



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»

Μαρία Γιαννακοπούλου
Βιολόγος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπων Καθηγητής:

Κούκλης Παναγιώτης, Αναπληρωτής καθηγητής, εργαστήριο Γενικής Βιολογίας,
Ιατρική σχολή πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη Επιτροπής:

- 1) Γαλάνη Βασιλική, Αναπληρώτρια καθηγήτρια, εργαστήριο Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρική σχολή πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 2) Τσάμης Κωνσταντίνος, Επίκουρος καθηγητής, εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική σχολή πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννινα, Ιούλιος 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας μου θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της και με στήριζαν καθ' όλη την διάρκεια αυτής.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Κούκλη Παναγιώτη, αναπληρωτή καθηγητή Γενικής Βιολογίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα αντικείμενο μεγάλου ενδιαφέροντος για εμένα, καθώς και για την συνεχή καθοδήγησή του κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Γαλάνη Βασιλική, αναπληρώτρια καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, για την συνεχή της στήριξη, πρακτική και ηθική, καθώς με καθοδηγούσε σε κάθε στάδιο της εργασίας και με ωθούσε να συνεχίσω την προσπάθειά μου.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Τσάμη Κωνσταντίνο, επίκουρο καθηγητή Φυσιολογίας, για την επιθυμία του να αποτελέσει μέλος της τριμελούς επιτροπής μου και για την συμβολή του στην ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου, τους γονείς μου Θεοδωρή και Βασιλική για την απόλυτη στήριξη τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου και την εμπιστοσύνη που μου δείχνουν σ' ότι κάνω στην ζωή μου, τον αδελφό μου Άγγελο και την σύζυγό του Νεφέλη για την στήριξη και την καθοδήγησή τους και, τέλος, τον σύντροφο μου Χρήστο για την κατανόηση και την συμπαράσταση του τα δύο αυτά χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τρισδιάστατα μοντέλα οργανοειδών του νευρικού συστήματος αντιπροσωπεύουν ένα καινοτόμο και πολλά υποσχόμενο εργαλείο στις μελέτες νευροεπιστήμης. Προέρχονται από hESCs και hiPSCs και ανακεφαλαιώνουν μοναδικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του ανθρώπινου εγκεφάλου, καθιστώντας τα ιδανικά μοντέλα συστημάτων για την απόκτηση νέων γνώσεων για μια ποικιλία νευρολογικών ασθενειών, και όχι μόνο. Τα hiPSCs αυτοσυναρμολογούνται για να σχηματίσουν μια οργανωμένη αρχιτεκτονική, που αποτελείται από προγονικούς νευρωνικούς και νευρογλοιακούς τύπους κυττάρων και μοιάζει με τον ανθρώπινο εγκέφαλο του εμβρύου. Σε αντίθεση με τις συμβατικές δισδιάστατες (2D) κυτταροκαλλιέργειες, τα οργανοειδή του εγκεφάλου παρομοιάζουν τον ανθρώπινο εγκέφαλο όχι μόνο σε κυτταρικό επίπεδο, αλλά και ως προς τη γενική δομή των ιστών και την αναπτυξιακή τροχιά, παρέχοντας επομένως μια μοναδική ευκαιρία για την μοντελοποίηση του ανθρώπινου εγκεφάλου. Τα οργανοειδή του νευρικού συστήματος έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα σε μια πληθώρα εφαρμογών, όπως στην μοντελοποίηση της ανάπτυξης και λειτουργίας του εγκεφάλου, στην μελέτη νευροαναπτυξιακών ή/και νευροεκφυλιστικών διαταραχών καθώς και στην μελέτη νεοπλασιών του εγκεφάλου. Ωστόσο, αν και τα οργανοειδή ανακεφαλαιώνουν πιστά μια σειρά από βασικά χαρακτηριστικά του ανθρώπινου εγκεφάλου, δεν αποτελούν τέλειο αντίγραφο και η υπέρβαση σημαντικών περιορισμών, όπως η ωριμότητα και η λειτουργικότητα τους καθώς και η ετερογένεια τους είναι αναγκαία.

ABSTRACT

Human 3D organoids of the nervous system represent an innovative and promising tool in neuroscience studies. They derived from hESCs and hiPSCs and recapitulate unique features of human brain development, making them ideal model systems for gaining new insights into a variety of neurological diseases and beyond. hiPSCs self-assemble to form an organized architecture, composed of progenitor neuronal and glial cell types, that resembles the human embryonic brain. Unlike conventional two-dimensional (2D) cell cultures, brain organoids mimic the human brain not only at the cellular level, but also in terms of general tissue structure and developmental trajectory , thus providing a unique opportunity for modeling human brain. Organoids of the nervous system have been used to date in a multitude of applications, such as in the modeling of brain development and function, in the study of neurodevelopmental and/or neurodegenerative disorders as well as in the study of brain neoplasms. However, although organoids faithfully recapitulate a number of key features of the human brain, they are not a perfect replica and overcoming important limitations such as their maturity and functionality as well as their heterogeneity is necessary.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.A. Βλαστικά κύτταρα.....	6
1.B. Βλαστικά κύτταρα νευρικού συστήματος.....	11
1.Γ. Καλλιέργεια νευρικών βλαστικών κυττάρων, νευροσφαιρών & οργανοειδών	21
2. ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΗ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	25
2.A. Καλλιέργεια & διαφοροποίηση οργανοειδών – μεθοδολογία	25
2.B. Εφαρμογές οργανοειδών νευρικού συστήματος	33
I. Μοντελοποίηση ανάπτυξης και λειτουργίας εγκεφάλου χρησιμοποιώντας οργανοειδή.....	33
II. Μοντελοποίηση νευροαναπτυξιακών διαταραχών του εγκεφάλου χρησιμοποιώντας οργανοειδή	37
III. Μοντελοποίηση νευροεκφυλιστικών διαταραχών του εγκεφάλου χρησιμοποιώντας οργανοειδή	45
IV. Μοντελοποίηση νεοπλασιών του εγκεφάλου χρησιμοποιώντας οργανοειδή	51
2.Γ. Περιορισμοί & προβλήματα στην χρήση των οργανοειδών νευρικού συστήματος	57
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	62

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

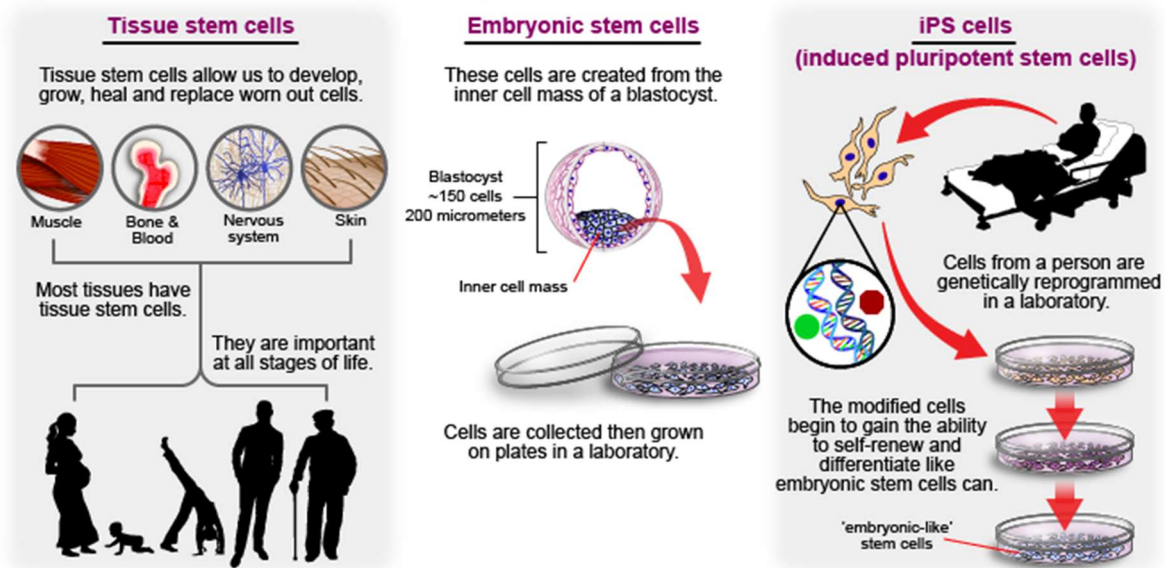
1.A. Βλαστικά κύτταρα

Ως βλαστικό κύτταρο ορίζεται το αδιαφοροποίητο κύτταρο που έχει τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε ιστικά εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους καθώς και τη δυνατότητα αυτοανανέωσης. Η συμπεριφορά τους ρυθμίζεται από τον θώκο (niche) ώστε να παράγουν προβαθμίδες με αποτέλεσμα τελικά να διαφοροποιούνται. [1]

Τα βλαστικά κύτταρα ταξινομούνται ως εξής:

- Ολοδύναμα- Παντοδύναμα (Totipotent)
- Πολυδύναμα (Pluripotent):
 - Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs, Embryonic stem cells)
 - Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs, induced Pluripotent stem cells)
- Ολιγοδύναμα – Πλειοδύναμα (Multipotent)

Types of stem cells and where they come from:



Εικόνα 1. Οι κατηγορίες βλαστικών κυττάρων. (MRC Centre for Regenerative Medicine The University of Edinburgh)

[Πληκτρολογήστε εδώ]

Τα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν και σε εμβρυικά κύτταρα αλλά και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς (πχ πλακούντας). Ένα παράδειγμα τέτοιου κυττάρου είναι ο ζυγώτης. Έπειτα από 4 ημέρες, σχηματίζονται τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας, τα οποία είναι πολυδύναμα κύτταρα και μπορούν να διαφοροποιηθούν προς κύτταρα όλων των βλαστικών στιβάδων αλλά όχι εξωεμβρυϊκών ιστών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα Embryonic stem cells (ESCs), πηγή των οποίων είναι τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης, πριν από την εμφύτευση και τα induced Pluripotent stem cells (iPSCs), τα οποία προέρχονται από την επιβλάστη εμφυτευμένων εμβρύων. Τα human Embryonic stem cells (hESCs) διαφοροποιούνται περαιτέρω δημιουργώντας τρία βλαστικά δέρματα, μια διαδικασία που ονομάζεται γαστριδίωση, όπου τα κύτταρα πλέον είναι πλειοδύναμα (MSCs, Multipotent Stem Cells). Σημειώνεται πως ανά βήμα μειώνεται και το δυναμικό διαφοροποίησης.

Τα Σωματικά βλαστικά κύτταρα ή αλλιώς ενήλικα βλαστικά κύτταρα (ASCs, Adult stem cells), είναι μη διαφοροποιημένα κύτταρα παρόντα σε όλο το σώμα και μπορούν να επαναπρογραμματιστούν ώστε να επιστρέψουν σε κατάσταση πολυδυναμίας. Για παράδειγμα με τη διαδικασία μεταφοράς ενός κυτταρικού πυρήνα ενήλικα σε κυτταρόπλασμα ενός ωοκυττάρου ή σε πολυδύναμο κύτταρο, όπως συνέβη στο πείραμα Dolly Sheep. [2]

Ζυγώτης → Βλαστοκύστη έσω Κυτταρική Μάζα [Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα (πολυδύναμα)] → Κύτταρα Επιβλάστης μετά την εμφύτευση (πολυδύναμα) →

Όψιμο Έμβryo Εμβρυονικά Βλαστικά κύτταρα (πολυδύναμα) →

Ενήλικας Πλειοδύναμα, Ολιγοδύναμα, Μονοδύναμα [Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs), Αιμοποιητικά Βλαστικά Κύτταρα (HSCs), Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα (NSCs), Βλαστικά Κύτταρα του Δέρματος]

Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (PSCs) πολλαπλασιάζονται επ' άπειρον και διαφοροποιούνται σε κύτταρα και των τριών βλαστικών στοιβάδων. Αυτές οι δύο ιδιότητες τα καθιστούν ελκυστικές πηγές για κυτταρικές θεραπείες για διάφορες

[Πληκτρολογήστε εδώ]

ασθένειες και τραυματισμούς. Υπάρχουν δύο τύποι ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (hPSCs) τα οποία διερευνήθηκαν για κλινική χρήση: ESCs και iPSCs.

Τα ESCs χαρακτηρίζονται από την ικανότητα της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης σε οποιονδήποτε κυτταρικό τύπο. Λόγω της πολυδύναμης φύσης τους και της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται σε όλους τους τύπους κυττάρων του σώματος, έχουν θεωρηθεί ως πηγή κυττάρων για την αναγεννητική ιατρική. [3]

Ενώ τα ESCs θεωρούνταν τα μόνα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από πολυδυναμικότητα, οι Takahashi και Yamanaka το 2006 έδειξαν ότι η μοίρα των σωματικών διαφοροποιημένων κυττάρων μπορεί να «αναστραφεί» και να μετατραπούν και πάλι σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα.

Οι Shinya Yamanaka, μαζί με τον Kazutoshi Takahashi, το 2006, έδειξαν ότι είναι δυνατός ο επαναπρογραμματισμός ενηλίκων βλαστικών κυττάρων στην πολυδύναμη κατάσταση. Αυτή η διαδικασία ήταν η μεσολαβούμενη από ρετροϊό μεταγωγή ινοβλαστών ποντικού με τέσσερις μεταγραφικούς παράγοντες (Oct-3/4, Sox2, KLF4 και c-Myc) που εκφράζονται σε ESCs και θα μπορούσαν να προκαλέσουν τη μεταβολή των ινοβλαστών σε πολυδύναμα κύτταρα. Αυτή η νέα μορφή βλαστοκυττάρων ονομάστηκε induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). [4] Ένα χρόνο αργότερα, το πείραμα επανελήφθη με ανθρώπινα κύτταρα. Μετά από αυτή την επιτυχία, η μέθοδος άνοιξε ένα νέο πεδίο στην έρευνα των βλαστοκυττάρων με μια γενιά σειρών iPSCs που μπορούν να προσαρμοστούν ώστε να είναι συμβατές με τον ασθενή.

Είναι, συνεπώς, δυνατόν τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα να γίνουν και πάλι πολυδύναμα μέσω του άμεσου επαναπρογραμματισμού μετατρέποντας τα διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα σε σειρές iPSCs που μπορούν να σχηματίσουν όλους τους τύπους κυττάρων ενός οργανισμού. Η εν λόγω διαδικασία περιλαμβάνει έκφραση των ογκογονιδίων Klf4 και Myc. Τα iPSCs που προκύπτουν είναι αυτόλογα και μειώνουν τον κίνδυνο ανοσολογικής απόρριψης. Επειδή τα πολυδύναμα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστων και να διαφοροποιούνται σε οποιοδήποτε είδος κυττάρου, μπορούν να είναι μια απεριόριστη πηγή κυττάρων. Η καλύτερη πηγή κυττάρων για την παραγωγή iPSCs, είναι οι ινοβλάστες, [5], ωστόσο έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης αιμοποιητικά κύτταρα περιφερικού αίματος, κερατινοκύτταρα και επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα που ανευρίσκονται στα ούρα. Ως φυσική πηγή στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής, τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) θα

[Πληκτρολογήστε εδώ]

μπορούσαν να παρέχουν ένα προτιμώμενο εργαλείο για προσεγγίσεις αντικατάστασης κυττάρων ή μηχανική ιστών. Τα MSCs απομονώθηκαν για πρώτη φορά από την θέση των βλαστοκυττάρων του μυελού των οστών (BM – MSCs). Στην συνέχεια, μια ποικιλία διαφορετικών ιστών έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανές πηγές για MSCs. Αυτοί οι ιστοί περιλαμβάνουν λιπώδη ιστό και περιφερικό αίμα. Ωστόσο, εκτεταμένη έρευνα τα τελευταία χρόνια έχει αποκαλύψει ότι κύτταρα με μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά παρόμοια με τα BM-MSCs, μπορούν να εντοπιστούν σε μεγάλο αριθμό οργάνων ή ιστών. Παρά το γεγονός ότι έχουν διαφορετική προέλευση, αυτοί οι πληθυσμοί MSCs διατηρούν κυτταρικές βιολογικές ιδιότητες που συνδέονται συνήθως με τα βλαστοκύτταρα. Αυτά περιλαμβάνουν την συνεχή πρόοδο του κυτταρικού κύκλου για αυτοανανέωση και την δυνατότητα διαφοροποίησης σε υψηλά εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους του μεσοδερματικού φαινοτύπου συμπεριλαμβανομένων των σειρών χονδροβλαστών, οστεοβλαστών και λιποκυττάρων. [6]

Τα iPSCs παρουσιάζουν ανάλογη μορφολογία και ιδιότητες ανάπτυξης με τα ESCs και εκφράζουν γονίδια δεικτών ESCs. Η in vivo υποδόρια μεταμόσχευση iPSCs σε ποντίκια οδηγεί σε ανάπτυξη όγκων που περιέχουν ιστούς και από τα τρία βλαστικά στρώματα. [7]

Συγκριτικά, τα iPSCs και τα ESCs παρουσιάζουν τόσο ομοιότητες όσο και διαφορές μεταξύ τους. Και τα δύο παρουσιάζουν απεριόριστη δυνατότητα αυτοανανέωσης και πολυδυναμικότητας. Επίσης είναι όμοια όσον αφορά τον φυσιολογικό καρύοτυπο, την μορφολογία τους, την δυνατότητα σχηματισμού τερατώματος, την υψηλή ενεργότητα τελομεράσης που τους προσδίδει «αθάνατο» χαρακτήρα και τους κυτταρικούς δείκτες επιφανείας. [8]

Εντούτοις, τα iPSCs παρουσιάζουν δυο σημαντικά προτερήματα, έναντι των ESCs. Πρώτον, τα iPSCs αποτελούν μια άμεση πηγή βλαστοκυττάρων και μάλιστα από τον ασθενή και επομένως με χαμηλότερο ρίσκο ανοσιακής απόκρισης. [9] Δεύτερον, τα iPSCs μπορούν να παρακάμψουν τα ηθικά ζητήματα που σχετίζονται με τη χρήση των ESCs, καθώς η χρήση τους απαιτεί την καταστροφή ανθρώπινων εμβρύων. Τα iPSCs ωστόσο είναι όμοια και όχι πανομοιότυπα με τα ESCs, όπως αποδείχθηκε από την πλειοψηφία των γονιδίων και των επιφανειακών δεικτών που εκφράζονται στα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα. [10] Σε αυτή τη διαφορά φαίνεται να συμβάλλουν οι επιγενετικοί μηχανισμοί. Δηλαδή ενώ όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν το ίδιο

[Πληκτρολογήστε εδώ]

DNA, την ίδια γενετική πληροφορία, παρουσιάζουν διαφορετική γονιδιακή έκφραση ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού σε κάθε στάδιο ανάπτυξης.

Επομένως, τα iPSCs χάρη στις ιδιότητές τους αποτελούν επιθυμητό στόχο για την ανακάλυψη και σωστή διαλογή των φαρμάκων για κάθε ασθενή (drug screening), την εξατομικευμένη ιατρική (patient-precised medicine), την αναγεννητική ιατρική (regenerative medicine) καθώς και την κατανόηση της βιολογίας των ασθενειών. [11]

Πίνακας 1: iPSC's προερχόμενα από διαφορετικά είδη και τύπους σωματικών κυττάρων. (Stadtfield *Hochedlinger Genes Dev.* 2010 Oct 15;24(20):2239-63)

Species	Germ layer	Cell type	Factors	Efficiency	Reference	
<u>Mouse</u>	MS	Fibroblasts	OKSM	0.02	Takahashi and Yamanak 2006	
			OKS	0.002	Nakagawa et al. 2008, Wernig et al. 2008b	
			OSE	ND	Feng et al. 2009	
			KSNr	0.002	Heng et al. 2010	
			OKSM + C	3%	Hanna et al. 2008	
			OKSM	0.02%	Eminli et al. 2009	
			OKSM	25%	Eminli et al. 2009	
			OKSM	13%	Eminli et al. 2009	
			OKSM	0.2%	Sugii et al. 2010	
			OKM	1.4%	Tsai et al. 2010	
	OK	0.02%	Tsai et al. 2010			
	EN	Pancreatic β cells Hepatic endoderm	OKSM	0.1%	Stadtfield et al. 2008a	
			OKS	ND	Aoi et al. 2008	
	EC	Neural stem cells Melanocytes	OK	<0.1%	JB Kim et al. 2008	
			O	<0.01%	JB Kim et al. 2009a	
OKM			0.2%	Utikal et al. 2009a		
<u>Human</u>	MS	Fibroblasts	OKSM	0.02%	Takahashi et al. 2007	
			OSLN	0.02%	Yu et al. 2007	
			OKS	0.002	Nakagawa et al. 2008	
			OKSM	0.01%	Loh et al. 2009	
			OSLN	<0.01%	Haase et al. 2009	
			OKSM	ND	Eminli et al. 2009	
			OS	<0.01%	Giorgetti et al. 2009	
			OKSM	0.5%	Sugii et al. 2010	
			OKS	<0.1%	Aoki et al. 2010	
			EN	Hepatocytes	OKSM	0.1%
	OKS	ND			Aasen et al. 2008	
	EC	Keratinocytes Neural stem cells	OKS	ND	Aasen et al. 2008	
			O	<0.004%	JB Kim et al. 2009b	
	EX	Amniotic cells	OKSM	0.05%–1.5%	C Li et al. 2009	
			OSN	0.1%	Zhao et al. 2010	
	<u>Rat</u>	MS	Fibroblasts	OKSM	0.05% ^a	Liao et al. 2009
				OKS	0.01% ^b	Chang et al. 2010
		EN	Liver progenitor cells	OKS	ND ^c	W Li et al. 2009a
EC	Neural progenitor cells	OKS	0.01% ^b	Chang et al. 2010		
<u>Pig</u>	MS	Embryonic fibroblasts	OKSM	ND	Esteban et al. 2009	
<u>Rhesus monkey</u>	MS	Ear skin fibroblasts	OKSM	ND	Liu et al. 2008	
<u>Marmoset</u>	MS	Skin fibroblasts	OKSM	0.1%	Wu et al. 2010	

(MS) μεσόδερμα, (EN) ενδόδερμα, (EC) εξώδερμα, (EX) εξωεμβρυονικό, (C) C/EBPα, (E) Esrrb, (K) Klf4, (L) Lin28, (M) c-Myc, (Nr) Nr5a2, (O) Okt4, (S) Sox2, (ND) δεν έχει προσδιοριστεί.

1.B. Βλαστικά κύτταρα νευρικού συστήματος

Στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) υπάρχουν δύο βασικοί τύποι κυττάρων: τα νευρικά κύτταρα ή νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα ή γλοία. Οι νευρώνες αποτελούν τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα του ΚΝΣ, ενώ τα νευρογλοιακά κύτταρα (μικρότερα από τους νευρώνες) έχουν κατά βάση υποστηρικτικό ρόλο. [12] Οι τρέχουσες επιστημονικές προσεγγίσεις έχουν αμφισβητήσει την επί χρόνια αντίληψη ότι ο ανθρώπινος εγκέφαλος περιλαμβάνει περίπου 100 δισεκατομμύρια νευρώνες και 1 τρισεκατομμύριο νευρογλοιακά κύτταρα (αναλογία γλοίας: νευρώνων 10:1). Σήμερα η επικρατούσα θεωρία είναι ότι η αναλογία γλοίας: νευρώνων είναι περίπου 1:1, ενώ ο συνολικός αριθμός νευρογλοιακών κυττάρων δε ξεπερνά τα 100 δισεκατομμύρια κύτταρα. [13] Τα νευρογλοιακά κύτταρα έχουν ποικίλα σχήματα και λειτουργίες. Ο όρος «νευρογλοία» (νεύρο και γλοία = κόλλα) αντανακλά την παλιότερη πεποίθηση ότι τα κύτταρα αυτά συγκρατούν τους νευρώνες κοντά με κάποιον τρόπο. Παρόλο που δεν υπάρχουν επιστημονικά τεκμήρια που να ενισχύουν αυτή την πεποίθηση, ο όρος έχει διατηρηθεί και χρησιμοποιείται έως και σήμερα. Στο ΚΝΣ συναντάμε τέσσερις τύπους νευρογλοιακών κυττάρων, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα μικρογλοιακά και τα επενδυματικά κύτταρα, ενώ στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (Π.Ν.Σ.) συναντάμε 2 τύπους γλοίας, τα δορυφόρα κύτταρα (satellite) που συνιστούν ομάδες κυττάρων που περιβάλλουν τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων στο Π.Ν.Σ. και τα κύτταρα Schwann, τα οποία σχηματίζουν έλυτρα μυελίνης γύρω από τις μεγάλες νευρικές ίνες στο Π.Ν.Σ [14]

Τα νευρικά κύτταρα (νευρώνες) αποτελούν τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος. Η βασική δομική ταξινόμηση των νευρώνων βασίζεται στον αριθμό και το σχήμα των αποφυάδων του κυτταρικού σώματος και βάσει αυτής οι νευρώνες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες. Οι πολύπολοι νευρώνες φέρουν πολλούς δενδρίτες και έναν άξονα, συνιστώντας τον πιο κοινό τύπο νευρικού κυττάρου στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Οι δίπολοι νευρώνες αποτελούνται από έναν κύριο δενδρίτη και έναν άξονα, και είναι σπάνιοι (εντοπίζονται στο κοχλιακό γάγγλιο, αιθουσαίο γάγγλιο, οσφρητικό βλεννογόνο και αμφιβληστροειδή). Τέλος, μονόπολοι νευρώνες με μία αποφυάδα μόνο, είναι μόνο αισθητικοί (αφής, έκτασης). Αναπτύσσονται από ένα δίπολο νευρώνα στο έμβρυο (άξονα και δενδρίτη), κατόπιν

[Πληκτρολογήστε εδώ]

συγγωνεύονται και στη συνέχεια διακλαδώνονται σε δύο διακλαδώσεις, με τον άξονα που προεξέχει προς την περιφέρεια να είναι ο δενδρίτης .

Συνεπώς, ένας τυπικός νευρώνας αποτελείται από το κυτταρικό σώμα, τον άξονα (νευράξονα) και τους δενδρίτες. Ο άξονας είναι το τμήμα του νευρώνα που συμμετέχει στη μετάδοση σημάτων σε μεγάλη απόσταση, χάρη στις πολυάριθμες διακλαδώσεις που φέρει στο άκρο του, ενώ οι δενδρίτες προσλαμβάνουν σήματα από άλλους νευράξονες και τα μεταφέρουν στο σώμα του νευρικού κυττάρου. Το κυτταρικό σώμα περιέχει έναν ευμεγέθη πυρήνα με εμφανή πυρήνιο, σωμάτια Nissl (αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο) και ελεύθερα ριβοσώματα για την σύνθεση πρωτεϊνών, οι οποίες αντικαθιστούν τα νευρωνικά κυτταρικά συστατικά για την ανάπτυξη και επιδιόρθωση των κατεστραμμένων νευραξόνων του Περιφερικού Νευρικού Συστήματος. Επιπρόσθετα, το κυτταρικό σώμα περιέχει άφθονα νευρονημάτια ή νευροϊνίδια που προσδίδουν την μορφή και στηρίζουν τον νευρώνα, δέσμες από ενδιάμεσα ινίδια, μικροσωληνίσκους που διακινούν υλικό εντός των κυττάρων και μάζες χρωστικής λιποφουσκίνης (αβλαβείς, δείκτης γήρανσης). Οι νευρώνες χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια ως προς το μέγεθος, το σχήμα, τον αριθμό και τη διεύθυνση των αξόνων και των δενδριτών. Οι δενδρίτες που εκφύονται από το κυτταρικό σώμα μπορεί να είναι από ένας έως κάποιες δεκάδες, έχουν μεγαλύτερη διάμετρο από τους άξονες και στην κυτταρική τους μεμβράνη φέρουν προεξοχές που ονομάζονται άκανθες. Εν αντιθέσει, οι άξονες είναι λείοι και μόνο ένας άξονας εκφύεται από κάθε κυτταρικό σώμα. [15]

Βασικό χαρακτηριστικό της επικοινωνίας των νευρικών κυττάρων είναι η δημιουργία συνάψεων. Ο νευρώνας που στέλνει το ηλεκτρικό σήμα κατά μήκος του νευράξονα προς τη σύναψη ονομάζεται προσυναπτικός νευρώνας. Ο νευρώνας αυτός εκκλύει μια ουσία (νευροδιαβιβαστής, νευροορμόνη) η οποία δρα στο δενδρίτη του γειτονικού νευρικού κυττάρου-στόχου το οποίο και ονομάζεται μετασυναπτικός νευρώνας. Οι συνάψεις εντοπίζονται κατά κόρον στους δενδρίτες του μετασυναπτικού νευρώνα, μπορούν όμως να βρεθούν και στον νευράξονα ή στο κυτταρικό σώμα.

Τα αστροκύτταρα είναι κύτταρα αστεροειδούς σχήματος με πολλές αποφυάδες που εντοπίζονται σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα (εγκέφαλος και ωτιαίος μυελός). Λόγω των πολλών κυτταρικών αποφυάδων που διαθέτουν, καταλαμβάνουν τον περισσότερο χώρο μεταξύ των νευρικών κυττάρων και αποτελούν αριθμητικά τον κυρίαρχο κυτταρικό τύπο της γλοίας. Διαδραματίζουν πολλές σημαντικές λειτουργίες

[Πληκτρολογήστε εδώ]

και πιο συγκεκριμένα προσδίδουν δομική στήριξη στους νευρώνες, διατηρούν το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη γένεση των νευρικών ερεθισμάτων (δυναμικά ενέργειας), ρυθμίζουν τις συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών για την επιβίωσή των νευρώνων, καθώς και τις συγκεντρώσεις ιόντων, γλουταμικού οξέος και νερού, συλλέγουν την περίσσεια των νευροδιαβιβαστών, παρέχουν βοήθεια στην νευρωνική μετανάστευση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εγκεφάλου, επιτελούν επιδιορθώσεις για τη σταθεροποίηση των ιστών, καθώς και συμμετέχουν στην άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, οι αποφυάδες (τελικά αγγειακά πόδια) των αστροκυττάρων βρίσκονται σε άμεση επαφή με τη βασική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, σχηματίζοντας μαζί με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood-brain Barrier). Οι αποφυάδες των αστροκυττάρων περιέχουν την πρωτεΐνη ενδιάμεσου ινιδίου που ονομάζεται γλοιακή όξινη ινιδική πρωτεΐνη (GFAP).[12]

Τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι μια άλλη κατηγορία νευρογλοιακών κυττάρων που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των ελύτρων μυελίνης που περιβάλλουν τους νευράξονες. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τη διαφοροποίηση προγονικών ολιγοδενδροκυττάρων, μια διαδικασία πολύπλοκη, που υπόκειται στον έλεγχο πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων νευροδιαβιβαστών και άλλων παραγόντων προερχόμενων από νευρώνες. [16]

Τα επενδυματικά κύτταρα επενδύουν τις κοιλίες του εγκεφάλου και τον Κεντρικό Νευρικό Σωλήνα του νωτιαίου μυελού, είναι τοποθετημένα σε μία μονή στοιβάδα, το σχήμα τους κυμαίνεται από κυβικό έως κυλινδρικό, και διαθέτουν ωοειδές πυρήνα με πυκνή χρωματίνη. Στην κορυφαία επιφάνεια τους φέρουν μακριούς κινητούς κροσσούς, οι οποίοι μέσω της συγχρονισμένης δόνησής τους συμμετέχουν στην προώθηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Άλλες σημαντικές λειτουργίες των επενδυματικών κυττάρων είναι η μηχανική και τροφική υποστήριξη των νευρικών βλαστικών κυττάρων, καθώς και η προστασία του εγκεφάλου από δυνητικά επιβλαβή μόρια που κυκλοφορούν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. [17]

Τα μικρογλοία είναι τα «μακροφάγα του ΚΝΣ», καθώς προστατεύουν τον εγκέφαλο από την εισβολή μικροοργανισμών και φαγοκυτταρώνουν νεκρά κύτταρα και υπολείμματα τους. Επιπλέον, μεταναστεύουν σε περιοχές της βλάβης, όπου απομακρύνουν τα τραυματισμένα κύτταρα, μπορεί επίσης να θανατώσουν και υγιή

[Πληκτρολογήστε εδώ]

κύτταρα. Έχουν τη μοναδική ιδιότητα να αλλάζουν μορφή και συμπεριφορά ανάλογα με τις απαιτήσεις του περιβάλλοντος και αυτό τα καθιστά ιδιαίτερα σημαντικά κύτταρα στην διατήρηση της ομοιόστασης του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι μικρά κύτταρα με λίγες διακλαδιζόμενες αποφυάδες και η προέλευσή τους παρέμενε έως πρόσφατα αμφιλεγόμενη. Για πολλά χρόνια, υπήρχε η παραδοχή ότι τα μικρογλοία, όπως και τα μακρογλοία (αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα) προέρχονται από κοινό κυτταρικό πρόγονο. Όμως, οι φαινοτυπικές ομοιότητες μεταξύ της μικρογλοίας και των μονοκύτταρων μακροφάγων οδήγησε στην αποδοχή της άποψης ότι τα μικρογλοία έχουν μυελογενή προέλευση. Μάλιστα, πρόσφατες μελέτες σε πειραματικές σειρές ποντικών έδειξαν ότι τα προγονικά κύτταρα της μικρογλοίας προέρχονται από τον λεκιθικό ασκό. Επομένως, σήμερα δεν υπάρχει αμφισβήτηση περί της μυελογενούς προέλευσης των μικρογλοιακών κυττάρων, και της παραδοχής ότι τα προγονικά κύτταρα της μικρογλοίας αποτελούν διακριτό κυτταρικό πληθυσμό από τα υπόλοιπα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. [18]

Τα νευρικά βλαστοκύτταρα (NSCs) είναι εξειδικευμένα κύτταρα που έχουν την ικανότητα να διαιρούνται και να διαφοροποιούνται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων του νευρικού συστήματος. Βρίσκονται σε διάφορα μέρη του νευρικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού και άλλων νευρικών ιστών.

