

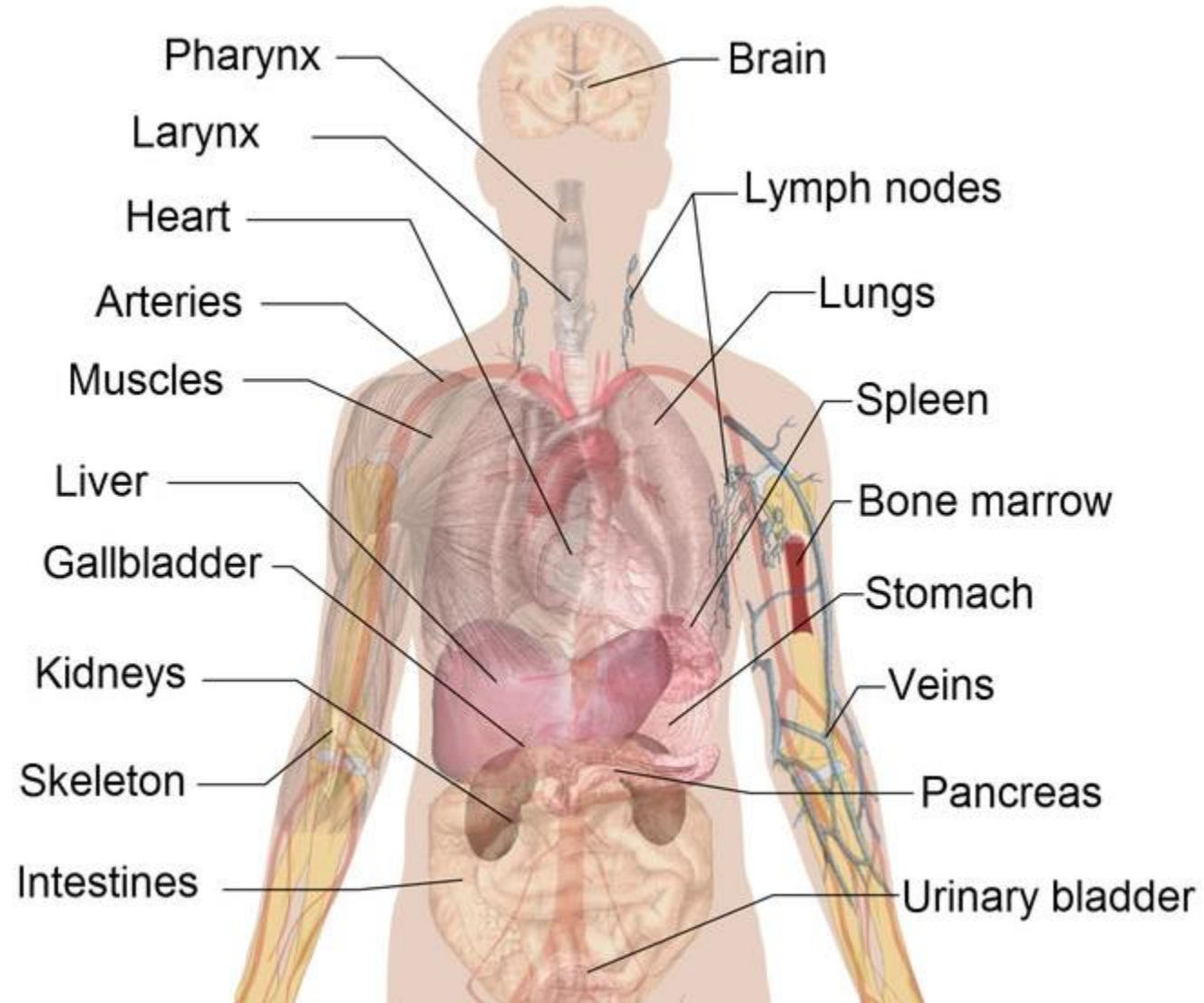
Οργανοειδή - μοντέλα ανάπτυξης και λειτουργίας οργάνων του ανθρώπου

