

Stanisław Surma, Marcin Adamczak

Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Możliwości zastosowania organoidów w leczeniu chorób nerek

Possibilities of using organoids in the treatment of kidney diseases

ABSTRACT

Kidney transplantation is the most effective method of renal replacement therapy. The constantly increasing number of patients awaiting kidney transplantation as compared to the number of potential donors means that other solutions are sought than a transplantation from a deceased or living human donor. Kidney organoids are among the methods that hopes for the future. Kidney organoids are three-dimensional structures whose anatomical structure and functional properties reflect some aspects of kidney structure and function *in vivo*. The beginning of research on kidney organoids dates back to the 1950s.

Three reasons justify research on kidney organoids. Kidney organoids can be used to study kidney development. With the help of organoids it will be possible to study congenital and acquired kidney diseases. Organoids may also become functional kidney-like organs used in the treatment of patients with end-stage kidney disease.

To date, methods have been developed for producing kidney organoids from mouse fetal cells and from human pluripotent stem cells.

Forum Nefrol 2020, vol 13, no 2, 69–74

Key words: kidney organoids, nephrogenesis, human pluripotent stem cells, kidney diseases

WSTĘP

Przeszczepienie nerki jest najskuteczniejszą metodą leczenia nerkozastępczego. Transplantacja nerki wydłuża życie chorego (u chorego w wieku 18–34 lat z 6,7 roku w programie hemodializ do 18 lat po przeszczepieniu nerki), a także zmniejsza koszty leczenia (z 39 000 USD/rok w programie hemodializ do 16 600 USD/rok w pierwszym roku po przeszczepieniu nerki) [1]. Najistotniejszą barierą w rozwoju transplantologii jest globalny niedobór organów do allotransplantacji. W Stanach Zjednoczonych w 2015 roku było 124 000 chorych oczekujących na przeszczepienie nerki. W tym samym roku przeprowadzono 16 291 zabiegów transplantacji nerki. Czas oczekiwania na przeszczepienie nerki od dawcy zmarłego wynosił ok. 5 lat [1].

Stale rosnąca liczba chorych oczekujących na przeszczepienie nerki w porównaniu z liczbą dawców sprawia, że poszukuje się innych rozwiązań niż przeszczepienie od dawcy ludzkiego — zmarłego lub żywego. Do metod, w których pokłada się nadzieje, należy zastosowanie organoidów nerkowych [2].

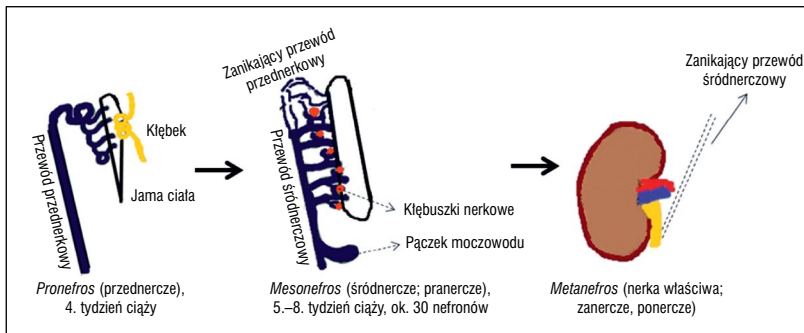
NEFROGENEZA

Organogeneza nerek jest procesem złożonym i wieloetapowym [3]. W nefrogenzie uczestniczą nefrogenne komórki progenitorowe, komórki pączka moczowodowego oraz płodowe komórki zrębu [4]. U człowieka, podobnie jak u innych ssaków, podczas rozwoju płodowego powstaje przednercze, następnie śródnercze, a w końcu nerka właściwa (ryc. 1). Wszystkie trzy typy nerek rozwijają się kolejno,

►► Organogeneza nerek jest procesem złożonym i wieloetapowym ◀◀

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Marcin Adamczak
Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Francuska 20–24, 40–027 Katowice
tel.: 32 255 26 95
e-mail: madamczak1@op.pl



Rycina 1. Nefrogeneza

jeden po drugim. Nerka nowego typu powstaje z tyłu za poprzednią od okolicy szyjnej do ogonowej zarodka [3].

