

Tina Levstek¹, Taja Železnik Ramuta², Mateja Erdani Kreft³

Organoidi ledvic in njihova uporaba v medicini

Kidney Organoids and Their Applications in Medicine

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: organoidi, ledvice, matične celice, bioinženiring, personalizirana medicina

Terapevtske možnosti pri končni odpovedi ledvic so zelo omejene, zato je težnja po razumevanju bolezenskih procesov v ledvicah, ki vodijo v slabšanje ledvične funkcije, zelo velika. Razumevanje teh procesov bi namreč omogočilo razvoj novih terapevtskih pristopov za preprečevanje razvoja ali upočasnitev napredovanja ledvične disfunkcije. V zadnjem desetletju je prišlo do velikega napredka v razumevanju celično-bioloških procesov med embrionalnim razvojem ledvic pri človeku, čemur je sledil tudi razvoj organoidov ledvic, ki sodijo med kompleksne modele *in vitro*. V organoidih se celice samoorganizirajo v strukture s kompleksno zgradbo, ki posnema zgradbo ledvic *in vivo*. Kljub trenutnim omejitvam organoidov ledvic, kot sta njihova slaba ožiljenost in velika variabilnost, so potenciali njihove uporabe v medicini številni. Organoidi ledvic že omogočajo proučevanje razvoja ledvic in določenih bolezenskih procesov, testiranje nefrotoksičnosti in preizkušanje zdravil, kar povečuje njihovo možnost uporabe v personalizirani in regenerativni medicini.

ABSTRACT

KEY WORDS: organoids, kidneys, stem cells, bioengineering, personalized medicine

When kidney dysfunction progresses to end-stage kidney disease, therapeutic options are very limited. Therefore, understanding the biological processes in the kidneys that lead to the deterioration of kidney function is very important, because it could allow the development of new therapeutic approaches to prevent the development of kidney dysfunction or slow its progression. In the last decade, considerable progress has been made in understanding the cellular biological processes during embryonic kidney development in humans, followed by the development of kidney organoids, which are complex *in vitro* models. In organoids, cells self-organize into formations with a complex structure that mimics the kidney structure *in vivo*. Despite the current limitations of kidney organoids, such as lack of vascularity and high variability, the possibilities for their use in medicine are numerous. Kidney organoids already enable the study of kidney development and certain disease processes, nephrotoxicity testing, and drug screening, which increases their potential for use in personalized and regenerative medicine.

¹ Asist. Tina Levstek, mag. lab. biomed., Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; tina.levstek@mf.uni-lj.si

² Asist. dr. Taja Železnik Ramuta, mag. mikrobiol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

³ Prof. dr. Mateja Erdani Kreft, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

UVOD

Ledvice so kompleksen organ, ki sodeluje pri uravnavanju volumna in osmolarnosti telesnih tekočin, uravnavanju acido-baznega ravnovesja, odstranjevanju presnovnih produktov in tujih snovi ter pri sintezi in izločanju nekaterih hormonov. Funkcionalne enote ledvic so nefroni, ki jih je v zdravi ledvici približno milijon (1). Zaradi slabe regenerativne sposobnosti ledvic se s staranjem število nefronov zmanjšuje. Poleg tega lahko pride do propada nefronov zaradi patoloških procesov, kot so sladkorna bolezen, hipertenzija in srčno-žilne bolezni, redkeje pa tudi zaradi prirojenih okvar ledvic, genetskih bolezni ter vnetja ledvic. Končna odpoved ledvic ima velik vpliv na kakovost življenja bolnikov in je povezana z zgodnejšo umrljivostjo (2).

Razumevanje patofizioloških procesov, udeleženih v razvoju in napredovanju ledvičnih bolezni, je zato izredno pomembno za preprečevanje ledvične okvare, upočasnjevanje njenega napredovanja in tudi razvoj novih terapevtskih možnosti. V ta namen so bile do sedaj izvedene številne temeljne in translacijske raziskave na področju embrionalnega razvoja ledvic, fizioloških ter patofizioloških procesov v ledvicah, ugotavljanja nefrotoksičnosti in regenerativne sposobnosti ledvic. Tradicionalni pristopi raziskav temeljijo na uporabi živalskih modelov (modeli *in vivo*) in celičnih kultur, npr. izoliranih primarnih ledvičnih celic oz. nesmrtnih celičnih linij (modeli *in vitro*) (3). Oba pristopa imata svoje slabosti, ki omejujejo prenos znanja v klinično okolje. Uporaba živalskih modelov je običajno zelo draga in dolgotrajna, poleg tega je neposreden prenos znanja v kliniko zaradi razlik v primerjavi s človekom omejen. Pri uporabi celičnih kultur pa se običajno omejimo le na en celični tip, pri čemer se zanemari povezave med različnimi tipi celic ter z zunaj-celičnim matriksom, ki so prisotne v razmerah *in vivo* in so zelo pomembne tako pri fizioloških kot patofizioloških procesih (3).

V zadnjih letih je prišlo do razvoja številnih tridimenzionalnih (3D) modelov *in vitro*, ki predstavljajo velik potencial za translacijsko medicino. Med najpogostejše uporabljene 3D-modele *in vitro* sodijo organi na čipih (angl. *organ-on-a-chip*), 3D-kulture ali kokulture na bioloških (npr. kolagen, matrigel, želatina) ali sintetičnih nosilcih (npr. polietilen glikol, polilaktična kislina), sferoidi in organoidi. Vsak izmed naštetih modelov ima svoje prednosti in slabosti, zato je izbira 3D-modela *in vitro* odvisna predvsem od predvidenega namena njegove uporabe (4). V nadaljevanju prispevka se podrobneje osredotočamo na organoide. Vir celic za organoide so matične celice. V eksperimentalne namene se uporabljajo celične linije embrionalnih matičnih celic (EMC), ki se jih vse pogostejše nadomešča s tkivnimi matičnimi celicami ali induciranimi pluripotentnimi matičnimi celicami (iPMC). Tkivne matične celice in iPMC so izolirane oz. pridobljene iz tkiv, izoliranih iz odraslega posameznika. iPMC je z ustreznim protokolom mogoče pripraviti iz praktično katere koli somatske celice. Tako je mogoče uporabiti tudi odlučene celice sečil, ki jih lahko popolnoma neinvazivno pridobimo iz urina, glavno težavo pa predstavlja nizka uspešnost priprave iPMC (5). V specifičnih razmerah *in vitro* se matične celice samoorganizirajo v skupek različnih tipov celic, ki posnema zastopnost posameznih tipov celic ter *in vivo* razvojni proces posameznega organa (6).