Χριστίνα Κυρούση

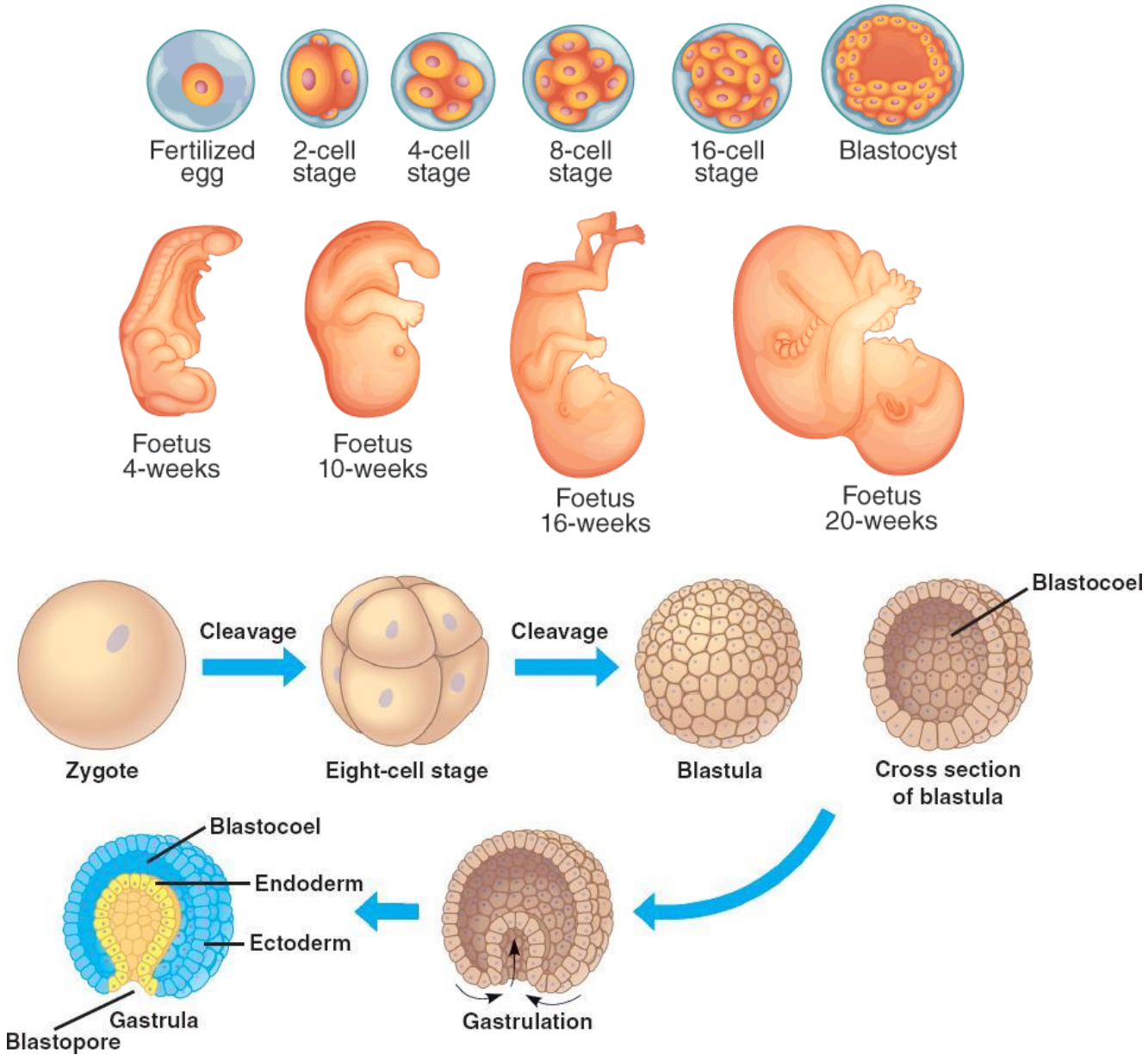
Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή

Email: ckyrousi@med.uoa.gr; ckyrousi@gmail.com

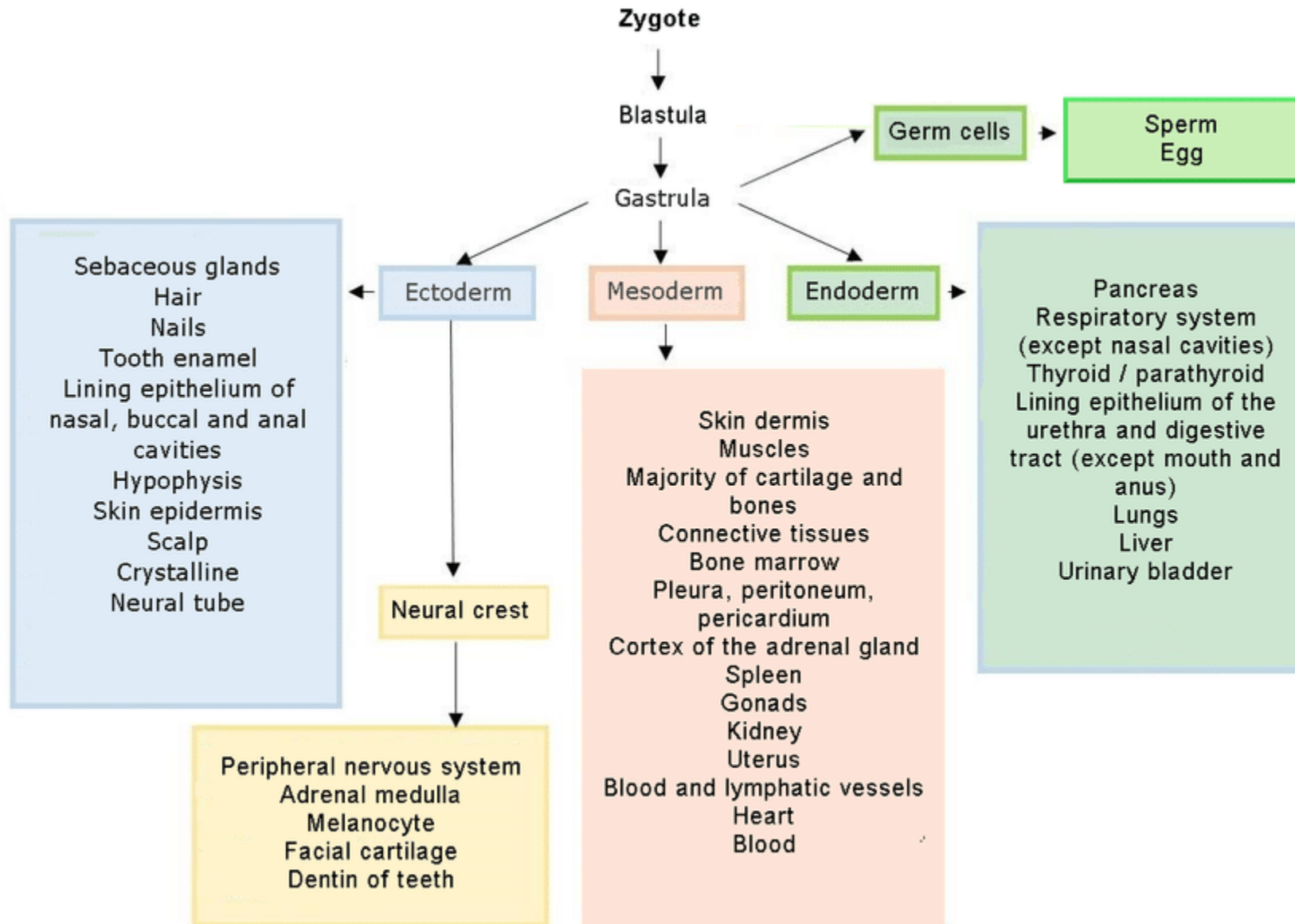
Ανθρώπινη ανατομία



Εμβρυϊκή ανάπτυξη – δημιουργία του ανθρώπινου σώματος



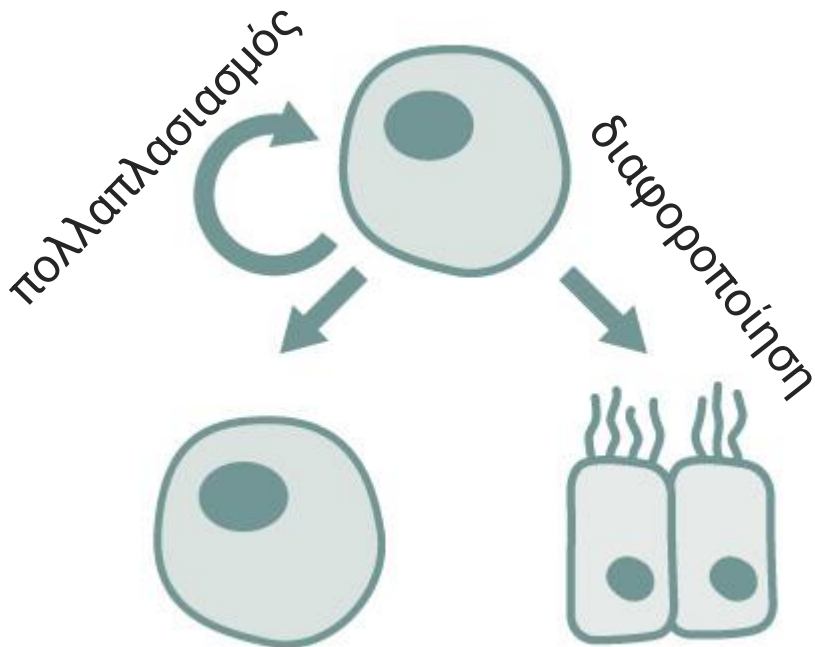
Εμβρυολογική προέλευση των ανθρώπινων οργάνων



Βλαστικά κύτταρα

Τα βλαστοκύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα που μπορούν:

