток человека асемблоиды могут стать моделью для изучения клеточных взаимодействий и перекрестных связей, которые существенны как для нормального развития мозга, так и при развитии его заболеваний (Marton, Paşca, 2019).

Особый интерес представляют эксперименты с формированием аксональных связей между разными типами церебральных органоидов. Первый пример *in vitro* выращенных длинных кортикальных аксонных трактов между органоидами мозга человека представлен в работе Каллена с коллегами (Cullen et al., 2019). Авторы собрали комплекс из двух органоидов, представляющих разные отделы коры, между которыми поместили специальные гидрогелевые микроколоники, предназначенные для поддержания и направления роста аксонов. В результате была сформирована достаточно “жесткая” биоинженерная конструкция с аксональными трактами длиной до 1 см, которая допускала физические манипуляции, необходимые для ее трансплантации в мозг. Авторы обращают внимание на то, что работа представляет собой первый шаг к возможности реконструкции мозга с помощью специфичной для пациента, выращенной *in vitro* кортикальной ткани с длинными аксонными трактами (Cullen et al., 2019).

РОЛЬ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ В ИЗУЧЕНИИ ПРИРОДЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Органоиды головного мозга, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов, используются для моделирования расстройств головного мозга, связанных с развитием нервной системы (Chen et al., 2019; Qian et al., 2019), для проверки эффектов лекарственных средств (Aasen, Vergara, 2020) и токсинов на нервные клетки (Chhibber et al., 2020). Прогресс, достигнутый в формировании органоидов мозга, имеет исключительную важность для изучения природы распространенных нарушений развития мозга человека. Механизмы развития патологий часто ищут в изменении регуляции клеток-предшественников, включая их преждевременную дифференцировку, сниженную пролиферацию или нарушение клеточного цикла, что можно, в определенных пределах, исследовать на церебральных органоидах.

Одно из первых нарушений развития мозга человека, исследованных на церебральных органоидах была микроцефалия – патология, при которой заметно уменьшается размер мозга (Lancaster et al., 2013). Микроцефалия связана с аутосомно-рецессивными мутациями в нескольких генах, каждый из которых кодирует белки, локализуемые в аппарате митотического веретена (Megraw et al., 2011). До недавнего времени патогенез микроцефалии исследовался на мышинной модели, где так и не удалось воспроизвести сильно уменьшенный размер мозга. В противоположность этому, микроцефальные органоиды человека имели выраженное уменьшение размеров в сравнении с контрольными образцами. В органоидах уменьшался слой нейроэпителлия и клеток радиальной глии и одновременно обнаруживалось большее число нейронов. Это свидетельствовало об их преждевременной дифференцировке нейронов, что могло объяснять изменение размера мозга (Lancaster et al., 2013). Нарушения касались и ориентации веретена деления клеток радиальной глии, что так же могло приводить к снижению числа симметричных делений и нарушению нейрогенеза. На органоидах было выявлено, что на клеточном уровне микроцефалия у человека, скорее всего, опосредуется снижением продукции прогениторных клеток и преждевременной дифференцировкой нейронов, что в сумме приводит к уменьшению размеров мозга.

Недавние клинические исследования обнаружили, что вызвать микроцефалию может вирус Зика, который во время беременности может проходить через плаценту и получить доступ к развивающемуся мозгу плода (Driggers et al., 2016; Mlakar et al., 2016). Поэтому органоиды были использованы как модель разных стадий развития

плода для изучения эффектов воздействия вируса Зика. После того как в культуру добавляли вирус Зика на сутки, было обнаружено, что церебральные органоиды развивались значительно меньшего размера. В них происходило уменьшение толщины и размера ростовой вентрикулярной зоны из-за клеточной гибели и подавления пролиферации. Выяснилось, что вирус Зика локализовался в незрелых нейронах и астроцитах, однако специфический тропизм вирус проявлял к НСК, включая клетки ВРГ, что, вероятно, и являлось причиной патологии развития мозга (Qian et al., 2016, 2017, 2019).

Церебральные органоиды были использованы для изучения механизмов проявления синдрома Дауна, при котором одной из причин когнитивных нарушений является дисбаланс возбуждающей и тормозной активности кортикальных нейронов. Как известно, много тормозных ГАМК-ергических интернейронов возникает и мигрирует в развивающуюся кору из нейроэпителлия вентральной части переднего мозга (Anderson et al., 2001), где у человека экспрессируются транскрипционные факторы OLIG1 и OLIG2 (Barber, Pierani, 2016). Авторы обнаружили, что в органоидах, полученных из клеток пациентов с синдромом Дауна, присутствует избыточное количество OLIG2+ клеток. Эти клетки генерируют увеличенное число определенных типов ГАМК-ергических интернейронов, из-за чего в коре может нарушаться баланс возбуждающих и тормозных нейронов и приводить к эпилептиформной активности (Xu et al., 2019). На органоидах, полученных от пациентов с синдромом Ангельмана, удалось показать, что в основе эпилептической нестабильности у больных лежит дисфункция калиевого канала, которую вызывают нарушения в гене убиквитин-белковой лигазы E3A (UBE3A) (Sun et al., 2019). В дополнение, органоиды использовали для моделирования гемического повреждения коры головного мозга, которое развивается вследствие человеческой церебральной малярии, и для тестирования лекарств, снижающих повреждение головного мозга и неврологические осложнения при малярии (Harbuzariu et al., 2019).