Με τον όρο NSCs αναφερόμαστε στα προγονικά κύτταρα σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια που ξεκινούν γενεές που οδηγούν στον σχηματισμό διαφοροποιημένων νευρώνων ή νευρογλοιακών κυττάρων στο εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Τα NSCs είναι σημαντικά κατά την ανάπτυξη, καθώς βοηθούν στον σχηματισμό του νευρικού συστήματος στα έμβρυα. Στους ενήλικες, τα NSCs εμπλέκονται στην επισκευή και την αναγέννηση των ιστών, καθώς μπορούν να δημιουργήσουν διαφορετικούς τύπους νευρικών κυττάρων όπως νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα. [19]

Ευρέως εικαζόταν ότι ο εγκέφαλος των ενηλίκων περιείχε προγονικά κύτταρα για την δημιουργία γλοιακών κυττάρων, αλλά οι νέοι νευρώνες μπορούσαν να σχηματίζονται μόνο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αυτό το δόγμα αμφισβητήθηκε την δεκαετία του 1960 όταν ο Joseph Altman πρότεινε ότι νεογέννητοι νευρώνες θα

[Πληκτρολογήστε εδώ]

μπορούσαν να εμφανιστούν σε πολλαπλές περιοχές του ενήλικα εγκεφάλου θηλαστικού, συμπεριλαμβανομένου του ιππόκαμπου, του οσφρητικού βολβού (OB) και του φλοιού. [20] Απευθείας η απόδειξη για την νευρογένεση προήλθε από μελέτες σε ωδικά πτηνά. Το εργαστήριο του Fernando Nottebohm εντόπισε νεοσχηματισμένα κύτταρα ως νευρώνες, βασισμένοι όχι μόνο στην δομή τους αλλά και στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες καθώς και στην λειτουργική ενσωμάτωση στον πυρήνα ελέγχου. [21, 22] Αυτό υποδηλώνει ότι τα προγονικά NSCs με δυνατότητα μακροχρόνιας αυτοανανέωσης και δημιουργίας νευρώνων και γλοίας παραμένουν στον εγκέφαλο των ενηλίκων. [23]

Στα αμφίβια και τα ψάρια, τα οποία συνεχίζουν να αναπτύσσονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού, τα βλαστοκύτταρα παραμένουν ενεργά σε όλο το νευρικό σύστημα των ενηλίκων. Στα θηλαστικά, τα βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται και έτσι εξαφανίζονται από τις περισσότερες περιοχές του ΚΝΣ στα όψιμα εμβρυϊκά ή πρώιμα μεταγεννητικά στάδια. Ωστόσο, παραμένουν ενεργά σε μερικές καλά καθορισμένες περιοχές του εγκεφάλου των ενηλίκων στα περισσότερα είδη θηλαστικών.

Κατά την ανάπτυξη, τα ESCs δημιουργούν όλους τους τύπους εγκεφαλικών κυττάρων, συχνά μέσω πολυδύναμων πρόδρομων ουσιών με πιο περιορισμένο δυναμικό. Αν και στον ενήλικο εγκέφαλο η παραγωγή νέων κυττάρων είναι μειωμένη σε σύγκριση με πολλούς άλλους ιστούς, τα NSCs επιμένουν σε δύο κύριες περιοχές: την κοιλιακή – υποκοιλιακή ζώνη, όπου δημιουργούν οσφρητικούς νευρώνες και τον ιππόκαμπο, όπου δημιουργούνται νέοι νευρώνες που εμπλέκονται στις γνωστικές διαδικασίες. Και στις δύο περιοχές, τα βλαστοκύτταρα που δημιουργούν νευρώνες είναι εξειδικευμένοι πληθυσμοί αστροκυττάρων που διατηρούν στενές αλληλεπιδράσεις με τα αγγεία του εγκεφάλου και μπορούν να ενεργοποιηθούν από συμπεριφορικά και φαρμακολογικά ερεθίσματα. [24]

Η παραγωγή νέων νευρώνων από ενήλικα NSCs επηρεάζεται από διάφορα φυσιολογικά ερεθίσματα και ρυθμίζεται σε πολλαπλά στάδια. Ένα απ' τα πιο σημαντικά σημεία ρύθμισης είναι η επιλογή των NSCs μεταξύ παραμονής σε ηρεμία ή εισόδου σε ενεργή κατάσταση. [25]

Η βάση για τις θεραπείες με NSCs βασίστηκε στην παρατήρηση ότι τα νευρικά προγονικά κύτταρα [neural progenitor cells (NPCs)] που προέρχονται από τη νευρική

[Πληκτρολογήστε εδώ]

πλάκα πρώιμων εμβρύων ποντικού συνέβαλαν στο σχηματισμό νευρωνικών κυττάρων όταν μεταμοσχεύθηκαν σε εγκεφάλους ενηλίκου ποντικού. [26, 27]

Τα Ενδογενή NSCs ενηλίκων εντοπίζονται κυρίως στην οδοντωτή έλικα του υπόκαμπου, στην υποκοιλιακή ζώνη (SVZ subventricular zone) και στον οσφρητικό βολβό. [28] Πολλές πειραματικές μελέτες έχουν δείξει αυξημένο πολλαπλασιασμό των NSCs εντός της SVZ σε ζωικό μοντέλο MCAO, ο οποίος πιθανά πυροδοτήθηκε από κυτοκίνες και χημειοκίνες όπως Vascular endothelial growth factor (VEGF), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) παραμένοντας τελικά για τουλάχιστον τέσσερις μήνες μετά την ισχαιμία. [29]

Τα εξωγενή NSCs θα μπορούσαν να ληφθούν από μια πλειάδα πηγών όπως: ESCs, iPSCs, MSCs από μυελό των οστών, εμβρυϊκά NSCs και εμβρυϊκά και ενήλικα νευρικά συστήματα. [30] Ο πολλαπλασιασμός *in vitro* όταν διεγείρονται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες όπως Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor (FGF) και ο παράγοντας αναστολής της λευχαιμίας (LIF) και η διαφοροποίηση σε νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα όταν επάγονται από διαφορετικούς παράγοντες όπως το ρετινοϊκό οξύ είναι χαρακτηριστικά που τα καθιστούν υποσχόμενους υποψηφίους για την αντικατάσταση των χαμένων νευρικών κυττάρων σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Σημειώνεται ότι, τα ανθρώπινα εμβρυϊκά NSCs είναι λιγότερο ογκογονικά από τα ESCs, συνεπώς καλύτερη πηγή εξωγενών NSCs. Επιπλέον, τα NSCs εκφράζουν καθόλου ή χαμηλά επίπεδα μορίων MHC, τα οποία εξαλείφουν το πρόβλημα της ανοσοαπόρριψης. [31] Ωστόσο, υπήρξαν επίσης πειράματα που έδειξαν ότι η έκφραση των μορίων MHC στα NSCs αυξήθηκε υπό φλεγμονώδεις συνθήκες. [32] Το μειονέκτημα των NSCs είναι η περιορισμένη ικανότητα επέκτασης και διαφοροποίησης όταν καλλιεργούνται *in vitro*.

Όσον αφορά τον νευρογενή θώκο, πρόκειται για ένα εξαιρετικά δυναμικό και πολύπλοκο μικροπεριβάλλον όπου βρίσκονται νέοι νευρώνες ή νευρογλοιακά κύτταρα που παράγονται από βλαστοκύτταρα ή προγονικά κύτταρα. Ο πρωτεύον ρόλος του είναι να αποτελέσει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την αυτοανανέωση και την διατήρηση των νευρικών βλαστικών ή προγονικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο θώκος παρέχει σήματα που καθορίζουν εάν τα βλαστοκύτταρα θα πρέπει να παραμείνουν σε ηρεμία, να διαιρεθούν ή να διαφοροποιηθούν σε συγκεκριμένες πρόδρομες ή μετά-μιτωτικές κυτταρικές σειρές, ικανές να ενσωματωθούν σε υπάρχοντα νευρωνικά δίκτυα.

Υπάρχει μια σειρά από νευρογενείς θώκους στο αναπτυσσόμενο και μεταγεννητικό ΚΝΣ, οι οποίοι διαθέτουν διακριτές ιδιότητες για την παραγωγή

[Πληκτρολογήστε εδώ]

απογόνων για συγκεκριμένες περιοχές. Έχουν γίνει εκτενείς μελέτες για την κοιλιακή / υποκοιλιακή ζώνη του ποντικού (V-SVZ), νευρογενής θώκος του εγκεφαλικού φλοιού. Πρόκειται για μια εξαιρετικά ετερογενή δομή που βρίσκεται κατά μήκος των τοιχωμάτων του ραβδωτού σώματος των πλάγιων κοιλιών με την επένδυση κυττάρων (επενδυματικών) κατά μήκος των γεμάτων με εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) κοιλιών και ένα πλούσιο αγγειακό πλέγμα στην αντίθετη πλευρά που καθορίζει τα όρια. Περιέχει NSCs ή κύτταρα τύπου B που διακρίνονται σε κύτταρα σε ηρεμία (qNSCs) ή κύτταρα που διαιρούνται ενεργά (aNSCs). Τα κύτταρα μπορούν να αυτοανανεωθούν για την διατήρηση του πληθυσμού ή να διαιρεθούν για να δημιουργήσουν κύτταρα τύπου Γ, προγόνους που ενισχύουν την διέλευση. Τα κύτταρα τύπου Γ μετά από αρκετές κυτταρικές διαιρέσεις θα δώσουν τελικά τους νευροβλάστες (κύτταρα τύπου A) ή νευρογλοιακά κύτταρα (ολιγοδενδροκύτταρα ή αστροκύτταρα). [33] Τα Olig2+ κύτταρα τύπου Γ μπορούν να διαφοροποιηθούν σε NG2 γλοιακά κύτταρα και μυελινωτικά ολιγοδενδροκύτταρα που στην συνέχεια ενσωματώνονται στο ραβδωτό σώμα και τους κροσσούς. Από την άλλη πλευρά, τα τύπου A, οι νευροβλάστες σχηματίζονται σε μακριές αλυσίδες, καλύπτοντας τα αστροκύτταρα και τα αγγεία, για να μεταναστεύσουν προς τον οσφρητικό βολβό. Εκεί τα τύπου A θα διαφοροποιηθούν τελικά σε λειτουργικούς ενδονευρώνες που θα ενσωματωθούν στο υπάρχον κύκλωμα. [34] Η κυτταροαρχιτεκτονική της περιοχής V-SVZ του ποντικού και του θώκου εντός του πρόσθιου εγκεφάλου προωθεί και διατηρεί τις αυτοανανεωτικές ιδιότητες των NSCs και των απογόνων τους.

Επιπρόσθετα, υπάρχει μια ποικιλία τροφικών παραγόντων (μορίων) που διατηρούν τα NSCs στο V-SVZ. Το V-SVZ δεν περιλαμβάνει μόνο τα NSCs ή τα μεταμιτωτικά κύτταρα ή το αγγειακό δίκτυο εντός του V-SVZ, αλλά και το ENY. Αυτά τα μόρια υπαγορεύουν τον ρυθμό με τον οποίο τα qNSCs παραμένουν σε ηρεμία ή αλλάζουν σε ενεργοποιημένη κατάσταση αλλά και την συνολική δυναμική του κυτταρικού κύκλου των aNSCs.

Η σηματοδότηση Sonic hedgehog (Shh) είναι ευρέως γνωστή για την μιτογόνο δράση της στα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, καθ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξης [35], ένας ρόλος που διατηρείται στο μεταγεννητικό V-SVZ. Shh συνδέτες που προέρχονται από το ENY ή από κοντινούς ώριμους νευρώνες ενεργοποιούν το μονοπάτι σηματοδότησης για την πρόκληση πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων και σε ηρεμία τύπου B κυττάρων, πιθανώς αλλάζοντας την δυναμική του κυτταρικού κύκλου των qNSCs και aNSCs μέσω δραστηριότητας του καταστολέα Gli.[36]

[Πληκτρολογήστε εδώ]

Οι συνδέτες Wnt βρίσκονται στο ENY και εκφράζονται σε ώριμους νευρώνες ή αστροκύτταρα εντός ή κοντά στο V-SVZ. Ενεργοποιημένη σηματοδότηση Wnt στα κύτταρα τύπου Β και στα Mash1+ κύτταρα τύπου Γ οδηγούν σε αυξημένο πολλαπλασιασμό και αυτοανανέωση. [37]

Όσον αφορά την σηματοδότηση GPCR αυτή εξίσου επηρεάζει τον νευρογενή θώκο και τον προσδιορισμό των qNSCs και aNSCs. Συνδέτες της GPCR σηματοδότησης όπως η Φωσφορική 1-Σφιγγοσίνη (S1P) και η Προσταγλαδίνη D2, οι οποίες βρέθηκαν επίσης στο ENY, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλουν στην διατήρηση της κατάστασης ηρεμίας των qNSCs. [38] Μέχρι σήμερα πολύ λίγα είναι γνωστά για τον ρόλο της Προσταγλαδίνης D2 στην νευρογένεση. Από την άλλη, το S1P, που εκκρίνεται επίσης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι γνωστό ότι προάγει την νευρογένεση κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. [39]

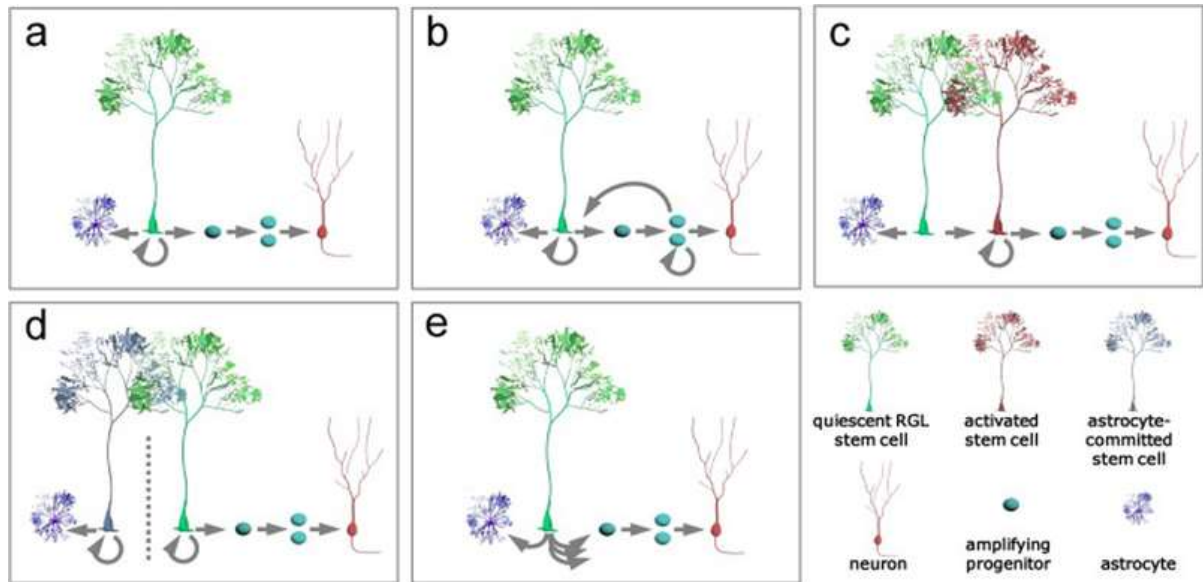
Ο πολλαπλασιασμός των NSCs εξαρτάται επίσης από το αγγειακό δίκτυο εντός του νευρογενή θώκου, ο οποίος παρέχει έναν μεγάλο αριθμό αυξητικών παραγόντων και διευκολύνει σημαντικές αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου που οδηγούν σε αυτοανανέωση των NSCs. Επιπλέον, τα περιαγγειακά σήματα επάγουν τον πολλαπλασιασμό προγονικών κυττάρων, απελευθερώνοντας παράγοντες που ενεργοποιούν μιτογόνες οδούς, όπως η σηματοδότηση του μονοξειδίου του αζώτου, η πουρινεργική σηματοδότηση, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και το μονοπάτι του Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF). [40]

Η χωρική διάταξη των NSCs εντός του V-SVZ καθορίζει τους τύπους γλοιακών ή νευρωνικών κυττάρων που θα παραχθούν. Υπάρχουν ενδείξεις ότι συγκεκριμένες γλοιακές σειρές δημιουργούνται από συγκεκριμένη περιοχή. Για παράδειγμα, η V-SVZ δημιουργεί ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα που τελικά μεταναστεύουν στο τυλώδες σώμα. [41] Συνεπώς, η τοποθεσία των NSCs παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή διακριτών κυτταρικών σειρών, υποδεικνύοντας ότι τα περιβαλλοντικά στοιχεία είναι πιθανό να είναι πολύ σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες της μοίρας των κυττάρων. [42]

Τόσο η σηματοδότηση του EGFR όσο και του PDGFRa είναι κρίσιμες για τον πολλαπλασιασμό και τον προσδιορισμό των ενήλικων προγονικών κυττάρων προς την ολιγοδενδρογλοιακή σειρά. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης EGFR σε έναν υποπληθυσμό κυττάρων τύπου Β και τύπου Γ οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό και αυτό προκαλείται και με την αλληλεπίδραση με την σηματοδότηση Notch. [43] Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μεταλλάξεις στον EGFR διαταράσσουν την

[Πληκτρολογήστε εδώ]

ολιγοδενδρογένεση σε προγονικές V-SVZ ενώ η ενίσχυση του επιταχύνει την παραγωγή ολιγοδενδροκυττάρων. [44] Η σηματοδότηση PDGFR είναι επίσης κρίσιμη για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων τύπου B, κατευθύνοντας σε μεγάλο βαθμό την διαφοροποίησή τους προς ολιγοδενδρογλοιακή σειρά. [45]



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των μοντέλων συντήρησης, διαίρεσης και διαφοροποίησης νευρικών βλαστοκυττάρων (a-e). (Lazutkin A, Podgorny O, Enikolopov G. Modes of division and differentiation of neural stem cells. *Behav Brain Res.* 2019 Nov 18;374:112118.)

Αν και έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στον χαρακτηρισμό των ενήλικων NSCs, τις γενιές που δημιουργούν και τις οδούς σηματοδότησης που επηρεάζουν την συμπεριφορά τους, μας λείπει ακόμα η λεπτομερής κατανόηση των μηχανισμών που συντηρούν την δεξαμενή NSCs ενώ εξασφαλίζουν και την δια βίου νευρογένεση. Για παράδειγμα, οι εξωγενείς ή/και εγγενείς παράγοντες που προάγουν την ηρεμία και την ενεργοποίηση των NSCs παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Επιπλέον, η ετερογένεια φαίνεται να είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό των NSCs στον εγκέφαλο των θηλαστικών, αλλά το πως προκύπτει αυτή ετερογένεια και πως επηρεάζει την λειτουργία τους δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητό.[23]

Η έρευνα σε NSCs έχει δείξει πολλά υποσχόμενες δυνατότητες για την θεραπεία νευρολογικών διαταραχών, όπως η νόσος του Πάρκινσον, η σκλήρυνση κατά πλάκας και οι τραυματισμοί του νωτιαίου μυελού. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες έως ότου αυτές οι θεραπείες γίνουν ευρέως διαθέσιμες.

[Πληκτρολογήστε εδώ]

Συμπερασματικά, τα βλαστοκύτταρα για να είναι χρήσιμα στη θεραπεία, πρέπει να μετατραπούν στους επιθυμητούς τύπους κυττάρων. Η διαφοροποίηση των ESCs είναι ζωτικής σημασίας επειδή τα αδιαφοροποίητα ESCs μπορούν να προκαλέσουν σχηματισμό τερατώματος in vivo. Το εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής συμπεριφοράς. Για το σκοπό αυτό αυξητικοί παράγοντες ή άλλα μόρια χρησιμοποιούνται ώστε να επάγουν τη μετατροπή των βλαστοκυττάρων σε κατάλληλα προγονικά κύτταρα, τα οποία αργότερα θα δημιουργήσουν τον επιθυμητό τύπο κυττάρου. Τα περισσότερα κατευθυνόμενα πρωτόκολλα διαφοροποίησης μιμούνται την ανάπτυξη της έσω κυτταρικής μάζας κατά τη γαστριδίωση. [46]

1.Γ. Καλλιέργεια νευρικών βλαστικών κυττάρων, νευροσφαιρών & οργανοειδών

Παρά τις σημαντικές προσπάθειες των ερευνητών, έχουμε ακόμα πολύ περιορισμένη κατανόηση του πώς λειτουργεί ο εγκέφαλος όταν είναι υγιής ή ασθενής. Οι μη επεμβατικές μέθοδοι απεικόνισης που εκτελούνται σε ανθρώπους δεν διαθέτουν την χωρική και χρονική ανάλυση για την ανίχνευση της μικροσκοπικής ανατομίας και λειτουργίας του. Επομένως χρειάζεται επειγόντως ένα απλοποιημένο και προσιτό μοντέλο του ανθρώπινου εγκεφάλου. Αν και τα ζωικά μοντέλα έχουν δώσει σημαντική ώθηση στην έρευνα της νευροεπιστήμης και εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως, τα όριά τους έχουν αποδειχθεί εκτενώς. Στην πραγματικότητα, εκτός από τα ηθικά ζητήματα, μελέτες έχουν δείξει ότι τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε ζώα συχνά αποτυγχάνουν να μεταφραστούν σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. Επιπλέον, μικροσκοπικές μελέτες μεταθανάτιου ανθρώπινου εγκεφάλου έχουν αποκαλύψει νευρικές δομές, ενισχυμένη σύνδεση και μορφές συνδεσιμότητας μεταξύ των νευρικών κυττάρων που δεν βρέθηκαν σε άλλα ζώα. Σε αυτό το σενάριο, είναι ζωτικής σημασίας να αναπτυχθούν περισσότερα αναπαραγωγίμα μοντέλα, αξιοποιώντας ανθρώπινα κύτταρα για την διευκόλυνση της μεταφρασιμότητας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται στον άνθρωπο. Τα ανθρώπινα νευρικά κύτταρα που καλλιεργούνται σε περιβάλλοντα υψηλού ελέγχου και παρακολούθησης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την διερεύνηση της νευροτοξικότητας, της νευροπροστασίας, του ελέγχου φαρμάκων και της θεραπευτικής αξιολόγησης τόσο για όγκους εγκεφάλου όσο και για νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Πιθανές πηγές ανθρώπινων κυττάρων είναι πρωτογενείς νευρώνες, απαθανατισμένα νευρικά βλαστοκύτταρα από εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και κυτταρικές σειρές. Ενηλικά νευρικά βλαστοκύτταρα ή προγονικά κύτταρα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση νευροεκφυλιστικών και νευρολογικών διαταραχών, νεοπλασιών του εγκεφάλου και ισχαιμίας *in vitro*. Οι πρωτογενείς νευρώνες από τον ανθρώπινο εγκέφαλο είναι συχνά απαγορευτικά ακριβοί, κυρίως λόγω της έλλειψης προσβασιμότητας και του κόστους που σχετίζεται με την απομόνωση. Επιπλέον, δεν υφίστανται κυτταρική διαίρεση, περιορίζοντας τον αριθμό των πειραμάτων που μπορούν να εκτελεστούν. Από την άλλη, τα εμβρυϊκά ή τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρικά κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα προσφέρουν μια άνευ προηγουμένου ευκαιρία για την διερεύνηση της παθογένεσης των νευροεκφυλιστικών διαταραχών, παρ' όλο που η

[Πληκτρολογήστε εδώ]

καλλιέργεια και η διατήρησή τους είναι, επίσης, πολύ δαπανηρή και τεχνικά απαιτητική. Ως εναλλακτική λύση οι ερευνητές μπορούν να εκμεταλλευτούν κυτταρικές σειρές, οι οποίες έχουν σημαντικά οφέλη. Έχουν χαμηλότερο κόστος, μπορούν να καλλιεργηθούν πιο εύκολα από τους πρωτογενείς νευρώνες και μπορούν να επεκταθούν σχεδόν απεριόριστα. Ως εκ τούτου, ένας (σχεδόν) απεριόριστος αριθμός κυττάρων είναι διαθέσιμος, αρκεί να μην προκαλείται διαφοροποίηση, επιτρέποντας πολλά πειράματα σε πολλές διαφορετικές συνθήκες. Επιπλέον, οι κυτταρικές σειρές δεν πλήττονται από ηθικά ζητήματα που σχετίζονται με την καλλιέργεια ανθρώπινων πρωταρχικών νευρώνων και βλαστοκυττάρων ή με πειράματα που αφορούν ζώα. [47]

Ωστόσο, οι ανθρώπινες νευρικές κυτταρικές σειρές έχουν συχνά κακοήγη προέλευση, των οποίων οι γενετικές μετατοπίσεις μπορεί να παρεμποδίσουν την φυσιολογία και την ακεραιότητά τους. Η καλλιέργεια κυττάρων που προέρχονται από τον εγκέφαλο σε μονοστιβάδα παρουσιάζει σημαντική πρόκληση όσον αφορά την πιστότητα των αποτελεσμάτων *in vitro*. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μετά από μερικούς αριθμούς διαιρέσεων τα νευρογλοιακά και νευρωνικά κύτταρα αρχίζουν να χάνουν τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και, το πιο σημαντικό, τους συγκεκριμένους κυτταρικούς δείκτες και τον φαινότυπό τους. Τα τελευταία χρόνια, η ανακάλυψη NPCs και η μεθοδολογία καλλιέργειας τους σε εναιώρημα διατηρώντας την ικανότητα διαφοροποίησης σε αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα και νευρώνες έχει συμβάλει σημαντικά στους τομείς της νευροεπιστήμης και της νευροπαθολογίας. [48] Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι το σώμα του νευρώνα είναι εξωπραγματικά πεπλατυσμένο και η νευρωνική νευραξονική και δενδριτική ανάπτυξη δεν μπορεί να συμβεί προς όλες τις κατευθύνσεις στις παραδοσιακές μονοστιβάδες, έχουν αναπτυχθεί προηγμένα μοντέλα όπου κυτταρικές προεξοχές διατεταγμένες στο χώρο χαρακτηρίζονται από πιο φυσιολογική νευρική δυναμική.

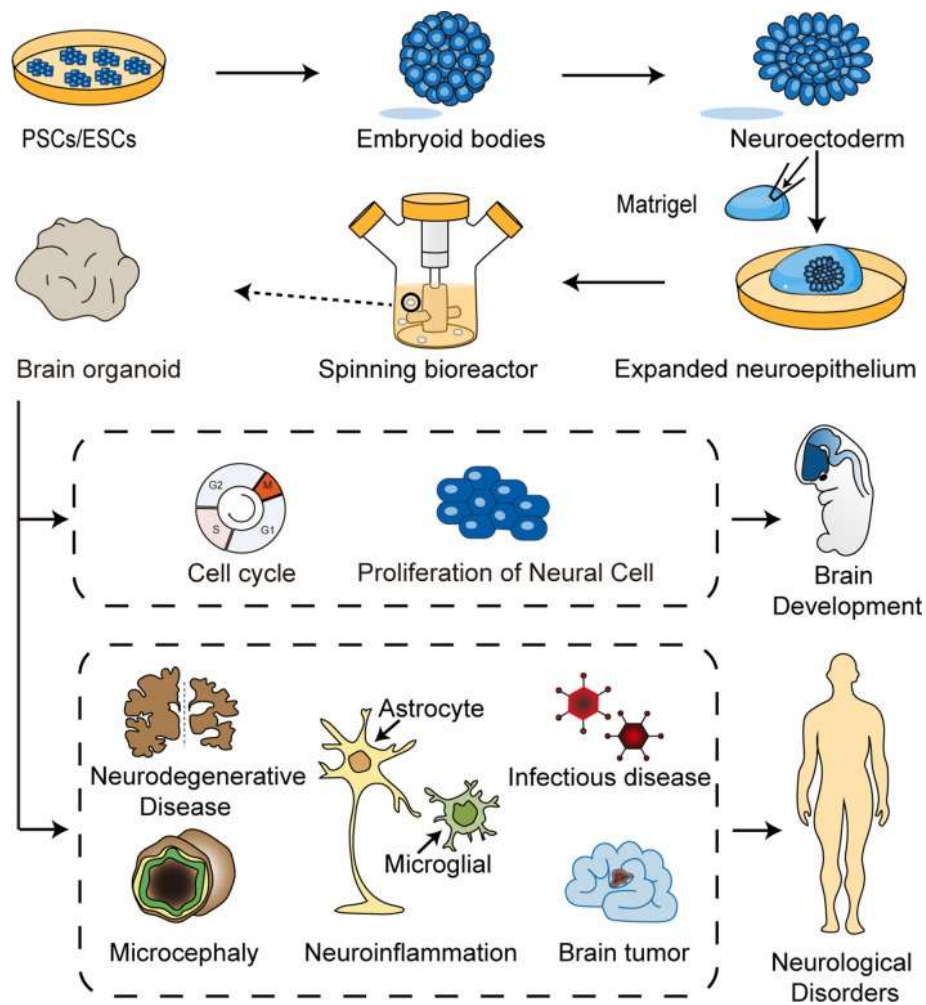
Οι νευρόσφαιρες είναι ένα σύστημα *in vitro* μοντελοποίησης, που αποτελείται από ελεύθερα επιπλέοντα συσσωματώματα NPCs συμπεριλαμβανομένων των NSCs, που προέρχονται από απομονωμένο πρωτογενή ιστό ή NPCs χαμηλού αριθμού διαιρέσεων από iPSCs και καλλιεργούνται για περιορισμένες χρονικές περιόδους προτού χρησιμοποιηθούν για διάφορες ερευνητικές εφαρμογές. Πρόκειται για παραδοσιακή μέθοδο καλλιέργειας NPCs και αποτελούν την προτιμώμενη μέθοδο για την απόκτηση NPCs από ζωικό και ανθρώπινο ιστό που διαχωρίζεται από νευρογενείς περιοχές. Συνήθως καλλιεργούνται σε μέσο χωρίς ορό, συμπληρωμένο με αυξητικό παράγοντα δύο ινοβλαστών (FGF-2) και επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) χωρίς

[Πληκτρολογήστε εδώ]

την ανάγκη για προσκολλητικό υπόστρωμα. Παρά την ευρεία χρήση τους οι καλλιέργειες νευροσφαιρών είναι, επίσης, δύσκολο να διατηρηθούν επειδή αναπτύσσονται ταχέως με σημαντική απόπτωση. Οι καλλιέργειες NPCs απαιτούν διάσπαση και διέλευση κάθε 7-10 ημέρες λόγω της αύξησης του μεγέθους της νευρόσφαιρας και του θανάτου της. Ως εκ τούτου, χρειάζονται νέες στρατηγικές για την ανάπτυξη νευροσφαιρών και NPCs. Επιπλέον, υπάρχουν περιορισμοί στην χρησιμότητα των νευροσφαιρών για τον προσδιορισμό της ικανότητας αυτοανανέωσης των NPCs επειδή οι νευροσφαίρες συγχωνεύονται *in vitro*, επομένως δεν είναι κλωνικές. [49]

Τα εγκεφαλικά οργανοειδή αντιπροσωπεύουν ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη των ανθρώπινων νευρολογικών ασθενειών, ιδιαίτερα εκείνων που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη δομή του εγκεφάλου. Προέρχονται από hESCs και hiPSCs και ανακεφαλαιώνουν μοναδικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του ανθρώπινου εγκεφάλου. Χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως μοντέλα συστημάτων για την απόκτηση νέων γνώσεων για μια ποικιλία νευρολογικών ασθενειών. [50] Τα οργανοειδή του εγκεφάλου διαφέρουν από τις προσεγγίσεις νευροσφαιρών κυρίως επειδή αξιοποιούν την ικανότητα αυτό-οργάνωσης των PSCs να μιμούνται την κυτταροαρχιτεκτονική και τις αναπτυξιακές τροχιές που βρίσκονται *in vivo*.

