

Organoidy w badaniach nad chorobami mózgu

O żywych trójwymiarowych modelach komórkowych odzwierciedlających budowę tkanek i organów z dr n. med. Wiolettą Lech z Zakładu Bioinżynierii Komórek Macierzystych w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN im. Miroslawa Mossakowskiego w Warszawie, asystentką prof. dr hab. n. med. Leonory Bużańskiej, dyrektora Instytutu i kierownika tej pracowni, rozmawia Ewa Biernacka

Medical Tribune: Reprogramowanie komórek dojrzałych, izolowanych z tkanek, a następnie ich kierunkowe różnicowanie w wybrane typy komórek zrewolucjonizowało badania nad rozwojem i chorobami człowieka. Na czym polega to reprogramowanie?

Dr n. med. Wioletta Lech: Proces reprogramowania ludzkich komórek dojrzałych (somatycznych) w indukowane pluripotentne komórki macierzyste (iPSC – induced pluripotent stem cells) polega na „cofnięciu” ich do wczesnego etapu rozwoju zarodkowego, kiedy to mają zdolność do wielokierunkowego różnicowania (są pluripotentne) w sposób niekontrowersyjny etycznie (nie są bowiem uzyskane z komórek izolowanych z płodów). Istotny postęp wiedzy na temat udoskonalania protokołów in vitro w zakresie różnicowania iPSC w wiele różnych typów komórek oraz ich unikatowa zdolność do samoorganizacji w struktury tkankowe pozwoliły otrzymać organoidy – trójwymiarowe modele odzwierciedlające budowę narządów.

MT: Brak architektury tkankowej w stosowanych w przeszłości jednowarstwowych hodowlach komórkowych nie pozwalał śledzić skomplikowanych procesów biologicznych zachodzących w organizmie. W jaki sposób organoidy służą jako nowe narzędzie do badań?

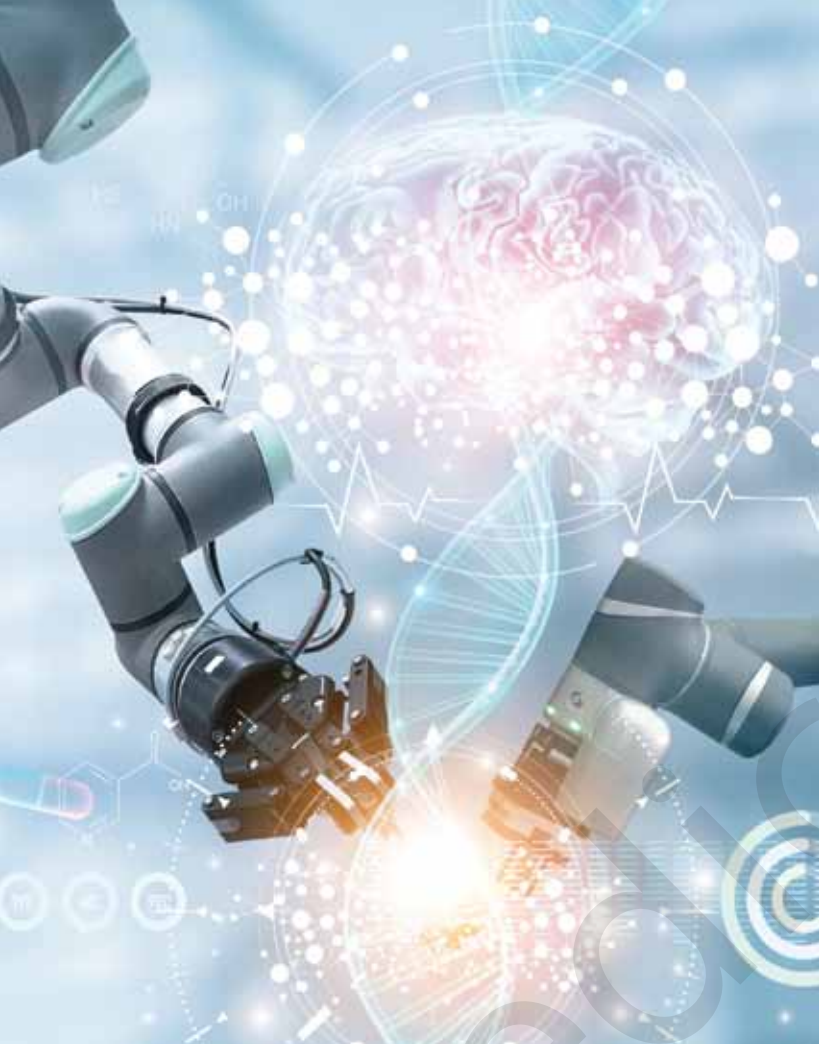
W.L.: Hodowle komórkowe in vitro pozwalają badać rozwój człowieka i tworzyć modele chorób, dzięki odtworzeniu złożoności komórkowej, struktury i funkcji tkanek. W połączeniu z inżynierią genetyczną, edycją genomu oraz analizami transkryptyczną