EMBRIONALNI RAZVOJ LEDVIC PRI ČLOVEKU

Predpogoj za pripravo organoidov je dobro razumevanje embrionalnega razvoja posameznega organa. Nastanek ledvic pri človeku je zelo kompleksen, saj so v njihov razvoj vpletene številne signalne poti, ki so časovno in prostorsko ločene. Ledvice se razvijejo iz mezoderma. Med organogenezo iz intermediarnega mezoderma (IM) nastanejo tri strukture izločal, in sicer pro-

nefros, mezonefros in metanefros. Pronefros je nedelujoč sistem sečil, ki kmalu degenerira. Od njega ostanejo le pronefrična izvoda, ki omogočijo nastanek mezonefroza. Mezonefrični ledvici sta sestavljeni iz glomerulov in mezonefričnih tubulov ter propadeta proti koncu prvega trimesečja. Metanefrični ledvici nastaneta v petem tednu embrionalnega razvoja in se razvijeta v stalni ledvici (7, 8).

Metanefros nastane zaradi medsebojnih vplivov metanefričnega mezenhima (MM), ki izvira iz posteriornega intermediarnega mezoderma (pIM), in uretrovega brstiča, ki izvira iz anteriornega intermediarnega mezoderma (aIM) (9). MM je sestavljen iz stromalnih, endotelijskih in nefronskih progenitornih celic (NPC), iz katerih nastanejo stroma, krvne žile in nefroni (10). Po gastrulaciji signaliziranje transformirajočega rastnega dejavnika β (angl. *transforming growth factor*, TGF- β) in fibroblastnega rastnega dejavnika (angl. *fibroblast growth factor*, FGF) omogoči nastanek in ohranjanje niše NPC (11, 12). Uretrov brstič nastane iz Wolffovega voda in se preplete s stromalnimi, endotelijskimi in nefronskimi progenitornimi celicami ter tako tvori razvejan zbiralni sistem ledvic. Za nastanek aIM je potrebno signaliziranje retinojske kisline, za razvoj uretrovega brstiča med gastrulacijo pa je ključno kratkotrajno signaliziranje beljakovine Wnt (angl. *wingless-related integration site*) in srednje dolgo signaliziranje kostne morfogenetične beljakovine 4 (angl. *bone morphogenetic protein*, BMP4) (13–15). Razvoj krvnih žil v ledvicah poteka sočasno z razvojem ledvic z dvema glavnima mehanizma: vaskulogenezo in angiogenezo. Krvne žile nastanejo *de novo* z diferenciacijo endotelijskih progenitorskih celic (16).

Za dokončen razvoj ledvic pri človeku je izredno pomembna tudi t. i. vzajemna indukcija med MM in uretrovim brstičem. Signaliziranje uretrovega brstiča je namreč pomembno za nastanek nefronskih struk-

tur, medtem ko signaliziranje MM omogoča razvoj posameznih uretrovih brstičev, njihovo brstenje in razvejanje (17–20).

PRIPRAVA ORGANOIDOV LEDVIC

Pomanjkljivo razumevanje razvoja ledvic pri človeku je še do nedavnega omejevalo pripravo organoidov ledvic. Ledvice odraslega so sestavljene iz nefronov. Vsak nefron je zgrajen iz glomerula, proksimalnega tubula, Henlejeve zanke in distalnega tubula ter se na koncu zlija v zbiralce. Zbiralca zbirajo urin iz tubulov in ga izločajo skozi ledvični meh v sečevod (1). Odkritje, da je razvoj zbiralc tako časovno kot prostorsko ločen od razvoja preostanka nefrona, je omogočilo razvijanje protokolov za pripravo organoidov ledvic, ki posnemajo razvoj ledvic *in vivo*, kot je prikazano na sliki 1.

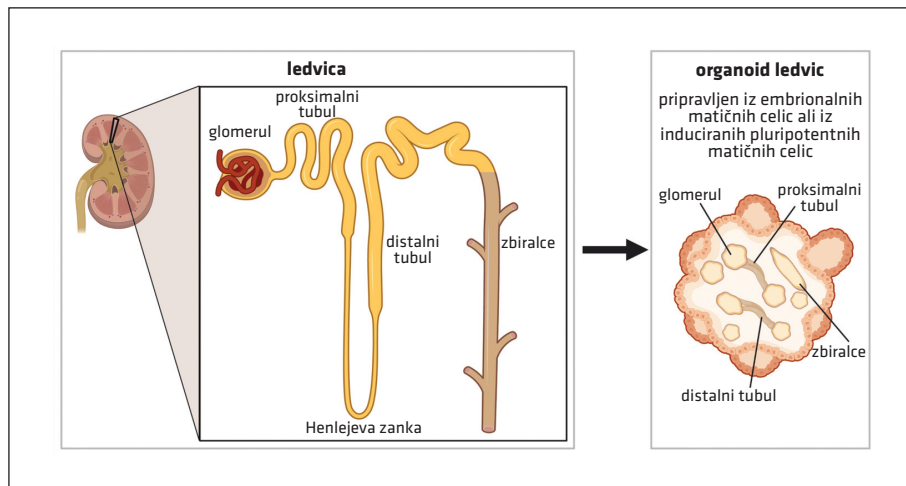
Prvi protokol za pripravo organoidov ledvic je bil objavljen leta 2014, ko je bilo dokazano, da je eden izmed ključnih dejavnikov za različen nastanek struktur iz pIM in aIM različno dolgo tretiranje s CHIR99021, agonistom Wnt (21). Signalne poti Wnt so evolucijsko močno ohranjene in igrajo pomembno vlogo v zgodnjem razvoju nefronov (22). V naslednjem letu so bili objavljeni še trije protokoli za pripravo organoidov ledvic, s katerimi so z natančno določeno koncentracijo različnih transkripcijskih dejavnikov in časovnim sosledjem njihovega dodajanja pripravili organoide ledvic iz človeških iPMC (23–25). Primerjava transkriptomov posameznih celic iz organoidov ledvic je pokazala, da je bilo prisotnih najmanj 12 različnih tipov ledvičnih celic, ki so tvorile nefronske strukture, ne pa tudi zbiralc. Poleg ledvičnih celic so organoidi ledvic vsebovali tudi različen delež celic drugega izvora, kot so živčne celice, mišične celice in melanociti. To kaže na težavnost natančnega nadzorovanja diferenciacije celic, saj je torej v organoidu prišlo tudi do diferenciacije v celične tipe, ki jih sicer v ledvicah ne najdemo. Organoidi ledvic so bili morfološko nezreli, saj so bili bolj