[Πληκτρολογήστε εδώ]



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας και των εφαρμογών των εγκεφαλικών οργανοειδών. (Sun N, Meng X, Liu Y, Song D, Jiang C, Cai J. Applications of brain organoids in neurodevelopment and neurological diseases. *J Biomed Sci.* 2021 Apr 22;28(1):30.)

2. ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΗ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

2.A. Καλλιέργεια & Διαφοροποίηση οργανοειδών - Μεθοδολογία

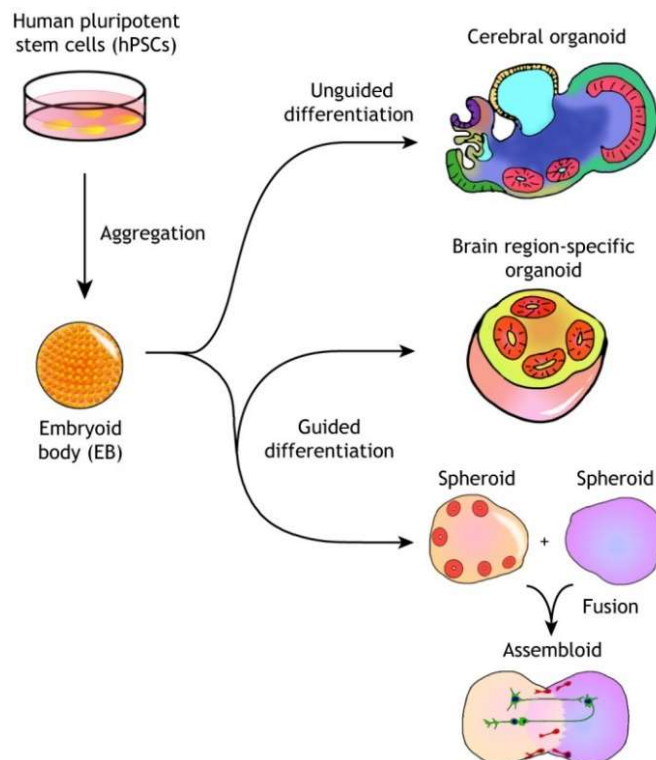
Τα τρισδιάστατα μοντέλα εγκεφαλικών οργανοειδών αντιπροσωπεύουν ένα καινοτόμο και πολλά υποσχόμενο εργαλείο στις μελέτες νευροεπιστήμης. Τα οργανοειδή του εγκεφάλου προέρχονται από hPSCs που αυτοσυναρμολογούνται για να σχηματίσουν μια οργανωμένη αρχιτεκτονική, που αποτελείται από προγονικούς νευρωνικούς και νευρογλοιακούς τύπους κυττάρων, που μοιάζει με τον ανθρώπινο εγκέφαλο του εμβρύου. Σε αντίθεση με τις συμβατικές δισδιάστατες (2D) κυτταροκαλλιέργειες, τα οργανοειδή του εγκεφάλου παρομοιάζουν τον ανθρώπινο εγκέφαλο όχι μόνο σε κυτταρικό επίπεδο, αλλά και ως προς τη γενική δομή των ιστών και την αναπτυξιακή τροχιά, παρέχοντας επομένως μια μοναδική ευκαιρία για την μοντελοποίηση της ανάπτυξης και λειτουργίας του ανθρώπινου εγκεφάλου.

Γενικά, δύο διαφορετικοί τύποι μεθοδολογιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία εγκεφαλικών οργανοειδών: μη καθοδηγούμενες μέθοδοι και καθοδηγούμενες μέθοδοι. Ενώ οι μη καθοδηγούμενες μέθοδοι βασίζονται πλήρως στην αυθόρμητη μορφογένεση και τις εγγενείς ικανότητες διαφοροποίησης εντός των συσσωματωμάτων hPSCs, οι καθοδηγούμενες μέθοδοι απαιτούν την συμπλήρωση εξωτερικών παραγόντων διαμόρφωσης για να παρακινήσουν τα hPSCs να διαφοροποιηθούν προς τις επιθυμητές γενεές. Ο αριθμός και ο συνδυασμός εξωτερικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στα πρωτόκολλα διαφοροποίησης ποικίλλει. [51]

Το μη καθοδηγούμενο οργανοειδές του εγκεφάλου εμπνέεται από μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν για την δημιουργία γαστρεντερικών οργανοειδών. [52] Στο πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε από την ομάδα Lancaster, Knoblich, τα εμβρυοειδή σώματα (EBs) που προέρχονται από συσσωματώματα hPSCs ενσωματώνονται σε μια εξωκυτταρική μήτρα (ECM), όπως το Matrigel, και στην συνέχεια καλλιεργούνται σε περιστρεφόμενους βιοαντιδραστήρες για την προώθηση της επέκτασης των ιστών και της νευρικής διαφοροποίησης. [53] Με ελάχιστη εξωτερική παρέμβαση, τα εγκεφαλικά οργανοειδή που παράγονται από αυτή την προσέγγιση δίνουν στα hPSCs την μεγαλύτερη ελευθερία για αυτό-οργάνωση και μερικές φορές δημιουργούν πολύ επιμήκεις νευροεπιθηλιακές δομές. Επιπλέον, εμφανίζουν μια ποικιλία ταυτοτήτων

[Πληκτρολογήστε εδώ]

κυτταρικής γενεαλογίας που κυμαίνονται από τον πρόσθιο, τον μεσεγκέφαλο και τον οπίσθιο εγκέφαλο έως τον αμφιβληστροειδή, το χοριοειδές πλέγμα και το μεσόδερμα. Μελετώντας το μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων έχει αποκαλυφθεί ότι τα εγκεφαλικά οργανοειδή περιέχουν προγονικούς νευρώνες, διεγερτικούς νευρώνες, ανασταλτικούς νευρώνες, αστροκύτταρα και πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα που βρίσκονται στο ΚΝΣ, καθώς και φωτοευαίσθητα κύτταρα που βρίσκονται στον αμφιβληστροειδή. [54] Ωστόσο, η αυθόρμητη διαφοροποίηση των hPSCs έχει ως αποτέλεσμα απρόβλεπτες αναλογίες και ετερογενή διάταξη κάθε γενεαλογίας και κυτταρικού τύπου σε παρτίδες διαφοροποιημένων οργανοειδών και σε σειρές hPSCs. Αν και αυτή η ποικιλομορφία κυτταρικού τύπου στα εγκεφαλικά οργανοειδή προσφέρει μια μοναδική ευκαιρία για την μοντελοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών περιοχών του εγκεφάλου, η υψηλή μεταβλητότητα και η ετερογένεια παρουσιάζουν σημαντικές προκλήσεις για συστηματικές και ποσοτικές μελέτες.



Εικόνα 4. Μη καθοδηγούμενες και καθοδηγούμενες προσεγγίσεις για την κατασκευή εγκεφαλικών οργανοειδών. (Qian X, Song H, Ming GL. Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development*. 2019 Apr 16;146(8):dev166074)

[Πληκτρολογήστε εδώ]

Η μέθοδος που περιγράφεται από τους Lancaster και Knoblich βασίζεται σε μια εκτενή βάση πρωτοκόλλων για την νευρωνική διαφοροποίηση, την τρισδιάστατη καλλιέργεια ιστών και την μηχανική ιστών. Τα εγκεφαλικά οργανοειδή αναπτύσσονται μέσω εγγενών διαδικασιών αυτό-οργάνωσης με την έγκαιρη εφαρμογή συστατικών και περιβαλλόντων καλλιέργειας. Έτσι, η μέθοδος είναι μια συγχώνευση προηγούμενων μεθόδων που συνδυάζονται με συγκεκριμένο τρόπο για την αντιμετώπιση δύο βασικών στόχων: 1) την καθιέρωση της νευρωνικής ταυτότητας και διαφοροποίησης και 2) την ανακεφαλαίωση της τρισδιάστατης δομικής οργάνωσης.

Ο πρώτος στόχος του πρωτοκόλλου είναι η επαγωγή και η διαφοροποίηση του νευρικού ιστού. Αυτό περιλαμβάνει προσθήκη μέσων για την προώθηση της νευρικής ταυτότητας και της ανάπτυξης του εγκεφάλου *in vitro*.

Ο νευρικός ιστός αναπτύσσεται *in vivo* από ένα βλαστικό στρώμα που ονομάζεται εξώδερμα. Ομοίως τα PSCs *in vitro* μπορούν να διεγερθούν για να αναπτύξουν βλαστικά στρώματα, συμπεριλαμβανομένου του εξωδέρματος, μέσα σε συσσωματώματα που ονομάζονται εμβρυϊκά σώματα (EBs). Ένας αριθμός προηγούμενων μελετών περιέγραψε επιτυχή διαφοροποίηση των EBs σε μέσο εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων με μειωμένο bFGF και υψηλή δόση αναστολέα ROCK για περιορισμό του κυτταρικού θανάτου. [55, 56] Ομοίως, εγκεφαλικά οργανοειδή αναπτύσσονται από EBs που αναπτύχθηκαν αρχικά σε μέσο εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων με χαμηλό bFGF και αναστολέα ROCK.

Η επακόλουθη νευρική επαγωγή των EBs ακολουθεί μια σύνθεση ελάχιστου μέσου για την επαγωγή νευρικής ροζέτας (neural rosettes), μια δισδιάστατη πολωμένη οργάνωση νευροεπιθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, για την δημιουργία εγκεφαλικών οργανοειδών, τα EBs διατηρούνται σε εναίωρημα, οδηγώντας σε ομοιόμορφο σχηματισμό νευρικού εξωδέρματος κατά μήκος της εξωτερικής επιφάνειας των EBs, ενώ οι εσωτερικοί μη νευρικοί μεσοδερματικοί ιστοί δεν αναπτύσσονται.

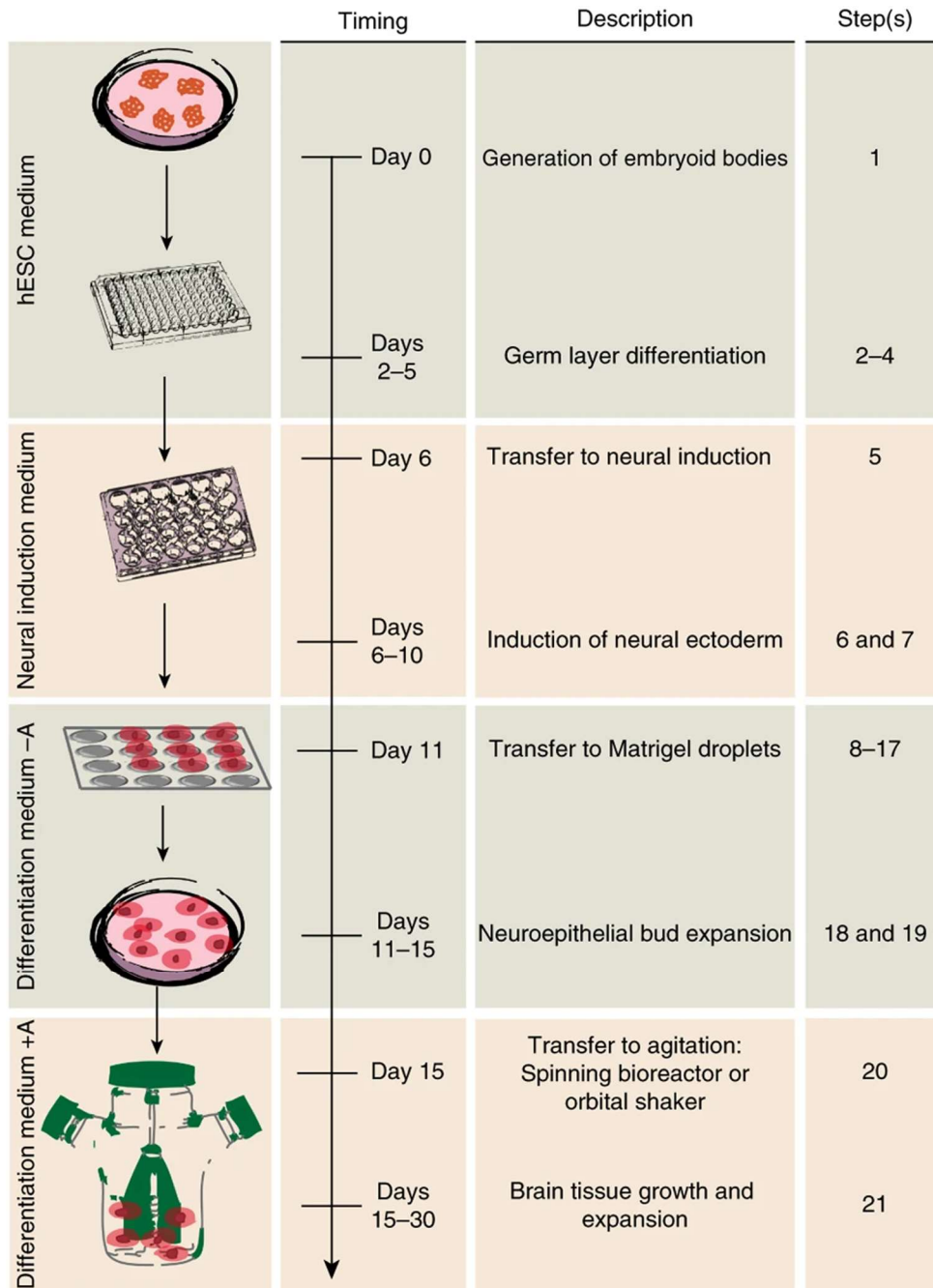
Το νευρικό εξώδερμα *in vivo* δημιουργεί ακτινικά οργανωμένα νευροεπιθήλια που επεκτείνονται για να σχηματίσουν διάφορες δομές του εγκεφάλου. Παρομοίως, τα οργανοειδή που τοποθετούνται σε ένα μέσο διαφοροποίησης που υποστηρίζει τόσο τους νευρικούς προγόνους όσο και τους απογόνους τους, εμφανίζουν αυτήν την εξέλιξη *in vitro*. Ένα μεγάλο σύνολο πρωτοκόλλων και μεθόδων NSCs έχουν δείξει την σημασία του μέσου Neurobasal και του συμπληρώματος B27 για την διαφοροποίηση

[Πληκτρολογήστε εδώ]

και την επιβίωση των νευρώνων. [57] Άλλα συμπληρώματα, τα οποία φαίνεται να έχουν θετική επίδραση στην διατήρηση των NSCs είναι η 2-μερκαπτοαιθανόλη και η ινσουλίνη. [58, 59] Επίσης, το ρετινοϊκό οξύ, το οποίο εκκρίνεται από τις μήνιγγες του εγκεφάλου, προάγει την νευρική διαφοροποίηση. Ωστόσο, περιλαμβάνεται μόνο στα μέσα διαφοροποίησης με την μορφή βιταμίνης A που παρέχεται στο συμπλήρωμα B27.

Επόμενος στόχος της μεθόδου ήταν η επίτευξη μιας τρισδιάστατης χωρικής οργάνωσης που θα μπορούσε να ανακεφαλαιώσει την ανάπτυξη διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου. Ένας αριθμός μελετών έχει αποδείξει την τεράστια ικανότητα αυτό-οργάνωσης των ιστών που αναπτύχθηκαν από PSCs, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων νευρικών ιστών. [60] Το νευρικό εξώδερμα *in vitro* μπορεί να αποκτήσει αυθόρμητα μια ακτινωτή οργάνωση που θυμίζει νευροεπιθήλιο. Ομοίως, το νευρικό εξώδερμα των EBs δημιουργεί αυθόρμητα κορυφαία – βασική πολικότητα για να σχηματίσει το νευροεπιθήλιο. Ωστόσο, απουσία της βασικής μεμβράνης που κανονικά υπάρχει *in vivo*, αυτό το επιθήλιο δεν έχει κατάλληλο προσανατολισμό και αποτυγχάνει να σχηματίσει ένα συνεχές επιθήλιο. Γι' αυτόν το λόγο απαιτείται η παροχή δομικής υποστήριξης για την προώθηση της συνέχειας και του κατάλληλου προσανατολισμού. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει τον σχηματισμό πολύπλοκων οργανωμένων επιθηλίων μέσα σε υδρογέλες που αποτελούνται από πρωτεΐνες εξωκυτταρικής μήτρας. [61] Εφαρμόζοντας αυτήν την προσέγγιση σε EBs που προκαλούνται από νευρικό εξώδερμα, λίγο μετά την ενσωμάτωση μεγάλοι οφθαλμοί συνεχούς επιθηλίου προεξέχουν από το μεγαλύτερο EB και περιέχουν κοιλότητες γεμάτες με υγρό που θυμίζουν κοιλίες του εγκεφάλου, με κατάλληλο κορυφαίο-βασικό προσανατολισμό.

Το τελευταίο βασικό στοιχείο του πρωτοκόλλου είναι η εφαρμογή της ανάδευσης. Αν και το Matrigel προήγαγε την επέκταση των νευροεπιθηλιακών οφθαλμών, τα οργανοειδή γρήγορα αναπτύχθηκαν πέρα από τα όρια της στατικής διάχυσης οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών, κάτι που αποδεικνύεται από τον σκοτεινό νεκρωτικό ιστό στο κέντρο των οργανοειδών. Μετά την εφαρμογή ενός περιστρεφόμενου βιοαντιδραστήρα για την καλύτερη προώθηση της διάχυσης, βελτιώθηκε δραματικά η επιβίωση των ιστών και η περαιτέρω ανάπτυξη.



Εικόνα 5. Σχηματικό διάγραμμα της μεθόδου και του χρόνου δημιουργίας εγκεφαλικών οργανοειδών. Το πρωτόκολλο ξεκινάει με την δημιουργία EBs από ανθρώπινα PSCs σε 96-well τρυβλίο. Η ημέρα κατά την οποία κατασκευάζονται τα EBs είναι η ημέρα 0. Η δημιουργία τους περιγράφεται στο βήμα 1. Η τροφοδοσία και η παρακολούθησή τους περιγράφονται στα βήματα 2-4. Την ημέρα 6, τα EBs μεταφέρονται σε ένα 24-well τρυβλίο που περιέχει μέσο νευρικής επαγωγής, όπως φαίνεται στο βήμα 5. Η τροφοδοσία και η παρακολούθησή της νευρικής επαγωγής περιγράφονται στα βήματα 6 και 7. Την 11η ημέρα, οι νευρικοί εξωδερμικοί ιστοί μεταφέρονται σε σταγονίδια Matrigel σε ένα φύλλο parafilm με εσοχές, όπως περιγράφεται στα βήματα 8-17, και στην συνέχεια καλλιεργούνται σε ένα πιάτο 60nm. Η παρακολούθηση αυτών των ιστών περιγράφεται στα βήματα 18 και 19. Τέλος, τα σταγονίδια Matrigel μεταφέρονται στον περιστρεφόμενο βιοαντιδραστήρα την 15η ημέρα, όπως περιγράφεται στο βήμα 20, και διατηρούνται περαιτέρω, όπως φαίνεται στο βήμα 21. (Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2014 Oct;9(10):2329-40. doi: 10.1038/nprot.2014.158. Epub 2014 Sep 4. PMID: 25188634; PMCID: PMC4160653.)

[Πληκτρολογήστε εδώ]

Οι καθοδηγούμενες μέθοδοι για την δημιουργία εγκεφαλικών οργανοειδών πρωτοστάτησαν από την ομάδα Sasai, η οποία ανέπτυξε μια σειρά τρισδιάστατων πρωτοκόλλων διαφοροποίησης με βάση την καλλιέργεια χωρίς ορό συσσωματωμάτων που μοιάζουν με EBs. [62, 63] Σε αυτές τις κατευθυνόμενες μεθόδους δημιουργίας οργανοειδών ή «σφαιροειδών» μικρά μόρια και αυξητικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας διαφοροποίησης για να καθοδηγήσουν τα hPSCs να σχηματίσουν κύτταρα και ιστούς αντιπροσωπευτικούς ορισμένων περιοχών, όπως ο εγκεφαλικός φλοιός, ο ιππόκαμπος και ο μεσεγκέφαλος. Αυτές οι κατευθυνόμενες καλλιέργειες οργανοειδών είναι μερικές φορές ικανές να παράγουν μείγματα κυτταρικών τύπων με σχετικά σταθερές αναλογίες, παρουσιάζοντας λιγότερες διακυμάνσεις μεταξύ παρτίδων και κυτταρικών σειρών. Ωστόσο, τα κατευθυνόμενα οργανοειδή τυπικά περιέχουν σχετικά μικρές νευροεπιθηλιακές δομές και η κυτταροαρχιτεκτονική τους μερικές φορές δεν είναι καλά καθορισμένη, πιθανώς λόγω της παρεμβολής της αυτό-οργάνωσης των hPSCs και των αλληλεπιδράσεων κυττάρου- κυττάρου από υπερβολική χρήση εξωτερικών παραγόντων.

Τα καθοδηγούμενα πρωτόκολλα διαφοροποίησης οργανοειδών μπορούν να προσαρμοστούν προσεκτικά ώστε να απαιτούν τη χρήση εξωτερικών παραγόντων διαμόρφωσης μόνο στο πρώιμο στάδιο διαφοροποίησης, επιτρέποντας έτσι τα hPSCs να προσδιορίζονται ως προγονικά κύτταρα που εμφανίζουν ταυτότητες ορισμένων περιοχών του εγκεφάλου με ελάχιστη ετερογένεια. Για αυτά τα ειδικά για την περιοχή του εγκεφάλου οργανοειδή, οι εξωτερικοί παράγοντες αφαιρούνται ή ελαχιστοποιούνται μετά από επιτυχή διαμόρφωση κατά το αρχικό στάδιο της διαφοροποίησης και η επακόλουθη διαφοροποίηση ακολουθεί εγγενή προγράμματα παρόμοια με εκείνα που λειτουργούν *in vivo*. Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την δημιουργία μεγάλων δομών που μοιάζουν με κοιλίες με περίτεχνη στρωματική οργάνωση και αρχιτεκτονική. Εκτός από την χρήση χημικών παραγόντων, τα συνθετικά βιοϋλικά μπορούν να κατασκευαστούν για να καθοδηγήσουν τον σχηματισμό των οργανοειδών του εγκεφάλου φυσικά. Αυτό αποδεικνύεται από τη μέθοδο των εγκεφαλικών οργανοειδών που έχουν σχεδιαστεί με μικρονήμα, στην οποία σχηματίζονται επιμήκη EBs γύρω από ικριώματα κατασκευασμένα από πολυμερή μικρονημάτια, με αποτέλεσμα τον πιο συνεπή σχηματισμό διευρυνμένων κοιλιακών δομών και νευροεπιθηλίου.

[Πληκτρολογήστε εδώ]

Η χρήση περιστρεφόμενων βιοαντιδραστήρων μπορεί επίσης να προσφέρει βελτιωμένη διάχυση θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου και παρατεταμένη καλλιέργεια 3D εναιωρήματος. Ωστόσο, οι βιοαντιδραστήρες του εμπορίου είναι ογκώδεις και καταναλώνουν μεγάλους όγκους μέσου καλλιέργειας, περιορίζοντας την αποτελεσματικότητα και την απόδοση της καλλιέργειας του οργανοειδούς. Για να μειωθεί η κατανάλωση του μέσου καλλιέργειας έχουν χρησιμοποιηθεί πλάκες καλλιέργειας πολλαπλών φρεατίων μαζί με τροχιακούς αναδευτήρες τοποθετημένους στον επωαστήρα ως εναλλακτική λύση σε έναν περιστρεφόμενο βιοαντιδραστήρα. Πιο πρόσφατα, ειδικά σχεδιασμένοι μικροσκοπικοί βιοαντιδραστήρες πολλαπλών φρεατίων περιστρεφόμενοι έχουν αναπτυχθεί τόσο για τη μείωση του κόστους διατήρησης των καλλιεργειών οργανοειδών όσο και για την εξάλειψη της ανάγκης για ογκώδεις μηχανές στον επωαστήρα. Αυτή η προσέγγιση επέτρεψε την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ώστε να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα καθώς και την δημιουργία οργανοειδών, ειδικών για την περιοχή του εγκεφάλου που μιμούνται τον ραχιαίο πρόσθιο εγκέφαλο, τον μεσεγκέφαλο και τον υποθάλαμο. Συγκεκριμένα, τα οργανοειδή του πρόσθιου εγκεφάλου που παράγονται μέσω αυτής της προσέγγισης σχηματίζουν σταθερά φλοιώδεις δομές με διακριτά στρώματα που μοιάζουν με την κοιλιακή ζώνη (VZ), την εσωτερική και εξωτερική υποκοιλιακή ζώνη (iSVZ και oSVZ) και τη φλοιώδη πλάκα (CP) σε μοριακό, κυτταρικό και δομικό επίπεδο. Η ανακεφαλαίωση των ειδικών αναπτυξιακών χαρακτηριστικών των πρωτεύοντων/ανθρώπων, όπως το διευρυμένο oSVZ, σε οργανοειδή πρόσθιου εγκεφάλου προσφέρει μοναδικά πλεονεκτήματα για την κατανόηση της ανθρώπινης ανάπτυξης του φλοιού και των αναπτυξιακών διαταραχών. [55]

Αν και οι μέθοδοι δημιουργίας εγκεφαλικών οργανοειδών μπορούν να παράγουν ιστούς που μοιάζουν με διάφορες περιοχές του εγκεφάλου που αλληλεπιδρούν, η αναλογία και η χωρική τους οργάνωση είναι εξαιρετικά ετερογενείς και απρόβλεπτες. Για να βελτιωθεί η μοντελοποίηση των διαπεριφερειακών αλληλεπιδράσεων, πολλές ομάδες ανέπτυξαν ταυτόχρονα νέες προσεγγίσεις, πρώτα διαφοροποιώντας τα hPSCs σε διαφορετικά οργανοειδή, ειδικά για την περιοχή του εγκεφάλου, ξεχωριστά, και στην συνέχεια συγχωνεύοντάς τα μεταξύ τους για να σχηματίσουν οργανοειδή με πολλαπλές διακριτές ταυτότητες περιοχών, με ελεγχόμενο τρόπο. [64] Για παράδειγμα τα συντηγμένα ραχιαία και κοιλιακά οργανοειδή του πρόσθιου εγκεφάλου έχει αποδειχθεί ότι σχηματίζουν ένα «συναρμολογοειδές»

[Πληκτρολογήστε εδώ]

(assembled organoid) με δύο διακριτές αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενες περιοχές. [65] Σε αυτές τις δομές, οι ενδονευρώνες που παράγονται από την κοιλιακή περιοχή μεταναστεύουν κατά προτίμηση προς την ραχιαία περιοχή, μοιάζοντας με την εφραπτομενική μετανάστευση ενδονευρώνων από το subpallium (υποπαλίωμα) στον εγκεφαλικό φλοιό *in vivo*. Επιπλέον, ο ηλεκτροφυσιολογικός χαρακτηρισμός των συναρμολογοειδών πρόσθιου εγκεφάλου αποκάλυψε ότι οι μεταναστευτικοί ενδονευρώνες συνδέονται συναπτικά με τοπικούς διεγερτικούς νευρώνες για να σχηματίσουν μικροκυκλώματα.

Συνολικά, οι εξελίξεις στις μεθοδολογίες των οργανοειδών του εγκεφάλου έχουν επεκτείνει την εργαλειοθήκη για την μοντελοποίηση της ανθρώπινης ανάπτυξης και των διαταραχών. Η επιλογή μεταξύ καθοδηγούμενων και μη καθοδηγούμενων μεθοδολογιών εξαρτάται από το συγκεκριμένο επίκεντρο της έρευνας. Για παράδειγμα, τα μη καθοδηγούμενα οργανοειδή είναι κατάλληλα για την μελέτη της ποικιλομορφίας των κυτταρικών τύπων κατά την ανάπτυξη ολόκληρου του εγκεφάλου, τα καθοδηγούμενα οργανοειδή ανακεφαλαιώνουν καλύτερα την κυτταροαρχιτεκτονική του εγκεφάλου με λιγότερη ετερογένεια και τα συναρμολογοειδή επιτρέπουν την διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ συγκεκριμένων περιοχών του εγκεφάλου με πιο κατάλληλο μοριακό και λειτουργικό χαρακτηρισμό.

2.B. Εφαρμογές οργανοειδών νευρικού συστήματος

I. Μοντελοποίηση ανάπτυξης και λειτουργίας εγκεφάλου χρησιμοποιώντας οργανοειδή

Τα ζωικά μοντέλα, ιδιαίτερα τα τρωκτικά, και τα συστήματα κυτταροκαλλιέργειας, όπως αυτά που χρησιμοποιούν νευρικές γενεές προερχόμενες από ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hPSCs), έχουν παράσχει τεράστιες γνώσεις για την ανάπτυξη, την λειτουργία και την δυσλειτουργία του ανθρώπινου εγκεφάλου, αλλά δεν αποτυπώνουν πλήρως την πολυπλοκότητα. [66] Οι τρισδιάστατοι (3D) νευρικοί ιστοί που παράγονται από hPSCs, και ονομάζονται εγκεφαλικά οργανοειδή, έχουν τεράστιες δυνατότητες για την διερεύνηση πτυχών της ανάπτυξης του ανθρώπινου εγκεφάλου. Τα οργανοειδή περιέχουν πολλαπλούς τύπους κυττάρων, έχουν νευρωνική λειτουργικότητα *in vitro* που ανακεφαλαιώνει ορισμένα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης και ωρίμανσης σύνθετου νευρωνικού ιστού και είναι πιο αντιπροσωπευτικά της *in vivo* φυσιολογίας από τις δισδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες. [67] Τα hiPSCs αναδύονται ως εργαλείο για την κατανόηση της ανάπτυξης του ανθρώπινου εγκεφάλου σε κυτταρικό, μοριακό και γονιδιωματικό επίπεδο.

Τα οργανοειδή που μιμούνται τον εγκεφαλικό φλοιό έχουν μέχρι στιγμής χαρακτηριστεί καλύτερα και χρησιμοποιούνται πιο συχνά από άλλα οργανοειδή εγκεφάλου. Τέτοια οργανοειδή έχουν, επίσης, προσελκύσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στο πεδίο, επειδή ο εγκεφαλικός φλοιός είναι η πιο εξελικτικά διευρυμένη περιοχή του ανθρώπινου εγκεφάλου, σε σύγκριση με αυτή άλλων ζώων και συχνά επηρεάζεται σοβαρά σε πολλές νευρολογικές διαταραχές. [68] Η παρουσία έντονων διαφορών μεταξύ των ειδών στον φλοιό δικαιολογεί την χρήση φλοιωδών οργανοειδών που προέρχονται από ανθρώπινα κύτταρα έναντι ζωικών μοντέλων. Ωστόσο, όπως όλα τα μοντέλα *in vitro*, αυτά τα οργανοειδή δεν είναι πανομοιότυπα αντίγραφα των *in vivo* ομολόγων τους.