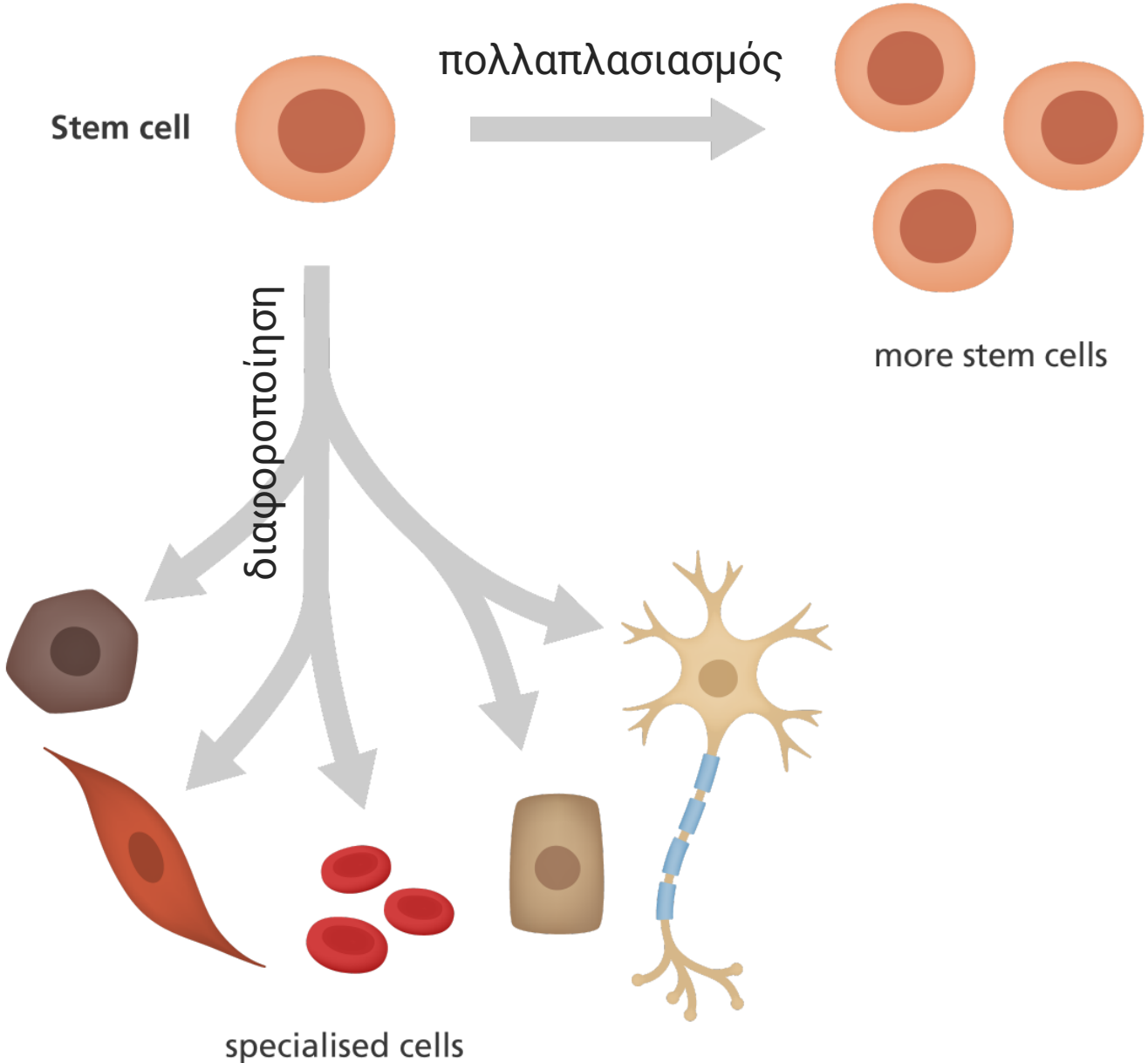
- να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον για να παράγουν πολλά βλαστοκύτταρα όμοια μεταξύ τους
- να διαφοροποιηθούν σε διάφορους τύπους κυττάρων.