Przednercze (*pronefros*) pojawia się w 4. tygodniu życia płodowego. Sznur nerkotwórczy dzieli się na nefrotomy, z których rozwijają się pęcherzyki. Wzrost pęcherzyków kończy się powstaniem kanalików tworzących przewód przednerczowy. U ssaków przednercze nie pełni funkcji wydalniczych i zanika, nie pozostawiając po sobie żadnych narządów szczątkowych [5, 6].

Śródniercze (*mesonefros*) ssaków rozwija się z regionu mezodermalnego, zwanego strefą aorta–gonada–śródniercze (AGM, *aorta-gonad-mesonefros*), mniej więcej w 5. tygodniu życia płodowego. Strefa AGM uczestniczy w rozwoju aorty i gonad, ale stanowi także źródło krwiotwórczych komórek macierzystych [7]. Organogeneza śródniercza jest inicjowana, gdy przewód przednerczowy osiągnie odpowiednią dojrzałość i pobudza sąsiednie komórki mezenchymalne do wzrostu. Zjawiska te przyczyniają się do powstania kanalików śródnierczowych o esowatych kształtach. Do jednego bieguna kanalika wnika pętla naczyniowa pochodząca z aorty, w wyniku czego tworzy się kłębuszek. Przeciwny koniec kanalika śródnierczowego ulega połączeniu z przewodem śródniercza (przewód Wolffa) [8]. W 8. tygodniu od zapłodnienia śródniercze osiąga maksymalny rozmiar i zaczyna ulegać stopniowemu zanikowi [9, 10]. U człowieka do czasu powstania nerki ostatecznej śródniercze spełnia rolę nerki zastępczej. Kłębuszki śródniercza są większe od kłębuszków nerki ostatecznej, ale jest ich o wiele mniej (10–50 na nerkę) [6]. Ostatecznie, kanaliki śródnierczowe zaczynają ulegać zanikowi, co prowadzi do całkowitego zaniku tego narządu u kobiet. W zarodkach męskich kanaliki śródniercza, które pozostały, stają się przewodami odprowadzającymi jądra, a prze-

wód śródniercza przekształca się w przewód najądrza i przewód wytryskowy [11].

Rozwój nerki ostatecznej (*metanefros*) u człowieka zachodzi na drodze szeregu zmian, w trakcie których osiąga ona swoją dojrzałość morfologiczną i czynnościową [12]. Nerka ostateczna powstaje z dwóch zawiązków mezodermalnych: pączka moczowodowego oraz mezodermi nerki ostatecznej. Pączek moczowodowy jest uwypukleniem grzbietowym, które odchodzi od przewodu śródnierczowego (przewodu Wolffa) w pobliżu jego ujścia do steku. W okolicach 5. tygodnia życia płodowego pączek moczowodowy wnika do mezodermi dolnej części sznura nerkotwórczego i pobudza ją do szybkiego rozmnażania. W efekcie dochodzi do powstania czapeczki nad pączkiem moczowodowym [13]. W wyniku przekształceń pączka moczowodowego powstają drogi wyprowadzające moc: moczowody, miedniczki nerkowe, mniejsze i większe kielichy nerkowe, przewody brodawkowe, a także kanaliki zbiorcze. Szypuła pączka moczowodowego ulega przekształceniu w moczowód. Ślepo zakończony biegun pączka moczowodowego, który jest zatopiony w mezodermie nerki ostatecznej, ulega licznym podziałom. W ich efekcie powstaje 13 generacji podziałów kielichów zbiorczych. Z pierwszych 4 powstają kielichy większe, z następnych 4 — kielichy mniejsze. Pozostałe odgałęzienia tworzą przewody brodawkowe i kanaliki zbiorcze. Część komórek czapeczki pokrywającej pączek moczowodowy tworzy po każdej stronie kanalika pęcherzyki nerki ostatecznej, zwane sferoidami. Przekształcenia sferoidu prowadzą do powstania nefronu [13, 14]. W odcinku bliższym kanalika nefronu powstaje torebka Bowmana. Do torebki Bowmana wnikają następnie naczynia krwionośne, w wyniku czego wytworzony zostaje kłębuszek nerkowy. Mniej więcej w 8. tygodniu życia płodowego dochodzi do połączenia dystalnej części kanalika z kanalikiem zbiorczym [10] (ryc. 2).