Επιπρόσθετα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε φάνηκε ότι τα hiPSCs που αναπτύσσονται σε εναιώρημα παρουσία παραγόντων ρυγχαίας νευροποίησης μπορούν να δημιουργήσουν τρισδιάστατες δομές που περιέχουν πολωμένα ακτινωτά γλοιοκύτταρα, ενδιάμεσους προγόνους και ένα φάσμα ειδικών για το στρώμα

[Πληκτρολογήστε εδώ]

φλοιωδών νευρώνων που θυμίζουν της οργάνωσή τους in vivo. Οι πολυστρωματικές δομές που προέρχονται από τα hiPSCs εκφράζουν ένα προφίλ γονιδιακής έκφρασης τυπικό για τον εμβρυϊκό τελεγκέφαλο αλλά όχι για τις άλλες περιοχές του ΚΝΣ. Το μεταγράφημα είναι εμπλουτισμένο σε μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν την ειδικότητα, την ανάπτυξη και το μοτίβο του ραχιαίου τελεγκέφαλου και εμφανίζει την υψηλότερη συσχέτιση με αυτό του πρώιμου ανθρώπινου εγκεφαλικού φλοιού στις 8-10 εβδομάδες μετά την σύλληψη. Έτσι τα hiPSCs είναι ικανά να δημιουργήσουν ένα μεταγραφικό μοντέλο που θα προσομοιάζει την ανθρώπινη τελεγκεφαλική ανάπτυξη. [69]

Σε άλλη μελέτη αναπτύχθηκε ένα αποτελεσματικό in vivo μοντέλο με μεταμόσχευση εγκεφαλικών οργανοειδών που προέρχονται από hPSCs εντός ενός περιβάλλοντος φυσιολογικού ιστού. Τα μοσχευμένα οργανοειδή ενσωματώθηκαν εύκολα στον εγκέφαλο του ποντικίου, εμφάνισαν προοδευτικά μοτίβα νευρωνικής χρονικής διαφοροποίησης, ανέπτυξαν ένα λειτουργικό σύστημα αγγείωσης και εμφάνισαν πρωτοφανή αξονική ανάπτυξη για να δημιουργήσουν ώριμους και λειτουργικούς ανθρώπινους εγκεφαλικούς ιστούς in vivo, που ανταποκρίνονταν σε φυσιολογικά ερεθίσματα. Τέλος, με την χρήση οπτογενετικής φάνηκε και η λειτουργική συναπτική συνδεσιμότητα μεταξύ μοσχευμένων οργανοειδών και του εγκεφάλου του ξενιστή. [70]

Τα εγκεφαλικά οργανοειδή έχουν την ικανότητα να μιμούνται την αρχιτεκτονική του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου και να σχηματίζουν διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων με χωροχρονικό τρόπο. Για να προσδιοριστεί εάν αυτές οι ομοιότητες με την in vivo ανάπτυξη του εγκεφάλου οφείλονται στην επανενεργοποίηση των προγραμμάτων έκφρασης των αναπτυξιακών γονιδίων, αρκετές μελέτες έχουν συγκρίνει την έκφραση γονιδίων των οργανοειδών με τον πρωτογενή εμβρυϊκό ιστό χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες [71], RNA-seq [72] και μονοκύτταρο RNA-seq [73]. Αυτές οι αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης έχουν δείξει ότι τα οργανοειδή μοντέλα αναπαράγουν ιδιαίτερα καλά την πρώιμη ανάπτυξη εγκεφάλου, δημιουργώντας μια ευρεία ποικιλία κυττάρων που μοιράζονται μεταγραφικά προφίλ με τον πρώιμο εμβρυϊκό νεοφλοιό. [74]

Τα οργανοειδή εγκεφάλου περιέχουν πολλαπλές περιοχές που μοιάζουν με νευρικό σωλήνα που εμφανίζουν περιοχές τύπου VZ οι οποίες καλύπτονται από

[Πληκτρολογήστε εδώ]

πολλαπλασιαστικούς κορυφαίους προγόνους που εκφράζουν τυπικά γονίδια ακτινωτών νευρογλοιακών δεικτών (SOX2, NESTIN, PAX6) και αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων στο οργανοειδές πριν απ' την νευρογένεση. Αυτά τα NSCs είναι ψευδοστρωματοποιημένα, εμφανίζουν την τυπική επιμήκη μορφολογία των ακτινωτών νευρογλοιακών κυττάρων και υφίστανται μίτωση στην κορυφαία επιφάνεια, μέσω διακινητικής πυρηνικής μετανάστευσης. [75] Μετά την έναρξη της νευρογένεσης, πληθυσμοί ενδιάμεσων προγονικών κυττάρων (TBR2+) αρχίζουν να εμφανίζονται σε μια περιοχή που μοιάζει με SVZ έως την περιοχή που μοιάζει με VZ. Έχουν επίσης παρατηρηθεί κύτταρα που εκφράζουν βασικούς ακτινωτούς νευρογλοιακούς δείκτες (HOPX, PTPRZ1) [76], τα οποία υπάρχουν αποκλειστικά στην εξωτερική SVZ περιοχή (oSVZ) in vivo, μια επιπλέον βλαστική ζώνη που πιστεύεται ότι απουσιάζει σε νεοφλοιούς τρωκτικών. [77]

In vivo οι νευρώνες που παράγονται από τις περιοχές VZ και SVZ μεταναστεύουν κατά μήκος των ακτινωγλοιακών διεργασιών προς την φλοιώδη πλάκα και σχηματίζουν μια δομή έξι στρωμάτων, καθένα από τα οποία αποτελείται από νευρώνες με διαφορετικές ιδιότητες. Η νευρογένεση συμβαίνει με χωροχρονικό τρόπο με νευρώνες βαθιάς στιβάδας να δημιουργούνται νωρίτερα και να ακολουθούν οι μεταγενέστερες γενιές νευρώνων ανωτέρου στρώματος. Αν και τα οργανοειδή μέχρι σήμερα δείχνουν μόνο μια περιορισμένη χωρική διαστρωμάτωση νευρώνων, παράγουν τις διάφορες κατηγορίες νευρώνων ακολουθώντας την χρονική τροχιά της αρχικής κατασκευής βαθιάς στρωμάτωσης (CTIP2+), ακολουθούμενη από νευρώνες ανώτερου στρώματος (SATB2+). [78]

Η ενιαία επισήμανση των νευρώνων που δημιουργούνται από οργανοειδή καταδεικνύει την ικανότητα τους να δημιουργούν σύνθετες μορφολογίες και να συνάπτονται μεταξύ τους, με δενδριτικές άκρες, σε κοντινή απόσταση από προσυναπτικά άκρα. Με σειριακή ηλεκτρονική μικροσκοπία σε οργανοειδή φάνηκε περαιτέρω η ικανότητα των νευρώνων να σχηματίζουν συνάψεις. Παρατηρήθηκαν επίσης απλοί δενδρίτες που κάνουν συνάψεις με πολλαπλούς άξονες, υποδηλώνοντας τον σχηματισμό πολύπλοκων δικτύων. [79]

Οι νευρώνες δεν είναι οι μόνοι τύποι κυττάρων που είναι απαραίτητοι για την δημιουργία εγκεφάλου. Τα νευρογλοιακά κύτταρα είναι εξίσου απαραίτητα για την λειτουργία του εγκεφάλου στην όψιμη ανάπτυξη και στον ενήλικο εγκέφαλο, γι' αυτό

[Πληκτρολογήστε εδώ]

αποτελούν τουλάχιστον το 50% των ανθρώπινων εγκεφαλικών κυττάρων. Τα δύο κύρια νευρογλοιακά κύτταρα, τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι απαραίτητα για την υποστήριξη της συναπτικής λειτουργίας και την ταχεία μετάδοση των νευρικών ερεθισμάτων, αντίστοιχα. Αυτοί οι τύποι κυττάρων προκύπτουν στην όψιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, ξεκινώντας από τα μέσα του δευτέρου τριμήνου και συνεχίζοντας μετά την γέννηση, όταν οι ίδιοι νευρικοί πρόγονοι που υποβάλλονταν σε νευρογένεση μεταπηδούν από μία πρωταρχική νευρογενή μοίρα στην γλοιογονική μοίρα. [80] Η ανοσοχρώση οργανοειδών που καλλιεργούνται μακροπρόθεσμα αποκαλύπτει κύτταρα που εκφράζουν GFAP με τις τυπικές μορφολογίες αστροκυττάρων. [71] Κύτταρα που μοιάζουν με αστροκύτταρα που απομονώθηκαν από φλοιώδη οργανοειδή ήταν ικανά να ανακεφαλαιώσουν αρκετές βασικές λειτουργίες των αστροκυττάρων, με αρκετές *in vitro* δοκιμές να δείχνουν την ικανότητά τους να προσλαμβάνουν γλουταμινικό, να επάγουν σχηματισμό συνάψεων, συναπτοσώματα φαγοκυττάρωσης και να ρυθμίζουν τη νευρωνική σηματοδότηση ασβεστίου. [81]

Με την χρήση της τεχνικής Single-cell RNA sequencing σε οργανοειδή μοντέλα ανιχνεύτηκε μόνο ένα μικρό ποσοστό κυττάρων που εκφράζουν δείκτες πρόδρομων κυττάρων ολιγοδενδροκυττάρων (OPC) μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια [82] Ο μικρός αριθμός είναι λογικός καθώς ο σχηματισμός περιβλημάτων μυελίνης γύρω από τους άξονες στα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα ξεκινά μόνο κατά την γέννηση *in vivo*.

Η μικρογλοία είναι τα μόνιμα έμφυτα ανοσοκύτταρα του εγκεφάλου που έχουν επίσης αποδειχθεί ότι έχουν ρόλο στην ρύθμιση των νευρωνικών κυκλωμάτων και στην ρύθμιση του αριθμού των νευρωνικών προγονικών κυττάρων. [83] Η μικρογλοία προέρχεται από εξωεμβρυϊκές και γενεές μεσοδέρματος και επομένως συνήθως απουσιάζουν από τα οργανοειδή πρωτόκολλα του εγκεφάλου που περιέχουν κυρίως ή αποκλειστικά γενεές νευροεξωδέρματος. Ωστόσο, ένα εντελώς μη κατευθυνόμενο πρωτόκολλο εγκεφαλικού οργανοειδούς, το οποίο παράγει λιγότερο σταθερές περιοχές του εγκεφάλου, χωρίς να χειραγωγούνται μοριακά μονοπάτια διαμόρφωσης, παράγει ένα ποσοστό προγονικών κυττάρων μεσοδέρματος που εξελίσσονται σε κύτταρα που μοιάζουν με μικρογλοία.[84] Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ότι κύτταρα που μοιάζουν με μικρογλοία, διαφοροποιημένα από τα iPSCs θα μπορούσαν να εισέλθουν και να ενσωματωθούν σε οργανοειδή του εγκεφάλου απλώς προσθέτοντάς τα στα μέσα

[Πληκτρολογήστε εδώ]

καλλιέργειας. [85] Επιπλέον, μετά από τραυματισμό του οργανοειδούς, αυτά τα κύτταρα που μοιάζουν με μικρογλοία άλλαξαν την μορφολογία τους και πλέον έμοιαζαν με ενεργοποιημένη μικρογλοία που βρέθηκε σε ασθενείς ή τραυματισμένους εγκεφάλους. [79]

II. Μοντελοποίηση νευροαναπτυξιακών διαταραχών του εγκεφάλου χρησιμοποιώντας οργανοειδή

Τα οργανοειδή του εγκεφάλου που προέρχονται από hPSCs, ειδικά τα iPSCs που προέρχονται από ασθενείς, έχουν διερευνηθεί εκτενώς για την δυνατότητα μοντελοποίησης νευροαναπτυξιακών διαταραχών του εγκεφάλου. [86] Ιδιαίτερα επιτυχής ήταν η ανακεφαλαίωση φαινοτύπων που σχετίζονται με ασθένειες, στις οποίες οι δομικές δυσπλασίες είναι εμφανείς στα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια. Οι μηχανισμοί τέτοιων διαταραχών αποδίδονται συχνά σε διαταραγμένη ρύθμιση των προγονικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της πρόωρης διαφοροποίησης, του μειωμένου πολλαπλασιασμού και της διαταραχής του κυτταρικού κύκλου, τα οποία μπορούν να αναλυθούν αξιόπιστα με την χρήση εγκεφαλικών οργανοειδών. [51] Επιπλέον έχουν γίνει πρόοδοι χρησιμοποιώντας οργανοειδή του εγκεφάλου για να αποσαφηνιστεί η γενετική βάση ορισμένων νευροαναπτυξιακών διαταραχών όπως η μικροκεφαλία και ο αυτισμός και να διερευνηθεί η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στον εγκεφαλο, όπως κατά την διάρκεια της μόλυνσης από τον ιό Ζίκα. [87]

Πράγματι, ίσως το πιο εντυπωσιακό παράδειγμα χρήσης αυτής της τεχνικής ήταν να δείξει την αιτιότητα μεταξύ του κυκλοφορούντος ιού Ζίκα και της εστίας μικροκεφαλικών περιπτώσεων στην Βραζιλία. [88] Με την έκθεση ανθρώπινων οργανοειδών εγκεφάλου που προέρχονται από iPSCs σε ένα απομονωμένο στέλεχος Ζίκα της Βραζιλίας, ήταν δυνατό να φανεί πως ο ιός έλκονταν από NPCs λόγω ενός συνόλου αποκλειστικά εκφραζόμενων υποδοχέων μεμβράνης. Η μόλυνση των κυττάρων με τον ιό οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο και ελαττώματα στην φλοιώδη πλάκα μειώνοντας συγκεκριμένους πληθυσμούς φλοιωδών νευρώνων σε διαφορετικά στρώματα του εγκεφαλικού οργανοειδούς. Τα οργανοειδή μοντέλα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για μελέτη φαρμάκων έναντι της μόλυνσης.

Η μικροκεφαλία, που προκαλείται από αυτοσωματικές υπολειπόμενες μεταλλάξεις σε πολλά γονίδια, ήταν ένας πρώιμος στόχος της μοντελοποίησης με εγκεφαλικά οργανοειδή. [89] Η μικροκεφαλία είναι μια νευροαναπτυξιακή νόσος στην οποία η περιφέρεια της κεφαλής μειώνεται σημαντικά και χαρακτηρίζεται άμεσα από μικρότερο εγκεφαλικό φλοιό. [90] Εκτεταμένες μελέτες έχουν δείξει ότι πολλοί αιτιολογικοί παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε μικροκεφαλία, συμπεριλαμβανομένων γενετικών μεταλλάξεων. [91] Πρότυποι οργανισμοί, όπως τα ποντίκια έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξέταση της παθογένεσης που σχετίζεται με την μικροκεφαλία. Ωστόσο, είναι δύσκολο να δημιουργηθεί ένα ρεαλιστικό ζωικό μοντέλο για την μικροκεφαλία με ποντίκια καθώς τα μεταλλαγμένα ποντίκια δεν κατάφεραν να προσομοιάσουν το σημαντικά μειωμένο μέγεθος εγκεφάλου, όπως αυτό προκύπτει σε ανθρώπους ασθενείς. [92] Για το μοντέλο της μικροκεφαλίας δημιουργήθηκαν iPSCs από έναν ασθενή με σοβαρή μικροκεφαλία. Τα κύτταρα που προήλθαν από τον ασθενή επιβεβαιώθηκε ότι έφεραν τις ετερόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου CDK5RAP2. Σε σύγκριση με τα άγριου τύπου εγκεφαλικά οργανοειδή, τα μεταλλαγμένα εγκεφαλικά οργανοειδή CDK5RAP2 εμφάνισαν πρόωρη νευρική διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε μικρότερα μεγέθη εγκεφαλικών οργανοειδών. [89] Τα εγκεφαλικά οργανοειδή που προέρχονται από iPSCs με μεταλλάξεις στα γονίδια KNL1 και NARS1 εμφάνισαν επίσης μείωση στους νευρικούς προγόνους και ελάττωμα στο σχηματισμό δομής νευρικής ροζέτας, που μπορεί να σχετίζεται με μικροκεφαλία. Εκτός από την εξασθένιση των NPCs, βρέθηκε ότι η μετάλλαξη NARS1 μπορεί επίσης να προκαλέσει καθυστέρηση στην νευροανάπτυξη. [93] Τα iPSCs με μεταλλάξεις ASPM χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή εγκεφαλικών οργανοειδών που μοιάζουν με ανθρώπινο φλοιό. Τα μεταλλαγμένα ASPM εγκεφαλικά οργανοειδή εμφάνισαν λιγότερο οργανωμένες δομές νευροεπιθηλίου, λιγότερα κοιλιακά ακτινογλοιακά κύτταρα (vRG), κύτταρα εξωτερικής ακτινωτής γλοίας (oRG) και ελαττωματική ελασματοποίηση στοιβάδας σε σύγκριση με εγκεφαλικά οργανοειδή άγριου τύπου. [94] Η κατάλυση στο γονίδιο WDR62, το δεύτερο πιο κοινό αιτιολογικό γονίδιο για την μικροκεφαλία, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη του κεντροσώματος, είχε ως αποτέλεσμα την πρόωρη διαφοροποίηση των NPCs και την μείωση του πολλαπλασιασμού του oRG. Είναι σημαντικό ότι η οδός WDR62-CEP170-KIF24A αναγνωρίστηκε ως κρίσιμος παράγοντας που συμβάλλει στην μικροκεφαλία με βάση μελέτες σε εγκεφαλικά οργανοειδή και ποντίκια. [95] Συνολικά, τα οργανοειδή του

[Πληκτρολογήστε εδώ]

εγκεφάλου έχουν εφαρμοστεί καλά στο μοντέλο φαινοτύπων που σχετίζονται με την μικροκεφαλία.

Ένα άλλο κλασικό παράδειγμα μοντελοποίησης μικροκεφαλικής νόσου με χρήση εγκεφαλικών οργανοειδών ήταν το σύνδρομο Aicardi Goutieres (AGS) τύπου I, που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο TREX 1 (Threeprime Repair Exonuclease I). Το AGS χαρακτηρίζεται από μία δραματική απώλεια νευρώνων που οδηγεί στην δια βίου κατάσταση αναπηρίας. [96] Η έλλειψη ισχυρών ζωικών μοντέλων έχει εμποδίσει την κατανόηση της παθολογίας και την ανάπτυξη πιθανών θεραπειών. Χρησιμοποιώντας ισογονικά και προερχόμενα από ασθενείς iPSCs ήταν δυνατό να αναλυθεί η συμβολή διαφορετικών τύπων κυττάρων στο AGS. Όταν τα AGS iPSCs διαφοροποιήθηκαν σε εγκεφαλικά οργανοειδή παρατηρήθηκε μαζικός κυτταρικός θάνατος, μιμούμενος τον νευροεκφυλισμό και την μικροκεφαλία που παρατηρήθηκαν κατά την νευροανάπτυξη της ασθενούς.

Τα οργανοειδή του εγκεφάλου έχουν συνεισφέρει και στην πρόοδο μοντελοποίησης ανθρώπινων πολυγονιδιακών ιδιοπαθών καταστάσεων, όπως οι ASDs (Autism Spectrum Disorders). Η μελέτη οργανοειδών εγκεφάλου που προέρχονται από iPSCs αποκάλυψε μια σημαντική αύξηση στην διαίρεση των NPCs σε επιλεγμένη ομάδα ατόμων με σοβαρή ιδιοπαθή ASD. [86] Η ASD είναι μια ετερογενής εγκεφαλική διαταραχή, που προκαλείται από μια σημαντική δεξαμενή γενετικών μεταλλάξεων. [97] Οι ασθενείς με ASD παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενες συμπεριφορές και εξασθενημένη κοινωνική αλληλεπίδραση. Τα αναδυόμενα στοιχεία υποδηλώνουν ότι πολλά από τα γονίδια που σχετίζονται με την ASD εμπλέκονται σε κυτταρικές λειτουργίες σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων του εμβρυϊκού εγκεφάλου. [98] Για να καθιερωθούν ανθρώπινα μοντέλα ASD δημιουργήθηκαν τελεγκεφαλικά οργανοειδή από iPSCs που προέρχονται από ασθενείς και οικογενειακά τους πρόσωπα. Είναι ενδιαφέρον ότι οι μεταγραφικές αναλύσεις των οργανοειδών από ασθενείς με ASD αποκάλυψαν σημαντική μείωση στο μήκος του κυτταρικού κύκλου και αύξηση στον αριθμό ανασταλτικών συνάψεων σε σύγκριση με τα controls. Στα οργανοειδή από τους ασθενείς με ASD παρατηρήθηκαν περισσότερα προγονικά κύτταρα και GABA-εργικοί νευρώνες. Είναι σημαντικό ότι το FOXP1, ένας μεταγραφικός παράγοντας κρίσιμος για την ανάπτυξη του τελεγκεφάλου και σχετιζόμενος με το άτυπο σύνδρομο Rett και το μικρό μέγεθος εγκεφάλου, [99] βρέθηκε με ασυνήθιστα αυξημένη ρύθμιση σε οργανοειδή από ασθενείς με ASD και η

[Πληκτρολογήστε εδώ]

διαμεσολαβούμενη από λεντι-ιό αποσιώπηση του FOXP1 ήταν ικανή να διασώσει την μην φυσιολογική υψηλή παραγωγή GABA-εργικών νευρώνων. [100] Μια πρόσφατη μελέτη, με την άμεση επαγωγή των iPSCs, από ασθενείς με ASD, σε νευρώνες και οργανοειδή του πρόσθιου εγκεφάλου αποκάλυψε μια χρονική απορρύθμιση συγκεκριμένων δικτύων γονιδίων που προκάλεσε έντονες ανωμαλίες στην ανάπτυξη των νευρώνων του φλοιού. Οι ώριμοι νευρώνες έδειξαν ανώμαλη δυναμική ανάπτυξης και περισσότερες διακλαδώσεις. [101] Το CDH8, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί έναν παράγοντα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, ήταν επίσης ένα αιτιολογικό γονίδιο για ASD. Γι' αυτόν το λόγο δημιουργήθηκαν και συγκρίθηκαν εγκεφαλικά οργανοειδή από ετερόζυγα νοκ-άουτ (CHD8^{+/-}) iPSCs και μάρτυρες (CHD8^{+/+}). Η μελέτη πρότεινε ότι η μετάλλαξη CHD8 άλλαξε την έκφραση των γονιδίων DLX, βασικών ρυθμιστών στην ανάπτυξη των GABA-εργικών ενδονευρώνων. Η ανάλυση των μονοπατιών των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων αποκάλυψε επίσης δυσρύθμιση στην σηματοδότηση WNT/β-κατενίνης. [102] Χρησιμοποιώντας οργανοειδή του εγκεφάλου, βρέθηκε ότι αλλοιώσεις σε διάφορα γονίδια και μονοπάτια σχετίζονται με ASD. [103] Εκτός από τους νευρώνες, άλλοι μη νευρικοί παράγοντες της ASD, όπως τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία, έχουν επίσης κερδίσει την προσοχή των ερευνητών. [104, 105, 106] Ωστόσο, η μοντελοποίηση τέτοιων πτυχών με οργανοειδή εγκεφάλου εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση. Τα αστροκύτταρα στα οργανοειδή του εγκεφάλου ωριμάζουν μόνο μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια, [107] και η παρουσία μικρογλοίας σ' αυτά είναι αραιή, εάν υπάρχει, και ελάχιστα ελεγχόμενη. [108] Έτσι πρέπει να αναπτυχθούν βελτιστοποιημένες προσεγγίσεις διαφοροποίησης ή ρυθμίσεις συγκαλλιέργειας για να ενσωματωθούν περισσότερα κυτταρικά στοιχεία και να υπάρχει μια πιο ολοκληρωμένη μοντελοποίηση της ASD.

Το Rett Syndrome (RTT) είναι μια σοβαρή νευροαναπτυξιακή διαταραχή, η οποία εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στις γυναίκες και χαρακτηρίζεται από νοητική υστέρηση και παρεκκλίνουσα συμπεριφορά. Η κύρια αιτία για την εμφάνιση του RTT είναι η μετάλλαξη στο X-συνδεδεμένο γονίδιο methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2). [109] Το MECP2 εκφράζεται σε αφθονία στους εγκεφαλικούς νευρώνες και σχετίζεται με την μορφολογία τους και την λειτουργική τους ωρίμανση. [110] Για την καλύτερη μοντελοποίηση των ειδικών για τον άνθρωπο φαινοτύπων του RTT, τα νευρικά κύτταρα παρασκευάστηκαν από iPSCs που προήλθαν από ασθενείς ή από hESCs επεξεργασμένα με MECP2 ως καλλιέργειες μονής στοιβάδας. Αυτά τα *in vitro*

[Πληκτρολογήστε εδώ]

μοντέλα RTT έδειξαν διαταραχή της ανθρώπινης νευρικής ωρίμανσης, συμπεριλαμβανομένων λιγότερων συνάψεων, μικρότερου μεγέθους σώματος και ελαττωμάτων στην λειτουργία. [111, 112] Τα οργανοειδή του εγκεφάλου βοηθούν περαιτέρω στην κατανόηση της αιτιολογίας του RTT σε ένα τρισδιάστατο αναπτυξιακό πλαίσιο. Τα εγκεφαλικά οργανοειδή που προέρχονται από τα iPSCs ασθενών με RTT εξήγησαν πώς η ανεπαρκής λειτουργία του MECP2 επηρεάζει τα NPCs και την μετανάστευση των νευρώνων μέσω της ρύθμισης του miR-199 ή του miR-214. [113] Μαζί με την ανάπτυξη διαφόρων οργανοειδών του εγκεφάλου για συγκεκριμένες περιοχές, έχουν εφαρμοστεί συντηγμένα οργανοειδή εγκεφάλου για την κατανόηση των αναπτυξιακών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με παθολογικό υπόβαθρο. Για παράδειγμα, τα ραχιαία, τα κοιλιακά και τα συναρμολογημένα οργανοειδή του πρόσθιου εγκεφάλου προήλθαν από iPSCs, προερχόμενα από ασθενή με RTT, που φέρουν μετάλλαξη R255X. [114] Παρατηρήθηκε πρόωρη ανάπτυξη της εν τω βάθει φλοιώδους υποπλάκας, δημιουργώντας νευρώνες με λειτουργικά ελλείμματα. Αυτή η μελέτη υποδηλώνει επίσης αρνητικό αντίκτυπο της μετάλλαξης MECP2 στην εφαιτομενική μετανάστευση ανθρώπινων ενδονευρώνων, ως συνέπεια μιας ανωμαλίας σε νευρωνικούς προγονικούς. Το RTT είναι η δεύτερη πιο κοινή αιτία νοητικής καθυστέρησης στις γυναίκες, μετά το σύνδρομο Down. Λίγα φάρμακα έχουν αποδειχθεί ότι βελτιώνουν ορισμένα συμπτώματα, ενώ αποτελεσματική θεραπεία δεν είναι ακόμα εφικτή. Απαιτούνται ακόμη συστηματικές μελέτες αιτιολογικών γενετικών μεταλλάξεων, μοριακών μηχανισμών παθολογίας της νόσου και στοχευμένες θεραπείες. Μαζί με τις εφαρμογές ζωικών μοντέλων, διάφορα οργανοειδή συστήματα του εγκεφάλου μπορούν να χρησιμεύσουν ως κρίσιμα εργαλεία για την διευκόλυνση αυτών των προσπαθειών. [115]

Περαιτέρω εφαρμογές των εγκεφαλικών οργανοειδών στην μοντελοποίηση νευροαναπτυξιακών διαταραχών είναι η μελέτη των κυτταρικών φαινοτύπων του συνδρόμου Timothy, μιας σπάνιας νευροαναπτυξιακής διαταραχής που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο του καναλιού ασβεστίου Cav1.2. Επιπλέον, με την δημιουργία οργανοειδών από iPSCs που προέρχονται από ασθενείς και την σύγκρισή τους με τα controls, αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά η μη φυσιολογική μετανάστευση των ενδονευρώνων. [116, 117]

Το Timothy Syndrome (TS) είναι μια σοβαρή νευροαναπτυξιακή νόσος που προκαλείται από γενετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο CACNA1C που κωδικοποιεί το

[Πληκτρολογήστε εδώ]

κανάλι ασβεστίου τύπου L (LTCC). [118] Κι άλλες γενετικές αλλοιώσεις έχουν βρεθεί να σχετίζονται με το TS, συμπεριλαμβανομένων μεταλλάξεων στο KCNQ1 [119], στο KCNH2 [120] και στο SCN5A [121]. Παρατηρήθηκε σε μελέτες ότι τα καρδιομυοκύτταρα που προέρχονται από iPSCs ασθενών με TS εμφάνιζαν σταθερά κυτταρικά ελαττώματα. Τα οργανοειδή που περιέχουν καρδιομυοκύτταρα θα μπορούσαν επομένως να είναι μία από τις πιθανές πλατφόρμες για την κατανόηση των μηχανισμών του TS και τον εντοπισμό υποψήφιων φαρμάκων. [122] Σε δύο παρόμοιες μελέτες, οι νευρώνες που προέρχονται από iPSCs από ασθενείς με TS έδειξαν μη φυσιολογική ικανότητα ανάκλησης δενδριτών, ανώμαλη διαφοροποίηση και εξασθενημένη, εξαρτώμενη από την δραστηριότητα, γονιδιακή έκφραση. [123, 124] Η μελέτη αποκάλυψε επίσης έναν τρόπο μέσω του οποίου τα κανάλια CaV1.2 ρυθμίζουν την σηματοδότηση RhoA στον εγκέφαλο. [125] Μια άλλη μελέτη του TS σε ποντίκια έδειξε προχωρημένη ωρίμανση προγονικών ολιγοδενδροκυττάρων (OPCs) και αυξημένη πυκνότητα μυελινοτικών ολιγοδενδροκυττάρων στον εγκέφαλο ποντικού [126], εμπλέκοντας μη νευρωνικούς ρυθμιστές στην αιτιολογία του TS. Η πρόωμη έρευνα των LTCCs σε ζωικά μοντέλα έχει δείξει τις κρίσιμες λειτουργίες τους στην μετανάστευση μεταξύ των νευρώνων. Ωστόσο, είναι πρόκληση να διερευνηθούν οι μεταναστευτικές συμπεριφορές των ανθρώπινων ενδονευρώνων σε ένα τρυβλίο, όπου τα *in vivo* φυσιολογικά περιβάλλοντα θα μπορούν να αναπαρασταθούν πιστά. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος, δημιουργήθηκαν ανθρώπινα φλοιώδη σφαιροειδή (hCS) και ανθρώπινα υποπαλλιακά σφαιροειδή (hSS) από iPSCs ασθενών με TS. Στη συνέχεια, τα ειδικά για τον ασθενή hCS και hSS συναρμολογήθηκαν μαζί για να μοντελοποιήσουν την εφραπτομενική μετανάστευση ανθρώπινων ενδονευρώνων σε 3D, με GABA-εργικούς ενδονευρώνες σημασμένους με Dlx1/2b::eGFP. Παρακολουθώντας τα ζωντανά κύτταρα φάνηκε ότι οι ανθρώπινοι ενδονευρώνες TS εμφάνισαν αύξηση στην συχνότητα μεταπήδησης αλλά με μικρότερο μήκος άλματος σε σύγκριση με το control, με αποτέλεσμα μεταναστευτική ανεπάρκεια. [117] Το ελάττωμα μετανάστευσης των ενδονευρώνων TS μπορεί να ανακτηθεί χρησιμοποιώντας αναστολέα LTCC και αναστολέα κινάσης εξαρτώμενης από κυκλίνη, νιμοδιπίνη και ροσκοβιτίνη, που μειώνουν την δραστηριότητα των LTCCs. [126] Τα τελευταία χρόνια, η χρήση οργανοειδών εγκεφάλου που προέρχονται από iPSCs σε συνδυασμό με την απεικόνιση ασβεστίου και άλλες προσεγγίσεις έχουν αποκαλύψει λεπτομερείς μηχανιστικές γνώσεις σχετικά με την λειτουργία και την δυσλειτουργία του διαύλου ιόντων στο TS, ρίχνοντας φως στην πιθανή θεραπεία. Απαιτούνται ακόμη

[Πληκτρολογήστε εδώ]

περισσότερες προσπάθειες για την μετάφραση των παρατηρήσεων από τα εργαστηριακά μοντέλα στην κλινική πρακτική.