podobni fetalnim kot odraslim ledvicam, čeprav so izražali tudi nekaj označevalcev končne diferenciacije (26). V naslednjih letih je bilo objavljenih še več protokolov, ki temeljijo na diferenciaciji človeških iPMC preko primitivne proge, pIM in MM do nastanka struktur nefrona v 3D-obliki (27–29). Kljub različnim pristopom, ki so jih uporabili raziskovalci, so stične točke protokolov za pripravo organoidov ledvic z nefronskimi strukturami (30):

- podaljšano signaliziranje Wnt za indukcijo pIM,
- natančno regulirana aktivnost BMP4 za posnemanje IM,
- dodatek fibroblastnega rastnega dejavnika 9 (angl. *fibroblast growth factor 9*, FGF9) za nastanek in ohranjanje niše NPC v MM in
- dodatek aktivina A za nastanek pIM.

Leto 2015 je bilo prelomno pri pripravi organoidov ledvic z nefronskimi strukturami, medtem ko je bil prvi protokol, ki je omogočal pripravo organoidov ledvic s strukturami uretrovega brstiča, objavljen šele leta 2017 (31). Prisotnost MM in uretrovega brstiča je namreč ključna, saj vzajemna indukcija med njima prispeva

k dokončnemu razvoju ledvic *in vivo*. Protokol, ki je omogočal razvoj MM in uretrovega brstiča iz mišjih EMC, so razvili s pomočjo analize izražanja genov med razvojem uretrovega brstiča pri mišjih zarodkih. V naslednjih letih so bili objavljeni različni protokoli, ki omogočajo nastanek uretrovih brstičev z nastankom primitivne proge, aIM in predhodnikov Wolffovega voda (32–34). Skupne točke protokolov za pripravo organoidov ledvic s strukturami uretrovega brstiča so kratka aktivacija signalne poti Wnt za indukcijo aIM, posnemanje signaliziranja aIM z dodatkom retinojske kisline in agonistov Wnt in odsotnost aktivina A, ki spodbuja nastanek pIM (30). Pomanjkljivost teh protokolov je, da zaradi prostorsko in časovno ločenega nastanka MM in uretrovega brstiča ne pride do njune vzajemne indukcije, kar omejuje diferenciacijo organoida. Posledično bo verjetno optimalen protokol za pripravo organoidov ledvic z nefronskimi strukturami in strukturami uretrovega brstiča moral vsebovati ločeno indukcijo človeških pluripotentnih matičnih celic (PMC) v MM in uretrov brstič, za dokončen razvoj organoidov pa bo potrebna še njuna kokultura,



Slika 1. Organoidi ledvic posnemajo razvoj in zgradbo ledvic *in vivo*. Shema je bila narejena s spletnim orodjem BioRender.com.

da se omogoči medsebojno signaliziranje med MM in uretrovim brstičem (3). Izbira protokola za pripravo organoidov ledvic je odvisna predvsem od predvidenega namena njihove uporabe (30).

UPORABA ORGANOIDOV LEDVIC V MEDICINI

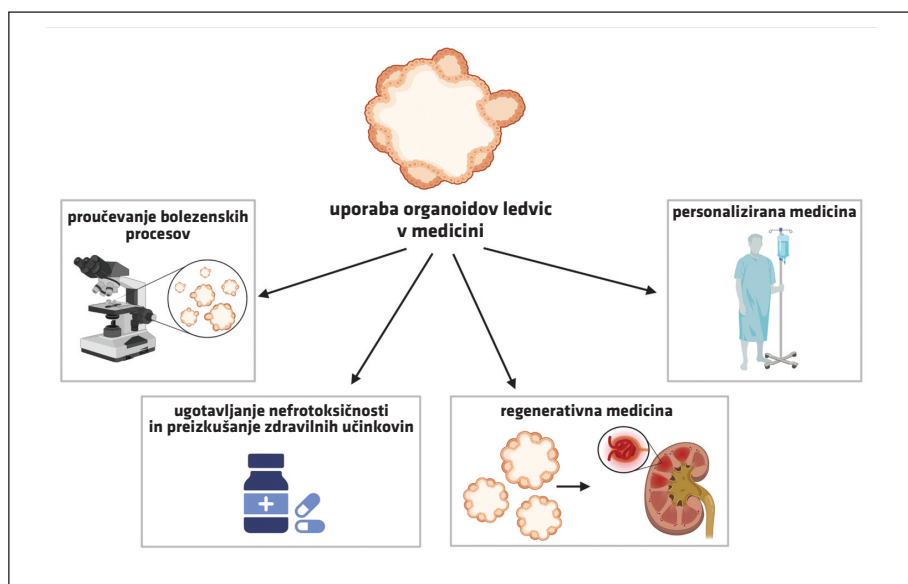
Organoidi ledvic omogočajo posnemanje okolja *in vivo* v razmerah *in vitro*, zato imajo v medicini številne možne aplikacije, ki so prikazane na sliki 2 in natančneje opisane v nadaljevanju.

Proučevanje ledvičnih bolezni

Organoidi ledvic imajo zelo velik potencial pri modeliranju bolezni, predvsem zaradi odkritja protokola dediferenciacije somatskih celic v iPMC, ki imajo sposobnost, da se diferencirajo v katero koli celico v telesu (35). Z uporabo somatskih celic bolnika, ki jih dediferenciramo v iPMC, je možno pripraviti organoide, ki posnemajo določeno bolezensko stanje in s tem omogočajo raziskovanje patofizioloških procesov, ki pri-

vedejo do zmanjšanja ledvične funkcije ali celo končne odpovedi ledvic. Ker dosegajo do sedaj razviti organoidi ledvic stopnjo zgodnjega razvoja ledvic, so bili uporabljeni predvsem za proučevanje prirojenih bolezni ledvic (34, 36, 37).