Pomiędzy 13. a 15. tygodniem życia płodowego w pełni wykształconych jest około 20% nefronów. W trakcie dalszego rozwoju prenatalnego liczba nefronów ulega stopniowemu zwiększaniu, aż do momentu porodu [15].

ORGANOIDY NERKOWE

Organoidy to trójwymiarowe struktury o wielkości rzędu mikrometrów lub milimetrów, które otrzymuje się w warunkach *in vitro* w wyniku samoorganizacji komórek macierzy-

►►Organoidy to trójwymiarowe struktury o wielkości rzędu mikrometrów lub milimetrów, które otrzymuje się w warunkach *in vitro*◄◄

stych, których budowa anatomiczna i właściwości funkcjonalne odzwierciedlają niektóre aspekty budowy i czynności organów w warunkach *in vivo* [16]. Początek badań na organoidami nerkowymi datuje się na lata 50. XX wieku [17].

Istnieje kilka powodów, które uzasadniają przeprowadzenie badań nad organoidami nerkowymi. Mogą one mianowicie zostać wykorzystane do badań nad rozwojem nerek. Przy pomocy organoidów będzie można badać wrodzone i nabyte choroby nerek. Organoidy mogą się również stać funkcjonalnymi narządami nerkopodobnymi, wykorzystywanymi w leczeniu chorych ze schyłkową niewydolnością nerek [17].

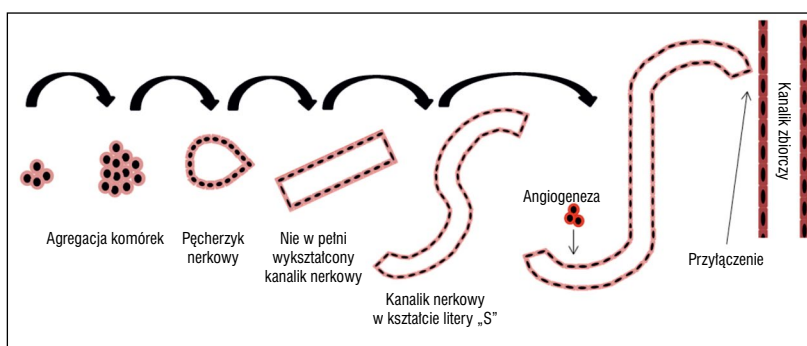
Dotychczas opracowano metody wytwarzania organoidów nerkowych z komórek płodu myszy oraz ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych (hPSCs, *human pluripotent stem cells*) [16].

Podobnie jak w przypadku innych narządów, dla których do tej pory opracowano odpowiadające im organoidy, dowody na to, że tkanka nerek może być zdolna do samoorganizacji, pochodzą z badań dotyczących ponownej agregacji komórek pozyskanych z płodowej nerkę piskląt [18].