Нужно отдавать себе отчет в том, что большинство нейродегенеративных заболеваний проявляются у взрослых и пожилых людей, вследствие чего органоиды, имитирующие эмбриональное развитие мозга, могут не подходить для моделирования их патогенеза. Тем не менее, в настоящее время в изучении патогенеза многих нейродегенеративных процессов получили важную роль исследования, связанные именно с развитием нервной системы, поэтому органоиды могут быть полезны и для патологий, проявляющихся с возрастом (Faravelli et al., 2020). Удивительным образом, но уже в органоидах, созданных на основе клеток пациентов с болезнью Альцгеймера, проявляются

такие характерные возрастные патологические признаки, как накопление амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков, что позволяет их использовать как модельные системы (Raja et al., 2016; Seo et al., 2017; Gonzalez et al., 2018). На органоидах можно частично моделировать даже болезнь Паркинсона. Известно, что допаминовые нейроны, дифференцированные из человеческих плюрипотентных стволовых клеток в адгезивных условиях *in vitro*, не повторяют некоторых особенностей нейронов среднего мозга *in vivo*. Например, они не продуцируют пигмент нейромеланин, если только “старение” не вызвано искусственно, посредством экспрессии ассоциированного с заболеванием прогерина (Miller et al., 2013). Исходя из этого, был разработан протокол получения органоидов среднего мозга, в которых развивались клетки экспрессирующие нейромеланин, структурно сходный с выделенным из черной субстанции мозга человека (Jo et al., 2016). Показано также, что органоиды среднего мозга, в которых развиваются ТН-позитивные допаминергические нейроны, при фармакологической индукции нейродегенерации могут служить подходящей моделью болезни Паркинсона (Qian et al., 2016; Jo et al., 2016; Monzel et al., 2017). Считается, что исследование органоидов, полученных от пациентов с болезнью Паркинсона, может дать уникальную возможность непосредственно исследовать патогенные механизмы и тестировать лекарственные соединения в нейронах человека (Marotta et al., 2020).

С целью изучения развития нервно-мышечных патологий, например, миастении были разработаны методы получения нервно-мышечных органоидов в которых развиваются функциональные нервно-мышечные соединения в комплексе с Шванновскими клетками. Использование таких органоидов даст возможность моделировать нервно-мышечные заболевания в будущем (Faustino Martins et al., 2020).

Церебральные органоиды человека могут представлять интересную модельную систему для изучения широкого спектра лекарственных препаратов. На них были изучены эффекты галлюциногенной молекулы 5-метокси-N,N-диметилтриптамина (5-MeO-DMT) на белковый состав 45 сут церебральных органоидов человека (Dakic et al., 2017). После воздействия 5-MeO-DMT в течение 24 ч, из 6728 идентифицированных белков 934 экспрессировались отличным от контроля образом. В опытных органоидах снижалась регуляция сигнальных путей NFAT и NF-κB, что свидетельствовало о противовоспалительных эффектах, и наблюдалась модификация белков связанных с организацией микротрубочек и цитоскелета, участвующего в формировании дендритных шипиков. О защитной функции препарата свидетельствовало снижение белков клеточной гибели и путей нейродегенерации. Интересно, что этот лекарственно-зависи-

мый паттерн экспрессии белка наблюдался только в 3D органоидной модели мозга, но не в двумерных клеточных культурах нейронов (Dakic et al., 2017). В другой работе церебральные органоиды человека использовали для изучения пренатального влияния метамфетамина на развитие мозга плода. Исследование с использованием одноклеточного РНК-секвенирования (scRNA-seq) показало изменения транскрипции в астроцитах и нейронных предшественниках. Авторы обнаружили повышенную регуляцию генов раннего ответа, факторов комплемента, апоптоза и генов иммунного ответа, что указывало на активацию нейровоспалительного ответа регулирующего пролиферацию, дифференцировку и гибель нервных стволовых клеток. Метамфетамин-индуцированные изменения в экспрессии нейровоспалительных и цитокиновых генов, показанные на уровне РНК и белка, свидетельствовали, что органоиды человека представляют собой модельную систему для изучения лекарственно-индуцированного воспаления в ЦНС (Dang et al., 2020).

Органоиды можно применять и в другой сфере, исследовать на них нейротоксичность, например, моделировать воздействие тяжелых металлов на плод (Chhibber et al., 2020). Кроме того, органоиды используют и для получения и изучения опухолей, без трансплантации опухолевых клеток лабораторным животным (Chenet al., 2019).

ОСОБЕННОСТИ ТКАНЕВОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ОРГАНОИДОВ, ПРОБЛЕМА ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ, И ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ ТРАНСПЛАНТАЦИИ *IN VIVO*

Определенно, что церебральные органоиды, имитирующие ряд аспектов нейрогенеза мозга человека, подобно всем другим модельным системам, имеют ряд ограничений. Одна из проблем связана с тем, что в церебральных органоидах практически отсутствуют мезенхимные клетки, в частности микроглия и эндотелиоциты, которые необходимы для нормального развития и функционирования нервной ткани. Клетки микроглии, происходящие от эритромиелодных предшественников желточного мешка, в раннем эмбриогенезе заселяют мозг и, являясь медиатором воспаления, выполняют иммунную функцию при повреждении и нейродегенерации. О значении васкуляризации нет смысла говорить, поскольку очевидно, что без развития сосудистой системы жизнеспособность церебральных органоидов резко ограничена. К решению этой “тканевой” проблемы подошли следующим образом, использовали раздельное культивирование клеток микроглии или эндотелиальных клеток, после чего их соединяли с мозговыми органоидами. Интересен пример сокультивирования изогенных микроглиоподобных клеток с органоидами дорсального переднего

мозга. В результате миграции микроглии внутрь органоидов в них усиливалась иммунная функция, активировалась передача сигналов mTOR и p53, повышалась экспрессия лигандов Notch, активировалась репрессия NF-κB и канонических путей Wnt (Bejoy et al., 2019). Кроме сокультивирования, путем манипулирования разными добавками к среде культивирования (bFGF, ROCK-inhibitor Y-27632, neural induction medium) оказалось возможным получить церебральные органоиды с микроглияльными клетками, которые развивались из мезенхимных закладок одновременно с нейральными клетками (Ormel et al., 2018). Авторы отмечают, что иммунологическая микросреда, приближенная к нормальной за счет ассоциации микроглии в кортикальные органоиды *in vitro*, позволит намного лучше воспроизводить функцию мозговой ткани *in vivo*, что необходимо для адекватного моделирования заболеваний и скрининга лекарств (Ormel et al., 2018; Bejoy et al., 2019).