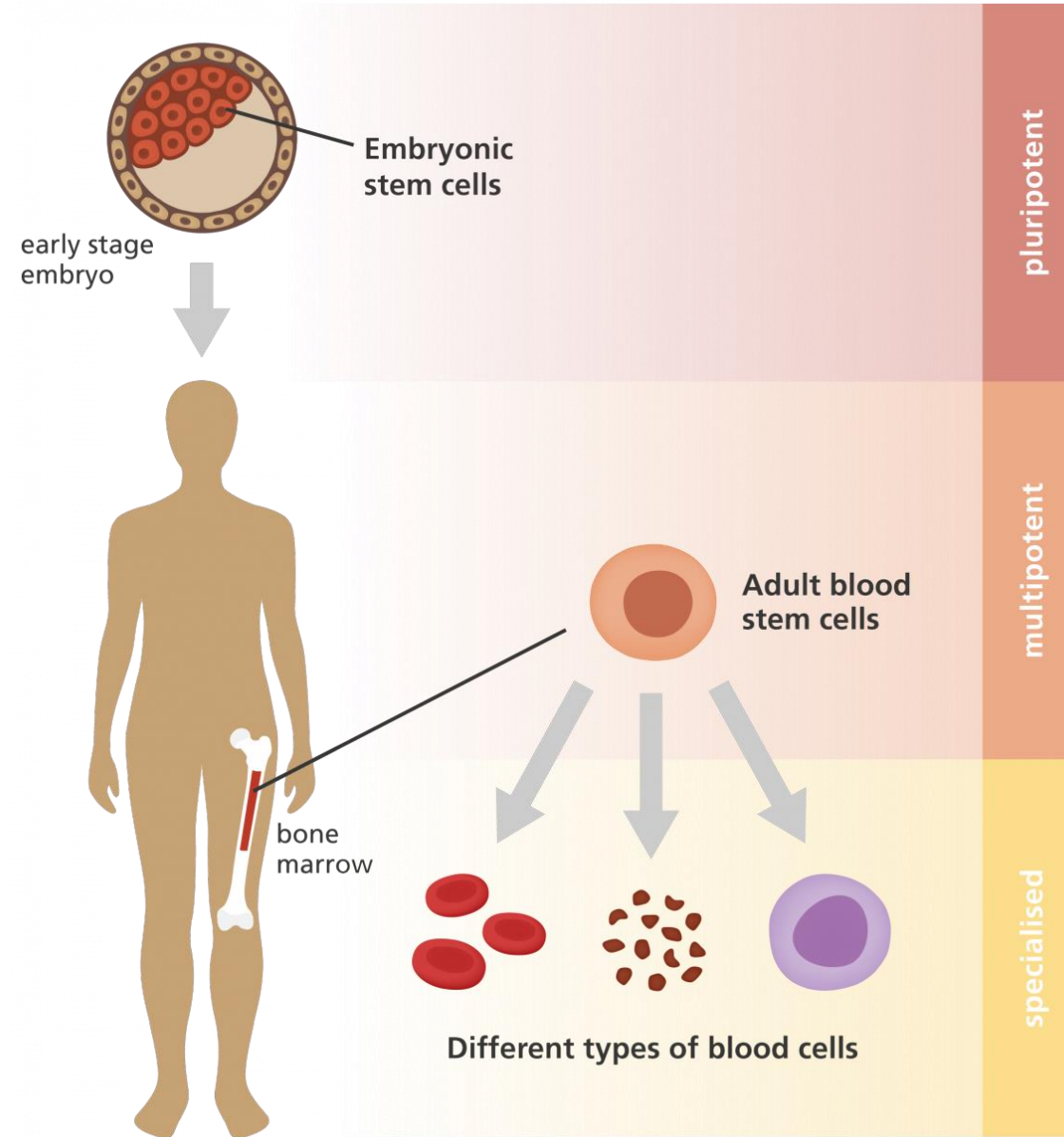
Το δυναμικό διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων τα κατηγοριοποιεί σε:

- Ολοδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε εμβρυϊκούς και εξωεμβρυϊκούς τύπους κυττάρων, μπορούν να κατασκευάσουν έναν πλήρη, βιώσιμο οργανισμό
- Πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι απόγονοι ολοδύναμων κυττάρων και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλα σχεδόν τα κύτταρα που προέρχονται από οποιοδήποτε από τα τρία βλαστικά στρώματα
- Εξειδικευμένα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διάφορους τύπους κυττάρων, αλλά μόνο σε αυτούς μιας στενά συγγενούς οικογένειας κυττάρων
- Ολιгодύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λίγους μόνο τύπους κυττάρων
- Μονοδύναμα κύτταρα μπορούν να παράγουν μόνο έναν τύπο κυττάρων, τον δικό τους, έχουν την ιδιότητα της αυτοανανέωσης, η οποία τα διακρίνει από τα μη βλαστοκύτταρα