(ekspresji genów) i epigenetyczną (pozagenową modyfikacją materiału genetycznego) pojedynczych komórek stały się narzędziem do badania rozwoju tkanek i narządów, zaburzeń w ich funkcjonowaniu i w przebiegu chorób. Umożliwia to powstawanie zastosowań translacyjnych w medycynie regeneracyjnej (dzięki poznaniu rozwoju i etiologii danej choroby) oraz personalizowanej (dzięki indywidualnym metodom leczenia), odkrywanie nowych leków (na podstawie badań farmakologicznych i toksykologicznych). Dotąd powstały modele organoidów m.in. nerki, wątroby, trzustki, płuca, jelita, siatkówki oraz mózgu. Umożliwiają badanie mechanizmów, które w standardowych, dwuwymiarowych warunkach hodowli in vitro są trudne, a nawet niemożliwe do zaobserwowania.

MT: Jaka jest historia badań laboratoryjnych prowadzących do powstania organoidów mózgu?

W.L.: Najpierw uzyskano indukowane pluripotentne komórki macierzyste, czym udowodniono, że z dojrzałych komórek somatycznych przy użyciu odpowiednich czynników regulujących transkrypcję genów można otrzymać komórki o cechach zarodkowych komórek macierzystych, zdolne do różnicowania się niemal w każdy typ komórek ludzkiego organizmu (Nagroda Nobla w 2012 r. – Shinya Yamanaka i John Gurdon). W laboratoriach na świecie standardem stał się protokół prof. Yamanaki stosowany do otrzymywania iPSC.

Kierunkowe różnicowanie iPSC w warunkach in vitro w wybrane typy komórek rozwinęło badania m.in. nad rozwojem



i właściwościami komórek nerwowych oraz nad modelowaniem chorób. Hodowle dwuwymiarowe (monowarstwowe) w modelowaniu i odwzorowaniu warunków panujących w ludzkim mózgu dają ograniczone możliwości. Uzyskanie różnicowania iPSC w kierunku komórek typowych dla tkanki nerwowej nadal w pełni nie daje możliwości odwzorowania komunikacji i oddziaływania między różnymi komórkami tej tkanki, np. neuronami a komórkami glejowymi. Trójwymiarowe hodowle komórkowe in vitro znacznie lepiej odzwierciedlają warunki panujące in vivo, m.in. interakcje biochemiczne i biofizyczne oraz strukturę przestrzenną in vivo, dlatego prace badaczy skupiały się na stosowaniu zaawansowanych technik i warunków mikrośrodowiska, które umożliwią powstanie takich hodowli.

Pierwsze doniesienia o samoorganizujących się trójwymiarowych hodowlach o charakterze organoidów mózgu otrzymanych z komórek pluripotencjalnych pojawiły się w badaniach prof. Yoshiki Sasai (RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research w Kobe w Japonii), który wraz z zespołem uzyskał spolaryzowane struktury przestrzenne wykazujące dynamiczną, autonomiczną formację architektury kory mózgu (2008 r.) oraz pęcherzyka wzrokowego – zawiązku siatkówki (2011 r.) z trójwymiarowej hodowli agregatów komórek macierzystych zarodka myszy (2011 r.). Nabłonek siatkówki pochodzący z komórek zarodka spontanicznie tworzył półkuliste pęcherzyki nabłonkowe. Prof. Sasai stwierdził zatem, że morfogeneza pęcherzyka wzrokowego w tej hodowli komórkowej in vitro zależy od wewnętrznego programu samoorganizacji – zaprogramowanego →



dr n. med. Wioletta Lech – od 2014 r. jest związana z Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie, gdzie prowadzi badania w Zakładzie Bioinżynierii Komórek Macierzystych kierowanym przez prof. dr hab. n. med. Leonorę Bużańską. Jest autorką i współautorką publikacji naukowych z zakresu biologii komórek macierzystych, tworzenia w warunkach laboratoryjnych trójwymiarowego mikrośrodowiska odwzorowującego warunki in vivo, uzyskiwania komórek macierzystych kompetentnych terapeutycznie oraz oceny ich właściwości neuroprotektoryjnych, proregeneracyjnych i immunomodulacyjnych w przedklinicznych badaniach translacyjnych. W pracy naukowej skupia się na wykorzystaniu komórek macierzystych w leczeniu schorzeń ośrodkowego układu nerwowego i na wdrażaniu produktów terapii zaawansowanej do zastosowania klinicznego. Jest również absolwentką studiów podyplomowych w Akademii Leona Koźmińskiego w Warszawie na kierunku Prowadzenie i monitorowanie badań klinicznych, co umożliwiło jej zdobycie niezbędnej wiedzy w zakresie międzynarodowych i krajowych regulacji prawnych dotyczących badań klinicznych, zasad prowadzenia badań, dokumentacji i zarządzania projektami. Kierowała grantem obejmującym ocenę molekularną właściwości neuroprotektoryjnych i regeneracyjnych komórek macierzystych po transplantacji do mózgu uszkodzonego w wyniku udaru niedokrwienne. Obecnie prowadzi projekt dotyczący optymalizacji uzyskiwania organoidów korowych mózgu z układem naczyniowym i ich transplantacji w modelu uszkodzenia mózgu in vivo, gdzie skupia się na ocenie integracji organoidów z tkanką biorcy i ich wpływu na modulację odpowiedzi zapalnej.