Подобным образом эндотелиальные клетки можно культивировать отдельно и добавлять к органоидам на стадии формирования эмбрионидных тел, что дает возможность эндотелиоцитам самоорганизоваться с образованием сетчатых структур (Nzou et al., 2018; Pham et al., 2018). Кроме того, рост сосудов можно индуцировать добавкой в эмбрионидные тела фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), который активирует дифференцировку эндотелиальных клеток, не блокируя нейрональную дифференцировку. В результате успешно развиваются церебральные органоиды с сосудистыми структурами, клетки которых экспрессируют маркер эндотелия CD31 и маркер плотных контактов клаудин-5, характеризующий гематоэнцефалический барьер (Nam et al., 2020). Хотя примитивные эндотелиальные сети оказались неспособными нормально функционировать и обеспечивать доставку питательных веществ в органоиды, сами эти исследования дают потенциальную платформу для моделирования нейроваскулярной ниши и гематоэнцефалического барьера (Nzou et al., 2018; Pham et al., 2018; Nam et al., 2020).

Очевидно, что в органоиде по мере генерации большого числа нейронов кортикальная пластинка утолщается и отсутствие васкуляризации ухудшает выживаемость клеток, ограничивается размер органоида и нарушает общую структуру ткани (Shen et al., 2004; Yin et al., 2016). Для васкуляризации органоида была предпринята имплантация в живой мозг с целью провоцирования их васкуляризации для долгосрочного выживания (Mansour et al., 2018). Трансплантированные в полость, сделанную в коре головного мозга иммунодефицитных мышей, GFP чЭСК органоиды интегрировались, и 80% из них переживало не менее 120 сут. Их отличительной морфологической чертой бы-

ло формирование четко выраженных нейроэпителиальных слоев и желудочковых зон. Кровеносные сосуды хозяина проникали на 7–10 день, и органоиды становились сильно васкуляризованными на 14 день. С помощью двуфотонной микроскопии авторы показали, что через сосуды идет активный кровоток, и ткани органоида снабжаются кровью. Отдельные трансплантаты, выжившие до 233 сут (последний срок, протестированный в исследовании), показали постоянную экспрессию в нейронах NeuN и SOX2. Число меченых hGFAP астроцитов, которых до трансплантации в органоидах было минимально, после интеграции значительно возрастало со временем. Кроме того, на средних и поздних сроках, в трансплантированных органоидах были выявлены олигодендроциты Olig2+, однако миелинизации не было обнаружено. О формировании синаптических контактов в трансплантированном органоиде свидетельствовала колокализация пресинаптического маркера Synapsin I и постсинаптического PSD95. Микроглия Iba1 мигрировала из ткани мозга хозяина в органоид. На 90 сутки обнаружился обширный рост аксонов GFP+ человека из органоида, и волокна распространялись в обоих полушариях мозга мыши, хотя в ипсилатеральном их было значительно больше. Кроме того, обнаруживались синапсы между нейронами человека и мыши. Функциональную активность нейронов трансплантатов подтвердили, используя кальцевый имиджинг, методы оптогенетики и электрофизиологии.

В другом исследовании церебральные органоиды из ИПСК человека сокультивировали с эндотелиальными клетками, выращенными от того же донора (Harding et al., 2017; Pham et al., 2018). Затем “васкуляризованные” органоиды трансплантировали в полость в коре мозга иммунодефицитных мышей. Через две недели в некоторых органоидах наблюдалась сильная васкуляризация вплоть до центра, а не васкуляризованные органоиды не переживали. После трансплантации человеческие CD31-позитивные кровеносные сосуды сохранялись внутри и в центре органоида, что свидетельствовало о том, что васкуляризация органоидов головного мозга с помощью ИПСК, полученных от того же пациента, технически возможна. Недостатком этого исследования является то, что авторы не доказали ни связь между капиллярами в органоидах человеческого мозга и мозгом мыши хозяина, ни перфузию человеческих капилляров кровью грызунов (Pham et al., 2018). Иную цель преследовала работа (Daviaud et al., 2018), где из чЭСК в культуре получали и НСК и церебральные органоиды, которые трансплантировали в виде суспензии, либо целиком в кору постнатальных (P8-10) мышей. Сравнивали выживаемость трансплантатов, их васкуляризацию, пул НСК и дифференцировку через две и

четыре недели после трансплантации. Трансплантаты НСК значительно уменьшались в размерах в интервале от двух до четырех недель после пересадки, тогда как размеры церебральных органоидов оставались стабильными в течение этого периода, что подтверждало их лучшую интеграцию в сравнении с суспензированными клетками. Через 2 недели в обоих видах трансплантатов хозяйских Iba1 клеток микроглии было мало, но через 4 нед. микроглии было много вокруг трансплантата суспензии, хотя у органоида их было относительно немного. Васкуляризацию изучали по маркеру эндотелиальных клеток CD31, и обнаружили множество капилляров в органоиде, врастающих со стороны реципиента уже через две недели. В результате оказалось, что в сравнении с трансплантатом суспензированных НСК, органоиды лучше переживают и интегрируются, в них больше DCX+ и NF+ нейронов, и лучше выражены собственные астроциты и олигодендроциты (Daviaud et al., 2018).