Βλαστικά κύτταρα



Είδη βλαστικών κυττάρων



In vivo and *in vitro* μοντέλα ανάπτυξης του ανθρώπου και ασθενειών αυτού

In vivo animal
model systems



C. elegans



D. melanogaster



D. rerio

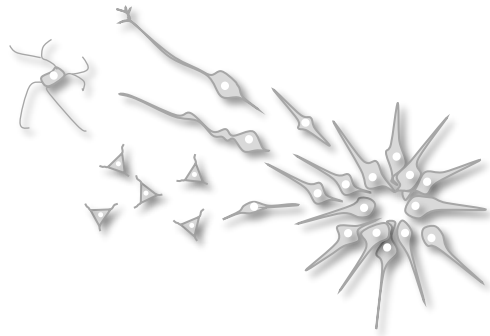


M. musculus

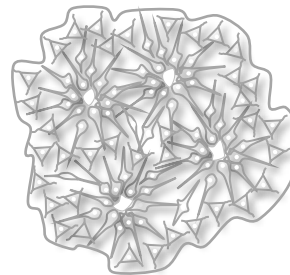


PDX

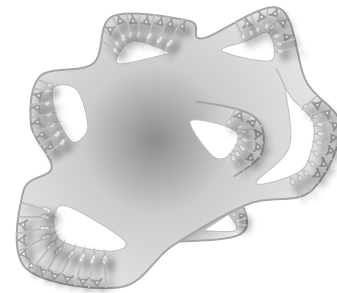
In vitro human
model systems



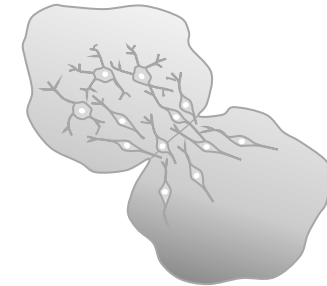
2D



spheroid



organoid

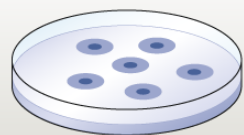


fused-organoids
assembloid

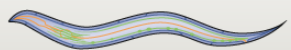
3D

Complexity

Σύγκριση οργανοειδών με άλλα μοντέλα



2D cell culture



C.elegans



D. melanogaster



D. rerio



M. musculus



PDX



Human organoids

Ease of establishing system

✓/✗

✓

✓

✓

✓

✓

✓

Ease of maintenance

✓

✓

✓

✓

✓

✓

✓

Recapitulation of developmental biology

✗

✓

✓

✓

✓

✗

✓

Duration of experiments

✓

✓

✓

✓

✓

✓

✓

Genetic manipulation

✓

✓

✓

✓

✓

✗

✓

Genome-wide screening

✓

✓

✓

✓

✗

✗

✓

Physiological complexity

✗

✓

✓

✓

✓

✓

✓

Relative cost

✓

✓

✓

✓

✓

✓

✓

Recapitulation of human physiology

✓

✓

✓

✓

✓

✓

✓

✓ Best

✓ Good

✓ Partly suitable

✗ Not suitable

Τι είναι τα οργανοειδή;

Τα οργανοειδή είναι μικροσκοπικά συσσωματώματα κυττάρων που προέρχονται από βλαστοκύτταρα *in vitro*.

Σχηματίζονται ως τρισδιάστατες δομές που μοιάζουν με ιστούς ή όργανα

Δημιουργούνται βασιζόμενα τις ικανότητες αυτοανανέωσης και πολλαπλής διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων

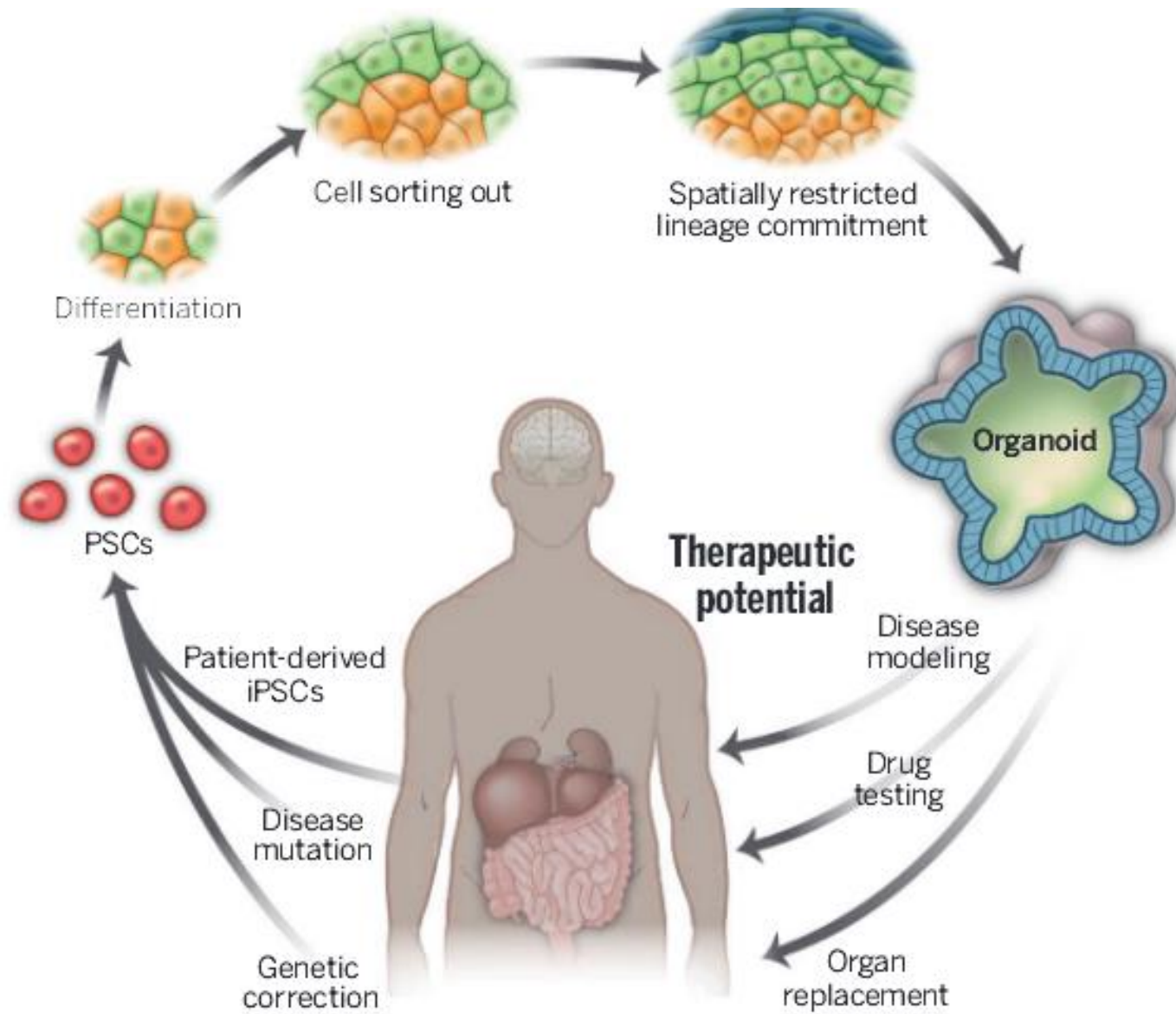
Σε σύγκριση με τις συμβατικές καλλιέργειες κυττάρων (2D) και τα σφαιροειδή, τα οργανοειδή είναι ανατομικά και λειτουργικά κοντά στα όργανα του ζωντανού σώματος