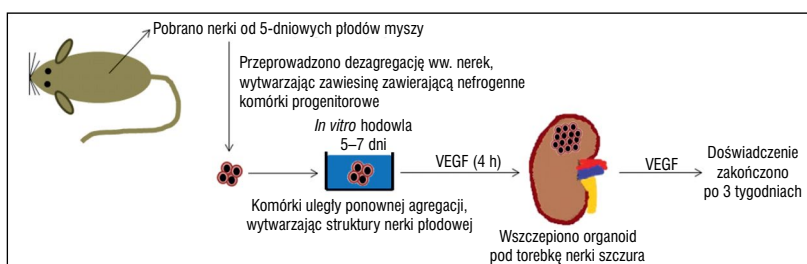
ORGANOIDY NERKOWE WYTWORZONE Z KOMÓREK PŁODU MYSZY

Efektywna metoda wytworzenia organoidów nerkowych powinna zapewniać: izolowanie lub generowanie komórek macierzystych zdolnych do wytworzenia struktury przypominającej nerkę, hodowanie zawiesiny tych komórek oraz wszczepienie uzyskanego organoidu do nerkę gospodarza [17].

Xinaris i wsp. opracowali metodę wszczepiania *in vivo* organoidów nerkowych uzyskanych w hodowli mysich nefrogennych komórek progenitorowych. Badanie tych autorów miało na celu wskazanie odpowiedzi na pytanie, czy zawiesiny jednokomórkowe mogą wytwarzać zarówno kłębuszki nerkowe zdolne do filtrowania krwi, jak i kanaliki nerkowe, w których zachodzą zjawiska sekrecji i reabsorpcji. Celem tego badania była również ocena, czy i w jaki sposób organoidy ulegną integracji z nerką gospodarza. Biorcą wszczepu był szczur po tymektomii [19]. Otrzymane organoidy nerkowe powstały z nefrogennych komórek progenitorowych. Od 5-dniowych mysich płodów pobrano nerki, które następnie poddano procesowi dezagregacji, wytwarzając w ten sposób zawiesinę za-



Rycina 2. Powstawanie nefronu



Rycina 3. Wytwarzanie organoidów nerkowych z nefrogennych komórek progenitorowych, pochodzących z płodowych nerek myszy. Na podstawie [19]. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) — czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

wierającą nefrogenne komórki progenitorowe. Po 3 dniach hodowli *in vitro* utworzyły się struktury nerkę płodowej (pęcherzyki, kanaliki S), cechujące się typową morfologią nerkę rozwijającej się w warunkach *in vivo* (ryc. 3).

W dalszym etapie doświadczenia otrzymane organoidy nerkowe wszczepiono pod torebkę nerkę biorcy, tj. szczura (ryc. 3). Przeżywalność wszczepionych organoidów zależała od liczby tworzących je komórek. Pięciodniowe organoidy zbudowane z zaledwie 10^5 komórek nie przetrwały. Organoidy zbudowane z $3,5-4 \times 10^5$ komórek w ponad 90% wszczepów przeżyły i zwiększyły rozmiary *in vivo*. Badania histologiczne i histochemiczne wykazały, że organoidy nerkowe w nerkach biorcy były zbudowane głównie z kanalików proksymalnych i mało zróżnicowanych struktur kłębuszków nerkowych (stwierdzono występowanie synaptopodiny — białka podocytów). Jednak kłębuszki były nieliczne i rozproszone. Stwierdzono upośledzenie glomerulogenezy. Zastosowanie podawanego parenteralnie biorcy wszczepów czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) przez 3 tygodnie od wszczepienia organoidów doprowadziło do ich unaczynienia oraz pobudziło rozwój kłębuszków nerkowych.

▶▶ Dotychczas opracowano metody wytwarzania organoidów nerkowych z komórek płodu myszy oraz ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych ◀◀

►► Obecnie organoidy nerkowe nie mogą być wykorzystywane do leczenia chorób nerek◀◀

Ekspresję genu erytropoetyny (EPO) zaobserwowano w organoidach wszczepionych do nerki szczura z niedokrwistością. W celu oceny zdolności do filtracji kłębuszkowej oraz reabsorpcji kanalikowej biorcy podano dożylnie FITC-dextran (fluoresceina w połączeniu z dextranem) na 30 minut przed eutanazją. Stwierdzono, że w organoidach zachodziła filtracja kłębuszkowa oraz reabsorpcja kanalikowa FITC-dextranu.