В следующих работах церебральные органоиды уже использовали для трансплантации в мозг после инсульта (Wang et al., 2019). Авторы подсаживали органоид в мозг крыс через 6 ч или даже 24 ч после окклюзии средней мозговой артерии, и показали значительное уменьшение объема инфаркта мозга и улучшение двигательной функции. Это пилотное исследование показало, что потенциально органоиды могут быть использованы для терапии при лечении инсульта.

Суммируя работы по трансплантации церебральных органоидов человека в мозг грызунов, необходимо обратить внимание на то, что основой органоидов являются малодифференцированные клетки, обладающих огромным потенциалом развития, находящиеся в архитектурно целостном комплексе. В органоидах прекрасно развит внеклеточный матрикс, являющийся источником нерастворимых и растворимых белков с нейротрофинами, факторами роста, навигации и т.д. Именно это дает органоидам преимущество перед суспензированными НСК в интеграции при трансплантации в полость мозга. Целостные органоиды из-за большого объема пересаживают в заранее подготовленную полость в мозге. Однако можно предположить, что еще лучше органоид будет развиваться в естественных полостях мозга, например, в боковых желудочках (Pothayee et al., 2018), чему будет способствовать цереброспинальная жидкость, которая служит важным компонентом ниши НСК и важна для поддержания пролиферативной активности и дифференцировки ранних клеток-предшественников (Lehtinen et al., 2011).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ОГРАНИЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ

Моделирование процесса формирования мозга путем построения его органоидов открывает перспективы изучения механизмов раннего эмбрионального развития в норме и при патологии, которые представляют особую проблему для человека. До настоящего времени морфология и развитие человеческого мозга не могут быть полностью воспроизведены на животных моделях, а геномные, метаболические и биохимические различия ограничивают прогностическую возможность трансляционных исследований. За последние годы были достигнуты значительные успехи в разработке методов культивирования 3D органоидов мозга человека. Несомненное преимущество органоидов, полученных из ЭСК или ИПСК человека, состоит в том, что в них воспроизводятся уникальные особенности развития человеческого мозга, которые отсутствуют в развивающемся мозге грызунов. Способность ЭСК и ИПСК к самоорганизации в процессе нейрализации, и повторение алгоритмов, свойственных нормальному развитию, делает органоиды уникальной моделью развития мозга человека. Тем не менее, органоиды из клеток мыши, по-прежнему играют важную роль, поскольку они могут использоваться для сравнительных исследований человеческих органоидов и разработки предварительных протоколов культивирования для получения специфичных областей мозга (Marshall, Mason, 2019). Несмотря на всю привлекательность органоидных моделей, очевидно, что на данном этапе существующие ограничения препятствуют их использованию в определенных направлениях. Так, например, существует много методов получения органоидов, но не один из них не позволяет получать стабильно повторяющиеся структуры из-за спонтанной дифференцировки клеток. В органоидах развертываются ранние этапы развития мозга, в то время как более поздние стадии развития, характеризующиеся ростом нервных волокон и формированием высших функций нейронной сети, не могут быть адекватно воспроизведены в этих структурах. Кроме того, технологии получения органоидов не лишены недостатков и ограничений, например, в них не происходит дифференцировка сосудов и капиллярной сети, обеспечивающих трофическую поддержку ткани мозга, и, в ряде случаев, играющих роль скаффолда при миграции клеток. Точно так же клетки микроглии, которые происходят из эритромиелодных предшественников желточного мешка и заселяют мозг в раннем эмбриогенезе, отсутствуют в органоидах, хотя их роль как медиатора воспаления и одного из ключевых игроков при повреждении и нейродегенерации чрезвычайно важна. Кроме того, существуют некоторые этические пробле-

мы, касающиеся источников клеток, которые используются для получения органоидов, и потенциального применения этих органоидов в организме человека (Hun et al., 2020).