Z organoidi ledvic je možno tudi proučevanje genetskih bolezni, ki prizadenejo ledvice. Z vnašanjem genskih popravkov s tehnologijo kratkih ponavljajočih se palindromskih zaporedij in beljakovine Cas (angl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein*, CRISPR/Cas) lahko ugotavljamo vlogo posameznih genetskih različic pri razvoju bolezni, prav tako je možno tudi popravljanje genetskih napak. Tako je bilo kar nekaj raziskav izvedenih na področju policistične ledvične bolezni, ki je ena najpogostejših prirojenih ledvičnih bolezni. To avtosomno dominantno bolezen, ki je posledica bolezenskih sprememb v genih *PDK1* ali *PDK2*, ima namreč do 10 % bolnikov s končno odpovedjo ledvic. S pomočjo organoidov ledvic so uspešno pripravili model policistične



Slika 2. Raznolike možnosti uporabe organoidov ledvic v medicini. Shema je bila narejena s spletnim orodjem BioRender.com.

bolezni in tudi proučevali cistogenezo (24, 38, 39). Ugotovili so, da spreminjanje sestave zunajceličnega matriksa lahko pomembno zveča oz. zmanjša nastanek cist, in s tem dokazali njegov pomen pri nastanku policistične ledvične bolezni. Poleg tega so dokazali tudi velik vpliv signaliziranja cAMP, saj so po dodatku njegovega agonista ugotovili povečanje organoidov ledvic in povečano cistogenezo, po njegovi odstranitvi pa so se organoidi zmanjšali. To bi lahko vplivalo na razvoj novih terapevtskih pristopov za zdravljenje policistične ledvične bolezni (39). Organoidi ledvic so uporabni tudi pri proučevanju sprememb neznanega pomena (angl. *variant of unknown significance*), ki običajno predstavljajo velik izziv v kliniki, saj njihov vpliv na razvoj oz. napredovanje bolezni še ni znan. Odločitev o vodenju bolnikov in njihovem morebitnem zdravljenju je zato pogosto težavna. Organoidi ledvic bi tako omogočili boljše razumevanje vpliva teh genetskih sprememb na fenotip, kar bi olajšalo predvidevanja o poteku in optimiziralo zdravljenje bolezni (40).

Proučevanje redkih bolezni je običajno zelo omejeno zaradi majhnega števila bolnikov, zato bi z organoidi ledvic lahko pomembno izboljšali tudi razumevanje patofizioloških procesov pri redkih boleznih. Tako so s pomočjo tehnologije CRISPR/Cas že pripravili organoide ledvic s prisotno bolezensko spremembo v genu za α -galaktozidazo (angl. *α -galactosidase*, GLA) in s tem poustvarili Fabryjevo bolezen. Tako kot v ledvicah bolnikov s Fabryjevo boleznijo so tudi v organoidih ledvic zaznali poškodbe podocitov in epitelijskih celic tubulov ter kopičenje globotriaozilceramida (Gb3). Ugotovili so tudi povečan oksidativni stres in povečano apoptozo. Z encimskim nadomestnim zdravljenjem se je oksidativni stres in kopičenje Gb3 zmanjšalo, poleg tega je prišlo tudi do omilitve ledvičnih poškodb (41).

Zmanjšanje ledvične funkcije vodi tudi v okrnjeno izločanje ledvičnih hormonov. Zaradi pomanjkanja ustreznih modelov je

raziskovanje endokrine funkcije ledvic zelo oteženo, pri čemer bi lahko bili v pomoč organoidi ledvic. Dokazano je namreč bilo, da imajo organoidi ledvic endokrino funkcijo, saj izločajo eritropoetin in renin (42, 43). Izločanje renina so spodbudili z dodatkom forskolina, ki aktivira delovanje cAMP, ali s stimulacijo organoidov s paratiroidnim hormonom. V organoidih ledvic so bili prisotni tudi številni receptorji renin-angiotenzinskega sistema (42). Izločanje eritropoetina so zaznali samo v hipoksičnih razmerah pri organoidih, ki so bili pripravljeni iz prve pasaže celic. Zakaj pri organoidih ledvic, pripravljenih iz celic druge ali višje pasaže, ne pride do sinteze in izločanja eritropoetina, še ni znano (43). V organoidih ledvic poteka tudi prevzem in presnova neaktivne oblike vitamina D3 v aktivno obliko, kar so dokazali z merjenjem izražanja genov, ki sodelujejo v teh procesih (44). Organoidi ledvic so zato primerni za raziskovanje hormonske disfunkcije kot tudi za razvoj novih terapij, ki bi uravnavale endokrino delovanje ledvic, v prihodnosti pa bi z njimi lahko tudi nadomestili endokrino funkcijo okvarjenih ledvic.

Ugotavljanje nefrotoksičnosti in preizkušanje zdravilnih učinkovin

Nefrotoksičnost je hitro poslabšanje ledvične funkcije zaradi toksičnega učinka zdravil ali kemikalij, ki jih imenujemo nefrotoksini. Organoidi ledvic omogočajo modeliranje akutne ledvične poškodbe zaradi nefrotoksinov in s tem ugotavljanje nefrotoksičnosti posameznih spojin. Do sedaj so bili pripravljeni različni modeli poškodb epitelijskih celic ledvičnih tubulov in modeli poškodb podocitov, ki omogočajo proučevanje procesov, ki potekajo po izpostavitvi nefrotoksinom, in vpliv odmerka nefrotoksinov na poškodbe ledvic (24, 25, 45, 46). Poleg ugotavljanja nefrotoksičnosti imajo organoidi ledvic tudi potencial pri odkrivanju novih označevalcev ledvičnih poškodb, saj so trenutni označevalci nespe-

cifični in pozni kazalci poškodb ledvic. Pozen začetek zdravljenja zmanjšuje njegovo učinkovitost in je povezan z dodatnimi zapleti (47).