Po raz pierwszy na organoidach w hodowli in vitro odtworzono rozwój choroby (mikrocefalii) w złożonych strukturach mózgu

w komórkach i obejmującego stopniową oraz specyficzną regulację lokalnych właściwości nabłonka. Udowodnił zdolność do samoorganizacji przestrzennych struktur stworzonych w hodowli in vitro. Dowiódł tym samym, że procesy biologiczne zachodzące na wczesnym etapie rozwoju tkanek i narządów można odwzorować w laboratorium. Podobne struktury zespołowi prof. Sasai udało się uzyskać, stosując pluripotencjalne komórki ludzkie.

W badaniach nad rozwojem układu nerwowego innowacyjnym odkryciem było uzyskanie przez Madeline Lancaster i Juergena Knoblich (2013 r.) organoidów całego mózgu (CE – cerebral organoids), budową przypominających ludzki mózg na etapie rozwoju 9-miesięcznego płodu. Hodowle organoidów powstałe z iPSC rozwijały zawiązki odrębnych, choć współzależnych obszarów mózgu, takich jak kora mózgu, siatkówka, opony mózgu oraz splot naczyniówkowy komór mózgu. W obszarze kory mózgu zlokalizowano charakterystyczną organizację strefy progenitorowej z komórkami macierzystymi gleju promienistego, które w wyniku podziałów dają początek kolejnym warstwom kory. Ten sam zespół bardzo szybko udowodnił, że takie organoidy mogą służyć do modelowania wady rozwojowej mózgu – mikrocefalii (małogłowie). Organoidy otrzymane z komórek pobranych od pacjentów z mikrocefalią wykazywały przedwczesne różnicowanie neuronów i pomogły wyjaśnić fenotyp choroby. W ten sposób po raz pierwszy na organoidach w hodowli in vitro odtworzono rozwój choroby w złożonych strukturach ludzkiego mózgu. W odróżnieniu od konwencjonalnych kultur komórkowych organoidy rekonstruują ludzkie narządy na poziomie komórkowym oraz pod względem ogólnej struktury tkanki, zapewniając wyjątkową platformę do odwzorowania rozwoju i funkcji np. mózgu. Hodowle organoidów in vitro pozwalają na modelowanie przebiegu, rozwoju i patogenezę m.in. chorób neurodegeneracyjnych, a także na testowanie nowych leków.

MT: Czym są choroby neurodegeneracyjne układu nerwowego?

W.L.: Powstają one w wyniku nieodwracalnego procesu obumierania komórek nerwowych i postępującej degeneracji różnych obszarów układu nerwowego. W normalnych warunkach fizjologicznych śmierć komórek nerwowych jest ograniczona w mózgu dorosłych ludzi, nawet u osób starszych, nadmierna zaś śmierć komórek w określonym obszarze mózgu stanowi podstawową cechę patologiczną w chorobach neurodegeneracyjnych: Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona, w stwardnieniu zanikowym

bocznym. U podłoża każdej z nich mogą leżeć czynniki immunologiczne lub niewłaściwa synteza białek w komórkach osoby chorej. Z uwagi na skomplikowaną budowę ludzkiego mózgu prowadzenie badań nad tymi chorobami było przez dekady wyzwaniem. Zrozumienie prowadzących do nich mechanizmów oraz opracowanie skutecznych terapii jest jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny.

MT: Jak organoidy wspomagają badania nad chorobami neurodegeneracyjnymi ludzkiego mózgu?