Насчитывая менее чем десятилетнюю историю, технология получения и исследования органоидов мозга человека заняли важное место в нейробиологии. Несмотря на существование множества проблем, и нерешенных вопросов, можно ожидать, что исследования 3D органоидов — уникальной модели развития мозга человека приведет к более глубокому пониманию фундаментальных механизмов эмбрионального нейрогенеза, развития заболеваний и персонализированному лечению расстройств мозга.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарности коллегам за обсуждение и рекомендации при написании обзора.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-00117).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в подготовку и написание текста обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aasen D.M., Vergara M.N.* New drug discovery paradigms for retinal diseases: A focus on retinal organoids // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2020. V. 36. № 1. P. 18–24.
- Aleksandrova M.A., Podgorny O.V., Poltavtseva R.A. et al.* Structure and cell composition of spheres cultured from human fetal retina // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006. V. 142. № 1. P. 9
- Altman J., Das G.D.* Post-natal origin of microneurons in the rat brain // *Nature.* 1965. V. 207. № 5000. P. 953–956.
- Altman J.* Autoradiographic and histological studies of post-natal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats // *J. Comp. Neurol.* 1969. V. 136. № 3. P. 269–293.
- Anderson S.A., Marín O., Horn C. et al.* Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences // *Development.* 2001. V. 128. P. 353–363.
- Avior Y., Sagi I., Benvenisty N.* Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2016. V. 17. № 3. P. 10–82.
- Bagley J.A., Reumann D., Bian S. et al.* Fused cerebral organoids model interactions between brain regions // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. № 7. P. 743–751.
- Barber M., Pierani A.* Tangential migration of glutamatergic neurons and cortical patterning during development: Lessons from Cajal-Retzius cells // *Dev. Neurobiol.* 2016. V. 76. № 8. P. 847–881.
- Bejoy J., Yuan X, Song L. et al.* Genomics analysis of metabolic pathways of human stem cell-derived microglia-like cells and the integrated cortical spheroids // *Stem. Cells. Int.* 2019. V. 18: 2382534.
- Bershteyn M., Kriegstein A.R.* Cerebral organoids in a dish: progress and prospects // *Cell.* 2013. V. 155. № 1. P. 19–20.
- Bershteyn M., Nowakowski T.J., Pollen A.A. et al.* Human iPSC-derived cerebral organoids model cellular features of lissencephaly and reveal prolonged mitosis of outer radial glia // *Cell Stem. Cell.* 2017. V. 20. № 4. P. 435–449.e4.
- Bertacchi M., Pandolfini L., D’Onofrio M. et al.* The double inhibition of endogenously produced BMP and Wnt factors synergistically triggers dorsal telencephalic differentiation of mouse ES cells // *Dev. Neurobiol.* 2015. V. 75. № 1. P. 66–79.
- Birey F., Andersen J., Makinson C.D. et al.* Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids // *Nature.* 2017. V. 545. № 7652. P. 54–59.
- Camp J.G., Badsha F., Florio M. et al.* Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 51. P. 15672–15677.
- Campbell K., Götz M.* Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development // *Trends of Neurosci.* 2002. V. 25. № 5. P. 235–238.
- Carpenter M.K., Cui X., Hu Z.Y. et al.* In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells // *Exp. Neurol.* 1999. V. 158. № 2. P. 265–278.
- Cavanaugh M.W.* Neuron development from trypsin-dissociated cells of differentiated spinal cord of the chick embryo // *Exp. Cell. Res.* 1955. V. 9. № 1. P. 42–48.
- Chambers S.M., Fasano C.A., Papapetrou E.P. et al.* Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. № 3. P. 275–280.
- Chambers J.M., McKee R.A., Drummond B.E. et al.* Evolving technology: creating kidney organoids from stem cells // *AIMS Bioeng.* 2016. V. 3. № 3. P. 305–318.
- Chen H.I., Song H., Ming G.L.* Applications of human brain organoids to clinical problems // *Dev. Dyn.* 2019. V. 248. № 1. P. 53–64.
- Chhibber T., Bagchi S., Lahooti B. et al.* CNS organoids: an innovative tool for neurological disease modeling and drug neurotoxicity screening // *Drug. Discov. Today.* 2020. V. 25. № 2. P. 456–465.
- Chichagova V., Dorgau B., Felemban M. et al.* Differentiation of retinal organoids from human pluripotent stem cells // *Curr. Protoc. Stem. Cell. Biol.* 2019. V. 50. № 1:e95.