Poleg ugotavljanja nefrotoksičnosti so organoidi ledvic uporabni tudi pri preizkušanju zdravilnih učinkovin, saj je z uporabo celičnih linij in živalskih modelov težko natančno predvideti njihov učinek pri človeku. Zato bi lahko organoidi ledvic služili kot presejalna metoda pred uporabo zdravil v predkliničnih in kliničnih testiranjih. Razvit je bil tudi že visokozmogljiv sistem, ki bi omogočil hitro presejanje velikega števila različnih potencialnih zdravil in tudi toksinov na mikrotitrskih ploščicah s 96 ali 384 vdolbinicami. Za pripravo organoidov ledvic so uporabili 21-dnevni protokol. V vsaki vdolbinici je bilo približno pet organoidov, poleg tega je uporaba robotov za pipetiranje omogočila popolnoma avtomatiziran proces od nasaditve celic, njihove diferenciacije do končne analize organoidov (38).

Personalizirana medicina

Namen personalizirane medicine je bolniku prilagojeno zdravljenje in izboljšanje izidov zdravljenja. V zadnjem desetletju je personalizirana medicina doživela velik napredek, poleg tega pridobiva vse večji ugled in velja za prihodnost medicine (48). Ker je mogoče organoide ledvic pripraviti tudi iz bolnikovih iPMC, bi lahko v prihodnosti imeli pomembno vlogo v personalizirani medicini. Organoidi ledvic, pripravljeni iz iPMC bolnika, namreč omogočajo testiranje posameznih spojin ali različnih kombinacij in s tem ugotavljanje njihove učinkovitosti oz. toksičnosti pri posameznem bolniku (3). Organoidi ledvic, pridobljeni iz celic urina bolnikov s cistično fibrozo, se lahko uporabijo za merjenje funkcije transmembranskega regulatorja prevodnosti cistične fibroze (angl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR) z znojnim testom s forskolinom,

s čimer identificiramo posameznike, ki jih lahko zdravimo z modulatorji CFTR (49). Po drugi strani je za tumorska obolenja značilna izjemna celična heterogenost na ravni molekularne sestave, celične funkcije in občutljivosti na zdravljenje. Prav celična heterogenost lahko vodi v odpornost na zdravljenje in posledično manjšo učinkovitost zdravljenja. Dandanes je naše razumevanje odpornosti in odziv tumorjev na zdravljenje omejeno na raziskave na človeških rakavih celičnih linijah, ki ne posnemajo heterogenosti tumorjev, s čimer je omejen tudi razvoj novih zdravil (50). Organoidi ledvic zato ponujajo nov pristop pri odločanju o zdravljenju. Grassi in sodelavci so pripravili organoide ledvic iz vzorcev tkiva karcinoma ledvičnih celic in ujemajočih sosednjih zdravih tkiv ter jih uporabili za testiranje različnih zdravil, ki učinkujejo z zaviranjem več različnih tipov kinaz. Uporabili so različne odmerke različnih zdravil in po zdravljenju spremljali raven mRNA, da so ovrednotili toksičnost in učinkovitost zdravljenja (51). Poleg tega organoidi s specifičnim genotipom omogočajo tudi raziskovanje molekularnih procesov, ki pomembno prispevajo k raznoliki klinični sliki bolnikov z isto boleznijo (52).

Regenerativna medicina

Terapevtske možnosti pri končni odpovedi ledvic so zelo omejene, saj sta bolnikom na voljo le dializa ali presaditev ledvic. Dializa je povezana s številnimi zapleti in zgodnjo umrljivostjo, pri presaditvi ledvic pa je dolgoročni uspeh za zdaj tudi še dokaj omejen, poleg tega pa velik izziv predstavlja pomanjkanje darovalcev organov (53). Zato imajo organoidi ledvic velik potencial tudi v regenerativni medicini kot možni nadomestki okvarjenih ledvic (54). V teoriji bi z organoidi ledvic, pripravljenimi iz bolnikovih lastnih PMC, lahko preprečili pretirane imunske odgovore in zavrnitve organov. Vendar se je treba zavedati, da do sedaj še ni bila izvedena nobena raziskava,

ki bi proučevala uspešnost zdravljenja bolnikov s končno odpovedjo ledvic z organoidi ledvic. Kljub temu so začetne raziskave, v katerih so raziskovalci iz PMC pripravili organoide ledvic in jih presadili v živalske modele, zelo obetavne (55, 56). Pred uporabo organoidov ledvic pri človeku se sicer pojavlja še nekaj varnostnih pomislov, predvsem glede zrelosti organoidov ledvic in prisotnosti celic, ki sicer niso prisotne v ledvičnem tkivu (57). Po presaditvi organoidov ledvic, pridobljenih iz iPMC v miši, so ugotovili zmanjšanje števila celic, ki sicer niso prisotne v ledvičnem tkivu (58). Pred samo uporabo organoidov ledvic za zdravljenje končne odpovedi ledvic pri človeku bo zato treba razviti varen in učinkovit postopek za presaditev organoidov, prav tako pa bo treba tudi ovrednotiti potencialne kratko- in dolgoročne zaplete.