Mimo wykazania czynności fizjologicznej komórek organoidów stwierdzono, że ich nefrony nie tworzą uporządkowanych struktur.

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że z zawiesiny zawierającej nefrogenne komórki progenitorowe można wytworzyć organoidy nerkowe, które po wszczepieniu do nerki gospodarza będą ulegać dalszemu zróżnicowaniu. Po wszczepieniu do nerki gospodarza organoidy nerkowe ulegały unaczynieniu. Stwierdzono, że w uzyskanych organoidach nerkowych zachodziły zjawiska filtracji kłębuszkowej, reabsorpcji kanalikowej i wytwarzania erytropoetyny [19].

W kolejnym badaniu w celu wytworzenia organoidów nerkowych o bardziej uporządkowanej strukturze dokonano izolacji z płodów myszy nefrogennych komórek progenitorowych oraz komórek pączka moczowodowego. Wyizolowane komórki wraz z płodowymi mysimi komórkami zrębu poddano ponownej agregacji, wytwarzając organoidy. Otrzymane organoidy cechowały się uporządkowaną strukturą nefronów i występowaniem kanalik zbiorczego. Następnie organoidy wszczepiono do nerki myszy. Mimo że otrzymane organoidy charakteryzowały się uporządkowaną strukturą, ich kanaliki zbiorcze nie uległy połączeniu z układem wydalniczym gospodarza [20].

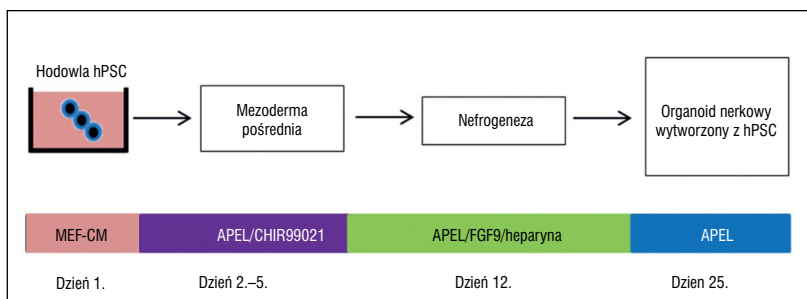
ORGANOIDY NERKOWE WYTWORZONE Z LUDZKICH PLURIPOTENCJALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Opracowano procedury umożliwiające wytworzenie organoidów z ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych, które mogą być pozyskiwane przez generowanie indukowanych ludzkich komórek pluripotencjalnych otrzymywanych przez odróżnicowanie zróżnicowanych komórek ludzkich (ihPSC, *induced human pluripotential stem cells*), na przykład z fibroblastów. Kolejnym etapem w wytwarzaniu organoidów nerkowych z hPSC jest ich ukierunkowanie, tak by różnicowały się do komórek mezodermy pośredniej. Z mezodermy pośredniej powstają nefrogenne komórki progenitorowe, które mogą być utrzymywane w hodowli dwuwymiarowej, gdzie z czasem tworzą rozgałęzione struktury (kanaliki nerkowe, prymitywne nefrony). Alternatywnie, nefrogenne komórki progenitorowe pochodzące z hPSC można rozdzielić i wysiać w postaci hodowli trójwymiarowej, w której się różnicują, tworząc kanaliki i kłębuszki nerkowe. Trzecią możliwością stanowi wszczepienie zawiesiny nefrogennych komórek progenitorowych pod skórę myszy z niedoborem odporności, gdzie komórki ludzkie przeżywają co najmniej kilka miesięcy i tworzą unaczynione kłębuszki. Kłębuszki te zawierają bardziej zróżnicowane błony podstawne niż kłębuszki w hodowli *in vitro*. Podobny wynik można uzyskać po wszczepieniu organoidów nerkowych pochodzących z hPSC pod torebkę nerkową u myszy z niedoborem odporności [17].