- Cullen D.K., Gordián-Vélez W.J., Struzyna L.A. et al. Bundled three-dimensional human axon tracts derived from brain organoids // *i Science*. 2019. № 21. P. 57–67.
- Curchoe C.L., Russo J., Terskikh A.V. hESC derived neuroepithelial rosettes recapitulate early mammalian neurulation events; an in vitro model // *Stem. Cell. Res.* 2012. V. 8. № 2. P. 239–246.
- Dakic V., Minardi Nascimento J., Costa Sartore R. et al. Short term changes in the proteome of human cerebral organoids induced by 5-MeO-DMT // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 12863.
- Dang J., Tiwari S.K., Agrawal K. et al. Glial cell diversity and methamphetamine-induced neuroinflammation in human cerebral organoids // *Mol. Psychiatry*. 2020. Feb 12. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0676-x>
- Daviaud N., Friedel R.H., Zou H. Vascularization and engraftment of transplanted human cerebral organoids in mouse cortex // *eNeuro*. 2018. V. 5. № 6. pii: ENEURO.0219-18.2018.
- Driggers R.W., Ho C.Y., Korhonen E.M., et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities // *N. Engl. J. Med.* 2016. V. 374. № 22. P. 2142–2151.
- Durens M., Nestor J., Williams M. et al. High-throughput screening of human induced pluripotent stem cell-derived brain organoids // *J. Neuro Sci. Methods*. 2020. Feb. 4:108627.
- Edri R., Yaffe Y., Ziller M.J. et al. Analysing human neural stem cell ontogeny by consecutive isolation of Notch active neural progenitors // *Nat. Commun.* 2015. Mar. 23; 6:6500.
- Eiraku M., Watanabe K., Matsuo-Takasaki M. et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals // *Cell. Stem. Cell.* 2008. V. 3. № 5. P. 519–532.
- Eiraku M., Takata N., Ishibashi H. et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture // *Nature*. 2011. V. 472. № 7341. P. 51–56.
- Elkabetz Y., Studer L. Human ESC-derived neural rosettes and neural stem cell progression // *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 2008. № 73. P. 377–387.
- Eremeev A.V., Volovikov E.A., Shuvalova L.D. et al. “Necessity is the mother of invention” or inexpensive, reliable, and reproducible protocol for generating organoids // *Biochemistry (Mosc)*. 2019. V. 84. № 3. P. 321–328.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
- Faravelli I., Costamagna G., Tamanini S. et al. Back to the origins: Human brain organoids to investigate neurodegeneration // *Brain Res.* 2020. Jan. 15; 1727:146561.
- Faustino Martins J.M., Fischer C., Urzi A. et al. Self-organizing 3D human trunk neuromuscular organoids // *Cell. Stem. Cell.* 2020. V. 26. № 2. P. 172–186.
- Fietz S.A., Huttner W.B. Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis—a polarized perspective // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011. V. 21. № 1. P. 23–35.
- Florio M., Albert M., Taverna E. et al. Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion // *Science*. 2015. № 347. P. 470.
- Florio M., Heide M., Pinson A. et al. Evolution and cell-type specificity of human-specific genes preferentially expressed in progenitors of fetal neocortex // *Elife*. 2018. Mar. 21. 7. pii: e32332.
- Gerrard L., Rodgers L., Cui W. Differentiation human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling // *Stem Cells*. 2005. Oct.; 23(9): 1234–1241.
- Giandomenico S.L., Lancaster M.A. Probing human brain evolution and development in organoids // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2017. V. 44. P. 36–43.
- Gonzalez C., Armijo E., Bravo-Alegria J. et al. Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids // *Mol. Psychiatry*. 2018. V. 23. № 12. P. 2363–2374.
- Ham O., Jin Y.B., Kim J. et al. Blood vessel formation in cerebral organoids formed from human embryonic stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 521. № 1. P. 84–90.
- Hansen D.V., Lui J.H., Parker P.R. et al. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex // *Nature*. 2010. V. 464. № 7288. P. 554–561.
- Harbuzariu A., Pitts S., Cespedes J.C. et al. Modelling heme-mediated brain injury associated with cerebral malaria in human brain cortical organoids // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 19162.
- Harding A., Cortez-Toledo E., Magner N.L. et al. Highly efficient differentiation of endothelial cells from pluripotent stem cells requires the MAPK and the PI3K pathways // *Stem. Cells*. 2017. V. 35. № 4. P. 909–919.
- Harrison R.G. Observations of the living developing nerve fiber // *Anat. Rec.* 1907. V. 1. № 5. P. 116–128.
- Heide M., Huttner W.B., Mora-Bermúdez F. Brain organoids as models to study human neocortex development and evolution // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2018. № 55. P. 8–16.
- He Z., Han D., Efimova O. et al. Comprehensive transcriptome analysis of neocortical layers in humans, chimpanzees and macaques // *Nat. Neurosci.* 2017. V. 20. № 6. P. 886–895.
- Hogue M.J. Tissue cultures of the brain; intercellular granules // *J. Comp. Neurol.* 1946. V. 85. № 3. P. 519–530.
- Homem C.C., Repic M., Knoblich J.A. Proliferation control in neural stem and progenitor cells // *Nat. Rev. Neurosci.* 2015. V. 16. № 11. P. 647–659.
- Hong Y.J., Do J.T. Neural lineage differentiation from pluripotent stem cells to mimic human brain tissues // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019. Dec. 6. 7: 400.
- Hyun I., Scharf-Deering J.C., Lunshof J.E. Ethical issues related to brain organoid research // *Brain Res.* 2020. Feb. 1: 146653.
- Itsykson P., Ilouz N., Turetsky T. et al. Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin // *Mol. Cell. Neurosci.* 2005. V. 30. P. 24–36.
- Jo J., Xiao Y., Sun A.X. et al. Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons // *Cell. Stem. Cell.* 2016. V. 19. № 2. P. 248–257.
- Kanton S., Boyle M.J., He Z. et al. Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development // *Nature*. 2019. V. 574. № 7778. P. 418–422.