Το Tuberous Sclerosis Complex (TSC) είναι μια αναπτυξιακή διαταραχή που επηρεάζει πολλαπλά όργανα, συμπεριλαμβανομένων κυρίως του δέρματος, των πνευμόνων, των νεφρών και του εγκεφάλου. [127] Οι αιτιολογικές γενετικές μεταλλάξεις του TSC περιλαμβάνουν αλλαγές στα ογκοκατασταλτικά γονίδια TSC1 ή TSC2, τα οποία σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα με το TBC1D7 για την αναστολή του συμπλέγματος mTOR 1 (mTORC1), ενός ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του μεταβολισμού. Έτσι, τα μεταλλαγμένα κύτταρα TSC1/TSC2 εμφανίζουν υπερενεργοποίηση των τελεστών του μονοπατιού mTOR και αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. [128] Οι ασθενείς με TSC όχι μόνο εμφανίζουν νευρολογικές και ψυχιατρικές βλάβες, αλλά και υψηλό ποσοστό επιληψίας. [129] Οι χαρακτηριστικές παθολογίες των TSC είναι φλοιώδεις κόνδυλοι που περιέχουν μεγάλο αριθμό αστροκυττάρων και δυσμορφικούς νευρώνες [130] Για να καθιερωθούν ανθρώπινα μοντέλα TSC, τα φλοιώδη σφαιροειδή προήλθαν από hPSCs που έφεραν μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας στο TSC1 ή στο TSC2. Με ομόζυγες, αλλά όχι με ετερόζυγες, μεταλλάξεις στα TSC1 και TSC2, τα φλοιώδη σφαιροειδή εμφάνισαν ανώμαλη διαφοροποίηση και υπερτροφία των νευρώνων και της γλοίας λόγω της αποτυχίας στην καταστολή της σηματοδότησης mTORC1. [131] Μία κατάλληλη θεραπεία θα μπορούσε να είναι η πρόληψη καταστολή του mTORC1 για την πρόληψη ελαττωμάτων νευρωνικής διαφοροποίησης. Όμως, η υπερδραστηριότητα του mTORC1 μπορεί να επανεμφανιστεί και να επηρεάσει τα διαφοροποιημένα κύτταρα εάν απουσιάζει η παρατεταμένη αναστολή του mTORC1. Όπως η νευρογένεση, η γλοιογένεση εμπλέκεται κρίσιμα στην ανάπτυξη του TSC. Παρατηρήθηκε στα οργανοειδή του φλοιού ότι τα αστροκύτταρα TSC εμφάνισαν αυξημένο πολλαπλασιασμό και έκκριση περισσότερων παραγόντων που σχετίζονται με την σηματοδότηση EGF σε σύγκριση με τα controls. Αυτή η ανωμαλία θα μπορούσε να αποτελεί σημαντικό παράγοντα που προκαλεί αύξηση των ανασταλτικών συνάψεων και κατά συνέπεια, μεταβάλλει την συναπτική ισορροπία. [132] Έτσι, ο έλεγχος της γλοιογένεσης θα μπορούσε επίσης να είναι μια πιθανή στρατηγική στην θεραπεία του TSC.

Το σύνδρομο Down (DS) είναι μια σύνθετη γενετική κατάσταση που προκαλείται από τριπλασιασμό του χρωμοσώματος 21 (T21), που χαρακτηρίζεται από υποτροφία του εγκεφάλου και από διανοητική αναπηρία. Ο εγκέφαλος T21 έχει

[Πληκτρολογήστε εδώ]

εξασθενημένη νευρογένεση, μικρότερα ημισφαίρια του εγκεφάλου και σημαντικά μειωμένη παρεγκεφαλίδα. [133] Πολλά τριπλασιασμένα γονίδια όπως το DYRK1A, η πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (APP) και το OLIG1/2 έχουν επαληθευτεί ως κρίσιμοι καθοριστικοί παράγοντες του DS. Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις στο DYRK1A προκαλούν λιγότερη συναπτική πλαστικότητα [134], ήπια μαθησιακή δυσκολία, αλλά φυσιολογική περιφέρεια κεφαλής. [135] Ο τριπλασιασμός του γονιδίου APP στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 21 συνδέεται με νευροπαθολογία παρόμοια με την νόσο του Alzheimer (AD) σε ασθενείς με DS. Τα μοντέλα τρωκτικών και οι δισδιάστατες νευρωνικές καλλιέργειες ήταν απαραίτητα στην μοντελοποίηση DS. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να μην παρουσιάζουν ειδικούς για το DS φαινοτύπους. Για παράδειγμα, τα γονίδια OLIG είναι ζωτικής σημασίας για την παραγωγή GABA-εργικών νευρώνων, αλλά τα πρότυπα έκφρασης των OLIG1 και OLIG2 στον εμβρυϊκό κοιλιακό πρόσθιο εγκέφαλο ανθρώπου και ποντικού είναι διαφορετικά. [136] Χρησιμοποιώντας οργανοειδή ανθρώπινου εγκεφάλου που προέρχονται από iPSCs ασθενών με DS, διαπιστώθηκε ότι το οργανοειδές κοιλιακού πρόσθιου εγκεφάλου DS υπερπαρήγαγε προγονικούς OLIG2+ και κατά συνέπεια έδειξε υπερπαραγωγή ανασταλτικών ενδονευρώνων (GABA-εργικοί νευρώνες), σύμφωνα με την εξασθενημένη διεγερτική και ανασταλτική ισορροπία ασθενών. [137] Σε ένα σύστημα 2D διαφοροποίησης, οι ενδονευρώνες που προέρχονται από DS iPSCs έδειξαν λιγότερο περίπλοκη μορφολογία, αλλοιωμένη προδιαγραφή υποτύπου και μειωμένη ικανότητα μετανάστευσης. [138] Όσον αφορά την ανάπτυξη του ραχιαίου πρόσθιου εγκεφάλου, τα φλοιώδη οργανοειδή προήλθαν από iPSCs ατόμων T21. [139] Σημαντική μείωση στην νευρογένεση παρατηρήθηκε σε δείγματα DS, που αντιπροσωπεύεται από μειωμένο πολλαπλασιασμό και μειωμένη έκφραση των δεικτών στοιβάδας II και IV. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο μικρότερο μέγεθος των οργανοειδών DS. Είναι σημαντικό ότι η καταστολή της οδού DSCAM/PAK1 μέσω πολλαπλών προσεγγίσεων ήταν επαρκής για την αποκατάσταση των ελλειμμάτων στην νευρογένεση και την αύξηση του μεγέθους των οργανοειδών DS. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν δείξει δόσοεξαρτώμενες επιδράσεις των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων στο T21 μεταξύ ασθενών με DS. [140] Επί του παρόντος, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της σίγασης XIST, της διαμεσολάβησης TKNEO και της επεξεργασίας με την μεσολάβηση CRISPR/Cas9 για την διόρθωση των γονιδίων-στόχων. Θα είναι σημαντικό να ενσωματωθούν αυτές οι

[Πληκτρολογήστε εδώ]

τεχνολογίες στην μοντελοποίηση οργανοειδών εγκεφάλου για την διερεύνηση της αιτιολογίας του DS και για την διερεύνηση πιθανών θεραπευτικών μεθόδων. [115]

III. Μοντελοποίηση νευροεκφυλιστικών διαταραχών του εγκεφάλου χρησιμοποιώντας οργανοειδή

Νόσος Prion:

Όσο προχωράνε οι έρευνες στα ανθρώπινα εγκεφαλικά οργανοειδή, φαίνεται ότι θα μπορούσαν να αποδειχθούν πολύτιμα μοντέλα για νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Prion. Οι ασθένειες Prion είναι ένα φαινοτυπικά ποικίλο σύνολο διαταραχών που χαρακτηρίζονται από ανθεκτικές στην πρωτεάση πρωτεΐνες μη φυσιολογικού σχήματος, γνωστές ως Prions. [141] Ήδη έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε εγκεφαλικά οργανοειδή για τις Prions. Τα οργανοειδή που εκφράζουν φυσιολογική πρωτεΐνη Prion (PrPC) είναι ευαίσθητα στην μόλυνση από prion, όταν εκτίθενται στις ισομορφές της νόσου του PrP (PrPD). Αυτό αναγκάζει τα οργανοειδή να αναπτύξουν πτυχές της παθολογίας της νόσου prion, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής αδιάλυτων σε απορρυπαντικό, ανθεκτικών στην πρωτεάση και λανθασμένα διπλωμένων ειδών PrPD,, ικανών να προκαλέσουν την παραγωγή περισσότερων λανθασμένων ειδών. Σε μία απ' τις μελέτες τα εγκεφαλικά οργανοειδή παρήχθησαν από ινοβλάστες δότη που έφεραν την μετάλλαξη E200K, την πιο κοινή αιτία της ανθρώπινης οικογενούς ασθένειας prion ώστε να αξιολογηθεί εάν η παρουσία της μετάλλαξης αυτής εντός του γονιδίου prion είναι επαρκής για να προκαλέσει ασθένεια στον νευρωνικό ιστό. [142] Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε τα οργανοειδή εμβολιάστηκαν με δύο σποραδικούς υποτύπους prion της νόσου Creutzfeldt-Jakob ώστε να προσδιοριστεί εάν τα οργανοειδή θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αναπαραγωγή της μόλυνσης και της παθογένειας. Τα οργανοειδή έδειξαν πρόσληψη του μολυσματικού εμβολίου. Η μελέτη συνολικά έδειξε ότι τα εγκεφαλικά οργανοειδή μπορούν να μοντελοποιήσουν πτυχές της νόσου και έτσι να προσφέρουν ένα ισχυρό σύστημα για την διερεύνηση διαφορετικών παθολογιών του ανθρώπινου υποτύπου prion και την δοκιμή πιθανών θεραπευτικών. [143] Τα εγκεφαλικά οργανοειδή προσφέρουν μία επιπλέον διάσταση στην έρευνα του ανθρώπινου PrPD. Όπως συμβαίνει με όλα τα μοντέλα, δεν είναι χωρίς περιορισμούς. Ωστόσο, με την συνεχή

[Πληκτρολογήστε εδώ]

και ταχεία ανάπτυξη αυτής της τεχνολογίας, είναι μια πολλά υποσχόμενη προσθήκη στα διαθέσιμα μοντέλα *in vitro*, με μεγάλες δυνατότητες. [144]

Νόσος Alzheimer

Η νόσος του Alzheimer (AD) είναι μία προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσος χωρίς θεραπεία, που χαρακτηρίζεται από εξωκυτταρικές πλάκες αμυλοειδούς βήτα (Aβ), προβληματικούς ενδοκυτταρικούς φωσφορυλιωμένους μικροσωληνίσκους που συνδέονται με την πρωτεΐνη tau (p-Tau) και απώλεια μνήμης που σχετίζεται με την ηλικία. Πάνω από 50 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πιστεύεται ότι ζουν με AD ή άλλου τύπου άνοια. [145] Η AD μπορεί να ταξινομηθεί σε οικογενή AD (fAD) και σποραδική AD (sAD). Έχει γίνει μεγάλος αριθμός προσπαθειών για την ανάπτυξη φαρμάκων κατά της AD τις τελευταίες δεκαετίες. Ωστόσο, όλα τα προγράμματα ανάπτυξης φαρμάκων για θεραπείες τροποποίησης της νόσου έχουν αποτύχει. Πιθανοί λόγοι για το υψηλό ποσοστό αποτυχίας περιλαμβάνουν την ελλιπή κατανόηση της πολύπλοκης παθοφυσιολογίας της AD, ιδιαίτερα της sAD, και της διαφοράς ειδών μεταξύ ανθρώπων και ζωικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται σε προκλινικές μελέτες. [146] Επομένως, η ανάπτυξη ανθρώπινων κυτταρικών μοντέλων για την AD και ο εντοπισμός στόχων πέρα από την πλάκα αμυλοειδούς Aβ μπορεί να οδηγήσει σε πιο αποτελεσματική θεραπευτική ανάπτυξη. Τα hiPSCs έχουν χρησιμοποιηθεί για την μοντελοποίηση μιας ποικιλίας ανθρώπινων ασθενειών, λόγω της ανθρώπινης προέλευσης, της εύκολης απομόνωσης και της ικανότητάς τους να δημιουργούν κυτταρικούς τύπους σχετικούς με την ασθένεια. [147] Τα τρισδιάστατα οργανοειδή που προέρχονται από hiPSCs έχουν αναπτυχθεί για ποικίλες εφαρμογές λόγω της ομοιότητάς τους με την ενδογενή κυτταρική οργάνωση και την δομή οργάνων και είναι ιδιαίτερα χρήσιμα επειδή μας επιτρέπουν να μελετήσουμε φαινοτύπους της νόσου σε ένα κυτταρικό πλαίσιο που μιμείται την ανθρώπινη φυσιολογία και ανάπτυξη. [46 53] Πρόσφατα, τα οργανοειδή εγκεφάλου που προέρχονται από hiPSCs έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την μοντελοποίηση ανθρώπινων νευρολογικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης και της AD. [148] Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε, μοντελοποιήθηκε η sAD χρησιμοποιώντας τρισδιάστατα οργανοειδή εγκεφάλου που προήλθαν από hiPSCs. Επειδή η διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) είναι ένας πολύ γνωστός παράγοντας κινδύνου για

[Πληκτρολογήστε εδώ]

AD, τα οργανοειδή εγκεφάλου εκτέθηκαν σε ανθρώπινο ορό για να μιμηθούν τις συνέπειες της έκθεσης στον ορό μετά την διάσπαση του BBB. [149] Τα εκτεθειμένα στον ορό οργανοειδή ήταν σε θέση να ανακεφαλαιώσουν παθολογίες που μοιάζουν με AD, συμπεριλαμβανομένων των αυξημένων συσσωματωμάτων αμυλοειδούς βήτα (Aβ) και του επιπέδου πρωτεΐνης tau που σχετίζεται με φωσφορυλιωμένο μικροσωληνίσκο (p-Tau), συναπτική απώλεια και εξασθενημένο νευρικό δίκτυο.[150] Η έκθεση στον ορό αύξησε τα επίπεδα Aβ και p-Tau μέσω επαγωγής των επιπέδων β-σεκρετάσης 1(BACE) και Glycogen Synthase Kinase-3 Alpha/Beta (GSK3a/b), αντίστοιχα. Επιπλέον, η μονοκυτταρική μεταγραφική ανάλυση των εγκεφαλικών οργανοειδών αποκαλύπτει ότι η έκθεση στον ορό μείωσε την συναπτική λειτουργία τόσο στους νευρώνες όσο και στα αστροκύτταρα και προκάλεσε ανοσολογική απόκριση στα αστροκύτταρα. [151] Το μοντέλο οργανοειδών για την sAD που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη αυτή θα μπορούσε να προσφέρει μια ισχυρή πλατφόρμα τόσο για μηχανιστική μελέτη όσο και για θεραπευτική ανάπτυξη στο μέλλον.

Νόσος Parkinson's

Η νόσος Πάρκινσον (PD) είναι μια κοινή διαταραχή κίνησης που χαρακτηρίζεται από προοδευτικό εκφυλισμό των νευρώνων της ντοπαμίνης (DA) στην μέλαινα ουσία (SN) του μεσεγκεφάλου. Δεδομένου ότι η βασική παθολογία περιλαμβάνει έναν διακριτό τύπο κυττάρων καθώς και περιοχή του εγκεφάλου, η PD είναι ιδιαίτερα ελκυστική για θεραπείες που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα. [152] Τα ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hPSCs) έχουν την δυνατότητα να γίνουν μια ισχυρή πηγή κυττάρων στην αναγεννητική ιατρική. [153] Η πιο κρίσιμη πρόκληση στην εφαρμογή των hPSCs για την θεραπεία της PD ήταν από καιρό η διαφοροποίηση τους σε νευρώνες ντοπαμίνης τύπου μεσεγκεφάλου, τον νευρωνικό τύπο που επηρεάζεται στην PD. Τα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν σε πρώιμα στάδια, όμως, απέτυχαν στον ακριβή σχηματισμό διαφοροποιημένων νευρώνων του μεσεγκεφάλου (mDA). Η αναπτυξιακή προέλευση των νευρώνων mDA έχει βρεθεί στα γονίδια FOXA2+ / LMX1A+ της κοιλιακής μοίρας του μεσεγκεφάλου. [154] Με βάση την φυσιολογική ανάπτυξη νευρώνων mDA in vivo, μια σημαντική πρωτοποριακή μελέτη από τους Kriks et al. [155] εισήγαγε ένα χημικά καθορισμένο πρωτόκολλο, στο οποίο παράγονται αυθεντικοί νευρώνες mDA από hESCs της κοιλιακής μοίρας του

[Πληκτρολογήστε εδώ]

μεσεγκεφάλου. Επί του παρόντος, αρκετές ομάδες έχουν δημιουργήσει τα δικά του πρωτόκολλα τροποποιώντας την μέθοδο αυτή και έχουν δείξει θεραπευτικά αποτελέσματα μεταμοσχεύοντας κύτταρα που προέρχονται από hPSCs σε μοντέλα ζώων με PD. [156] Η πιο ενημερωμένη προκλινική μελέτη έδειξε ότι ο βαθμός ανάκαμψης στην νευρολογική βαθμολογία και η αυθόρμητη κίνηση των πιθήκων με PD που εμβολιάστηκαν με hiPSCs ήταν παρόμοια ή χαμηλότερη από αυτά που προκύπτουν μετά την χορήγηση φαρμάκου L-DOPA. [157] Ωστόσο, οι μελέτες για την βελτίωση της κυτταρικής θεραπευτικής αποτελεσματικότητας και ασφάλειας θα πρέπει να συνεχιστούν έως ότου επιτευχθεί πλήρης επιτυχία στην κλινική μετάβαση. Μερικά από τα ζητήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν για μια επιτυχημένη κλινική μετάφραση της θεραπείας PD με κύτταρα είναι πρώτον, η έκφραση ειδικών για τον μεσεγκέφαλο παραγόντων όπως τα FOXA2, LMX1A, NURR1, ENGRAILED-1 (EN1) στον διαφοροποιημένο νευρωνικό πληθυσμό mDA πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω. Οι παράγοντες αυτοί είναι κρίσιμοι για την επιβίωση, την λειτουργία και την διατήρηση των νευρώνων mDA. [158] Γι' αυτόν τον λόγο όλα τα πρόσφατα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν μετά τους Kriks et al. στοχεύουν στην έκφραση των παραγόντων αυτών. Η έκφραση τους, όμως, στους νευρώνες mDA είναι ασταθής και χάνεται εύκολα σε εχθρικά περιβάλλοντα, ειδικά μετά την μεταμόσχευση. [159] Ακόμα και στις πιο ενημερωμένες μεθόδους σημαντικά ποσοστά νευρώνων mDA στερούνται την έκφραση παραγόντων *in vitro* και ιδιαίτερα *in vivo* μετά την μεταμόσχευση. Οι νευρώνες mDA παράγονται από hPSCs χωρίς αστροκυτταρική διαφοροποίηση κι έτσι εγείρονται ανησυχίες σχετικά με την ωριμότητα και την λειτουργικότητα των νευρώνων απουσία νευροτροφικής υποστήριξης από την αστρογλοία. Οι ανθρώπινοι νευρώνες mDA με ωριμότητα και λειτουργίες ισοδύναμες με εκείνες του φυσιολογικού μεσεγκεφάλου των ενηλίκων είναι αναμφίβολα η καλύτερη κυτταρική πηγή για έλεγχο φαρμάκων και βιοδοκιμασίες για την ανάπτυξη θεραπείας PD. Επιπλέον, οι νευρώνες mDA που έχουν συμμοσχευθεί με αστροκύτταρα έχουν βελτιωμένα κυτταρικά θεραπευτικά αποτελέσματα. Στην μελέτη των Kim et al. [160] οργανοειδή του μεσεγκεφάλου παρήχθησαν από ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hPSCs) για θεραπεία της PD. Απ' τα οργανοειδή απομονώθηκαν νευρικά βλαστοκύτταρα/ πρόδρομα κύτταρα (Og-NSCs), επεκτάθηκαν σταθερά και διαφοροποιήθηκαν σε νευρώνες ντοπαμίνης mDA τύπου μεσεγκεφάλου και ένα αρκετά υψηλό ποσοστό εξέφρασε παράγοντες ειδικούς για τον μεσεγκέφαλο. Η ανάλυση μεταγραφώματος ενός κυττάρου που ακολουθήθηκε από δοκιμές *in vitro* έδειξε ότι η πλειονότητα των κυττάρων στις

[Πληκτρολογήστε εδώ]

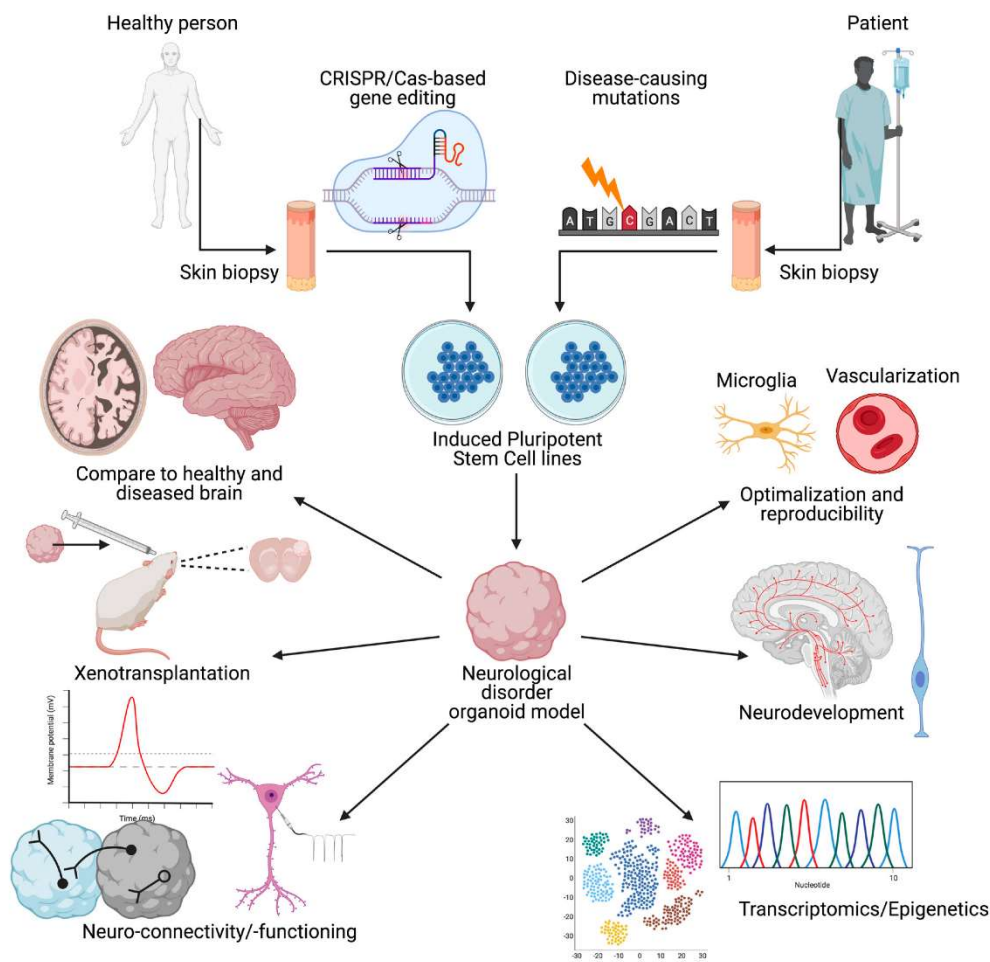
καλλιέργειες Og – NSCs έχουν μοτίβο κοιλιακής μοίρας μεσεγκεφάλου με χαμηλά επίπεδα κυτταρικής γήρανσης και μιτοχονδριακού στρες, σε σύγκριση με εκείνα που προέρχονται από περιβάλλοντα καλλιέργειας 2D. Συγκεκριμένα, σε αντίθεση με τις τρέχουσες μεθόδους που αποδίδουν νευρώνες mDA χωρίς διαφοροποίηση αστροκυττάρων, οι νευρώνες mDA που διαφοροποιήθηκαν από τα Og-NSCs διασκορπίστηκαν με αστροκύτταρα όπως στο φυσιολογικό εγκεφαλικό περιβάλλον και εμφάνισαν βελτιωμένη συναπτική ωριμότητα, λειτουργικότητα, αντίσταση σε τοξικές προσβολές και πιστές εκφράσεις των ειδικών για τον μεσεγκέφαλο παραγόντων, *in vitro* και *in vivo* πολύ μετά την μεταμόσχευση. Κατά συνέπεια, η μεταμόσχευση Og-NSCs απέδωσε ισχυρά θεραπευτικά αποτελέσματα που μπορούν να αναπαραχθούν σε πειραματόζωα – μοντέλα PD και οι παρατηρήσεις καταδεικνύουν ότι η μέθοδος που βασίζεται σε οργανοειδή μπορεί να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις του κλινικού πλαισίου της θεραπείας PD με κύτταρα.

Νόσος ALS

Η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) είναι μια θανατηφόρα νευροεκφυλιστική διαταραχή που προκαλείται από προοδευτική απώλεια κινητικών νευρώνων και δεν υπάρχει επί του παρόντος αποτελεσματική θεραπεία. Ο εσφαλμένος κυτταροπλασματικός εντοπισμός και η συσσωμάτωση της πρωτεΐνης που δεσμεύει το TAR DNA 43 kDa (TDP-43) εντός του ΚΝΣ είναι ένα παθολογικό χαρακτηριστικό σε σποραδική ALS και η διάδοση του θεωρείται ότι εμπλέκεται στην εξέλιξη της νόσου. Ωστόσο, η μετάδοση από κύτταρο σε κύτταρο του παθογόνου TDP-43 στο ανθρώπινο ΚΝΣ δεν έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά. [161] Οι Tamaki et al. [162] στην μελέτη που πραγματοποίησαν, χρησιμοποίησαν εγκεφαλικά οργανοειδή που προέρχονται από iPSCs ως μοντέλο ιστού του ΚΝΣ. Πραγματοποιήθηκε ένεση μεμονομένων εκχυλισμάτων πρωτεΐνης νωτιαίου μυελού από τρεις ασθενείς χωρίς ALS και πέντε ασθενείς με σποραδική ALS που περιέχουν το παθογόνο TDP-43 στα εγκεφαλικά οργανοειδή, με σκοπό να επικυρωθεί η διάδοση και εξάπλωση της παθολογίας TDP-43 στον ανθρώπινο ιστό του ΚΝΣ. Στο πρώτο στάδιο της μελέτης αποδείχθηκε ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων νωτιαίου μυελού από ασθενή με ALS προκάλεσε τον σχηματισμό της παθολογίας TDP-43 που προοδευτικά εξαπλώθηκε με χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο στα εγκεφαλικά οργανοειδή. Επιπλέον, η χορήγηση πρωτεϊνικών

[Πληκτρολογήστε εδώ]

εκχυλισμάτων που προέρχονται από ασθενείς με ALS προκάλεσε πολλαπλασιασμό αστροκυττάρων για να σχηματιστεί αστρογλοΐωση στα εγκεφαλικά οργανοειδή, αναπαράγοντας το παθολογικό χαρακτηριστικό που παρατηρείται στην ALS. Τέλος, αποδείχθηκε η παθογόνος κυτταρική απόπτωση που προκαλείται από το TDP-43 και ότι η παθολογία αυτή σχετίζεται με γονιδιωματική βλάβη λόγω θραύσεων διπλού κλώνου DNA. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι οι αναλύσεις με ανθρώπινα εγκεφαλικά οργανοειδή που αναπαράγουν την παθοφυσιολογία της ALS έχουν μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικές προσπάθειες ανακάλυψης φαρμάκων κατά της νόσου.



Εικόνα 6. Σχηματική επισκόπηση της δημιουργίας και των χρήσεων των οργανοειδών ως μοντέλα νευρολογικών διαταραχών. Επισκόπηση των διαφόρων αποτελεσμάτων της έρευνας που είναι διαθέσιμα σήμερα. (Jalink P, Caiazzo M. Brain Organoids: Filling the Need for a Human Model of Neurological Disorder. *Biology*. 2021; 10(8):740)

IV. Μοντελοποίηση νεοπλασιών του εγκεφάλου χρησιμοποιώντας οργανοειδή

Το γλοίωμα είναι ο πιο συχνός πρωτοπαθής όγκος του εγκεφάλου και η πρόγνωση του είναι κακή. Παρά την χειρουργική αφαίρεση, το γλοίωμα εξακολουθεί να είναι επιρρεπές σε υποτροπή καθώς αναπτύσσεται γρήγορα στον εγκέφαλο, είναι ανθεκτικό στην χημειοθεραπεία και είναι εξαιρετικά επιθετικό. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), τα γλοιώματα χωρίζονται σε καλά διαφοροποιημένα αστροκυτώματα χαμηλού βαθμού (WHO I-II), αναπλαστικά αστροκυτώματα (WHO III) και το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM, WHO IV). [163] Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα είναι ο πιο θανατηφόρος τύπος γλοιώματος. Τα μέσα ποσοστά επιβίωσης παρέμειναν σε μεγάλο βαθμό αμετάβλητα για 30 χρόνια, με ποσοστό 5ετούς επιβίωσης μικρότερο από 5%. [164] Ως εκ τούτου, υπάρχει μεγάλη ανάγκη για την εύρεση κατάλληλων μοντέλων για την μελέτη της δυναμικής των κυττάρων των γλοιομάτων προκειμένου να ανακαλυφθούν τα χαρακτηριστικά της νόσου και να αναπτυχθούν πιο αποτελεσματικές θεραπείες. Αν και τα δισδιάστατα μοντέλα κυττάρων και τα μοντέλα ζώων σε προηγούμενες μελέτες έχουν προσφέρει μεγάλη βοήθεια στην έρευνα, έχουν αρκετά ελαττώματα. Ιστορικά, οι καρκινικές κυτταρικές σειρές ήταν ένα εύχρηστο μοντέλο για την μελέτη της μοριακής βιολογίας του όγκου και τον έλεγχο φαρμάκων. Τα τελευταία χρόνια, πολλές κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, συμπεριλαμβανομένων των U87, U251 και T98G, έχουν καθιερωθεί για την μελέτη των μηχανισμών που σχετίζονται με την βιολογία του γλοιοβλαστώματος. [165] Ωστόσο, μετά από πολλά περάσματα στο πρότυπο μέσο που περιέχει ορό, η ανθρώπινη κυτταρική σειρά GBM έδειξε μεγάλο αριθμό γονοτυπικών και μεταγραφικών αλλαγών, οι οποίες εξαφάνισαν εντελώς την ομοιότητα με τον πρωτοπαθή όγκο. [166] Επιπλέον, όταν μεταμοσχεύονται σε γυμνά ποντίκια οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές GBM είναι συνήθως πιο ομοιογενείς απ' τους όγκους της πηγής τους, παρουσιάζοντας νέκρωση και μικροαγγειακές αλλαγές. [167] Συνοψίζοντας, αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν την κυτταρική σειρά GBM ένα ελαττωματικό μοντέλο για την μελέτη της εμφάνισης και ανάπτυξης του GBM. Οι ελλείψεις των μεθόδων δισδιάστατης κυτταρικής καλλιέργειας συνοψίζονται ως εξής: (1) έλλειψη αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρων γλοιώματος και μικροπεριβάλλοντος όγκου [168], (2) έλλειψη οξυγόνου, θρεπτικών ουσιών και διαβαθμίσεων pH [169], (3) έλλειψη φυσιολογικών εισροών από άλλα μεταβολικά ενεργά όργανα (όπως το ήπαρ, τα νεφρά κλπ) και (4) οι γονιδιωματικές αλλαγές μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια.

[Πληκτρολογήστε εδώ]

[170] Ως εκ τούτου, τα απλά πειράματα καλλιέργειας 2D κυτταρικής σειράς γίνονται όλο και λιγότερο αξιόπιστα.