W.L.: Umożliwiają otrzymanie modeli schorzeń mózgu, których nie można wygenerować w badaniach z wykorzystaniem dwuwymiarowych hodowli komórkowych bądź z udziałem zwierząt laboratoryjnych. Protokoły pozyskiwania organoidów ludzkiego mózgu stosowane w laboratoriach pozwalają na wyprodukowanie organoidów całego mózgu lub wybranych regionów mózgowia, np. organoidów dorsalnych (grzbietowych) lub wentralnych (brzuszných) przodomózgowia, śródmózgowia, a także kory mózgowej, wzgórze, podwzgórze, hipokampu lub mózdzku. Protokoły uzyskiwania organoidów ludzkiego mózgu można ogólnie podzielić na spontaniczne i ukierunkowane rozwojowo. Protokoły spontaniczne wykorzystują wewnętrzne zdolności samoorganizacji komórek pluripotencjalnych do różnicowania się w tkanki typowe dla różnych obszarów mózgu. Protokoły ukierunkowane rozwojowo zaś opierają się na zastosowaniu znanych czynników regulujących procesy rozwojowe, które kierują różnicowaniem iPSC w wybrane przez badaczy typy komórek, jak kora mózgowa, hipokamp bądź śródmózgowie. Tego typu metody mogą być też używane do generowania dwóch lub więcej organoidów reprezentujących różne obszary i łączenia ich w assembly – przestrzenne struktury modelujące interakcje zachodzące między regionami mózgu.

Możliwość uzyskiwania organoidów konkretnych struktur mózgu, zbudowanych z komórek będących przedmiotem badań w danych chorobach, pozwala na tworzenie modeli in vitro oraz analizę procesów zachodzących w zmienionych patologicznie komórkach i tkankach. Te modele chorób neurodegeneracyjnych umożliwiają zgłębianie mechanizmów rozwoju patologii, a odkryte osobnicze różnice w ich przebiegu testowanie potencjalnych terapii. Spersonalizowane modele organoidów danej choroby z komórek pobranych od pacjentów w przyszłości mogą posłużyć do doboru leków, ustalania optymalnych dawek, a wręcz do stosowania terapii indywidualnych. ●

Organoidy mózgu w badaniach nad chorobami tego narządu

Dr n. med. Wioletta Lech
przybliży funkcjonowanie
modeli mózgu – organoidów
– w badaniach nad patologiami
na poziomie komórkowym chorób
neurodegeneracyjnych mózgu



CHOROBA PARKINSONA

Jedna z najczęściej występujących chorób neurodegeneracyjnych – choroba Parkinsona (PD – Parkinson's disease), złożona i postępująca, nazywana drżączką porażną – występuje w starzejących się społeczeństwach na całym świecie. Charakteryzuje ją utrata neuronów dopaminergicznych w części zwartej istoty czarnej śródmózgowia. Przedwczesne starzenie się i śmierć komórek substancji czarnej prowadzi do obniżenia stężenia jednego z najważniejszych neuroprzekaźników w mózgu – dopaminy. Klinicznie skutkuje to niedoborami motorycznymi, w tym bradykinezją (spowolnieniem ruchowym), sztywnością, drżeniem i niestabilnością postawy.

Laboratoryjne modele organoidów śródmózgowia odwzorowują kluczowe patologiczne cechy choroby Parkinsona, w tym agregację α -synukleiny i postępującą utratę neuronów dopaminergicznych. α -synukleina jest białkiem licznie występującym w neuronach i uczestniczy w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego oraz procesie apoptozy (programowanej śmierci komórki). To występujące w formie agregatów białko traci swoje prawidłowe funkcje i odgrywa znaczącą rolę w charakterystycznym dla chorób neurodegeneracyjnych obumieraniu komórek. W modelach organoidów wyprowadzonych z komórek pacjentów z PD z triplikacją genu *SNCA* (synuclein alpha), który koduje α -synukleinę, zaobserwowano agregację tego białka i utratę neuronów dopaminergicznych w porównaniu z organoidami

wyprowadzonymi z komórek zdrowych dawców. Ponadto wykazano rolę patologicznej postaci α -synukleiny (zagregowanej) w wywoływaniu astrosenescencji (starzenia się) astrocytów, co może zwiększać podatność neuronów dopaminergicznych na degenerację. Astrocyty wspierają funkcjonowanie neuronów, pomagając w komunikacji między neuronami i odpowiadając za utrzymanie prawidłowej homeostazy. Ponieważ utrata prawidłowej funkcji astrocytów i nabycie fenotypu prozapalnego z powodu starzenia ma prawdopodobnie istotne implikacje dla chorób neurodegeneracyjnych, zjawisko astrosenescencji coraz częściej staje się przedmiotem badań. Wiadomo bowiem, iż interakcja między zdrowymi neuronami i starzejącymi się astrocytami zaburza funkcjonowanie neuronów, plastyczność synaptyczną, wielkość pęcherzyków synaptycznych i dojrzewanie synaps.