- Kadoshima T., Sakaguchi H., Nakano T. et al.* 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.* 2013. V. 110. № 50. P. 20284–20289.
- Knight G.T., Lundin B.F., Iyer N. et al.* Engineering induction of singular neural rosette emergence within hPSC-derived tissues // *Elife.* 2018. Oct. 29; 7. pii: e37549.
- Koo B., Choi B., Park H. et al.* Past, present, and future of brain organoid technology // *Mol. Cells.* 2019. V. 42. № 9. P. 617–627.
- Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A. et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly // *Nature.* 2013. V. 501. № 7467. P. 373–379.
- Lancaster M.A., Corsini N.S., Wolfinger S. et al.* Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids // *Nat. Biotechnol.* 2017. V. 35. № 7. P. 659–666.
- Lancaster M.A., Knoblich J.A.* Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. № 10. P. 2329–2340.
- Lehtinen M.K., Zappaterra M.W., Chen X. et al.* The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells // *Neuron.* 2011. V. 69. № 5. P. 893–905.
- Luo C., Lancaster M.A., Castanon R. et al.* Cerebral organoids recapitulate epigenomic signatures of the human fetal brain // *Cell Rep.* 2016. V. 17. № 12. P. 3369–3384.
- Lui J.H., Hansen D.V., Kriegstein A.R.* Development and evolution of the human neocortex // *Cell.* 2011. V. 146. № 1. P. 18–36.
- Mak I.W., Evaniew N., Ghert M.* Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment // *Am. J. Transl. Res.* 2014. V. 6. P. 114–118.
- Mansour A.A.F., Gonçalves J.T., Bloyd C.W. et al.* An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 36. P. 432–441.
- Mariani J., Simonini M.V., Palejev D. et al.* Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 31. P. 12770–12775.
- Marotta N., Kim S., Krainc D.* Organoid and pluripotent stem cells in Parkinson's disease modeling: an expert view on their value to drug discovery // *Expert Opin. Drug. Discov.* 2020. Jan. 3. P. 1–15.
- Marshall J.J., Mason J.O.* Mouse vs man: Organoid models of brain development & disease // *Brain Res.* 2019. Dec. 1; 1724: 146427.
- Marton R.M., Paşca S.P.* Neural differentiation in the third dimension: Generating a human midbrain // *Cell. Stem. Cell.* 2016. V. 19. № 2. P. 145–146.
- Megraw T.L., Sharkey J.T., Nowakowski R.S.* Cdk5rap2 exposes the centrosomal root of microcephaly syndromes // *Trends Cell Biol.* 2011. V. 21. № 8. P. 470–480.
- Miller J.D., Ganat Y.M., Kishinevsky S. et al.* Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging // *Cell. Stem. Cell.* 2013. V. 13. № 6. P. 691–705.
- Mlakar J., Korva M., Tul N. et al.* Zika virus associated with microcephaly // *N. Engl. J. Med.* 2016. V. 374. № 10. P. 951–958.
- Moscona A.* Effect of temperature on adhesion to glass and histogenetic cohesion of dissociated cells // *Nature.* 1961. V. 190. P. 408–409.
- Monzel A.S., Smits L.M., Hemmer K. et al.* Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells // *Stem. Cell. Reports.* 2017. V. 8. № 5. P. 1144–1154.
- Mostajo-Radji M.A., Schmitz M.T., Montoya S.T. et al.* Reverse engineering human brain evolution using organoid models // *Brain. Res.* 2019. Feb. 15; 1729: 146582.
- Muñoz-Sanjuán I., Brivanlou A.H.* Neural induction, the default model and embryonic stem cells // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. P. 271–280.
- Muotri A.R.* Brain organoids and insights on human evolution // *F1000Res.* 2019. May 30;8. pii: F1000 Faculty Rev-760.
- Nascimento J.M., Saia-Cereda V.M., Sartore R.C. et al.* Human cerebral organoids and fetal brain tissue share proteomic similarities // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2019. Nov. 28. 7: 303.
- Nowakowski T.J., Rani N., Golkaram M. et al.* Regulation of cell-type-specific transcriptomes by microRNA networks during human brain development // *Nat. Neurosci.* 2018. V. 21. № 12. P. 1784–1792.
- Nzou G., Wicks R.T., Wicks E.E. et al.* Human cortex spheroid with a functional blood brain barrier for high-throughput neurotoxicity screening and disease modeling // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 7413.
- Oberheim N.A., Takano T., Han X. et al.* Uniquely hominid features of adult human astrocytes // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 10. P. 3276–3287.
- Ormel P.R., Vieira de Sá R., van Bodegraven E.J. et al.* Microglia innately develop within cerebral organoids // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4167.
- Otani T., Marchetto M.C., Gage F.H. et al.* 2D and 3D stem cell models of primate cortical development identify species-specific differences in progenitor behavior contributing to brain size // *Cell. Stem. Cell.* 2016. V. 18. № 4. P. 467–480.
- Pacitti D., Privolizzi R., Bax B.E.* Organs to cells and cells to organoids: the evolution of in vitro central nervous system modelling // *Front. Cell. Neurosci.* 2019. Apr. 9. V. 13. P. 129.
- Pamies D., Hartung T., Hogberg H.T.* Biological and medical applications of a brain-on-a-chip // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2014. V. 239. № 9. P. 1096–1107.
- Paşca A.M., Sloan S.A., Clarke L.E. et al.* Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. № 7. P. 671–678.
- Podgornyi O.V., Poltavtseva R.A., Marei M.V. et al.* Formation of neuroepithelial structures in culture of neural stem cells from human brain // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005. V. 140. № 1. P. 113–117.
- Prodromidou K., Matsas R.* Species-specific miRNAs in human brain development and disease // *Front. Cell. Neurosci.* 2019. Dec. 18; 13: 559.
- Perrin S.* Preclinical research: make mouse studies work // *Nature.* 2014. V. 507. P. 423–425.