Η εμφάνιση των εγκεφαλικών οργανοειδών παρέχει μια πολύ καλή πλατφόρμα για την έρευνα του γλοιώματος. Τα οργανοειδή γλοιώματος έχουν κυρίως τρεις τύπους. Πρώτον, τα οργανοειδή γλοιώματος που λαμβάνονται μέσω γονιδιακής επεξεργασίας εγκεφαλικών οργανοειδών. Η γονιδιακή επεξεργασία σε οργανοειδή ανθρώπινου εγκεφάλου κατέστησε δυνατή την μελέτη των πρώιμων σταδίων της ογκογένεσης και της εξέλιξης του καρκίνου. [171] Η γενετική μηχανική των ανθρώπινων εγκεφαλικών οργανοειδών είναι μια νέα τεχνολογία η οποία έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να δημιουργήσει *in vitro* μοντέλα γλοιώματος σε συνδυασμό με τις πιο κοινές κλινικές γονιδιακές μεταλλάξεις. Η γονιδιακή επεξεργασία των ανθρώπινων εγκεφαλικών οργανοειδών μπορεί να ανοίξει ένα νέο οπτικό πεδίο για την θεραπεία των γλοιωμάτων. Δεύτερον, τα οργανοειδή γλοιώματος τα οποία λαμβάνονται μέσω συγκαλλιέργειας εγκεφαλικών οργανοειδών και glioma stem cells (GSCs). Για την προσομοίωση της πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων γλοιώματος και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου *in vitro* έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές. Μεταξύ αυτών, η συγκαλλιέργεια GSCs με εγκεφαλικά οργανοειδή είναι η πιο ελπιδοφόρα. Συγκεκριμένα, η συγκαλλιέργεια μπορεί κάλλιστα να αντιπροσωπεύει παρόμοια μοντέλα ιστού στους ανθρώπους και έτσι να αποκτήσει μια εις βάθος κατανόηση της φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών. [172] Τρίτον, οργανοειδή γλοιώματος που λαμβάνονται μόνο από υλικό όγκου. Αυτό το είδος οργανοειδών διατηρεί την ετερογένεια του γονικού όγκου, του σχετικού 3D χωρικού ιστού και της βασικής αλληλεπίδρασης με την εξωκυτταρική μήτρα. [173] Όσον αφορά το υλικό όγκου, αυτό μπορεί να είναι καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs). Το 2016, ο Jeremy Rich και οι συνεργάτες του έλαβαν οργανοειδή γλοιοβλαστώματος για πρώτη φορά από λεπτοκομμένες βιοψίες όγκου τόσο ασθενών όσο και γενετικά τροποποιημένων μοντέλων ποντικών GB. [174] Το πλεονέκτημα τέτοιων οργανοειδών γλοιώματος είναι ότι μπορούν να μιμηθούν πιο αποτελεσματικά το μικροπεριβάλλον του όγκου. Έχει αποδειχθεί ότι παράγουν διαβαθμίσεις στην πυκνότητα των βλαστοκυττάρων και την υποξία. Εναλλακτικά τα οργανοειδή γλοιώματος μπορούν να ληφθούν από ιστό γλοιώματος. Το 2020, οι Jacob et al. χρησιμοποίησαν την τεχνολογία για να αναπτύξουν οργανοειδή γλοιώματος που προέρχονται από ιστό όγκου, τα οποία

[Πληκτρολογήστε εδώ]

μπορούν να διατηρήσουν την κυτταρική δομή και να διατηρήσουν διαφορετικές αλληλεπιδράσεις κυττάρου με κύτταρο. [175]

Απ' τις πιο σημαντικές εφαρμογές των οργανοειδών γλοιώματος είναι η χρήση τους για τεστ ευαισθησίας σε φάρμακα, για εξατομικευμένη θεραπεία καρκίνου καθώς και για την εξερεύνηση του γλοιώματος και του μικροπεριβάλλοντός του. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το οργανοειδές μπορεί να προέρχεται από ιστούς όγκου ασθενών και πολλές βιολογικές τράπεζες έχουν καθιερωθεί ώστε να μπορούν να αποτελούν πολύτιμα εργαλεία για τον έλεγχο των φαρμάκων. Επειδή το μοντέλο μεταμόσχευσης ανθρώπινου γλοιώματος σε ποντίκια είναι χρονοβόρο και σχετικά ακριβό, και μερικοί θεραπευτικοί στόχοι που υπάρχουν στον άνθρωπο απουσιάζουν από τα ζώα, γι' αυτούς τους λόγους η πρακτικότητα των ζωικών μοντέλων σε αξιολογήσεις ευαισθησίας των γλοιωμάτων στα φάρμακα μειώνεται σημαντικά. Τα οργανοειδή γλοιώματος που προέρχονται από το GBM, ειδικά αυτά που παράγονται από κύτταρα που προέρχονται από τον ασθενή, παρέχουν αποτελεσματική πλατφόρμα για τον έλεγχο φαρμάκων, γιατί ξεπερνούνται τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η βιοτράπεζα οργανοειδών γλοιώματος έχει τρία χαρακτηριστικά που την καθιστούν ελκυστική πλατφόρμα για δοκιμές φαρμάκων. Πρώτα απ' όλα, η ταχεία δημιουργία οργανοειδών γλοιώματος κάνει δυνατή την δοκιμή απόκρισης στο φάρμακο πριν από την κλινική θεραπεία, επιτυγχάνοντας έτσι μια πραγματικά εξατομικευμένη φαρμακευτική θεραπεία. Δεύτερον, μία περίληψη πολλών πτυχών της ετερογένειας του GBM σε ένα μεμονωμένο οργανοειδές γλοιώματος δείχνει ότι υπάρχει η δυνατότητα προσομοίωσης όλων των αντιδράσεων στα φάρμακα καλύτερα απ' τα παραδοσιακά μοντέλα. Τρίτον το μέγεθος και η ποικιλομορφία των οργανοειδών γλοιώματος σε μία βιοτράπεζα, καθώς και η σχετική ευκολία περαιτέρω επέκτασης ανοίγουν τον δρόμο για την κατανόηση της σχέσης μεταξύ των γονοτύπων των οργανοειδών γλοιώματος και των κυτταρικών καταστάσεων ως απάντηση στα φάρμακα. [176] Το 2020, οι Zhang LY et al. ανέφεραν ένα ολοκληρωμένο σύστημα με την δημιουργία, σε πραγματικό χρόνο, *ex vivo* τρισδιάστατων εγκεφαλικών οργανοειδών και *in vivo* όγκων ξενομοσχευμάτων με βάση το γλοίωμα που προέρχεται από ιστούς και κύτταρα ασθενή. Το σύστημα ανακεφαλαίωσε πιστά τα ιστολογικά χαρακτηριστικά, την ανταπόκριση σε φάρμακα χημειοθεραπείας, και την κλινική εξέλιξη των αντίστοιχων γονικών όγκων τους. Συμπερασματικά, ανέπτυξαν ένα ολοκληρωμένο σύστημα παράλληλων μοντέλων γλοιώματος που προέρχονται από

[Πληκτρολογήστε εδώ]

ασθενή, αποτελούμενο από εγκεφαλικά οργανοειδή και ξενομοσχεύματα, για την κατανόηση της βιολογίας του γλοιώματος και την πρόβλεψη απόκρισης στα φάρμακα χημειοθεραπείας. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε μία νέα στρατηγική για εξατομικευμένη θεραπεία για αυτή την θανατηφόρα ασθένεια. [177]

Τα οργανοειδή γλοιώματος δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για τεστ ευαισθησίας στα φάρμακα, αλλά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών. Γιατί με την εμφάνιση της τεχνολογίας στοχευμένου προσδιορισμού αλληλουχίας που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό γονιδιωματικών αλλαγών σε συνδυασμό με το γεγονός ότι καλλιέργειες οργανοειδών που προέρχονται από τον ασθενή μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πραγματικό χρόνο *in vitro* για δοκιμές φαρμάκων, η εξατομικευμένη θεραπεία έχει καταστεί δυνατή. Το 2020, ο Loong HH και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι χρησιμοποίησαν την τεχνολογία οργανοειδών για την παροχή εξατομικευμένης θεραπείας σε ασθενή. Εξήγαγαν Glioma stem cells (GSC's) από διεγχειρητικό ιστό ασθενή που υποβλήθηκε στην πρώτη χειρουργική επέμβαση, και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν τα οργανοειδή γλοιώματος. Έπειτα, βρέθηκε η αλληλουχία των δειγμάτων του ασθενή, η οποία παρέχει πληροφορίες για τα επόμενα υποψήφια φάρμακα. Μέσω της αλληλουχίας, οι συγγραφείς βρήκαν ότι υπήρχαν δύο μετατοπίσεις πλαισίου του NF1 σε όλα τα δείγματα, μαζί με ένα εξαιρετικά συνεπές προφίλ αλλαγών αριθμού αντιγράφων, κυρίως στα κοινής κλωνικής προέλευσης. Απώλεια αντιγράφου ετερόζυγου PTEN μαζί με μία άνευ νοήματος μετάλλαξη PTENW111* στον αρχικό όγκο υποδηλώνουν δι-αλληλική απώλεια της λειτουργίας PTEN που πιθανότατα προκάλεσε σηματοδότηση mTOR. Εν τω μεταξύ, η ενδοογκική ετερογένεια στην πρώτη κλινική παρουσίαση ήταν εμφανής λόγω της χαμηλής συχνότητας των μεταλλάξεων PIK3CAH1047Q που ανιχνεύθηκαν στον αρχικό όγκο αλλά εμπλουτίστηκαν σε υποτροπή. Μαζί, αυτές οι γενετικές ανωμαλίες υπογράμμισαν την ενεργοποίηση της οδού PI3K/AKT/mTOR. Στη συνέχεια, οι συγγραφείς εξέτασαν μια ομάδα υποψήφιων φαρμάκων για την πρόβλεψη της ευαισθησίας. Οι συγγραφείς βρήκαν ότι εμφανίστηκε αντοχή του ασθενούς στην Τεμοζολομίδη (TMZ). Έτσι, δοκίμασαν εναλλακτικά αντικαρκινικά φάρμακα εγκεκριμένα από τον FDA, τα οποία σχετίζονται είτε με απώλεια PTEN/PTENW111* όπως ο αναστολέας mTOR, everolimus, είτε με μετατόπιση πλαισίου NF1 όπως ο αναστολέας MEK, cobimetinib. Μετά την μελέτη των φαρμάκων στο οργανοειδές του ασθενή και την εύρεση του κατάλληλου, ο ασθενής υποβλήθηκε στο αντίστοιχο φάρμακο και η απεικόνιση επαναξιολόγησε μετά από τέσσερις

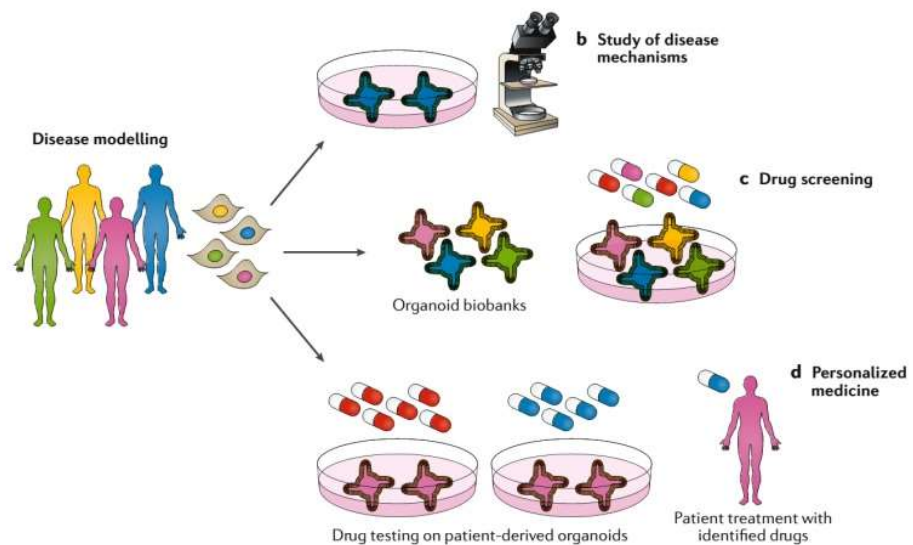
[Πληκτρολογήστε εδώ]

εβδομάδες θεραπείας έδειξε ότι ο υπολειπόμενος ενισχυτικός όγκος ήταν λιγότερο ογκώδης. Ως εκ τούτου, η ουσία της εξατομικευμένης θεραπείας είναι να υπάρχουν τα ακριβή δεδομένα του όγκου ώστε να εντοπίζονται και να στοχεύονται οι γονιδιωματικές και μοριακές ανωμαλίες του ατόμου και να παρέχονται οι κατάλληλες θεραπείες. Σε σύγκριση με τα παραδοσιακά μοντέλα καλλιεργούμενων καρκινικών κυτταρικών σειρών, το πλεονέκτημα του οργανοειδούς είναι ότι μπορεί να συνοψίσει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα μοριακά χαρακτηριστικά και την βιολογία της νόσου. [178]

Ο καρκίνος δεν είναι μια αυτόνομη κυτταρική ασθένεια, αλλά μια ασθένεια στην οποία τα καρκινικά κύτταρα συνδέονται στενά με τη βιολογία των κυττάρων-ξενιστών. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για το GBM, το οποίο δεν δίνει μεταστάσεις, αλλά τα κύτταρα εξαπλώνονται και τελικά ο ασθενής σκοτώνεται λόγω εξάπλωσης και διόγκωσης στο φυσιολογικό περιβάλλοντα εγκεφαλικό ιστό. Ως εκ τούτου, η εξερεύνηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου διαδραματίζει βασικό ρόλο, μελετώντας την ετερογένεια, την πλαστικότητα και την εξέλιξη των γλοιωμάτων. Τα Cancer stem cells (CSC's) του γλοιώματος όχι μόνο μπορούν να ανανεωθούν, να πολλαπλασιαστούν και να διαχωριστούν σε διαφορετικά καρκινικά κύτταρα, αλλά και να αλληλεπιδρούν με διαφορετικά συστατικά του όγκου όπως την εξωκυτταρική μήτρα, τους μεσοκυττάριους παράγοντες (ινοβλάστες που σχετίζονται με όγκους, ανοσοκύτταρα, διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα, κ.λπ.) ακόμη και με τον αιμοατοεγκεφαλικό φραγμό (Blood-Brain Barrier, BBB) μέσω περικυττάρων που προέρχονται από όγκο. Ως εκ τούτου, η μελέτη του μικροπεριβάλλοντος του όγκου είναι ιδιαίτερα σημαντική. Ωστόσο, η παραδοσιακή δισδιάστατη καλλιέργεια δεν μπορεί να προσομοιάσει την αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου και μικροπεριβάλλον όγκου. Αν και το μοντέλο ξеноμεταμόσχευσης ποντικού από ασθενή λύνει το πρόβλημα της αλληλεπίδρασης, το μοντέλο δεν είναι τέλειο λόγω σημαντικών διαφορών των ειδών στη νευροανατομία (π.χ., υπο-ανάπτυκτος νεοφλοιός στο ποντίκι) και σε κυτταρικό επίπεδο (π.χ. αστροκυτταρική και δενδριτική πολυπλοκότητα και ταχύτητα μετάδοσης του ασβεστίου παροδικά σε αστροκύτταρα του ποντικού έναντι του ανθρώπου). Το μοντέλο οργανοειδές γλοιώματος αντιμετωπίζει πολλούς από τους περιορισμούς των προηγούμενων μοντέλων επειδή επιτρέπει στους ανθρώπους να κάνουν μελέτες ειδικές για τον ασθενή GBM in vitro σε ένα μικροπεριβάλλον παρόμοιο με τον ανθρώπινο εγκέφαλο. Βιολογική συμπεριφορά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του GBM που εντοπίζονται σε εγκεφαλικά οργανοειδή που προέρχονται από ασθενείς σχετίζονται στενά με χειρουργικά και νεκροτομικά

[Πληκτρολογήστε εδώ]

δείγματα, γεγονός που αποδεικνύει την κλινική συσχέτιση αυτού του μοντέλου. Αυτό επιβεβαιώνεται περαιτέρω και από την διατήρηση της ενίσχυσης του ειδικού για τον ασθενή EGFR καθώς και των φωσφορυλιωμένων σημάτων RTK στα οργανοειδή γλοιώματος, όπως και απ' τον αυθόρμητο σχηματισμό μικροσωληνίσκων και τα χαρακτηριστικά μικροδομής που βρέθηκαν επίσης in situ. [176]



Εικόνα 7. Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τις βασικές εφαρμογές των οργανοειδών στην μοντελοποίηση ασθενειών, τον έλεγχο φαρμάκων και συνολικά της εξατομικευμένης ιατρικής. (Rossi G, Manfredin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research. Nat Rev Genet. 2018 Nov;19(11):671-687)

2.Γ. Περιορισμοί & προβλήματα στην χρήση των οργανοειδών νευρικού συστήματος

Τα εγκεφαλικά οργανοειδή είναι μια συναρπαστική νέα τεχνολογία με την δυνατότητα να αλλάξει σημαντικά τον τρόπο με τον οποίο κατανοούνται και αντιμετωπίζονται οι ασθένειες του εγκεφάλου. Αυτά τα αυτοσυναρμολογούμενα τρισδιάστατα συσσωματώματα με τύπους και δομές κυττάρων που μοιάζουν με τον εγκέφαλο έχουν αναδειχθεί ως νέα μοντέλα συστημάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διερεύνηση της ανθρώπινης νευροανάπτυξης και των νευρολογικών διαταραχών. Ωστόσο, τα οργανοειδή δεν είναι τόσο ώριμα και λειτουργικά όσο οι πραγματικοί ανθρώπινοι εγκέφαλοι λόγω περιορισμών του συστήματος καλλιέργειας με ανεπαρκή αναπτυξιακά σήματα και έλλειψη συστατικών που είναι σημαντικά για την ανάπτυξη και την λειτουργία του εγκεφάλου, όπως ο μη νευρικός πληθυσμός και τα αγγεία. Η απουσία αγγείωσης καθιστά δύσκολη την τροφοδοσία των κεντρικών στιβάδων του οργανοειδούς. Συνεπώς, η δημιουργία του επιθυμητού περιβάλλοντος που μοιάζει με τον εγκέφαλο και η παρακολούθηση των πολύπλοκων νευρωνικών δικτύων και των φυσιολογικών λειτουργιών των οργανοειδών του εγκεφάλου παραμένουν προκλήσεις. Ακόμα, τα τρέχοντα πρωτόκολλα για την δημιουργία εγκεφαλικών οργανοειδών έχουν προβλήματα με την ετερογένεια και την διακύμανση κατά παρτίδες λόγω της αυθόρμητης αυτοοργάνωσής τους σε πολύπλοκες αρχιτεκτονικές του εγκεφάλου. [179]

Όσον αφορά την ωρίμανση των εγκεφαλικών οργανοειδών, φαίνεται να είναι ακόμα πολύ χαμηλή. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ωριμότητα των εγκεφαλικών οργανοειδών που παράγονται *in vitro* είναι ισοδύναμη με αυτή του εγκεφάλου στις 8-10 εβδομάδες κύησης [180]. Ωστόσο, κάποιες ασθένειες του εγκεφάλου όπως τα γλοιώματα εμφανίζονται συνήθως στον εγκέφαλο των ενηλίκων. Ο Goranci-BuzhalaG και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι τα βλαστοκύτταρα του γλοιώματος εισβάλουν καλύτερα στον ώριμο εγκέφαλο. Αναλυτικά, οι Goranci-BuzhalaG et al. συγκρίνοντας τις ενσωματώσεις των GSC's που συμβαίνουν σε οργανοειδή ηλικίας 20, 40 και 60 ημερών αποκάλυψαν ότι η συμπεριφορά ενσωμάτωσης των GSC's που προέρχονται από ασθενείς συσχετίζεται με την ηλικία των οργανοειδών. Αυτό συμβαίνει επειδή τα ώριμα οργανοειδή θα μπορούσαν να παρέχουν κατάλληλους μικροπεριβαλλοντικούς καθοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη GSC's, μια πτυχή που συνάδει με το

[Πληκτρολογήστε εδώ]

γεγονός ότι η νευρωνική δραστηριότητα δημιουργεί μιτογόνους παράγοντες που προάγουν την ανάπτυξη του γλοιώματος. Επομένως, υποψιάζονταν ότι η σχετικά αργή ενσωμάτωση των GSC's σε οργανοειδή ηλικίας 20 ημερών μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη επαρκών μιτογόνων παραγόντων που εκκρίνονται από νευρώνες. Πράγματι, εξωγενείς συμπληρωματικοί μιτογόνοι παράγοντες Neuroigin σε οργανοειδή ηλικίας 3 έως 20 ημερών προώθησαν την ενσωμάτωση των GSC's. Παραδόξως, ο Liu SJ και οι συνάδελφοί του δημιούργησαν «ώριμα» οργανοειδή ανθρώπινου εγκεφάλου τα οποία αντικατοπτρίζουν στενά τη διαφοροποιημένη κυτταρική κατάσταση του μεταγεννητικού ανθρώπινου εγκεφάλου [181].

Το μικρό μέγεθος των σημερινών οργανοειδών παραμένει ο θεμελιώδης περιοριστικός παράγοντας που μας απαγορεύει να τα χρησιμοποιούμε για να ανακεφαλαιώσουμε πλήρως τα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του ανθρώπινου εγκεφάλου. Το βιώσιμο πάχος των οργανοειδών περιορίζεται από τη φυσική απόσταση στην οποία το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά μπορούν να διαχέονται από την επιφάνεια, η οποία είναι συνήθως μικρότερη από 400 μm [182]. Επειδή τα NPC's με υψηλές μεταβολικές απαιτήσεις εντοπίζονται συχνά στο πιο εσωτερικό μέρος των δομών του φλοιού, είναι τα πρώτα που υποκύπτουν στο όριο διάχυσης και η νευρογένεση δεν μπορεί να διατηρηθεί σε μακροχρόνιες οργανοειδείς καλλιέργειες. Ο σχηματισμός ενός οργανοειδούς εγκεφάλου με έξι διακριτά στρώματα και φλοιώδη αναδίπλωση είναι επομένως ακόμα απρόσιτος. Οι μέθοδοι για τη δημιουργία ενός καταλληλότερου περιβάλλοντος για αυτήν την κατάσταση περιλαμβάνουν τη χρήση περιστρεφόμενων βιοαντιδραστηρίων ή τροχιακών αναδευτήρων για την ενίσχυση της διάχυσης και την παροχή υψηλότερης συγκέντρωσης οξυγόνου στον επωαστήρα. [183]

Τα τρέχοντα οργανοειδή παρασκευάσματα στερούνται επίσης αγγειακών κυττάρων και, παρόλο που τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να ενσωματωθούν εξωγενώς σε οργανοειδή εγκεφάλου, αυτό από μόνο του είναι ανεπαρκές για τη βελτίωση της μακροχρόνιας καλλιέργειας καθώς το πρωτόγονο ενδοθηλιακό δίκτυο που σχηματίζεται δεν είναι λειτουργικό. Οι μελλοντικές εργασίες για την ενσωμάτωση βιοϋλικών και μικρορευστικών συστημάτων θα μπορούσαν επομένως να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία αγγειακών δικτύων με αιμάτωση για την παροχή στο οργανοειδές εσωτερικό με επαρκές οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Η μεταμόσχευση οργανοειδών σε ζώα, επιτρέποντας στο αγγείο του ξενιστή να αναπτυχθεί στο οργανοειδές μόσχευμα, έχει επίσης αποδειχθεί μια πολλά υποσχόμενη

[Πληκτρολογήστε εδώ]

προσέγγιση για την προώθηση της βιωσιμότητας και της ωρίμανσης των οργανοειδών.
[184]

Το γεγονός ότι τα οργανοειδή του εγκεφάλου μιμούνται δυναμικά τη χρονική εξέλιξη της ανάπτυξης του ανθρώπινου εγκεφάλου αποτελεί πλεονέκτημα και μειονέκτημα για τους ερευνητές. Από τη μια πλευρά, τα οργανοειδή του εγκεφάλου διαφορετικών ηλικιών ανακεφαλαιώνουν τα *in vivo* αντίστοιχά τους, προσφέροντας στους ερευνητές μια ευέλικτη πλατφόρμα για την ανίχνευση διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Από την άλλη πλευρά, από πρακτική άποψη, τα οργανοειδή του εγκεφάλου χρειάζονται πολύ χρόνο για να αναπτυχθούν και να ωριμάσουν, αυξάνοντας το κόστος και εμποδίζοντας την αποτελεσματικότητα των πειραμάτων. Πρέπει επομένως να διερευνηθούν μέθοδοι για την επιτάχυνση της διαδικασίας ωρίμανσης. Για παράδειγμα, η χρήση των αναστολέων NOTCH είναι πολύ αποτελεσματική στην επιτάχυνση της νευρωνικής διαφοροποίησης *in vitro* και θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε οργανοειδή του εγκεφάλου. Αλλά αυτό θέτει ένα δίλημμα επειδή ένας τέτοιος χειρισμός θα μπορούσε να επηρεάσει το εγγενές πρόγραμμα της νευρικής διαφοροποίησης, καθιστώντας τα προκύπτοντα οργανοειδή να μην είναι πλέον αντιπροσωπευτικά των *in vivo* ομολόγων τους. [185] Επιπλέον, για να μοντελοποιηθούν πιστά οι εξαρτώμενες από την ηλικία νευροεκφυλιστικές ασθένειες απαιτείται η πρόκληση γήρανσης σε οργανοειδή με φαρμακολογικές ή γενετικές μεθόδους. Μια τέτοια στρατηγική για την πρόκληση χαρακτηριστικών που σχετίζονται με τη γήρανση σε ανθρώπινα οργανοειδή που προέρχονται από iPSC's, που χρησιμοποιούνται για τη μοντελοποίηση της ασθένειας Parkinson's, περιλαμβάνει την έκφραση της προγερίνης, μιας κολοβωμένης μορφής λαμίνης A που σχετίζεται με την πρόωρη γήρανση. [186] Η βράχυνση των τελομερών που προκαλείται μέσω μείωσης της ρύθμισης της τελομεράσης έχει επίσης αποδειχθεί ότι οδηγεί σε φαινότυπους που σχετίζονται με την ηλικία και με την ασθένεια ανθρώπινων νευρώνων που προέρχονται από iPSC's. [51] Ωστόσο, παραμένει να καθοριστεί εάν αυτά τα «προκαλούμενα» συμβάντα γήρανσης αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια τη διαδικασία γήρανσης που συμβαίνει φυσικά *in vivo*.

Εκτός από τις τεχνικές βελτιώσεις στην δημιουργία και την κατανόηση εγκεφαλικών οργανοειδών, υπάρχουν ζητήματα που σχετίζονται με την κλινική εφαρμογή αυτών των οντοτήτων και απαιτούν προσεκτική εξέταση. Το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την δημιουργία κυττάρων iPSCs και εγκεφαλικών

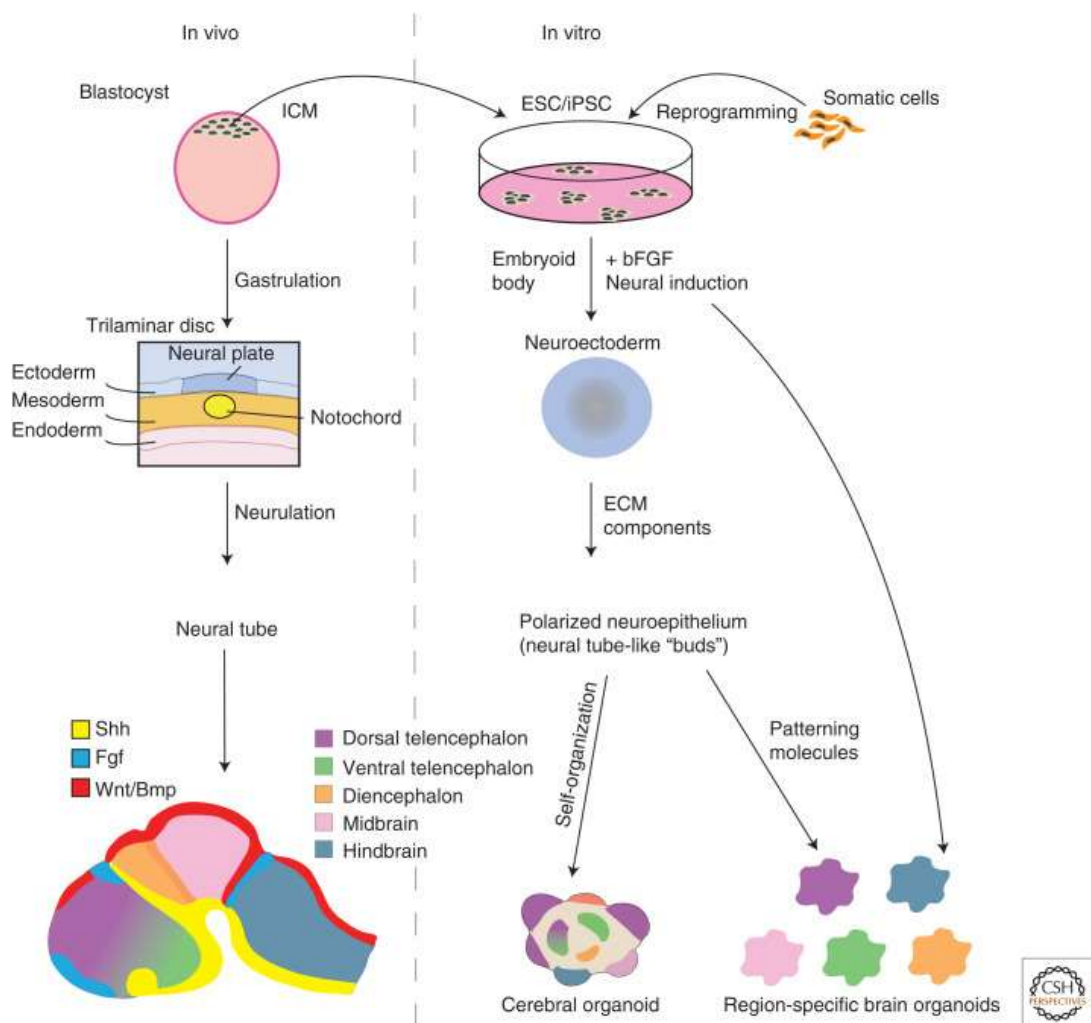
[Πληκτρολογήστε εδώ]

οργανοειδών ειδικά για τον ασθενή αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην πρακτική χρήση τους τόσο για την μοντελοποίηση του εγκεφάλου όσο και για την θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Μια εναλλακτική λύση θα μπορούσε να είναι η δημιουργία τραπεζών οργανοειδών για συγκεκριμένα γενετικά προφίλ ασθενών, ανοσολογικούς φαινοτύπους και τύπους ασθενειών. Επιπρόσθετα, το πολύπλοκο μικροπεριβάλλον των εγκεφαλικών οργανοειδών μπορεί να τα προδιαθέτει σε γενετική, επιγενετική και φαινοτυπική μετατόπιση με την πάροδο του χρόνου, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει την ικανότητά τους να μοντελοποιούν αποτελεσματικά εγκεφαλικές διαταραχές. Τέλος, υπάρχουν πιθανοί κίνδυνοι από την χρήση εγκεφαλικών οργανοειδών για την θεραπεία του εγκεφάλου, οι οποίοι επικαλύπτονται με ανησυχίες που σχετίζονται με τις θεραπείες που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα γενικά. Ακόμα και τα κύτταρα iPSCs που προέρχονται από τον ασθενή θα μπορούσαν να προκαλέσουν μια ανοσολογική αντίδραση. [187] Ο ογκογόνος μετασχηματισμός των μεταμοσχευμένων προγονικών κυττάρων παραμένει ανησυχητικός και η υπερβολικά πληθωρική οργανοειδής ανάπτυξη που δεν είναι νεοπλασματική θα μπορούσε, επίσης, να προκαλέσει νευρολογικά προβλήματα. Τα μεταμοσχευμένα οργανοειδή θα μπορούσαν να προκαλέσουν ανεπιθύμητα λειτουργικά αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένης της δραστηριότητας επιληπτικών κρίσεων.

Η δημιουργία οργανοειδών ανθρώπινου εγκεφάλου πυροδότησε και ηθικές συζητήσεις για μια σειρά θεμάτων. [188] Υπάρχουν τρεις γενικοί τομείς συζήτησης. Ο πρώτος αφορά την ηθική κατάσταση και την ευημερία των ίδιων των οργανοειδών. Λόγω της ανθρώπινης προέλευσης και της εγκεφαλικής αρχιτεκτονικής τους, τα οργανοειδή του εγκεφάλου θεωρητικά έχουν την δυνατότητα να επιτύχουν πιο προηγμένες εγκεφαλικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της αισθητηριακής αντίληψης (π.χ. πόνος) και ίσως της συνείδησης. Η πιθανότητα τα σημερινά εγκεφαλικά οργανοειδή να έχουν συνείδηση είναι ελάχιστη δεδομένου του μικρού μεγέθους και της πρωτόγονης φύσης τους. Ωστόσο, καθώς το μέγεθος και η πολυπλοκότητα τους αυξάνονται, οι σχετικές ερωτήσεις περιλαμβάνουν τον καθορισμό ευαίσθητων μεθόδων για την αξιολόγηση πιθανής αίσθησης και τον προσδιορισμό της ανάγκης προστασίας αυτών των πιο προηγμένων οργανοειδών με τρόπους παρόμοιους με τα πειραματόζωα. [189] Δεύτερον, η μεταμόσχευση οργανοειδών ανθρώπινου εγκεφάλου σε ξενιστές ζώων θα δημιουργήσει ένα φάσμα από χίμαιρες ανθρώπου – ζώου. Ενώ οι χίμαιρες έχουν γίνει συνηθισμένες στην βιοϊατρική έρευνα, οι χίμαιρες εγκεφάλου μπορεί να απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή.