Takasato i wsp. opracowali metodę wytwarzania organoidów nerkowych z hPSC. W celu uzyskania hPSC wykorzystano ludzkie embrionalne komórki macierzyste (co budzi istotne wątpliwości etyczne). Hodowlę prowadzono przy użyciu odpowiednich podłoży, uzyskując w efekcie — po 25 dniach doświadczenia — organoidy nerkowe powstałe z hPSC (ryc. 4) [21].

Wykazano, że organoidy nerkowe otrzymane z hPSC po wszczepieniu pod torebkę nerki myszy ulegają unaczynieniu [22].

Kaminski i wsp. opracowali metodę wytwarzania indukowanych komórek nabłonkowych kanalików nerkowych (iRECs, *induced renal tubular epithelial cells*) z ludzkich i mysich fibroblastów, które mogą posłużyć do tworzenia organoidów nerkowych (ryc. 5). Do wytworzenia iRECs z fibroblastów wykorzystano czynniki transkrypcyjne, takie jak Emx2,

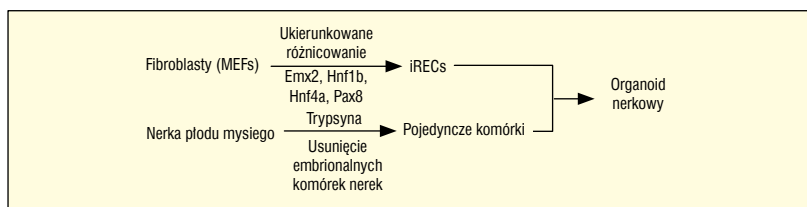


Rycina 4. Wytwarzanie organoidów nerkowych z ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych pozyskanych z ludzkich embrionalnych komórek macierzystych. Na podstawie [21]. hPSC (*human pluripotential stem cells*) — ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste; MEF-CM, APEL/CHIR99021, FGF9, heparyna — podłoża wykorzystywane w hodowli komórkowej hPSC

Hnf1b, Hnf4a oraz Pax8. Geny tych czynników wprowadzono do embrjonalnych mysich fibroblastów (MEFs, *mouse embryonic fibroblasts*). Otrzymane MEFs hodowano wraz z komórkami nerki płodu mysiego (po wcześniejszym usunięciu embrjonalnych komórek nerkowych). Po 4 dniach hodowli otrzymano organoidy nerkowe. Wytworzone iRECs cechowały się profilem ekspresji genów, właściwościami fizjologicznymi oraz wrażliwością na czynniki nefrotoksyczne przypominającymi ich odpowiedniki *in vivo*. Co więcej, w nabłonku kanalikowym wytworzonym z iRECs zaobserwowano występowanie receptorów oraz białek transportowych typowych dla nabłonka kanalika bliższego i dalszego w warunkach *in vivo*. Ponadto iRECs ulegały integracji z organoidami nerkowymi i tworzyły w ich obrębie kanaliki nerkowe. Nie stwierdzono natomiast ekspresji genów białek uczestniczących w rozwoju nerek. Badacze ci wskazują, że iRECs otrzymywane *ex vivo* przez wymuszoną ekspresję czynników transkrypcyjnych mogą ułatwiać wytwarzanie organoidów nerkowych [23].

Ograniczenia w zastosowaniu organoidów nerkowych wytworzonych z hPSC wiążą się z kilkoma jak dotąd nierozwiązanymi zagadnieniami. Nefrony organoidów uzyskanych z hPSC nie tworzą uporządkowanych struktur. Po wszczęciu organoidów pod torebkę nerki gospodarza (myszy) nie dochodzi do integracji ich kanalików dalszych z układem moczowym gospodarza, tj. kanalikami zbiorczymi (ryc. 2).