Inne badania dotyczące modelowania choroby Parkinsona skupiają się na pojedynczej mutacji w genie kinazy 2 bogatej w leucynę (LRRK2 – leucine-rich repeat kinase 2), bowiem mutacje w tym genie są jednymi z najczęstszych czynników genetycznych przyczyniających się do inicjacji tej choroby. Jedną z nich jest mutacja powodująca substytucję glicyny na serynę (G2019S), zlokalizowana w domenie kinazy LRRK2. Badania na organoidach śródmózgowia wyprowadzonych z iPSC zawierających tę mutację wykazały, iż organoidy te były podobne do starzejącego się ludzkiego śródmózgowia, co charakteryzowało się m.in. nagromadzeniem neuromelaniny. Organoidy z mutacją →

Organoidy umożliwiają badanie degeneracji neuronów ruchowych oraz wpływu mutacji w genach powiązanych z występowaniem stwardnienia zanikowego bocznego

w genie *LRRK2* wykazywały też patologie charakterystyczne dla choroby Parkinsona, w tym nieprawidłową lokalizację fosforylacji α -synukleiny (w pozycji Ser-129) oraz podwyższony poziom ekspresji łańcucha lekkiego 3B (LC3B – light chain 3B), będący markerem autofagii, odpowiadającej głównie za usuwanie toksycznych lub zlepionych białek. Te patologiczne zmiany obserwowane u pacjentów z chorobą Parkinsona związaną z mutacją w genie *LRRK2* okazały się zależne od wieku.

Badania z wykorzystaniem organoidów pozwalają na obserwację zjawisk zachodzących pomiędzy komórkami w warunkach fizjologii i patologii spowodowanych chorobą Parkinsona. Na organoidach testuje się leki, nowe substancje chemiczne analizowane w badaniach klinicznych i strategię terapeutyczne mające chronić neurony dopaminergiczne przed degeneracją.

CHOROBA ALZHEIMERA

Choroba Alzheimer (AD – Alzheimer's disease) to postępująca choroba neurodegeneracyjna charakteryzująca się odkładaniem i nagromadzeniem pozakomórkowych blaszek β -amyloidu (A β – amyloid-beta) oraz obecnością wewnątrzkomórkowych spletek fosforylowanego białka tau związanego z mikrotubulami (p-Tau). Głównymi objawami są zaburzenia pamięci, orientacji, językowe oraz koncentracji i uwagi. W rodzinnych autosomalnych dominujących postaciach tej choroby obserwuje się mutacje w różnych genach, w tym białka prekursora amyloidu (APP – amyloid precursor protein), preseniliny 1 (PSEN1) oraz preseniliny 2 (PSEN2). Mutacje patogenne warunkują niemal połowę przypadków.

W badaniach nad AD z wykorzystaniem organoidów mózgu wyprowadzonych z komórek pozyskanych od pacjentów z rodzinnymi mutacjami w genach *APP* oraz *PSEN1* zaobserwowano zwiększoną agregację β -amyloidu oraz nadmierną fosforylację białka tau. Dodanie do hodowli organoidów specyficznych inhibitorów sekretaz (enzymów uczestniczących w nieprawidłowym przekształcaniu A β prowadzącym do jego agregacji i nagromadzenia blaszek β -amyloidu) doprowadziło do zmniejszenia stężenia fosforylowanego białka tau oraz toksycznego A β w badanych organoidach. W powyższym modelu odtworzono kluczowe aspekty patologii choroby: nagromadzenie blaszek amyloidowych i splotów neurofibrylarnych.

Posiadanie dwóch kopii genu kodującego apolipoproteinę E4 (ApoE4), której zadaniem jest metabolizm lipidów (cholesterolu i fosfolipidów) w organizmie, jest jednym z głównych

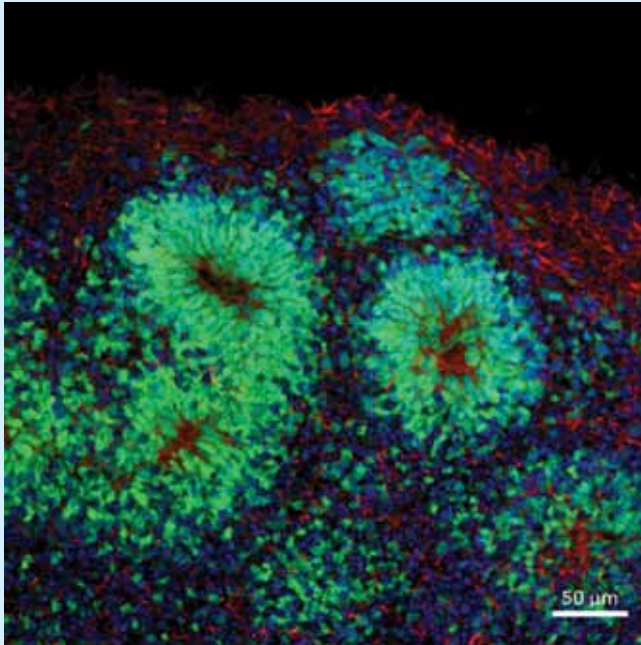
determinantów choroby Alzheimer. Obecność więcej niż jednej kopii tego genu oraz nieszczelność bariery krew–mózg (BBB – blood–brain barrier), dobrze poznanych czynników ryzyka choroby Alzheimer, są pewnym ograniczeniem w modelowaniu AD na organoidach. Brak przepływu krwi w obecnie stosowanych modelach mózgu uniemożliwia dokładne odwzorowanie efektów wynikających z ekspozycji komórek nerwowych na działanie prekursorów amyloidu obecnych w surowicy właśnie z powodu uszkodzenia BBB w wyniku starzenia lub obecności więcej niż jednej kopii genu *ApoE4*.