[Πληκτρολογήστε εδώ]

Τέλος, υπάρχουν ζητήματα που σχετίζονται με την συγκατάθεση και την ιδιοκτησία. Όταν οι δότες δωρίζουν τα κύτταρα τους για την δημιουργία σειρών iPSCs θα πρέπει να έχουν ενημερωθεί για την δημιουργία εγκεφαλικών οργανοειδών από αυτές τις σειρές; Θα μπορούσαν να ζητήσουν συγκεκριμένα να μην δημιουργηθούν εγκεφαλικά οργανοειδή; Καθώς τα οργανοειδή του εγκεφάλου γίνονται πιο περίπλοκα, το ερώτημα «ποιος ελέγχει την μοίρα αυτών των οντοτήτων» (π.χ. ο ερευνητής, το υποκείμενο της πηγής ή ίσως το κράτος) μπορεί επίσης να γίνει πιο αμφιλεγόμενο. Οι περαιτέρω συζητήσεις αυτών των θεμάτων θα πρέπει να περιλαμβάνουν όλους τους σχετικούς ενδιαφερόμενους φορείς και να βασίζονται σε κατάλληλα καθορισμένα επιστημονικά πλαίσια και ηθικές αρχές. [190, 191]



Εικόνα 8. Σύγκριση μεταξύ της *in vivo* και *in vitro* ανάπτυξης εγκεφάλου. (Benito-Kwiecinski S, Lancaster MA. Brain Organoids: Human Neurodevelopment in a Dish. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2020 Aug 3;12(8):a035709)

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ταχέως εξελισσόμενος τομέας της βιολογίας των βλαστοκυττάρων παρέχει συνεχώς νέες γνώσεις σχετικά με τη βασική βιολογία και τις ανθρώπινες διαταραχές και οδηγεί στην καινοτομία για νέες θεραπείες. Τα ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hPSC's), συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (hESC's) και των ανθρώπινων επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (hiPSC's), έχουν αναδειχθεί ανεκτίμητα εργαλεία για τη μοντελοποίηση ανθρώπινων διαταραχών, ειδικά εκείνων με πολύπλοκη γενετική προέλευση που είναι δύσκολο να μοντελοποιηθούν σε ζώα. Κάτω από συγκεκριμένους παράγοντες και ευνοϊκές συνθήκες, τα hPSC's έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρου ή ιστού βρίσκεται στο ανθρώπινο σώμα. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία οργανοειδών, τρισδιάστατων (3D) καλλιέργειών ιστού που περιέχουν πολλαπλούς τύπους κυττάρων και αποτελούν προσβάσιμα συστήματα για τη μοντελοποίηση της οργανογένεσης και των αναπτυξιακών διαταραχών.

Τα νευρικά βλαστοκύτταρα (NSCs) βρίσκονται σε διάφορα μέρη του νευρικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού και άλλων νευρικών ιστών. Είναι εξειδικευμένα κύτταρα που μπορούν να διαιρεθούν και να διαφοροποιηθούν σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων του νευρικού συστήματος.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές μελέτες για τα NSCs και τις δυνατότητές τους στην θεραπεία αρκετών νευρολογικών διαταραχών, όπως η νόσος του Πάρκινσον, η σκλήρυνση κατά πλάκας, η νόσος Alzheimer κ.α. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες έως ότου αυτές οι θεραπείες γίνουν ευρέως διαθέσιμες, καθώς τα βλαστοκύτταρα για να είναι χρήσιμα στην θεραπεία θα πρέπει να μετατραπούν στους επιθυμητούς τύπους κυττάρων. Στην διαδικασία της διαφοροποίησης σημαντικό ρόλο παίζει το εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον. Για αυτό τον σκοπό χρησιμοποιούνται αυξητικοί παράγοντες ή άλλα μόρια ώστε να επάγουν την μετατροπή των βλαστοκυττάρων σε κατάλληλα προγονικά κύτταρα, τα οποία στην συνέχεια θα δημιουργήσουν τον επιθυμητό τύπο κυττάρου.

Οι πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνολογία 3D καλλιέργειας επιτρέπουν σε εμβρυϊκά και ενήλικα βλαστοκύτταρα να επιδεικνύουν αξιοσημείωτες

[Πληκτρολογήστε εδώ]

αυτοοργανωτικές ιδιότητες και να προκύπτουν οργανοειδή που αντικατοπτρίζουν βασικές δομικές και λειτουργικές ιδιότητες οργάνων. Η τεχνολογία των οργανοειδών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μοντελοποίηση της ανάπτυξης ανθρώπινων οργάνων και διαφόρων ανθρώπινων παθολογιών σε «ένα τρυβλίο».

Τα οργανοειδή του εγκεφάλου είναι οργανοειδή που προέρχονται από hPSC's, τα οποία αυτοσυναρμολογούνται για να σχηματίσουν μια οργανωμένη αρχιτεκτονική, που αποτελείται από προγονικούς νευρωνικούς και νευρογλοιακούς τύπους κυττάρων και μοιάζει με τον ανθρώπινο εγκέφαλο του εμβρύου. Σε αντίθεση με τις συμβατικές δισδιάστατες (2D) κυτταροκαλλιέργειες, τα οργανοειδή του εγκεφάλου ανακεφαλαιώνουν τον ανθρώπινο εγκέφαλο όχι μόνο σε κυτταρικό επίπεδο, αλλά και ως προς τη γενική δομή των ιστών και την αναπτυξιακή τροχιά, παρέχοντας επομένως μια μοναδική ευκαιρία για τη μοντελοποίηση της ανάπτυξης και λειτουργίας του ανθρώπινου εγκεφάλου. Σε συνδυασμό με τις πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις, όπως τα hiPSC's που προέρχονται από ασθενείς, την γενετική μηχανική, την γονιδιωματική επεξεργασία, την επιγενετική κ.α., τα οργανοειδή του εγκεφάλου έφεραν επανάσταση στις εργαλειοθήκες μας για τη διερεύνηση της ανάπτυξης, των ασθενειών και της εξέλιξης του ανθρώπινου εγκεφάλου.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει τεράστιες ανακαλύψεις στις τεχνολογίες οργανοειδών του εγκεφάλου. Αν και αυτά τα εγκεφαλικά οργανοειδή ανακεφαλαιώνουν πιστά μια σειρά από βασικά χαρακτηριστικά του ανθρώπινου εγκεφάλου, δεν είναι τέλειο αντίγραφο και η υπέρβαση των σημερινών περιορισμών στην δημιουργία «καλύτερων» οργανοειδών θα επεκτείνει σημαντικά την ικανότητά μας να ερευνούμε την ανάπτυξη και τις διαταραχές του ανθρώπινου εγκεφάλου. Ο ορισμός των «καλύτερων» οργανοειδών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με συγκεκριμένες εφαρμογές, αλλά το σημείο αναφοράς είναι να δημιουργηθούν οργανοειδή που ανακεφαλαιώνουν πιο πιστά τα χαρακτηριστικά του ανθρώπινου εγκεφάλου. Επομένως, ο συστηματικός χαρακτηρισμός του ανθρώπινου εμβρυϊκού και μεταγεννητικού εγκεφαλικού ιστού είναι θεμελιώδης. Παρά τη δυσκολία στη συλλογή δειγμάτων ανθρώπινου εγκεφάλου με σταθερή ποιότητα, οι αναλύσεις αυτών των δειγμάτων συνέχισαν να διευρύνουν τις γνώσεις μας για τους υγιείς και ασθενείς ανθρώπινους εγκεφάλους. Είναι αξιοσημείωτο ότι το μεγάλου κλίμακας μεταγραφικό προφίλ ενός κυττάρου έχει οδηγήσει σε άνευ προηγουμένου ανάλυση, αποκαλύπτοντας την έκταση της κυτταρικής ποικιλομορφίας και τις μοριακές ταυτότητες του εμβρυϊκού

[Πληκτρολογήστε εδώ]

ανθρώπινου εγκεφάλου. Το ινστιτούτο Allen, για την Επιστήμη του Εγκεφάλου, καθιέρωσε ένα ολοκληρωμένο άτλαντα ανθρώπινου εγκεφάλου που θα περιέχει δεδομένα ανοσοϊστολογίας, *in situ* υβριδισμού και μεταγραφομικής και θα προσφέρει μια ανεκτίμητη πηγή για την τεχνολογία των οργανοειδών. [51]

Η εισαγωγή συντηγμένων οργανοειδών ή συστημάτων «συναρμολογοειδών» παρέχει μια διαδρομή προς μια προσέγγιση αρθρωτού σχεδιασμού για τη διερεύνηση της ενδοεγκεφαλικής περιφέρειας και της ενδοοργανικής επικοινωνίας. Η συναρμολόγηση φλοιωδών οργανοειδών και οργανοειδών με υποφλοιώδεις ταυτότητες, όπως ο θάλαμος, μπορεί να προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την ανάπτυξη φλοιοφυγόκεντρων προβολών των νευρώνων του φλοιού βαθιάς στιβάδας. [192] Είναι εφικτά πιο πολύπλοκα συναρμολογοειδή συστήματα που αποτελούνται από τρεις ή περισσότερες περιοχές του εγκεφάλου και ο απώτερος στόχος είναι η συναρμολόγηση ενός οργανοειδούς ολόκληρου του εγκεφάλου για ολοκληρωμένη μοντελοποίηση της ανάπτυξης και της λειτουργίας του εγκεφάλου. Ο συνδυασμός οργανοειδών από διαφορετικούς τύπους ιστών θα μπορούσε επίσης να συλλάβει τη διεπαφή μεταξύ του νευρικού συστήματος και άλλων οργάνων. Αυτό συμβαίνει με τα πρόσφατα αναφερθέντα εντερικά οργανοειδή που προέρχονται από hPSC's που περιέχουν κύτταρα νευρικής ακρολοφίας, τα οποία αυτοοργανώνονται για να μοιάζουν με το εντερικό νευρικό σύστημα και παράγουν ρυθμικά κύματα για να ρυθμίσουν τη συστολή των οργανοειδών. [193]

Επιπλέον, ο χειρισμός ογκογονιδίων χρησιμοποιώντας CRISPR/Cas9 μπορεί να εφαρμοστεί για την έναρξη της ογκογένεσης σε οργανοειδή ανθρώπινου εγκεφάλου ως μια καινοτόμος προσέγγιση για μοντέλα όγκων εγκεφάλου. [194] Εναλλακτικά, οργανοειδή όγκου εγκεφάλου μπορούν να δημιουργηθούν από δείγματα πρωτογενούς γλοιοβλαστώματος που ανατέμνονται σε μικρότερα κομμάτια και καλλιεργούνται σε τρισδιάστατο περιβάλλον. Η επακόλουθη σύντηξη αυτών των οργανοειδών όγκου με φυσιολογικά εγκεφαλικά οργανοειδή μπορεί να δημιουργήσει ένα κλιμακούμενο *in vitro* μοντέλο για μετάσταση καρκίνου, παρέχοντας τα μέσα για τον έλεγχο για θεραπείες που εμποδίζουν ειδικά την εισβολή των καρκινικών κυττάρων στον περιβάλλοντα ιστό.

Τα οργανοειδή αν και αποτελούν σπουδαία καινοτομία και εργαλείο στην μελέτη ασθενειών, έχουν αρκετούς περιορισμούς στην χρήση τους, οι οποίοι θα πρέπει

[Πληκτρολογήστε εδώ]

να ξεπεραστούν ώστε να καθιερωθούν ως επιλεγόμενος τρόπος θεραπείας. Αφενός, τα οργανοειδή δεν είναι τόσο ώριμα και λειτουργικά όσο οι πραγματικοί άνθρωποι εγκέφαλοι λόγω περιορισμών του συστήματος καλλιέργειας. Τα ανεπαρκή αναπτυξιακά σήματα, η έλλειψη συστατικών καθώς και η έλλειψη αγγείωσης αποτελούν βασικούς ανασταλτικούς παράγοντες στην ωρίμανση αυτών. Αφετέρου, το μικρό μέγεθος των σημερινών οργανοειδών παραμένει ουσιαστικός περιοριστικός παράγοντας στην χρήση τους για την πλήρη ανακεφαλαίωση της ανάπτυξης του ανθρώπινου εγκεφάλου. Το βιώσιμο πάχος των οργανοειδών περιορίζεται από την φυσική απόσταση στην οποία το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά μπορούν να διαχέονται. Το αποτέλεσμα είναι τα εσωτερικά κύτταρα του οργανοειδούς να στερούνται θρεπτικών συστατικών και να μην επιβιώνουν. [182]

Ακόμα, πρέπει να σημειωθεί ότι τα πρωτόκολλα οργανοειδούς διαφοροποίησης που βασίζονται στην αυτο-οργάνωση των hPSCs και στην αυθόρμητη διαφοροποίησή τους οδηγούν σε εγγενώς μεταβλητά αποτελέσματα. Επομένως, σε αντίθεση με τα όργανα που προκύπτουν από την επακριβώς ελεγχόμενη διαδικασία της in vivo οργανογένεσης, κανένα από τα δύο οργανοειδή δεν είναι πανομοιότυπα. Για να βελτιωθεί ο ποιοτικός έλεγχος, οι μεταβλητές στο σύστημα θα πρέπει να εξαλειφθούν όπου είναι δυνατόν. [195] Οι καλλιέργειες hPSCs που εξαρτώνται από τον τροφοδότη εξαρτώνται περισσότερο από την τεχνική και οι ιδιότητες κάθε σειράς hPSCs μερικές φορές είναι ασυνεπείς. Μια στροφή στη χρήση καλλιέργειας hPSCs χωρίς τροφοδότη είναι πιθανό να βελτιώσει σημαντικά την αναπαραγωγιμότητα σε εργαστήρια και κυτταρικές σειρές. [196] Η χρήση μεταβλητών συστατικών, όπως η ζωικής προέλευσης εξωκυτταρική μήτρα (Matrigel), στα πρωτόκολλα καλλιέργειας θα πρέπει επίσης να ελαχιστοποιηθεί και οι ανασυνδυασμένοι αυξητικοί παράγοντες θα πρέπει να αντικαθίστανται από μικρά μόρια όποτε είναι δυνατό. [197] Επιπλέον, οι μέθοδοι παραγωγής οργανοειδών που αναπτύχθηκαν πρόσφατα πρέπει να χαρακτηριστούν ποσοτικά για να δείξουν συνεπή αποτελέσματα με πολλαπλές σειρές hPSCs και ανεξάρτητες παρτίδες προτού είναι έτοιμες για δημοσίευση. Η ανάπτυξη ενός μικροσκοπικού περιστρεφόμενου βιοαντιδραστήρα πολλαπλών φρεατίων επέτρεψε την αποτελεσματική βελτιστοποίηση των οργανοειδών πρωτοκόλλων και την κλιμακούμενη παραγωγή οργανοειδών. [198] Προχωρώντας προς τα εμπρός, η ανάπτυξη συστημάτων με αυτοματοποιημένες αναλύσεις υψηλής απόδοσης θα είναι

[Πληκτρολογήστε εδώ]

καθοριστική για την μετατροπή των οργανοειδών μοντέλων σε πλατφόρμες υψηλής απόδοσης κατάλληλες για έλεγχο και ανακάλυψη φαρμάκων.

Τελευταίος αλλά εξίσου σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στην χρήση των οργανοειδών είναι αυτός της ηθικής. Η δημιουργία οργανοειδών ανθρώπινου εγκεφάλου πυροδότησε μια σειρά από ηθικές συζητήσεις για θέματα όπως η ανθρώπινη προέλευση τους και η πιθανότητα να έχουν συνείδηση καθώς το μέγεθος και η πολυπλοκότητά τους αυξάνονται, το κατά πόσο η δημιουργία χίμαιρων εγκεφάλου είναι αποδεκτή αλλά και θέματα που σχετίζονται με την συγκατάθεση και την ιδιοκτησία. Όλα αυτά θα πρέπει να αποσαφηνιστούν και να μην αποτελούν εμπόδιο στην πρόοδο της έρευνας αλλά ταυτόχρονα να υπάρχει ένα κοινό νομικό πλαίσιο που θα ισχύει για όλους και θα είναι όσο το δυνατόν πιο δίκαιο και συμφέρον για κάθε πλευρά.

Οι ραγδαίες εξελίξεις στις τεχνολογίες των οργανοειδών του εγκεφάλου έχουν ανοίξει νέους δρόμους για την καλύτερη κατανόηση της ανάπτυξης, της λειτουργίας, της εξέλιξης και των διαταραχών του ανθρώπινου εγκεφάλου. Τα οργανοειδή προσφέρουν σημαντικό εργαλείο για την αναγεννητική ιατρική και, σε συνδυασμό με τεχνολογίες επεξεργασίας, για γονιδιακή θεραπεία. Το πεδίο οργανοειδών του εγκεφάλου έχει κάνει συναρπαστικά βήματα για να ενδυναμώσει τους ερευνητές με νέα εργαλεία για την αντιμετώπιση ερωτημάτων που είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν σε άλλα συστήματα μοντέλων, αλλά απομένει πολύς δρόμος για την επίτευξη μιας πιο πιστής *in vitro* αναπαράστασης του αναπτυσσόμενου ανθρώπινου εγκεφάλου. Είναι σημαντικό να έχουμε κατά νου ότι κανένα μοντέλο δεν είναι τέλειο. Μόνο μέσω της συνέργειας μεταξύ διαφορετικών συστημάτων μοντέλων μπορούμε να αποκτήσουμε πραγματικά γνώση που θα φωτίσει το δρόμο για την υπέρβαση των νευρολογικών ασθενειών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23257690.
2. Ota, Ken Ichiro. 2008. "Fuel Cells: Past, Present and Future." *IEEJ Transactions on Fundamentals and Materials* 128(5): 329–32.
3. Damdimopoulou P, Rodin S, Stenfelt S, Antonsson L, Tryggvason K, Hovatta O. Human embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016 Feb;31:2-12. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2015.08.010. Epub 2015 Sep 11. PMID: 26602389.
4. Kazutoshi Takahashi, Shinya Yamanaka; Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development* 15 June 2013; 140 (12): 2457–2461. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.092551>
5. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010 Feb;10(2):116-29. doi: 10.1038/nrc2780. PMID: 20094046.
6. Hilfiker, Andres, Cornelia Kasper, Ralf Hass, and Axel Haverich. 2011. "Mesenchymal Stem Cells and Progenitor Cells in Connective Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Is There a Future for Transplantation?" *Langenbeck's Archives of Surgery* 396(4): 489–97.
7. Tat, Pollyanna A. et al. 2010. "The Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem (IPS) Cells from Adult Mouse Adipose Tissue-Derived and Neural Stem Cells." *Cell Transplantation* 19(5): 525–36.
8. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998 Jan 16;279(5349):349-52. doi: 10.1126/science.279.5349.349. PMID: 9454332.
9. Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, Reubinoff B, Mandelboim O, Benvenisty N. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 23;99(15):9864-9. doi: 10.1073/pnas.142298299. Epub 2002 Jul 11. PMID: 12114532; PMCID: PMC125045.
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904174.
11. Shi Y, Yamada K, Liddel SA, Smith ST, Zhao L, Luo W, Tsai RM, Spina S, Grinberg LT, Rojas JC, Gallardo G, Wang K, Roh J, Robinson G, Finn MB, Jiang H, Sullivan PM, Baufeld C, Wood MW, Sutphen C, McCue L, Xiong C, Del-Aguila JL, Morris JC, Cruchaga C; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative; Fagan AM, Miller BL, Boxer AL, Seeley WW, Butovsky O, Barres BA, Paul SM, Holtzman DM. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature*. 2017 Sep 28;549(7673):523-527. doi: 10.1038/nature24016. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28959956; PMCID: PMC5641217.

12. Ludwig PE, Reddy V, Varacallo M. Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS). 2022 Oct 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 28723039.
13. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 2016 Dec 15;524(18):3865-3895. doi: 10.1002/cne.24040. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27187682; PMCID: PMC5063692.
14. Schirmer L, Schafer DP, Bartels T, Rowitch DH, Calabresi PA. Diversity and Function of Glial Cell Types in Multiple Sclerosis. *Trends Immunol*. 2021 Mar;42(3):228-247. doi: 10.1016/j.it.2021.01.005. Epub 2021 Feb 13. PMID: 33593693; PMCID: PMC7914214.
15. Ludwig PE, Reddy V, Varacallo M. Neuroanatomy, Neurons. 2022 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 28723006.
16. Butt AM, Papanikolaou M, Rivera A. Physiology of Oligodendroglia. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1175:117-128. doi: 10.1007/978-981-13-9913-8_5. PMID: 31583586.
17. MacDonald A, Lu B, Caron M, Caporicci-Dinucci N, Hatrock D, Petrecca K, Bourque G, Stratton JA. Single Cell Transcriptomics of Ependymal Cells Across Age, Region and Species Reveals Cilia-Related and Metal Ion Regulatory Roles as Major Conserved Ependymal Cell Functions. *Front Cell Neurosci*. 2021 Jul 15;15:703951. doi: 10.3389/fncel.2021.703951. PMID: 34335193; PMCID: PMC8319996.
18. Vidal-Itriago A, Radford RAW, Aramideh JA, Maurel C, Scherer NM, Don EK, Lee A, Chung RS, Graeber MB, Morsch M. Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Front Immunol*. 2022 Oct 19;13:997786. doi: 10.3389/fimmu.2022.997786. PMID: 36341385; PMCID: PMC9627549.
19. Lazutkin A, Podgorny O, Enikolopov G. Modes of division and differentiation of neural stem cells. *Behav Brain Res*. 2019 Nov 18;374:112118. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112118. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31369774; PMCID: PMC6892343.
20. ALTMAN J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 1962 Mar 30;135(3509):1127-8. doi: 10.1126/science.135.3509.1127. PMID: 13860748.
21. Paton JA, Nottebohm FN. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*. 1984 Sep 7;225(4666):1046-8. doi: 10.1126/science.6474166. PMID: 6474166.
22. Burd GD, Nottebohm F. Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J Comp Neurol*. 1985 Oct 8;240(2):143-52. doi: 10.1002/cne.902400204. PMID: 4056107.
23. Obernier K, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*. 2019 Feb 18;146(4):dev156059. doi: 10.1242/dev.156059. PMID: 30777863; PMCID: PMC6398449.
24. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 2009;32:149-84. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600. PMID: 19555289; PMCID: PMC3086722.

25. Urbán N, Blomfield IM, Guillemot F. Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest. *Neuron*. 2019 Dec 4;104(5):834-848. doi: 10.1016/j.neuron.2019.09.026. PMID: 31805262.
26. Uchida, Kohichi, Michael D. Kawaja, Shigeo Toya, and Arthur H. Roach. 1995. "Transgenic Neural Plate Contributes Neuronal Cells That Survive Greater than One Year When Transplanted into the Adult Mouse Central Nervous System." *Experimental Neurology* 132(2): 194–208.
27. Thored, Pär et al. 2006. "Persistent Production of Neurons from Adult Brain Stem Cells During Recovery after Stroke." *Stem Cells* 24(3): 739–47.
28. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011 May 26;70(4):687-702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001. PMID: 21609825; PMCID: PMC3106107.
29. Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*. 2006 Mar;24(3):739-47. doi: 10.1634/stemcells.2005-0281. Epub 2005 Oct 6. PMID: 16210404.
30. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2010 Aug 6;7(2):150-61. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.007. PMID: 20682444.
31. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61. doi: 10.1126/science.1079490. Epub 2003 Jan 9. PMID: 12522256.
32. Yin C, Kiskowski M, Pouille PA, Farge E, Solnica-Krezel L. Cooperation of polarized cell intercalations drives convergence and extension of presomitic mesoderm during zebrafish gastrulation. *J Cell Biol*. 2008 Jan 14;180(1):221-32. doi: 10.1083/jcb.200704150. PMID: 18195109; PMCID: PMC2213609.
33. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):703-16. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80783-7. PMID: 10380923.
34. Lim DA, Alvarez-Buylla A. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 May 2;8(5):a018820. doi: 10.1101/cshperspect.a018820. PMID: 27048191; PMCID: PMC4852803.
35. Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G. Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci*. 2010 Feb 3;30(5):1582-94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4515-09.2010. PMID: 20130169; PMCID: PMC2826846.
36. Ahn S, Joyner AL. In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature*. 2005 Oct 6;437(7060):894-7. doi: 10.1038/nature03994. PMID: 16208373.

37. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev.* 2007 Apr;53(2):367-78. doi: 10.1262/jrd.18146. Epub 2007 Jan 10. PMID: 17213691.
38. Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, Doetsch F. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron.* 2014 May 7;82(3):545-59. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.039. PMID: 24811379; PMCID: PMC4360885.
39. Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol.* 2005 Dec;25(24):11113-21. doi: 10.1128/MCB.25.24.11113-11121.2005. PMID: 16314531; PMCID: PMC1316977.
40. Goldman, S., Chen, Z. Perivascular instruction of cell genesis and fate in the adult brain. *Nat Neurosci* 14, 1382–1389 (2011). <https://doi.org/10.1038/nn.2963>
41. Tong, C.K., Fuentealba, L.C., Shah, J.K., Lindquist, R.A., Ihrie, R.A., Guinto, C.D., Rodas-Rodriguez, J.L., and Alvarez-Buylla, A. (2015). A Dorsal SHH-Dependent Domain in the V-SVZ Produces Large Numbers of Oligodendroglial Lineage Cells in the Postnatal Brain. *Stem Cell Reports* 5, 461–470.
42. Alcantara Llaguno SR, Wang Z, Sun D, Chen J, Xu J, Kim E, Hatanpaa KJ, Raisanen JM, Burns DK, Johnson JE, Parada LF. Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell.* 2015 Oct 12;28(4):429-440. doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.007. PMID: 26461091; PMCID: PMC4607935.
43. Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron.* 2002 Dec 19;36(6):1021-34. doi: 10.1016/s0896-6273(02)01133-9. PMID: 12495619.
44. Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev.* 2011 Jun 24;67(1-2):147-56. doi: 10.1016/j.brainresrev.2011.01.001. Epub 2011 Jan 12. PMID: 21236296; PMCID: PMC3109119.
45. Jackson, E.L., Garcia-Verdugo, J.M., Gil-Perotin, S., Roy, M., Quinones-Hinojosa, A., VandenBerg, S., and Alvarez-Buylla, A. (2006). PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51, 187–199.
46. Turner, Nicholas, and Richard Grose. 2010. “Fibroblast Growth Factor Signalling: From Development to Cancer.” *Nature Reviews Cancer* 10(2): 116–29. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2780>.
47. Fabbri R, Cacopardo L, Ahluwalia A, Magliaro C. Advanced 3D Models of Human Brain Tissue Using Neural Cell Lines: State-of-the-Art and Future Prospects. *Cells.* 2023 Apr 18;12(8):1181. doi: 10.3390/cells12081181. PMID: 37190089; PMCID: PMC10136913.

48. Parker Struckhoff A, Del Valle L. Neurospheres and Glial Cell Cultures; from Plating to Cell Phenotyping. *Methods Mol Biol.* 2021;2311:131-145. doi: 10.1007/978-1-0716-1437-2_9. PMID: 34033081.
49. Watanabe F, Schoeffler A, Fair SR, Hester ME, Fedorko J, Imitola J. Generation of Neurosphere-Derived Organoid-Like-Aggregates (NEDAS) from Neural Stem Cells. *Curr Protoc.* 2021 Feb;1(2):e15. doi: 10.1002/cpz1.15. Erratum in: *Curr Protoc.* 2022 Aug;2(8):e552. Erratum in: *Curr Protoc.* 2022 Aug;2(8):e551. Erratum in: *Curr Protoc.* 2022 Aug;2(8):e550. PMID: 33534198.
50. Samarasinghe RA, Miranda OA, Buth JE, Mitchell S, Ferando I, Watanabe M, Allison TF, Kurdian A, Fotion NN, Gandal MJ, Golshani P, Plath K, Lowry WE, Parent JM, Mody I, Novitch BG. Identification of neural oscillations and epileptiform changes in human brain organoids. *Nat Neurosci.* 2021 Oct;24(10):1488-1500. doi: 10.1038/s41593-021-00906-5. Epub 2021 Aug 23. PMID: 34426698; PMCID: PMC9070733.
51. Qian X, Song H, Ming GL. Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development.* 2019 Apr 16;146(8):dev166074. doi: 10.1242/dev.166074. PMID: 30992274; PMCID: PMC6503989.
52. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology.* 2011 Nov;141(5):1762-72. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050. Epub 2011 Sep 2. PMID: 21889923.
53. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2014 Oct;9(10):2329-40. doi: 10.1038/nprot.2014.158. Epub 2014 Sep 4. PMID: 25188634; PMCID: PMC4160653.
54. Quadrato G, Nguyen T, Macosko EZ, Sherwood JL, Min Yang S, Berger DR, Maria N, Scholvin J, Goldman M, Kinney JP, Boyden ES, Lichtman JW, Williams ZM, McCarroll SA, Arlotta P. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature.* 2017 May 4;545(7652):48-53. doi: 10.1038/nature22047. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28445462; PMCID: PMC5659341.
55. Shevde NK, Mael AA. Techniques in embryoid body formation from human pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol.* 2013;946:535-46. doi: 10.1007/978-1-62703-128-8_33. PMID: 23179854.
56. Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, Wataya T, Nishiyama A, Muguruma K, Sasai Y. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell.* 2008 Nov 6;3(5):519-32. doi: 10.1016/j.stem.2008.09.002. PMID: 18983967.
57. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res.* 1993 Aug 1;35(5):567-76. doi: 10.1002/jnr.490350513. PMID: 8377226.
58. Gaspard N, Bouschet T, Hourez R, Dimidschstein J, Naeije G, van den Ameele J, Espuny-Camacho I, Herpoel A, Passante L, Schiffmann SN, Gaillard A, Vanderhaeghen P. An intrinsic

- mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature*. 2008 Sep 18;455(7211):351-7. doi: 10.1038/nature07287. Epub 2008 Aug 17. PMID: 18716623.
59. Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brüstle O. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):3225-30. doi: 10.1073/pnas.0808387106. Epub 2009 Feb 13. PMID: 19218428; PMCID: PMC2651316.
60. Eiraku M, Sasai Y. Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of ES cells. *Curr Opin Neurobiol*. 2012 Oct;22(5):768-77. doi: 10.1016/j.conb.2012.02.005. Epub 2012 Mar 9. PMID: 22405989.
61. Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan;84(1):136-40. doi: 10.1073/pnas.84.1.136. PMID: 3467345; PMCID: PMC304157.
62. Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell*. 2013 May 2;12(5):520-30. doi: 10.1016/j.stem.2013.04.009. PMID: 23642363.
63. Danjo T, Eiraku M, Muguruma K, Watanabe K, Kawada M, Yanagawa Y, Rubenstein JL, Sasai Y. Subregional specification of embryonic stem cell-derived ventral telencephalic tissues by timed and combinatorial treatment with extrinsic signals. *J Neurosci*. 2011 Feb 2;31(5):1919-33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5128-10.2011. PMID: 21289201; PMCID: PMC6623725.
64. Bagley JA, Reumann D, Bian S, Lévi-Strauss J, Knoblich JA. Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat Methods*. 2017 Jul;14(7):743-751. doi: 10.1038/nmeth.4304. Epub 2017 May 10. PMID: 28504681; PMCID: PMC5540177.
65. Birey F, Andersen J, Makinson CD, Islam S, Wei W, Huber N, Fan HC, Metzler KRC, Panagiotakos G, Thom N, O'Rourke NA, Steinmetz LM, Bernstein JA, Hallmayer J, Huguenard JR, Pasca SP. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*. 2017 May 4;545(7652):54-59. doi: 10.1038/nature22330. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28445465; PMCID: PMC5805137.
66. Shanks N, Greek R, Greek J. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med*. 2009 Jan 15;4:2. doi: 10.1186/1747-5341-4-2. PMID: 19146696; PMCID: PMC2642860.
67. Renner M, Lancaster MA, Bian S, Choi H, Ku T, Peer A, Chung K, Knoblich JA. Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids. *EMBO J*. 2017 May 15;36(10):1316-1329. doi: 10.15252/embj.201694700. Epub 2017 Mar 10. PMID: 28283582; PMCID: PMC5430225.
68. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*. 2011 Jul 8;146(1):18-36. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.030. Erratum in: *Cell*. 2011 Jul 22;146(2):332. PMID: 21729779; PMCID: PMC3610574.
69. Mariani J, Simonini MV, Palejev D, Tomasini L, Coppola G, Szekely AM, Horvath TL, Vaccarino FM. Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 31;109(31):12770-5. doi: 10.1073/pnas.1202944109. Epub 2012 Jul 3. PMID: 22761314; PMCID: PMC3411972.

70. Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Quang D, Johnston S, Parylak SL, Jin X, Gage FH. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol.* 2018 Jun;36(5):432-441. doi: 10.1038/nbt.4127. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29658944; PMCID: PMC6331203.
71. Paşca AM, Sloan SA, Clarke LE, Tian Y, Makinson CD, Huber N, Kim CH, Park JY, O'Rourke NA, Nguyen KD, Smith SJ, Huguenard JR, Geschwind DH, Barres BA, Paşca SP. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods.* 2015 Jul;12(7):671-8. doi: 10.1038/nmeth.3415. Epub 2015 May 25. PMID: 26005811; PMCID: PMC4489980.
72. Luo C, Lancaster MA, Castanon R, Nery JR, Knoblich JA, Ecker JR. Cerebral Organoids Recapitulate Epigenomic Signatures of the Human Fetal Brain. *Cell Rep.* 2016 Dec 20;17(12):3369-3384. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.001. PMID: 28009303; PMCID: PMC5495578.
73. Camp JG, Badsha F, Florio M, Kanton S, Gerber T, Wilsch-Bräuninger M, Lewitus E, Sykes A, Hevers W, Lancaster M, Knoblich JA, Lachmann R, Pääbo S, Huttner WB, Treutlein B. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Dec 22;112(51):15672-7. doi: 10.1073/pnas.1520760112. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26644564; PMCID: PMC4697386.
74. Chen HI, Song H, Ming GL. Applications of Human Brain Organoids to Clinical Problems. *Dev Dyn.* 2019 Jan;248(1):53-64. doi: 10.1002/dvdy.24662. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30091290; PMCID: PMC6312736.
75. Bershteyn M, Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Nene A, Wynshaw-Boris A, Kriegstein AR. Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Model Cellular Features of Lissencephaly and Reveal Prolonged Mitosis of Outer Radial Glia. *Cell Stem Cell.* 2017 Apr 6;20(4):435-449.e4. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.007. Epub 2017 Jan 19. PMID: 28111201; PMCID: PMC5667944.
76. Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, Yao B, Hamersky GR, Jacob F, Zhong C, et al. 2016. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell* 165: 1238–1254. 10.1016/j.cell.2016.04.032
77. LaMonica BE, Lui JH, Wang X, Kriegstein AR. 2012. OSVZ progenitors in the human cortex: an updated perspective on neurodevelopmental disease. *Curr Opin Neurobiol* 22: 747–753. 10.1016/j.conb.2012.03.006
78. Renner M, Lancaster MA, Bian S, Choi H, Ku T, Peer A, Chung K, Knoblich JA. 2017. Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids. *EMBO J* 36: 1316–1329. 10.15252/embj.201694700
79. Benito-Kwiecinski S, Lancaster MA. Brain Organoids: Human Neurodevelopment in a Dish. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020 Aug 3;12(8):a035709. doi: 10.1101/cshperspect.a035709. PMID: 31767649; PMCID: PMC7397826.
80. Jiang X, Nardelli J. 2016. Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol Dis* 92: 3–17. 10.1016/j.nbd.2015.07.007

81. Sloan SA, Darmanis S, Huber N, Khan TA, Birey F, Caneda C, Reimer R, Quake SR, Barres BA, Pasca SP. 2017. Human astrocyte maturation captured in 3D cerebral cortical spheroids derived from pluripotent stem cells. *Neuron* 95: 779–790.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.035
82. Giandomenico SL, Mierau SB, Gibbons GM, Wenger LMD, Masullo L, Sit T, Sutcliffe M, Boulanger J, Tripodi M, Derivery E, et al. 2019. Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat Neurosci* 22: 669–679. doi: 10.1038/s41593-019-0350-2
83. Cunningham CL, Martínez-Cerdeño V, Noctor SC. 2013. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 33: 4216–4233. doi: 10.1523/jneurosci.3441-12.2013
84. Ormel PR, Vieira de Sá R, van Bodegraven EJ, Karst H, Harschnitz O, Sneboer MAM, Johansen LE, van Dijk RE, Scheefnals N, Berdenis van Berlekom A, et al. 2018. Microglia innately develop within cerebral organoids. *Nat Commun* 9: 4167. doi: 10.1038/s41467-018-06684-2
85. Abud EM, Ramirez RN, Martinez ES, Healy LM, Nguyen CHH, Newman SA, Yeromin AV, Scarfone VM, Marsh SE, et al. 2017. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron* 94: 278–293.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.042
86. Trujillo CA, Muotri AR. Brain Organoids and the Study of Neurodevelopment. *Trends Mol Med*. 2018 Dec;24(12):982-990. doi: 10.1016/j.molmed.2018.09.005. Epub 2018 Oct 28. PMID: 30377071; PMCID: PMC6289846.
87. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodušek V, Vizjak A, Pižem J, Petrovec M, Avšič Županc T. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 2016 Mar 10;374(10):951-8. doi: 10.1056/NEJMoa1600651. Epub 2016 Feb 10. PMID: 26862926.
88. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimarães KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, Cunha I, Freitas CL, Brandão WN, Rossato C, Andrade DG, Faria Dde P, Garcez AT, Buchpiguel CA, Braconi CT, Mendes E, Sall AA, Zanotto PM, Peron JP, Muotri AR, Beltrão-Braga PC. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 2016 Jun 9;534(7606):267-71. doi: 10.1038/nature18296. Epub 2016 May 11. PMID: 27279226; PMCID: PMC4902174.
89. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013 Sep 19;501(7467):373-9. doi: 10.1038/nature12517. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23995685; PMCID: PMC3817409.
90. Hanzlik E, Gigante J. Microcephaly. *Children (Basel)*. 2017 Jun 9;4(6):47. doi: 10.3390/children4060047. PMID: 28598357; PMCID: PMC5483622.
91. Jayaraman D, Bae BI, Walsh CA. The genetics of primary microcephaly. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018;19:177–200.

92. Mahmood S, Ahmad W, Hassan MJ. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): clinical manifestations, genetic heterogeneity and mutation continuum. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:39
93. Wang L, Li Z, Sievert D, Smith DEC, Mendes MI, Chen DY, Stanley V, Ghosh S, Wang Y, Kara M, et al. Loss of NARS1 impairs progenitor proliferation in cortical brain organoids and leads to microcephaly. *Nat Commun.* 2020;11:4038.
94. Li R, Sun L, Fang A, Li P, Wu Q, Wang X. Recapitulating cortical development with organoid culture in vitro and modeling abnormal spindle-like (ASPM related primary) microcephaly disease. *Protein Cell.* 2017;8:823–833.
95. Zhang W, Yang SL, Yang M, Herrlinger S, Shao Q, Collar JL, Fierro E, Shi Y, Liu A, Lu H, et al. Modeling microcephaly with cerebral organoids reveals a WDR62-CEP170-KIF2A pathway promoting cilium disassembly in neural progenitors. *Nat Commun.* 2019;10:2612.
96. Crow YJ, Manel N. Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jul;15(7):429-40. doi: 10.1038/nri3850. Epub 2015 Jun 5. PMID: 26052098.
97. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K, et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry.* 2011;68:1095–1102.
98. Iossifov I, O’Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, Stessman HA, Witherspoon KT, Vives L, Patterson KE, et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature.* 2014;515:216–221.
99. Kortum F, Das S, Flindt M, Morris-Rosendahl DJ, Stefanova I, Goldstein A, Horn D, Klopocki E, Kluger G, Martin P, et al. The core FOXP1 syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis. *J Med Genet.* 2011;48:396–406.
100. Mariani J, Coppola G, Zhang P, Abyzov A, Provini L, Tomasini L, Amenduni M, Szekely A, Palejev D, Wilson M, et al. FOXP1-dependent Dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism Spectrum disorders. *Cell.* 2015;162:375–390.
101. Schafer ST, Paquola ACM, Stern S, Gosselin D, Ku M, Pena M, Kuret TJM, Liyanage M, Mansour AA, Jaeger BN, et al. Pathological priming causes developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons. *Nat Neurosci.* 2019;22:243–255.
102. Wang P, Mokhtari R, Pedrosa E, Kirschenbaum M, Bayrak C, Zheng D, Lachman HM. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in cerebral organoids derived from iPS cells. *Mol Autism.* 2017;8:11.
103. Marchetto MC, Belinson H, Tian Y, Freitas BC, Fu C, Vadodaria K, Beltrao-Braga P, Trujillo CA, Mendes APD, Padmanabhan K, et al. Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Mol Psychiatry.* 2017;22:820–835.
104. Petrelli F, Pucci L, Bezzi P. Astrocytes and microglia and their potential link with autism Spectrum disorders. *Front Cell Neurosci.* 2016;10:21.

105. Tan YL, Yuan Y, Tian L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry*. 2020;25:351–367.
106. Wang Q, Kong Y, Wu DY, Liu JH, Jie W, You QL, Huang L, Hu J, Chu HD, Gao F, et al. Impaired calcium signaling in astrocytes modulates autism spectrum disorder-like behaviors in mice. *Nat Commun*. 2021;12:3321.
107. Sloan SA, Darmanis S, Huber N, Khan TA, Birey F, Caneda C, Reimer R, Quake SR, Barres BA, Pasca SP. Human astrocyte maturation captured in 3D cerebral cortical spheroids derived from pluripotent stem cells. *Neuron*. 2017;95:779–790.e776.
108. Ormel PR, Vieira de Sá R, van Bodegraven EJ, Karst H, Harschnitz O, Sneebouwer MAM, Johansen LE, van Dijk RE, Scheefhals N, Berdenis van Berlekom A, et al. Microglia innately develop within cerebral organoids. *Nat Commun*. 2018;9:4167.
109. Chahrouh M, Zoghbi HY. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron*. 2007;56:422–437.
110. Jung BP, Jugloff DG, Zhang G, Logan R, Brown S, Eubanks JH. The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. *J Neurobiol*. 2003;55:86–96.
111. Tang X, Kim J, Zhou L, Wengert E, Zhang L, Wu Z, Carromeu C, Muotri AR, Marchetto MC, Gage FH, et al. KCC2 rescues functional deficits in human neurons derived from patients with Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:751–756.
112. Xiang Y, Tanaka Y, Patterson B, Hwang SM, Hysolli E, Cakir B, Kim KY, Wang W, Kang YJ, Clement EM, et al. Dysregulation of BRD4 function underlies the functional abnormalities of MeCP2 mutant neurons. *Mol Cell*. 2020;79:84–98.e89.
113. Mellios N, Feldman DA, Sheridan SD, Ip JPK, Kwok S, Amoah SK, Rosen B, Rodriguez BA, Crawford B, Swaminathan R, et al. MeCP2-regulated miRNAs control early human neurogenesis through differential effects on ERK and AKT signaling. *Mol Psychiatry*. 2018;23:1051–1065.
114. Gomes AR, Fernandes TG, Vaz SH, Silva TP, Bekman EP, Xapelli S, Duarte S, Ghazvini M, Gribnau J, Muotri AR, et al. Modeling Rett syndrome with human patient-specific forebrain Organoids. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:610427.
115. Lu X, Yang J, Xiang Y. Modeling human neurodevelopmental diseases with brain organoids. *Cell Regen*. 2022 Jan 4;11(1):1. doi: 10.1186/s13619-021-00103-6. PMID: 34982276; PMCID: PMC8727646.
116. Trujillo CA, Muotri AR. Brain Organoids and the Study of Neurodevelopment. *Trends Mol Med*. 2018 Dec;24(12):982-990. doi: 10.1016/j.molmed.2018.09.005. Epub 2018 Oct 28. PMID: 30377071; PMCID: PMC6289846.
117. Birey F, Andersen J, Makinson CD, Islam S, Wei W, Huber N, Fan HC, Metzler KRC, Panagiotakos G, Thom N, O'Rourke NA, Steinmetz LM, Bernstein JA, Hallmayer J, Huguenard JR, Pasca SP. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*. 2017 May 4;545(7652):54-59. doi: 10.1038/nature22330. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28445465; PMCID: PMC5805137.

118. Birey F, Andersen J, Makinson CD, Islam S, Wei W, Huber N, Fan HC, Metzler KRC, Panagiotakos G, Thom N, et al. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*. 2017;545:54–59.
119. Wiener R, Haitin Y, Shamgar L, Fernández-Alonso MC, Martos A, Chomsky-Hecht O, Rivas G, Attali B, Hirsch JA. The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. *J Biol Chem*. 2008;283:5815–5830.
120. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell*. 1995;81:299–307.
121. Wang Q, Li Z, Shen J, Keating MT. Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics*. 1996;34:9–16.
122. Yazawa M, Hsueh B, Jia X, Pasca AM, Bernstein JA, Hallmayer J, Dolmetsch RE. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*. 2011;471:230–234.
123. Krey JF, Paşca SP, Shcheglovitov A, Yazawa M, Schwemberger R, Rasmusson R, Dolmetsch RE. Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat Neurosci*. 2013;16:201–209.
124. Simms BA, Zamponi GW. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*. 2014;82:24–45.
125. Krey JF, Paşca SP, Shcheglovitov A, Yazawa M, Schwemberger R, Rasmusson R, Dolmetsch RE. Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat Neurosci*. 2013;16:201–209.
126. Cheli VT, Santiago Gonzalez DA, Zamora NN, Lama TN, Spreuer V, Rasmusson RL, Bett GC, Panagiotakos G, Paez PM. Enhanced oligodendrocyte maturation and myelination in a mouse model of Timothy syndrome. *Glia*. 2018;66:2324–2339.
127. Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet*. 2008;372:657–668.
128. Li Y, Cao J, Chen M, Li J, Sun Y, Zhang Y, Zhu Y, Wang L, Zhang C. Abnormal neural progenitor cells differentiated from induced pluripotent stem cells partially mimicked development of TSC2 neurological abnormalities. *Stem Cell Rep*. 2017;8:883–893.
129. Curatolo P, Moavero R, de Vries PJ. Neurological and neuropsychiatric aspects of tuberous sclerosis complex. *Lancet Neurol*. 2015;14:733–745.
130. Katz JS, Frankel H, Ma T, Zagzag D, Liechty B, Zeev BB, Tzadok M, Devinsky O, Weiner HL, Roth J. Unique findings of subependymal giant cell astrocytoma within cortical tubers in patients with tuberous sclerosis complex: a histopathological evaluation. *Childs Nerv Syst*. 2017;33:601–607.
131. Blair JD, Hoekemeyer D, Bateup HS. Genetically engineered human cortical spheroid models of tuberous sclerosis. *Nat Med*. 2018;24:1568–1578.
132. Dooves S, van Velthoven AJH, Suciati LG, Heine VM. Neuron-glia interactions in tuberous sclerosis complex affect the synaptic balance in 2D and Organoid cultures. *Cells*. 2021;10:134.

133. Chakrabarti L, Galdzicki Z, Haydar TF. Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Neurosci.* 2007;27:11483–11495.
134. Ahn KJ, Jeong HK, Choi HS, Ryoo SR, Kim YJ, Goo JS, Choi SY, Han JS, Ha I, Song WJ. DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol Dis.* 2006;22:463–472.
135. Ronan A, Fagan K, Christie L, Conroy J, Nowak NJ, Turner G. Familial 4.3 Mb duplication of 21q22 sheds new light on the Down syndrome critical region. *BMJ Case Rep.* 2009;2009.
136. Jakovcevski I, Zecevic N. Olig transcription factors are expressed in oligodendrocyte and neuronal cells in human fetal CNS. *J Neurosci.* 2005;25:10064–10073.
137. Xu R, Brawner AT, Li S, Liu JJ, Kim H, Xue H, Pang ZP, Kim WY, Hart RP, Liu Y, et al. OLIG2 drives abnormal neurodevelopmental phenotypes in human iPSC-based Organoid and chimeric mouse models of Down syndrome. *Cell Stem Cell.* 2019;24:908–926.e908.
138. Huo HQ, Qu ZY, Yuan F, Ma L, Yao L, Xu M, Hu Y, Ji J, Bhattacharyya A, Zhang SC, et al. Modeling Down syndrome with patient iPSCs reveals cellular and migration deficits of GABAergic neurons. *Stem Cell Rep.* 2018;10:1251–1266.
139. Tang XY, Xu L, Wang J, Hong Y, Wang Y, Zhu Q, et al. DSCAM/PAK1 pathway suppression reverses neurogenesis deficits in iPSC-derived cerebral organoids from patients with Down syndrome. *J Clin Invest.* 2021;131.
140. Prandini P, Deutsch S, Lyle R, Gagnebin M, Delucinge Vivier C, Delorenzi M, Gehrig C, Descombes P, Sherman S, Dagna Bricarelli F, et al. Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *Am J Hum Genet.* 2007;81:252–263.
141. Baldwin KJ, Correll CM. Prion Disease. *Semin Neurol.* 2019 Aug;39(4):428-439. doi: 10.1055/s-0039-1687841. Epub 2019 Sep 18. PMID: 31533183.
142. Foliaki ST, Groveman BR, Yuan J, Walters R, Zhang S, Tesar P, Zou W, Haigh CL. Pathogenic Prion Protein Isoforms Are Not Present in Cerebral Organoids Generated from Asymptomatic Donors Carrying the E200K Mutation Associated with Familial Prion Disease. *Pathogens.* 2020 Jun 18;9(6):482. doi: 10.3390/pathogens9060482. PMID: 32570796; PMCID: PMC7350378.
143. Groveman BR, Foliaki ST, Orru CD, Zanusso G, Carroll JA, Race B, Haigh CL. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease prion infection of human cerebral organoids. *Acta Neuropathol Commun.* 2019 Jun 14;7(1):90. doi: 10.1186/s40478-019-0742-2. Erratum in: *Acta Neuropathol Commun.* 2019 Aug 14;7(1):131. PMID: 31196223; PMCID: PMC6567389.
144. Groveman BR, Smith A, Williams K, Haigh CL. Cerebral organoids as a new model for prion disease. *PLoS Pathog.* 2021 Jul 21;17(7):e1009747. doi: 10.1371/journal.ppat.1009747. PMID: 34288977; PMCID: PMC8294539.
145. Gaugler J., James B., Johnson T., Marin A., Weuve J., Assoc A. s., *Alzheimers Dementia* 2019, 15, 321.

146. Yiannopoulou, K. G., Anastasiou, A. I., Zachariou, V., & Pelidou, S. H. (2019). Reasons for failed trials of disease-modifying treatments for Alzheimer disease and their contribution in recent research. *Biomedicines*, 7(4), 97.
147. Lee G., Papapetrou E. P., Kim H., Chambers S. M., Tomishima M. J., Fasano C. A., Ganat Y. M., Menon J., Shimizu F., Viale A., Tabar V., Sadelain M., Studer L., *Nature* 2009, 402, 402.
148. Penney J, Ralvenius WT, Tsai LH. Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol Psychiatry*. 2020 Jan;25(1):148-167. doi: 10.1038/s41380-019-0468-3. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31391546; PMCID: PMC6906186.
149. Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, Toga AW, Jacobs RE, Liu CY, Amezcua L, Harrington MG, Chui HC, Law M, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*. 2015 Jan 21;85(2):296-302. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.032. PMID: 25611508; PMCID: PMC4350773.
150. Senatorov VV Jr, Friedman AR, Milikovsky DZ, Ofer J, Saar-Ashkenazy R, Charbash A, Jahan N, Chin G, Mihaly E, Lin JM, Ramsay HJ, Moghbel A, Preininger MK, Eddings CR, Harrison HV, Patel R, Shen Y, Ghanim H, Sheng H, Veksler R, Sudmant PH, Becker A, Hart B, Rogawski MA, Dillin A, Friedman A, Kaufer D. Blood-brain barrier dysfunction in aging induces hyperactivation of TGF β signaling and chronic yet reversible neural dysfunction. *Sci Transl Med*. 2019 Dec 4;11(521):eaaw8283. doi: 10.1126/scitranslmed.aaw8283. PMID: 31801886.
151. Chen X, Sun G, Tian E, Zhang M, Davtyan H, Beach TG, Reiman EM, Blurton-Jones M, Holtzman DM, Shi Y. Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure. *Adv Sci (Weinh)*. 2021 Sep;8(18):e2101462. doi: 10.1002/advs.202101462. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34337898; PMCID: PMC8456220.
152. Ivar Mendez and others, Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease, *Brain*, Volume 128, Issue 7, July 2005, Pages 1498–1510
153. Penelope J. Hallett, Michela Deleidi, Arnar Astradsson, Gaynor A. Smith, Oliver Cooper, Teresia M. Osborn, Maria Sundberg, Michele A. Moore, Eduardo Perez-Torres, Anna-Liisa Brownell, James M. Schumacher, Roger D. Spealman, Ole Isacson, Successful Function of Autologous iPSC-Derived Dopamine Neurons following Transplantation in a Non-Human Primate Model of Parkinson's Disease, *Cell Stem Cell*, Volume 16, Issue 3, 2015, Pages 269-274, ISSN 1934-5909
154. Bonilla S, Hall AC, Pinto L, Attardo A, Götz M, Huttner WB, Arenas E. Identification of midbrain floor plate radial glia-like cells as dopaminergic progenitors. *Glia*. 2008 Jun;56(8):809-20. doi: 10.1002/glia.20654. PMID: 18351630.
155. Kriks, S., Shim, JW., Piao, J. et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480, 547–551 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10648>.
156. Kirkeby A, Nolbrant S, Tiklova K, Heuer A, Kee N, Cardoso T, Ottosson DR, Lelos MJ, Rifes P, Dunnett SB, Grealish S, Perlmann T, Parmar M. Predictive Markers Guide Differentiation to

- Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell*. 2017 Jan 5;20(1):135-148. doi: 10.1016/j.stem.2016.09.004. Epub 2016 Oct 27. PMID: 28094017; PMCID: PMC5222722.
157. Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D. et al. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* 548, 592–596 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature23664>
158. Blaudin de Thé FX, Rekaik H, Prochiantz A, Fuchs J, Joshi RL. Neuroprotective Transcription Factors in Animal Models of Parkinson Disease. *Neural Plast*. 2016;2016:6097107. doi: 10.1155/2016/6097107. Epub 2015 Dec 31. PMID: 26881122; PMCID: PMC4736191.
159. Rhee HS, Closser M, Guo Y, Bashkirova EV, Tan GC, Gifford DK, Wichterle H. Expression of Terminal Effector Genes in Mammalian Neurons Is Maintained by a Dynamic Relay of Transient Enhancers. *Neuron*. 2016 Dec 21;92(6):1252-1265. doi: 10.1016/j.neuron.2016.11.037. Epub 2016 Dec 8. PMID: 27939581; PMCID: PMC5193225.
160. Kim SW, Woo HJ, Kim EH, Kim HS, Suh HN, Kim SH, Song JJ, Wulansari N, Kang M, Choi SY, Choi SJ, Jang WH, Lee J, Kim KH, Lee W, Kim SH, Yang J, Kyung J, Lee HS, Park SM, Chang MY, Lee SH. Neural stem cells derived from human midbrain organoids as a stable source for treating Parkinson's disease: Midbrain organoid-NSCs (Og-NSC) as a stable source for PD treatment. *Prog Neurobiol*. 2021 Sep;204:102086. doi: 10.1016/j.pneurobio.2021.102086. Epub 2021 May 28. PMID: 34052305.
161. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 22;351(3):602-11. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.093. Epub 2006 Oct 30. PMID: 17084815.
162. Tamaki Y, Ross JP, Alipour P, Castonguay CÉ, Li B, Catoire H, Rochefort D, Urushitani M, Takahashi R, Sonnen JA, Stifani S, Dion PA, Rouleau GA. Spinal cord extracts of amyotrophic lateral sclerosis spread TDP-43 pathology in cerebral organoids. *PLoS Genet*. 2023 Feb 6;19(2):e1010606. doi: 10.1371/journal.pgen.1010606. PMID: 36745687; PMCID: PMC9934440.
163. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131:803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
164. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radio-therapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med* 352, 987–996.
165. Xie Y, Bergström T, Jiang Y, Johansson P, Marinescu VD, Lindberg N, Segerman A, Wicher G, Niklasson M, Baskaran S, et al. The human glioblastoma cell culture resource: validated cell

- models representing all molecular subtypes. *EBioMedicine*. 2015;2:1351–1363. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.08.026.
166. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*. 2006;9:391–403. doi: 10.1016/j.ccr.2006.03.030.
167. Jones TR, Bigner SH, Schold SJ, Eng LF, Bigner DD. Anaplastic human gliomas grown in athymic mice. Morphology and glial fibrillary acidic protein expression. *Am J Pathol*. 1981;105:316–327.
168. Wang X, Prager BC, Wu Q, Kim L, Gimple RC, Shi Y, Yang K, Morton AR, Zhou W, Zhu Z, et al. Reciprocal signaling between glioblastoma stem cells and differentiated tumor cells promotes malignant progression. *Cell Stem Cell*. 2018;22:514–528. doi: 10.1016/j.stem.2018.03.011.
169. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:180–192. doi: 10.1038/nrc2344.
170. Torsvik A, Stieber D, Enger PØ, Golebiewska A, Molven A, Svendsen A, Westermark B, Niclou SP, Olsen TK, Chekenya EM, Bjerkvig R. U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. *Cancer Med*. 2014;3:812–824. doi: 10.1002/cam4.219.
171. Andreatta F, Beccaceci G, Fortuna N, Celotti M, De Felice D, Lorenzoni M, Foletto V, Genovesi S, Rubert J, Alaimo A. The organoid era permits the development of new applications to study glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12:3303. doi: 10.3390/cancers12113303.
172. Goers L, Freemont P, Polizzi KM. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface*. 2014;11:20140065. doi: 10.1098/rsif.2014.0065.
173. Kopper O, de Witte CJ, Löhmußaar K, Valle-Inclan JE, Hami N, Kester L, Balgobind AV, Korving J, Proost N, Begthel H, et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat Med*. 2019;25:838–849. doi: 10.1038/s41591-019-0422-6.
174. Hubert CG, Rivera M, Spangler LC, Wu Q, Mack SC, Prager BC, Couce M, McLendon RE, Sloan AE, Rich JN. A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found in vivo. *Cancer Res*. 2016;76:2465–2477. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2402.
175. Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, Nguyen P, Schnoll JG, Wong S, Thokala R, Sheikh S, Saxena D, Prokop S, et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral heterogeneity. *Cell*. 2020;180:188–204. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.036.
176. Xu X, Li L, Luo L, Shu L, Si X, Chen Z, Xia W, Huang J, Liu Y, Shao A, Ke Y. Opportunities and challenges of glioma organoids. *Cell Commun Signal*. 2021 Oct 11;19(1):102. doi: 10.1186/s12964-021-00777-0. PMID: 34635112; PMCID: PMC8504127.
177. Zhang L, Liu F, Weygant N, Zhang J, Hu P, Qin Z, Yang J, Cheng Q, Fan F, Zeng Y, Tang Y, Li Y, Tang A, He F, Peng J, Liao W, Hu Z, Li M, Liu Z. A novel integrated system using

- patient-derived glioma cerebral organoids and xenografts for disease modeling and drug screening. *Cancer Lett.* 2021 Mar 1;500:87-97. doi: 10.1016/j.canlet.2020.12.013. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33309780.
178. Loong HH, Wong AM, Chan DT, Cheung MS, Chow C, Ding X, Chan AK, Johnston PA, Lau JY, Poon WS, Wong N. Patient-derived tumor organoid predicts drugs response in glioblastoma: A step forward in personalized cancer therapy? *J Clin Neurosci.* 2020 Aug;78:400-402. doi: 10.1016/j.jocn.2020.04.107. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32340843.
179. Jeong E, Choi S, Cho SW. Recent Advances in Brain Organoid Technology for Human Brain Research. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2023 Jan 11;15(1):200-219. doi: 10.1021/acsmami.2c17467. Epub 2022 Dec 5. PMID: 36468535.
180. Paşca AM, Sloan SA, Clarke LE, Tian Y, Makinson CD, Huber N, Kim CH, Park JY, O'Rourke NA, Nguyen KD, et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods.* 2015;12:671–8.
181. Liu SJ, Malatesta M, Lien BV, Saha P, Thombare SS, Hong SJ, Pedraza L, Koontz M, Seo K, Horlbeck MA, et al. CRISPRi-based radiation modifier screen identifies long non-coding RNA therapeutic targets in glioma. *Genome Biol.* 2020;21:83.
182. Rambani K., Vukasinovic J., Glezer A. and Potter S. M. (2009). Culturing thick brain slices: an interstitial 3D microperfusion system for enhanced viability. *J. Neurosci. Methods* 180, 243-254. 10.1016/j.jneumeth.2009.03.016
183. Lancaster M. A., Corsini N. S., Wolfinger S., Gustafson E. H., Phillips A. W., Burkard T. R., Otani T., Livesey F. J. and Knoblich J. A. (2017). Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids. *Nat. Biotechnol.* 35, 659-666. 10.1038/nbt.3906
184. Mansour A. A. F., Gonçalves J. T., Bloyd C. W., Li H., Fernandes S., Quang D., Johnston S., Parylak S. L., Jin X. and Gage F. H. (2018). An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat. Biotechnol.* 36, 432-441. 10.1038/nbt.4127
185. Borghese L., Dolezalova D., Opitz T., Haupt S., Leinhaas A., Steinfarz B., Koch P., Edenhofer F., Hampl A. and Brustle O. (2010). Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo. *Stem Cells* 28, 955-964. 10.1002/stem.408
186. Miller J. D., Ganat Y. M., Kishinevsky S., Bowman R. L., Liu B., Tu E. Y., Mandal P. K., Vera E., Shim J.-W., Kriks S. et al. (2013). Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* 13, 691-705. 10.1016/j.stem.2013.11.006
187. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. 2011. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474:212–215.
188. Farahany NA, Greely HT, Hyman S, Koch C, Grady C, Pasca SP, Sestan N, Arlotta P, Bernat JL, Ting J, Lunshof JE, Iyer EPR, Hyun I, Capestany BH, Church GM, Huang H, Song H. 2018. The ethics of experimenting with human brain tissue. *Nature* 556:429–432.
189. Lavazza A, Massimini M. 2018. Cerebral organoids: ethical issues and consciousness assessment. *J Med Ethics*

190. Chen HI, Song H, Ming GL. Applications of Human Brain Organoids to Clinical Problems. *Dev Dyn*. 2019 Jan;248(1):53-64. doi: 10.1002/dvdy.24662. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30091290; PMCID: PMC6312736.
191. Lavazza A. Potential ethical problems with human cerebral organoids: Consciousness and moral status of future brains in a dish. *Brain Res*. 2021 Jan 1;1750:147146. doi: 10.1016/j.brainres.2020.147146. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33068633.
192. Pasca S. P. (2018). The rise of three-dimensional human brain cultures. *Nature* 553, 437-445. 10.1038/nature25032
193. Workman M. J., Mahe M. M., Trisno S., Poling H. M., Watson C. L., Sundaram N., Chang C. F., Schiesser J., Aubert P., Stanley E. G. et al. (2017). Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat. Med.* 23, 49-59. 10.1038/nm.4233
194. Ogawa J., Pao G. M., Shokhirev M. N. and Verma I. M. (2018). Glioblastoma model using human cerebral organoids. *Cell Rep*. 23, 1220-1229. 10.1016/j.celrep.2018.03.105
195. Jabaudon D. and Lancaster M. (2018). Exploring landscapes of brain morphogenesis with organoids. *Development* 145, dev172049 10.1242/dev.172049
196. Yoon S.-J., Elahi L. S., Pasca A. M., Marton R. M., Gordon A., Revah O., Miura Y., Walczak E. M., Holdgate G. M., Fan H. C. et al. (2019). Reliability of human cortical organoid generation. *Nat. Methods* 16, 75-78. 10.1038/s41592-018-0255-0
197. Cruz-Acuña R., Quirós M., Farkas A. E., Dedhia P. H., Huang S., Siuda D., García-Hernández V., Miller A. J., Spence J. R., Nusrat A. et al. (2017). Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair. *Nat. Cell Biol.* 19, 1326-1335. 10.1038/ncb3632
198. Qian X., Nguyen H. N., Song M. M., Hadiono C., Ogden S. C., Hammack C., Yao B., Hamersky G. R., Jacob F., Zhong C. et al. (2016). Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell* 165, 1238-1254. 10.1016/j.cell.2016.04.032