Ponadto naczynia organoidów wytworzonych z hPSC nie przypominają tętniczek doprowadzających i odprowadzających. Komórki organoidów są niedojrzałe (przypominają komórki zarodka w 1.–2. trymestrze ciąży). Organoidy przypominają śródnercze (podlegające fizjologicznemu zanikowi) lub niedojrzałą nerkę ostateczną. Pośród komórek tworzących organoidy mogą występować niepożądane rodzaje komórek (do 10% komórek przypominających neurony) [4, 17, 20, 24]. Innym istotnym ograniczeniem w otrzymywaniu z hPSC w pełni funkcjonalnych organoidów nerkowych jest brak opracowanej technologii przekształcania hPSC w komórki zrębu, co uniemożliwia ich zastosowanie w wytwarzaniu (co uzyskano przy



Rycina 5. Wytwarzanie organoidów nerkowych z mysich fibroblastów. Na podstawie [23]. MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) — embrjonalne mysie fibroblasty; iRECs (*induced renal tubular epithelial cells*) — indukowane komórki nabłonkowe kanalików nerkowych; Emx2, Hnf1b, Hnf4a, Pax8 — czynniki transkrypcyjne

użyciu komórek myszy) organoidów cechujących się uporządkowaną strukturą nefronów i z kanalikiem zbiorczym [25].

POTENCJALNE ZASTOSOWANIE ORGANOIDÓW NERKOWYCH

Biorąc pod uwagę wyniki dotychczasowych badań, należy uznać, że obecnie organoidy nerkowe nie mogą być wykorzystywane do leczenia chorób nerek. Eksperci wskazują natomiast, że ze względu na fakt, że organoidy nerkowe zawierają wszystkie rodzaje komórek, z których zbudowane są nerki, mogą one znaleźć zastosowanie w badaniach *in vitro* nad patogenezą chorób nerek (w tym zwłaszcza dziedzicznych). Dzięki wykorzystaniu metody CRISP-Cas-9 można indukować różnego rodzaju mutacje w obrębie komórek organoidów i następnie wykorzystywać je do prowadzenia badań nad chorobami nerek. Organoidy nerkowe mogą być również używane do badań *in vitro* nad toksycznością leków [21].

PODSUMOWANIE

1. Jak dotąd nie uzyskano integracji kanalików dalszych i kanalików zbiorczych wszczepionych organoidów z układem moczowym gospodarza, co powoduje, że organoidy nerkowe nie mogą pełnić funkcji wydalniczych i nie mogą być stosowane do leczenia chorób nerek.
2. Organoidy nerkowe mogą być wykorzystywane do badań *in vitro* nad patogenezą chorób nerek i toksycznością leków.

▶▶ Organoidy nerkowe mogą znaleźć zastosowanie w badaniach *in vitro* nad patogenezą chorób nerek ◀◀

STRESZCZENIE

Przeszczepienie nerki jest najskuteczniejszą metodą leczenia nerkozastępczego. Stale rosnąca liczba chorych oczekujących na przeszczepienie nerki w porównaniu z liczbą potencjalnych dawców sprawia, że poszukuje się innych rozwiązań niż przeszczepienie od dawcy ludzkiego — zmarłego lub żywego. Do metod, w których pokłada się ostatnio coraz większe nadzieje, należy zastosowanie organoidów nerkowych.

Organoidy nerkowe to trójwymiarowe struktury, których budowa anatomiczna i właściwości funkcjonalne odzwierciedlają niektóre aspekty budowy i czynności nerek w warunkach *in vivo*. Początek badań nad organoidami nerkowymi datuje się na lata 50. XX wieku.

Przeprowadzenie badań nad organoidami nerkowymi uzasadniają trzy powody. Mogą one mianowicie zostać wykorzystane do badań nad rozwojem nerki. Przy pomocy organoidów będzie można przeprowadzać badania nad wrodzonymi i nabytymi chorobami nerek. Organoidy mogą się stać również funkcjonalnymi narządami nerkopodobnymi, wykorzystywanymi w leczeniu chorych ze schyłkową niewydolnością nerek.

Dotychczas opracowano metody wytwarzania organoidów nerkowych z komórek płodu myszy oraz z ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych.