Niemniej, w modelu spontanicznej postaci AD z użyciem organoidów mózgu wystawionych na działanie surowicy, odwzorowującym sytuację po rozpadzie BBB, odkryto, że organoidy te odtwarzały wiele aspektów patologii podobnych do choroby Alzheimer. Analiza transkryptomyczna pojedynczych komórek w organoidach mózgowych wykazała, że ekspozycja na surowicę powodowała zmniejszoną funkcję synaptyczną w neuronach i astrocytach oraz indukowała odpowiedź immunologiczną w komórkach gleju gwiaździstego.

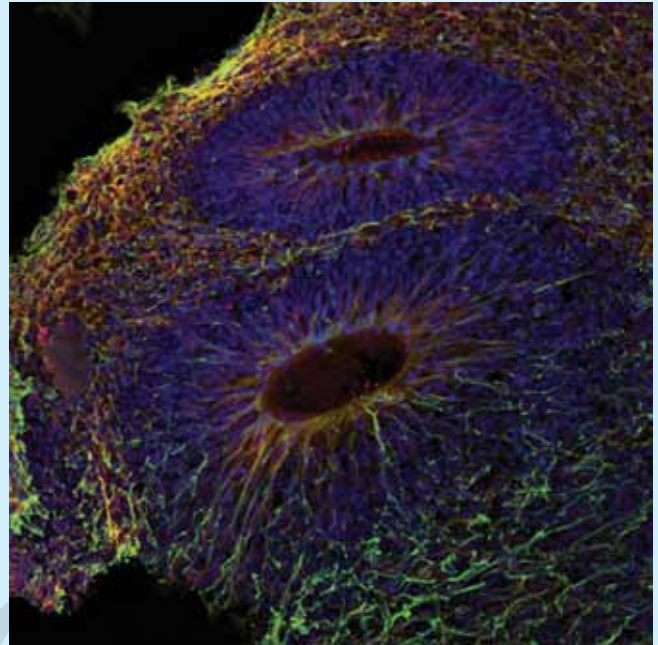
CHOROBA HUNTINGTONA

We wczesnych stadiach choroby Huntingtona (HD – Huntington's disease), śmiertelnej dziedzicznej choroby neurodegeneracyjnej przebiegającej z zaburzeniami motorycznymi, postępującym pogorszeniem funkcji poznawczych i ze zmianami behawioralnymi, obserwuje się subtelne zmiany w ruchach gałek ocznych, w koordynacji, drobne mimowolne ruchy oraz trudności w planowaniu myślowym. W kolejnym etapie zaś nasilenie objawów płasawicy, trudności w wykonywaniu ruchów, zaburzenia mowy i połykania.

Choroba ta jest spowodowana ekspansją powtarzających się trójek nukleotydowych: cytozyny, adeniny, guaniny (CAG) w genie *HTT*, który koduje białko huntingtynę. Nadmierna liczba CAG prowadzi do produkcji wydłużonych powtórzeń glutaminy w białku (na N-końcu szlaku poliglutaminowego), które stają się przez to bardziej podatne na nieprawidłowe fałdowanie i tworzenie agregatów wewnątrzkomórkowych. Wyższa niż 35 liczba (stanowiąca normę) powtórzeń CAG może prowadzić do rozwinięcia choroby Huntingtona, a liczba 40 lub wyższa – nieuchronnie tym skutkuje. Nadmierna liczba powtórzeń CAG powoduje liczne zmiany komórkowe, w tym zaburzenia w transporcie pęcherzykowym, funkcjonowaniu mitochondriów, transkrypcji genów oraz wartościach



Obraz z mikroskopii konfokalnej 52-dniowego ludzkiego organoidu korowego części grzbietowej przodomózgowia. Marker Sox2 (zielony) znakuje komórki progenitorowe neuronów, podczas gdy białko Map2 (czerwony) zaznacza dojrzałe struktury neuronów, podkreślając organizację komórkową i różnicowanie w obrębie organoidu. Jądra komórkowe zaznaczono kolorem niebieskim



Obraz z mikroskopii konfokalnej 44-dniowego ludzkiego organoidu całego mózgowia hodowanego w warunkach 5% stężenia tlenu. Kolorem zielonym wyznakowano białko neuralne β -tubulinę III, natomiast kolorem czerwonym białko glejowe GFAP. Jądra komórkowe zaznaczono kolorem niebieskim

adenozyno-5'-trifosforanu (ATP — adenosine triphosphate) odpowiadającego za transport energii w komórkach. Prowadzi to w konsekwencji do degeneracji neuronów i śmierci komórek w prążkowie i korze mózgowej.