- Pham M.T., Pollock K.M., Rose M.D. et al. Generation of human vascularized brain organoids // *Neuroreport*. 2018. V. 29. № 7. P. 588–593.
- Pollen A.A., Nowakowski T.J., Chen J. et al. Molecular identity of human outer radial glia during cortical development // *Cell*. 2015. V. 163. № 1. P. 55–67.
- Pollen A.A., Bhaduri A., Andrews M.G. et al. Establishing cerebral organoids as models of human-specific brain evolution // *Cell*. 2019. V. 176. № 4. P. 743–756.e17.
- Pothayee N., Maric D., Sharer K. et al. Neural precursor cells form integrated brain-like tissue when implanted into rat cerebrospinal fluid // *Commun. Biol.* 2018. Aug. 14. № 1. P. 114.
- Qian X., Nguyen H.N., Song M.M. et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure // *Cell*. 2016. V. 165. № 5. P. 1238–1254.
- Qian X., Nguyen H.N., Jacob F. et al. Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly // *Development*. 2017. V. 144. № 6. P. 952–957.
- Qian X., Jacob F., Song M.M. et al. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor // *Nat. Protoc.* 2018. V. 13. № 3. P. 565–580.
- Qian X., Song H., Ming G.L. Brain organoids: advances, applications and challenges // *Development*. 2019. V. 146. № 8. pii: dev166074.
- Quadrato G., Nguyen T., Macosko E.Z. et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids // *Nature*. 2017. V. 545. № 7652. P. 48–53.
- Ranga A., Girgin M., Meinhardt A. et al. Neural tube morphogenesis in synthetic 3D microenvironments // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 44. E6831–E6839.
- Raja W.K., Mungenast A.E., Lin Y.T. et al. Self-organizing 3D human neural tissue derived from induced pluripotent stem cells recapitulate Alzheimer's disease phenotypes // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 9. e0161969.
- Reynolds B.A., Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell // *Dev. Biol.* 1996. V. 175. № 1. P. 1–13.
- Sakaguchi H., Kadoshima T., Soen M. et al. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. № 8896.
- Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture // *Cell. Stem. Cell*. 2013. V. 12. № 5. P. 520–530.
- Seo J., Kritskiy O., Watson L.A. et al. Inhibition of p25/Cdk5 attenuates tauopathy in mouse and iPSC models of frontotemporal dementia // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. № 4. P. 9917–9924.
- Simian M., Bissell M.J. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions // *J. Cell. Biol.* 2017. V. 216. № 1. P. 31–40.
- Shen Q., Goderie S.K., Jin L. et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells // *Science*. 2004. V. 304. № 5675. P. 1338–1340.
- Sloan S.A., Darmanis S., Huber N., Khan T.A. et al. Human astrocyte maturation captured in 3D cerebral cortical spheroids derived from pluripotent stem cells // *Neuron*. 2017. V. 95. № 4. P. 779–790.e6.
- Smukler S.R., Runciman S.B., Xu S. et al. Embryonic stem cells assume a primitive neural stem cell fate in the absence of extrinsic influences // *J. Cell. Biol.* 2006. V. 172. P. 79–90.
- Sousa A.M.M., Meyer K.A., Santpere G. et al. Evolution of the human nervous system function, structure, and development // *Cell*. 2017. V. 170. P. 226–247.
- Sun A.X., Ng H.H., Tan E.K. Translational potential of human brain organoids // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2018. V. 5. № 2. P. 226–235.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
- Taverna E., Götz M., Huttner W.B. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2014. V. 30. P. 465–502.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Todd G.K., Boosalis C.A., Burzycki A.A. et al. Towards neuronal organoids: a method for long-term culturing of high-density hippocampal neurons // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 4. e58996.
- Trevino A.E., Sinnott-Armstrong N., Andersen J. et al. Chromatin accessibility dynamics in a model of human forebrain development // *Science*. 2020. V. 367. № 6476. pii: eaay164.
- Tropepe V., Hitoshi S., Sirard C. et al. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: A primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism // *Neuron*. 2001. V. 30. P. 65–78.
- Vescovi A.L., Parati E.A., Gritti A. et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation // *Exp. Neurol.* 1999. V. 156. № 1. P. 71–83.
- Wang S.N., Wang Z., Xu T.Y. et al. Cerebral organoids repair ischemic stroke brain injury // *Transl Stroke Res*. 2019. Dec. 30.
- Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A. et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 3. P. 288–296.
- Winanto, Khong Z.J., Hor J.H. et al. Spinal cord organoids add an extra dimension to traditional motor neuron cultures // *Neural. Regen. Res*. 2019. V. 14. № 9. P. 1515–1516.
- Xiang Y., Tanaka Y., Patterson B. et al. Fusion of regionally specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration // *Cell Stem Cell*. 2017. V. 21. № 3. P. 383–398.e7.
- Xu R., Brawner A.T., Li S., Liu J.J. et al. OLIG2 drives abnormal neurodevelopmental phenotypes in human iPSC-based organoid and chimeric mouse models of down syndrome // *Cell Stem Cell*. 2019. V. 24. № 6. P. 908–926.e8.

- Yakoub A.M., Sadek M.* Development and characterization of human cerebral organoids: An optimized protocol // *Cell Transplant.* 2018. V. 27. № 3. P. 393–406.
- Yakoub A.M., Sadek M.* Analysis of synapses in cerebral organoids // *Cell Transplant.* 2019. V. 28. № 9–10. P. 1173–1182.
- Yakoub A.M.* Cerebral organoids exhibit mature neurons and astrocytes and recapitulate electrophysiological activity of the human brain // *Neural. Regen. Res.* 2019. V. 14. № 5. P. 757–761.
- Yin X., Mead B.E., Safaei H. et al.* Engineering stem cell organoids // *Cell Stem. Cell.* 2016. V. 18. № 1. P. 25–38.
- Ying Q.L., Stavridis M., Griffiths D. et al.* Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 2. P. 183–186.
- Zhang S.C., Wernig M., Duncan I.D. et al.* In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 1129–1133.
- Ziller M.J., Edri R., Yaffe Y. et al.* Dissecting neural differentiation regulatory networks through epigenetic footprinting // *Nature.* 2015. V. 518. № 7539. P. 355–359.
- Ziv O., Zaritsky A., Yaffe Y. et al.* Quantitative live imaging of human embryonic stem cell derived neural rosettes reveals structure-function dynamics coupled to cortical development // *PLoS. Comput. Biol.* 2015. V. 11. № 10. e1004453.

Cerebral Organoids: Brain Development Model

K. K. Sukhinich^{1, *} and M. A. Aleksandrova¹

¹*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russian*

**e-mail: transpl@hotmail.com*

At the moment, the development of the human brain in normal and pathological conditions cannot be fully reproduced in animal models, which leads to the necessity to search for alternative solutions. In recent years, significant successes have been achieved in the development of methods of culturing of the human brain cerebral organoids. Cerebral organoids are 3D cultures in which brain-specific cell types develop from embryonic or induced pluripotent stem cells. In cerebral organoids, due to self-organization of nervous tissue, unique features of the development of the human brain are reproduced, which are absent in the developing brain of rodents. However, they are not an exact copy, therefore, overcoming a number of restrictions will expand our ability to study the development and disorders of the human brain in the future. Obviously, modeling of cerebral organoids is already opening up prospects for both basic and clinical research. In this review, we discuss methods of nerve tissue culturing, production methods of cerebral organoids, features of their self-organization, modeling of normal development processes and brain pathology.

Keywords: cerebral organoids, 3D cultures, brain development, neurogenesis, human radial glia