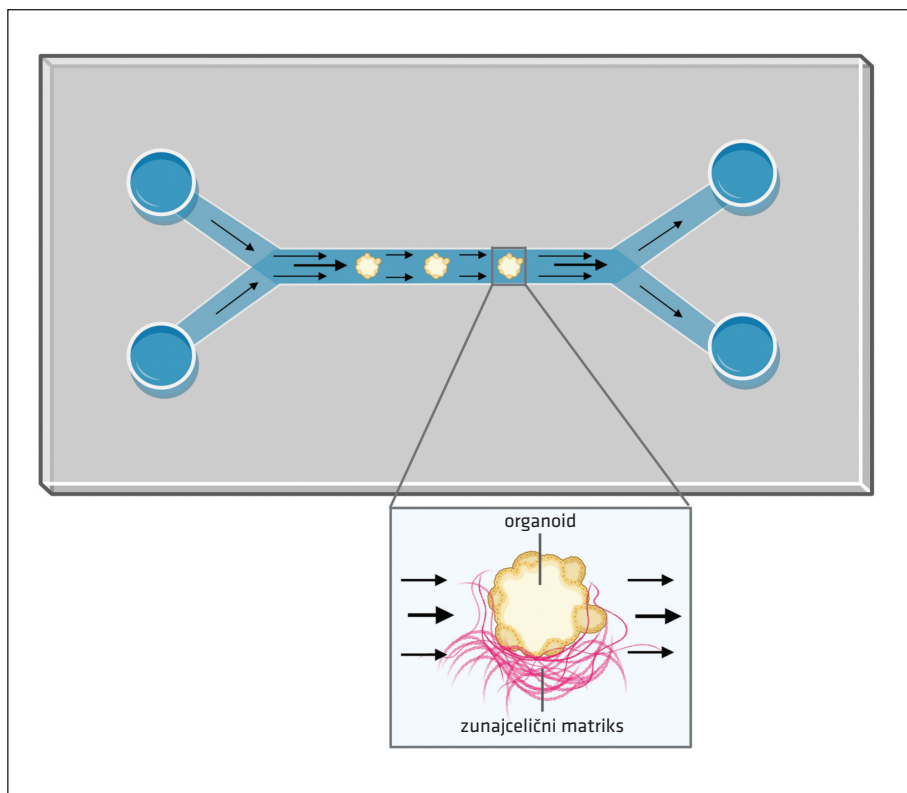
IZZIVI PRI UPORABI ORGANOIDOV LEDVIC

Kljub velikemu napredku pri pripravi organoidov ledvic še vedno precej izzivov ostaja nerešenih. Eden izmed njih je morfološka in funkcionalna nezrelost organoidov ledvic. Sekvenciranje mRNA je namreč pokazalo, da so organoidi ledvic podobni fetalnim ledvicam (28, 59–61). Zaradi tega so trenutni organoidi ledvic primernejši za raziskovanje razvoja ledvic in pediatričnih ledvičnih bolezni, medtem ko so manj primerni za proučevanje ledvičnih bolezni v odrasli dobi (36). Za zdaj tudi podaljšanje časa gojenja organoidov ne izboljša njihove zrelosti, saj se pri starih organoidih celo zmanjša izražanje označevalcev podocitov ter proksimalnih in distalnih tubulov, poleg tega pride do pojava fibroze in ekspanzije celic, ki sicer niso prisotne v ledvičnem tkivu (8, 62, 63).

Eden glavnih razlogov za nezrelost organoidov ledvic je pomanjkljivo ožiljenje, ki vodi v slabo preskrbo s kisikom in hranili v sredici organoida, ko ta doseže dolo-

čeno velikost (36). S tem je seveda omejena največja velikost organoidov, ki jih je trenutno mogoče pripraviti, in posledično tudi možnost njihove uporabe v regenerativne namene. S presaditvijo organoidov ledvic v miši z oslabljenim imunskim sistemom so sicer dokazali izboljšano ožiljenje ter večjo zrelost podocitov in tubulov, kar nakazuje na to, da se ožilje prejemnika vsaj delno poveže z organoidom (28, 55, 56, 62). Homan in sodelavci so združili pripravo organoidov z metodo organov na čipih (angl. *organ-on-a-chip*) in dokazali, da strižne sile izboljšajo dozorevanje in ožiljenje ledvičnih organoidov, kot je prikazano na sliki 3 (64). Pri laminarnem toku skozi komoro ima namreč hitrost toka paraboličen profil. Največja hitrost toka je v sredini komore, najmanjša pa ob steni. Paraboličen profil nastane, ker se plast tekočine neposredno ob steni prilepi nanjo in se zato ne premika, vsaka naslednja plast proti sredini pa se premika hitreje, saj se manj pritrdi na sosednjo plast. Zaradi različnih hitrosti plasti tekočine skozi pretočno komoro nastanejo strižne sile, ki so največje ob steni, kjer je razlika v hitrosti med plastjo, ki se ne premika, in sosednjo plastjo proti sredini, največja (1). Pritrditev organoidov ledvic na zunajcelični matriks na površini pretočne komore omogoči nastanek strižnih sil na njegovi površini in posledično sproži njihovo diferenciacijo.

V prihodnosti pričakujemo tudi izboljšanje protokolov za pripravo organoidov ledvic z uretrovimi brstiči, ki bi vsebovali tako nefrone kot zbiralca (37). Prav tako trenutno znani protokoli ne omogočajo vzajemne indukcije med MM in uretrovim brstičem, ki je zelo pomembna v embrionalnem razvoju ledvic *in vivo* (30, 33). Za zdaj izziv predstavlja tudi velika variabilnost med pripravljenimi organoidi in slaba ponovljivost, k čemur prispevajo različni dejavniki. Glavni vzrok za variabilnost celicne sestave organoidov je uporaba iPMC, ki izvirajo iz različnih posameznikov, zaradi



Slika 3. Pretok tekočine preko površine organoidov ledvic, pritrjenih na zunajcelični matriks v pretočni komori, izboljša njihovo ožiljenje in diferenciacijo. Debelejše puščice nakazujejo mesta večje hitrosti toka. Shema je bila narejena s spletnim orodjem BioRender.com.

česar so med njimi prisotne genetske in epigenetske razlike, medtem ko je slaba ponovljivost lahko posledica uporabe reagentov iz različnih serij (58, 65). Z nekaterimi novjšimi pristopi, kot so avtomatizirano pipetiranje, 3D-biotiskanje in uporaba bioreaktorjev, so že izboljšali ponovljivost in zmogljivost priprave organoidov (38, 61, 63, 66, 67). Priprava organoidov ledvic je v primerjavi s celičnimi kulturami torej še dokaj kompleksen in dolgotrajen postopek, ki je sestavljen iz veliko zaporednih korakov (pridobivanje celic, gojenje, proliferacija, indukcija v specifičen celični tip, diferenciacija itd.), kjer lahko vsak vodi v napako in izgubo celične linije. Poleg tega je sam postopek priprave organoidov relativno drag (68). Če bi bili organoidi uporabljeni za zdrav-

ljenje ledvične bolezni *in situ*, bodo v prihodnje nujne tudi raziskave, ki bodo opredelile, kako organoide tarčiti na/v določeno mesto organa. Tudi to ostaja eden izmed izzivov pri uporabi organoidov ledvic.