Organoidy z komórek pacjentów z nadmierną liczbą powtórzeń CAG w genie *HTT* pozwalają na obserwację efektów akumulacji zmutowanej huntingtyny na poziomie komórkowym oraz badanie ścieżek sygnałowych zaangażowanych w patogenezę choroby. Organoidy mózgu zbudowane z komórek z mutacją w genie *HTT* wykazywały nieprawidłową organizację i specyfikację progenitorów neuralnych, z niedojrzałymi strefami komorowymi. Długość powtórzeń CAG regulowała zatem równowagę między ekspansją i różnicowaniem komórek progenitorowych w organoidach mózgowych. Organoidy wentralne (brzuszne) kresomózgowia stworzone z komórek z HD z nadmierną liczbą powtórzeń CAG ujawniały nieprawidłowości neurorozwojowe. Zauważalne były nie tylko deficyty w budowie organoidów, ale również zmiany transkrypcyjne prowadzące do produkcji mniejszej liczby neuronów GABA-ergicznych. Uzyskane wyniki dotyczące modelowania choroby Huntingtona w organoidach prezentowały mniejszą liczbę struktur neuroepitelialnych, zmniejszone rozmiary i nieprawidłowy rozwój struktur korowych. Udowodniono tym samym, iż obecność zmutowanego białka (huntingtyny) znacząco negatywnie wpływa na specyfikację prążkowie i kory mózgowej, co prowadzi do nieprawidłowego dojrzewania neuronów oraz zaburzonej organizacji komórek w mózgu.

STWARDNIENIE ZANIKOWE BOCZNE

Jedną z najcięższych chorób neurodegeneracyjnych, stwardnienie zanikowe boczne (ALS — amyotrophic lateral sclerosis), jest chorobą śmiertelną o bardzo złym rokowaniu. Pacjenci z rozpoznaniem ALS od wystąpienia pierwszych objawów rzadko przeżywają ponad 5 lat. Schorzenie to jest wynikiem procesów patologicznych zachodzących w komórkach nerwowych odpowiedzialnych za pracę mięśni. Symptomami ALS są łącznie występujące dysfunkcje górnych i dolnych neuronów ruchowych, obejmujące segmenty opuszkowe, szyjne, piersiowe i/lub lędźwiowe. Obraz kliniczny postępującego osłabienia mięśni szkieletowych zaangażowanych w ruchy kończyn, potykanie, mowę oraz funkcje oddechowe jest zróżnicowany. Osłabienie mięśni rozprzestrzenia się kontrlateralnie, w kierunkach dogłowym i doogonowym. ALS występuje w różnych fenotypach, a najczęstszymi są postaci opuszkowa (objawy pojawiają się najpierw na twarzy i powodują problemy z mową oraz przełykaniem) i rdzeniowa (szyjna, lędźwiowa).

Organoidy umożliwiają badanie degeneracji neuronów ruchowych oraz wpływu mutacji w genach powiązanych z występowaniem ALS, takich jak gen dysmutazy nadadtlenkowej *SOD1* (superoxide dismutase type 1), gen otwartej ramki odczytu (open reading frame) 72 chromosomu 9 (*C9orf72*) — na funkcje i przeżycie neuronów. Ekspansje powtórzeń heksanukleotydowych (sekwencja GGGGCC) w genie *C9orf72* są najczęstszą przyczyną ALS i otępienia czołowo-skroniowego z agresywną progresją choroby i krótkim czasem przeżycia. →



Mutacje w genie *C9orf72* odpowiadają za niemal 50% przypadków tej choroby.

Modele organoidów do badań nad ALS wymagają odwzorowania neurodegeneracji rdzeniowo-mięśniowej, dlatego ich uzyskanie jest skomplikowane i wymaga optymalizacji. Aby obserwować procesy związane z neurodegeneracją, zaproponowano modele organoidów kory mózgowej oraz organoidów rdzenia kręgowego dla uzyskania w warunkach *in vitro* interakcji komórkowych i mikrośrodowiskowych obserwowanych w ALS *in vivo*. Organoidy kory mózgowej łączono z organoidami rdzenia kręgowego, a następnie z ludzkimi sferoidami mięśni szkieletowych, aby wygenerować trójwymiarowe assembloidy korowo-ruchowe, odzwierciedlające zaburzoną w ALS drogę przekazywania sygnału nerwowego od kory mózgu, poprzez rdzeń kręgowy do mięśni szkieletowych. Wykazano, że w strukturze składającej się z trzech połączonych organoidów neurony korowe tworzyły połączenia ze sferoidami rdzeniowymi, podczas gdy neurony ruchowe rdzenia kręgowego tworzyły połączenia z mięśniami.