Forum Nefrol 2020, tom 13, nr 2, 69–74

Słowa kluczowe: organoidy nerkowe, nefrogenеза, ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste, choroby nerek

Piśmiennictwo

1. Wijkstrom M., Iwase H., Paris W. i wsp. Renal xenotransplantation: experimental progress and clinical prospects. *Kidney Int.* 2017; 91: 790S–796S.
2. Morizane R., Bonventre J.V. Kidney organoids: a translational journey. *Trends Mol Med.* 2017; 23: 246S–263S.
3. Romagnani P. Toward the identification of a “renopoietic system”? *Stem Cells* 2009; 27: 2247S–2253S.
4. Islam M., Nishinakamura R. How to rebuild the kidney: recent advances in kidney organoids. *J. Biochem.* 2019; 166: 7S–12S.
5. Vize P.D., Seufert D.W., Carroll T.J., Wallingford J.B. Model systems for the study of kidney development: analysis of organ induction and patterning. *Dev. Biol.* 1997; 188: 189S–204S.
6. Moritz K.M., Wintour E.M. Functional development of the meso- and metanephros. *Pediatr. Nephrol.* 1999; 13: 171S–178S.
7. Medvinsky A., Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996; 86: 897S–906S.
8. Saxen L. Developmental and cell biology series: organogenesis of the kidney. Cambridge University Press, New York 1987.
9. Beck F., Moffat D.B., Davies D.P. Human embryology. Blackwell Scientific Press, Oxford 1985; 246–276.
10. Dakovi-Bjelakovi M., Stefanovi N., Vljakovi S. i wsp. Human kidney development. *Acta Fac. Med. Naiss.* 2004; 21: 163S–170S.
11. Kuure S., Vuolteenaho R., Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech. Dev.* 2000; 92: 31S–45S.
12. Dodge A.H. Introduction: review of microscopic studies on the fetal and neonatal kidney. *Micr. Res. Techn.* 1997; 39: 205S–210S.
13. Davidson A.J. Mouse kidney development. The Stem Cell Research Community, StemBook. Boston 2008.
14. Faa G., Gerosa C., Fanni D. i wsp. Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. *J. Cell Physiol.* 2012; 227: 1257S–1268S.
15. Carney E. Regulation of nephrogenesis. *Nat. Rev. Nephrol.* 2018; 14: 536S.
16. Lancaster M.A., Knoblich J.A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014; 345: 1247125.
17. Woolf A.S. Growing a new human kidney. *Kidney Int.* 2019; 96: 871S–882S.
18. Weiss P., Taylor A.C. Reconstitution of complete organs from single-cell suspensions of chick embryos in advanced stages of differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1960; 46: 1177S–1185S.
19. Xinaris C., Benedetti V., Rizzo P. i wsp. In vivo maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012; 23: 1857S–1868S.
20. Taguchi A., Nishinakamura R. Higher-order kidney organogenesis from pluripotent stem cells. *Cell Stem. Cell.* 2017; 21: 730S–746S.
21. Takasato M., Er X.P., Chiu H.S., Little M.H. Generating kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 2016; 11: 1681S–1692S.
22. van den Berg C.W., Ritsma L., Avramut M.C. i wsp. Renal subcapsular transplantation of PSC-derived kidney organoids induces neo-vasculogenesis and significant glomerular and tubular maturation in vivo. *Stem. Cell Reports.* 2018; 10: 751S–765S.
23. Kaminski M.M., Tosic J., Kresbach C. i wsp. Direct reprogramming of fibroblasts into renal tubular epithelial cells by defined transcription factors. *Nat. Cell Biol.* 2016; 18: 1269S–1280S.
24. Little M.H., Combes A.N. Kidney organoids: accurate models or fortunate accidents. *Genes. Dev.* 2019; 33: 1319S–1345S.
25. Nishinakamura R. Human kidney organoids: progress and remaining challenges. *Nat. Rev. Nephrol.* 2019; 15: 613S–624S.