Αυτές οι δομές ιστών χρησιμοποιούνται στη βασική έρευνα, όπως η εμβρυολογία, η φυσιολογία και η εξέλιξη, καθώς και στη μεταφραστική έρευνα, για χαρακτηρισμό παθολογικών παθήσεων και της έρευνας ανακάλυψης φαρμάκων

Τα οργανοειδή μπορούν να κατασκευαστούν τόσο από φυσιολογικούς όσο και από ασθενείς ιστούς, επιτρέποντας τη χρήση τους σε διάφορες ερευνητικές εφαρμογές

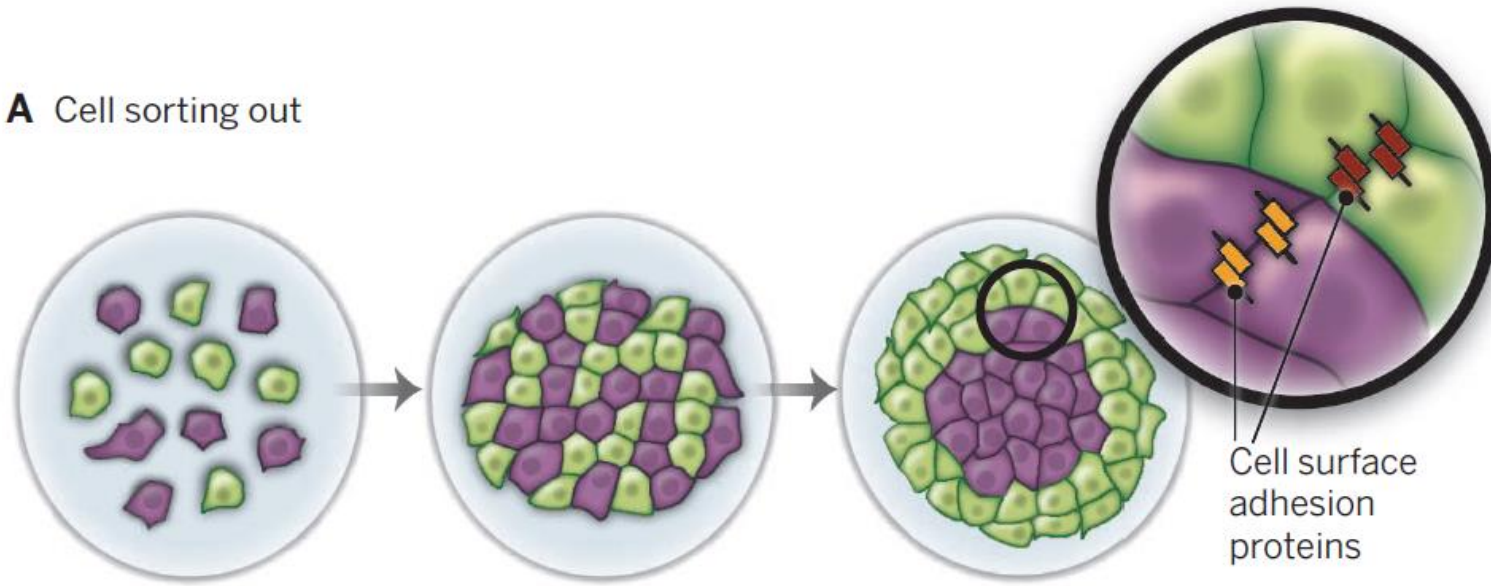
Στο μέλλον, θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εφαρμοσμένη έρευνα για την αναγεννητική ιατρική ----> χρήση οργανοειδών για μεταμόσχευση