W badaniach w 2024 r. uzyskano organoidy z komórek pochodzących z tkanki nerwowej rdzenia kręgowego i tkanki mięśni obwodowych. Komórki zostały pozyskane od pacjentów z ALS ze stwierdzoną ekspansją sekwencji nukleotydowych (ok. 800 powtórzeń) w genie *C9orf72*. Zastosowanie organoidów wyprowadzonych z komórek pacjentów umożliwiło modelowanie procesów neurodegeneracyjnych charakterystycznych dla tej choroby. W organoidach zaobserwowano defekty charakterystyczne dla ALS, takie jak osłabienie skurczów, denervacja nerwów (zanik/zakłócenie unerwienia skutkujące zaburzeniami w przekazywaniu impulsów nerwowych) oraz utrata komórek Schwanna (komórek glijowych wytwarzających osłonki mielinowe otaczające aksony neuronów). Obserwowano zmiany w liczbie i rozmieszczeniu komórek w organoidach, w tym zmniejszenie liczby neuronów korowych warstwy głębokiej, a także zmiany w strukturze i funkcji synaps. Badania te dostarczyły systemu organoidowego do modelowania

patologii rdzeniowo-mięśniowych w ALS oraz jego zastosowania w testowaniu leków. Np. krótkotrwałe użycie inhibitora (związku GSK2606414) dla enzymu odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka (kinazy PERK – protein kinase RNA-like ER kinase) dwukrotnie zwiększyło glutaminergiczne skurcze mięśni oraz zmniejszyło agregację białek i autofagię.

Kolejnym postępowaniem w badaniu połączeń nerwowo-mięśniowych *in vitro* było uzyskanie organoidów neuromięśniowych rozwiniętych z progenitorów neuromezodermalnych. Komórki progenitorowe jednocześnie wygenerowały neurony rdzenia kręgowego pochodzenia ektodermalnego i komórki mięśni szkieletowych pochodzenia mezodermalnego, które samoorganizowały się w dwie anatomicznie odrębne populacje, tworząc trójwymiarowe organoidy neuromięśniowe. Organoidy te rozwinięły funkcjonalne połączenia nerwowo-mięśniowe (prezentowały rytmiczną aktywność impulsów i skurcze mięśni), podkreślając ich znaczący potencjał w modelowaniu i badaniu mechanizmów ALS, a także innych chorób nerwowo-mięśniowych.

PRZYSZŁOŚĆ BADAŃ NAD NEURODEGENERACJĄ Z WYKORZYSTANIEM ORGANOIDÓW

Modele eksperymentalne – organoidy – odgrywają kluczową rolę w badaniach biomedycznych, ułatwiając zrozumienie mechanizmów chorób i opracowywanie nowych metod leczenia. Są potężnym narzędziem do badania rozwoju ludzkiego mózgu, dojrzewania komórek nerwowych, interakcji zachodzących między nimi, a także ich degeneracji w związku z chorobą. Mają zatem ogromny potencjał w badaniach nad chorobami neurodegeneracyjnymi. Możliwość wytwarzania dużych ilości organoidów mózgu pozwala na ich wykorzystanie w badaniach przesiewowych leków, transplantacjach i toksykologii, co oszczędza czas i pieniądze w porównaniu z wykorzystaniem tradycyjnych modeli komórkowych *in vitro* i modeli zwierzęcych. Naukowcy dążą do precyzyjniejszego odwzorowania budowy i funkcji mózgu w organoidach. Prace nad wprowadzeniem do nich naczyń krwionośnych (organoidy unaczynione) pozwalają na wydłużenie czasu ich przeżycia w warunkach *in vitro* i badanie bardziej zaawansowanych funkcji. Rozwój organoidów zmierza w stronę modeli bardziej złożonych, z wykorzystaniem fibroblastów i komórek układu odpornościowego (makrofagi i komórki mikrogleju), co może przyczynić się do przełomów w neurobiologii, farmakologii i medycynie spersonalizowanej, a tym samym skuteczniejszego leczenia chorób mózgu. Podjęto pierwsze udane próby integracji tych typów komórek, ale dostępność modeli obejmujących komórki mikrogleju i śródbłónka wciąż pozostaje ograniczona, a ich zastosowanie w modelowaniu chorób neurodegeneracyjnych – nie w pełni zbadane. ●