ZAKLJUČEK

V zadnjih letih je prišlo do velikega napredka pri razumevanju embrionalnega razvoja ledvic, kar je vodilo tudi v pripravo ustrežnejših modelov ledvic *in vitro*, med drugim tudi organoidov. Kljub temu da so tradicionalne 2D-kulture še vedno uporabljene pogosteje, menimo, da bodo organoidi ledvic v prihodnosti zagotovo dobili svoje mesto pri določenih vrstah raziskav. Ker se število bolnikov s kronično ledvično boleznijo iz leta v leto povečuje, možnosti

zdravljenja pa so zelo omejene, organoidi ledvic, kljub številnim še nerešenim izizivom, predstavljajo obetavno terapevtsko možnost pri končni odpovedi ledvic. Poleg tega imajo skupaj s tehnologijo CRISPR/Cas velik potencial pri izboljšanju razumevanja ledvičnih bolezni ter pri testiranju nefrotoksičnosti in razvoju novih terapevtskih pristopov z uporabo visokozmogljivih

metod, ki omogočajo avtomatizirano pripravo organoidov in njihovo končno analizo na mikrotitrskih ploščicah. Organoidi bi skupaj z novejšimi biotehnološkimi metodami, kot sta metoda organov na čipih in 3D-biotiskanje, lahko omogočili zelo dobro posnemanje okolja *in vivo* in s tem pomemben preobrat pri razumevanju ter zdravljenju ledvičnih bolezni v prihodnosti.

LITERATURA

1. Costanzo LS. Physiology. 5th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2014. p. 121–2, 239–41.
2. Miyoshi T, Hiratsuka K, Saiz EG, et al. Kidney organoids in translational medicine: Disease modeling and regenerative medicine. *Dev Dyn*. 2020; 249 (1): 34–45.
3. Gupta N, Dilmen E, Morizane R. 3D kidney organoids for bench-to-bedside translation. *J Mol Med (Berl)*. 2021; 99 (4): 477–87.
4. Langhans SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 6.
5. Zhou T, Benda C, Duzinger S, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22 (7): 1221–8.
6. Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell*. 2016; 165 (7): 1586–97.
7. Kopač M. Prirojene napake sečil. *Slov Pediatr*. 2015; 22: 183–91.
8. Little MH, Combes AN. Kidney organoids: Accurate models or fortunate accidents. *Genes Dev*. 2019; 33 (19–20): 1319–45.
9. Mugford JW, Sipilä P, McMahon JA, et al. *Osr1* expression demarcates a multi-potent population of intermediate mesoderm that undergoes progressive restriction to an *Osr1*-dependent nephron progenitor compartment within the mammalian kidney. *Dev Biol*. 2008; 324 (1): 88–98.
10. Hendry C, Rumballe B, Moritz K, et al. Defining and redefining the nephron progenitor population. *Pediatr Nephrol*. 2011; 26 (9): 1395–406.
11. Dudley AT, Godin RE, Robertson EJ. Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme. *Genes Dev*. 1999; 13 (12): 1601–13.
12. Barak H, Huh SH, Chen S, et al. FGF9 and FGF20 maintain the stemness of nephron progenitors in mice and man. *Dev Cell*. 2012; 22 (6): 1191–207.
13. Halt K, Vainio S. Coordination of kidney organogenesis by Wnt signaling. *Pediatr Nephrol*. 2014; 29 (4): 737–44.
14. Mills CG, Lawrence ML, Munro DAD, et al. Asymmetric BMP4 signaling improves the realism of kidney organoids. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 14824.
15. Hannema SE, Hughes IA. Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res*. 2007; 67 (3): 142–51.
16. Sequeira-Lopez ML, Lin EE, Li M, et al. The earliest metanephric arteriolar progenitors and their role in kidney vascular development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015; 308 (2): R138–49.
17. Nagalakshmi VK, Yu J. The ureteric bud epithelium: Morphogenesis and roles in metanephric kidney patterning. *Mol Reprod Dev*. 2015; 82 (3): 151–66.
18. Stark K, Vainio S, Vassileva G, et al. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*. 1994; 372 (6507): 679–83.

19. Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, et al. Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J Clin Invest.* 2000; 105 (7): 863–73.
20. Michos O, Cebrian C, Hyink D, et al. Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10. *PLoS Genet.* 2010; 6 (1): e1000809.
21. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2014; 14 (1): 53–67.
22. Wang Y, Zhou CJ, Liu Y. Wnt signaling in kidney development and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018; 153: 181–207.
23. Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPSC cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature.* 2015; 526 (7574): 564–8.
24. Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, et al. Modeling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun.* 2015; 6: 8715.
25. Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol.* 2015; 33 (11): 1193–200.
26. Wu H, Uchimura K, Donnelly EL, et al. Comparative analysis and refinement of human PSC-derived kidney organoid differentiation with single-cell transcriptomics. *Cell Stem Cell.* 2018; 23 (6): 869–81.
27. Garreta E, Prado P, Tarantino C, et al. Fine tuning the extracellular environment accelerates the derivation of kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Mater.* 2019; 18 (4): 397–405.
28. Tran T, Lindström NO, Ransick A, et al. *In vivo* developmental trajectories of human podocyte inform *in vitro* differentiation of pluripotent stem cell-derived podocytes. *Dev Cell.* 2019; 50 (1): 102–16.
29. Low JH, Li P, Chew EGY, et al. Generation of human PSC-derived kidney organoids with patterned nephron segments and a *de novo* vascular network. *Cell Stem Cell.* 2019; 25 (3): 373–87.
30. Gupta N, Morizane R. Kidney development to kidney organoids and back again. *Semin Cell Dev Biol.* 2022; 127: 468–76.
31. Taguchi A, Nishinakamura R. Higher-order kidney organogenesis from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2017; 21 (6): 730–46.
32. Mae SI, Ryosaka M, Sakamoto S, et al. Expansion of human iPSC-derived ureteric bud organoids with repeated branching potential. *Cell Rep.* 2020; 32 (4): 107963.
33. Uchimura K, Wu H, Yoshimura Y, et al. Human pluripotent stem cell-derived kidney organoids with improved collecting duct maturation and injury modeling. *Cell Rep.* 2020; 33 (11): 108514.
34. Zeng Z, Huang B, Parvez RK, et al. Generation of patterned kidney organoids that recapitulate the adult kidney collecting duct system from expandable ureteric bud progenitors. *Nat Commun.* 2021; 12 (1): 3641.
35. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007; 131 (5): 861–72.
36. Przepiorski A, Crunk AE, Espiritu EB, et al. The utility of human kidney organoids in modeling kidney disease. *Semin Nephrol.* 2020; 40 (2): 188–98.
37. Shimizu T, Yamagata K, Osafune K. Kidney organoids: Research in developmental biology and emerging applications. *Dev Growth Differ.* 2021; 63 (2): 166–77.
38. Czerniecki SM, Cruz NM, Harder JL, et al. High-throughput screening enhances kidney organoid differentiation from human pluripotent stem cells and enables automated multidimensional phenotyping. *Cell Stem Cell.* 2018; 22 (6): 929–40.
39. Cruz NM, Song X, Czerniecki SM, et al. Organoid cystogenesis reveals a critical role of microenvironment in human polycystic kidney disease. *Nat Mater.* 2017; 16 (11): 1112–9.
40. Huang CY, Ho MC, Lee JJ, et al. Generation of induced pluripotent stem cells derived from an autosomal dominant polycystic kidney disease patient with a p.Ser1457fs mutation in PKD1. *Stem Cell Res.* 2017; 24: 139–43.
41. Kim JW, Kim HW, Nam SA, et al. Human kidney organoids reveal the role of glutathione in Fabry disease. *Exp Mol Med.* 2021; 53 (10): 1580–91.
42. Shankar AS, Du Z, Mora HT, et al. Human kidney organoids produce functional renin. *Kidney Int.* 2021; 99 (1): 134–47.
43. Ding B, Sun G, Liu S, et al. Three-dimensional renal organoids from whole kidney cells: Generation, optimization, and potential application in nephrotoxicology *in vitro*. *Cell Transplant.* 2020; 29: 963689719897066.
44. Shankar AS, van den Berg SAA, Tejeda Mora H, et al. Vitamin D metabolism in human kidney organoids. *Nephrol Dial Transplant.* 2021; 37 (1): 190–3.

45. Morizane R, Bonventre JV. Generation of nephron progenitor cells and kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2017; 12 (1): 195–207.
46. Hale LJ, Howden SE, Phipson B, et al. 3D organoid-derived human glomeruli for personalized podocyte disease modeling and drug screening. *Nat Commun.* 2018; 9 (1): 5167.
47. Nassirpour R, Ramaiah SK, Whiteley LO. Nephron segment specific microRNA biomarkers of pre-clinical drug-induced renal toxicity: Opportunities and challenges. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016; 312: 34–41.
48. Ginsburg GS, Phillips KA. Precision medicine: From science to value. *Health Aff (Millwood).* 2018; 37 (5): 694–701.
49. Schutgens F, Rookmaaker MB, Margaritis T, et al. Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling. *Nat Biotechnol.* 2019; 37 (3): 303–13.
50. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15 (2): 81–94.
51. Grassi L, Alfonsi R, Francescangeli F, et al. Organoids as a new model for improving regenerative medicine and cancer personalized therapy in renal diseases. *Cell Death Dis.* 2019; 10 (3): 201.
52. Romero-Guevara R, Ioannides A, Xinari C. Kidney organoids as disease models: Strengths, weaknesses and perspectives. *Front Physiol.* 2020; 11: 563981.
53. Abbasi MA, Chertow GM, Hall YN. End-stage renal disease. *BJM Clin Evid.* 2010; 2010: 2002.
54. Geuens T, van Blitterswijk CA, LaPointe VLS. Overcoming kidney organoid challenges for regenerative medicine. *NPJ Regen Med.* 2020; 5: 8.
55. Sharmin S, Taguchi A, Kaku Y, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived podocytes mature into vascularized glomeruli upon experimental transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27 (6): 1778–91.
56. van den Berg CW, Ritsma L, Avramut MC, et al. Renal subcapsular transplantation of PSC-derived kidney organoids induces neo-vasculogenesis and significant glomerular and tubular maturation *in vivo*. *Stem Cell Reports.* 2018; 10 (3): 751–65.
57. Nam SA, Seo E, Kim JW, et al. Graft immaturity and safety concerns in transplanted human kidney organoids. *Exp Mol Med.* 2019; 51 (11): 1–13.
58. Subramanian A, Sidhom EH, Emani M, et al. Single cell census of human kidney organoids shows reproducibility and diminished off-target cells after transplantation. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 5462.
59. Combes AN, Phipson B, Lawlor KT, et al. Single cell analysis of the developing mouse kidney provides deeper insight into marker gene expression and ligand-receptor crosstalk. *Development.* 2019; 146 (12): dev178673.
60. Kim YK, Refaeli I, Brooks CR, et al. Gene-edited human kidney organoids reveal mechanisms of disease in podocyte development. *Stem Cells.* 2017; 35 (12): 2366–78.
61. Kumar SV, Er PX, Lawlor KT, et al. Kidney micro-organoids in suspension culture as a scalable source of human pluripotent stem cell-derived kidney cells. *Development.* 2019; 146 (5): dev172361.
62. Bantounas I, Ranjzad P, Tengku F, et al. Generation of functioning nephrons by implanting human pluripotent stem cell-derived kidney progenitors. *Stem Cell Reports.* 2018; 10 (3): 766–79.
63. Przepiorski A, Sander V, Tran T, et al. A simple bioreactor-based method to generate kidney organoids from pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 2018; 11 (2): 470–84.
64. Homan KA, Gupta N, Kroll KT, et al. Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids *in vitro*. *Nat Methods.* 2019; 16 (3): 255–62.
65. Phipson B, Er PX, Combes AN, et al. Evaluation of variability in human kidney organoids. *Nat Methods.* 2019; 16 (1): 79–87.
66. Higgins JW, Chambon A, Bishard K, et al. Bioprinted pluripotent stem cell-derived kidney organoids provide opportunities for high content screening. 2018; bioRxiv: 505396.
67. Lawlor KT, Vanslambrouck JM, Higgins JW, et al. Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation. *Nat Mater.* 2021; 20 (2): 260–71.
68. Bose S, Clevers H, Shen X. Promises and challenges of organoid-guided precision medicine. *Med (N Y).* 2021; 2 (9): 1011–26.