Δημιουργία οργανοειδών

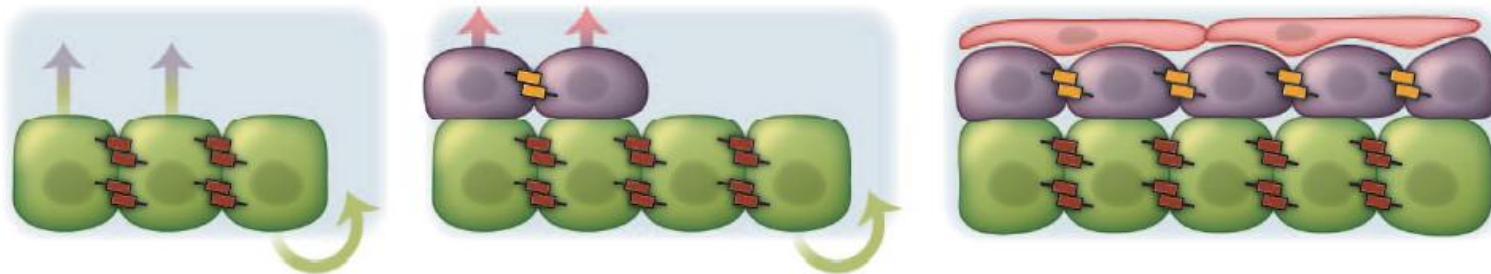


Αρχές αυτό-οργάνωσης οργανοειδών

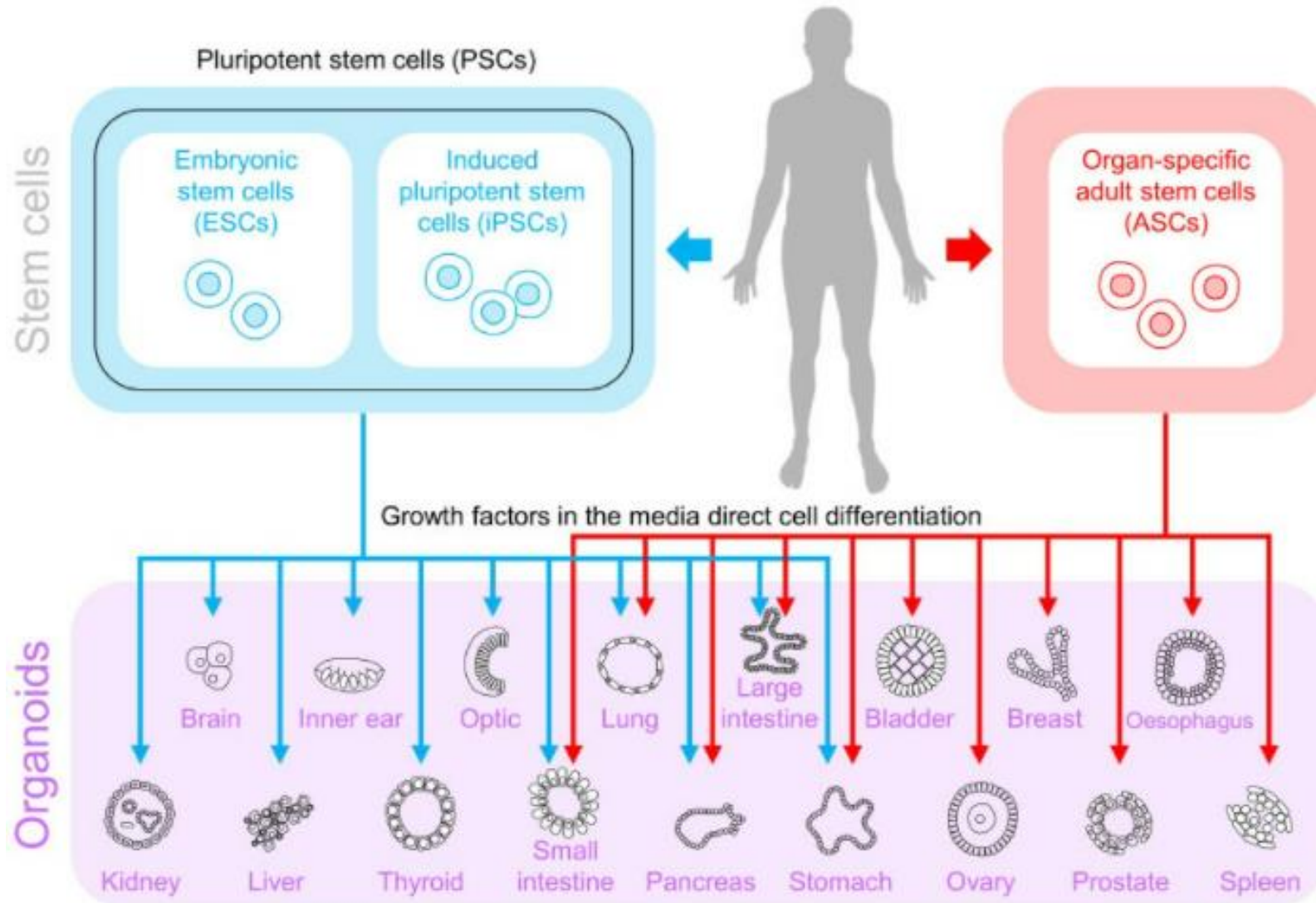
A Cell sorting out

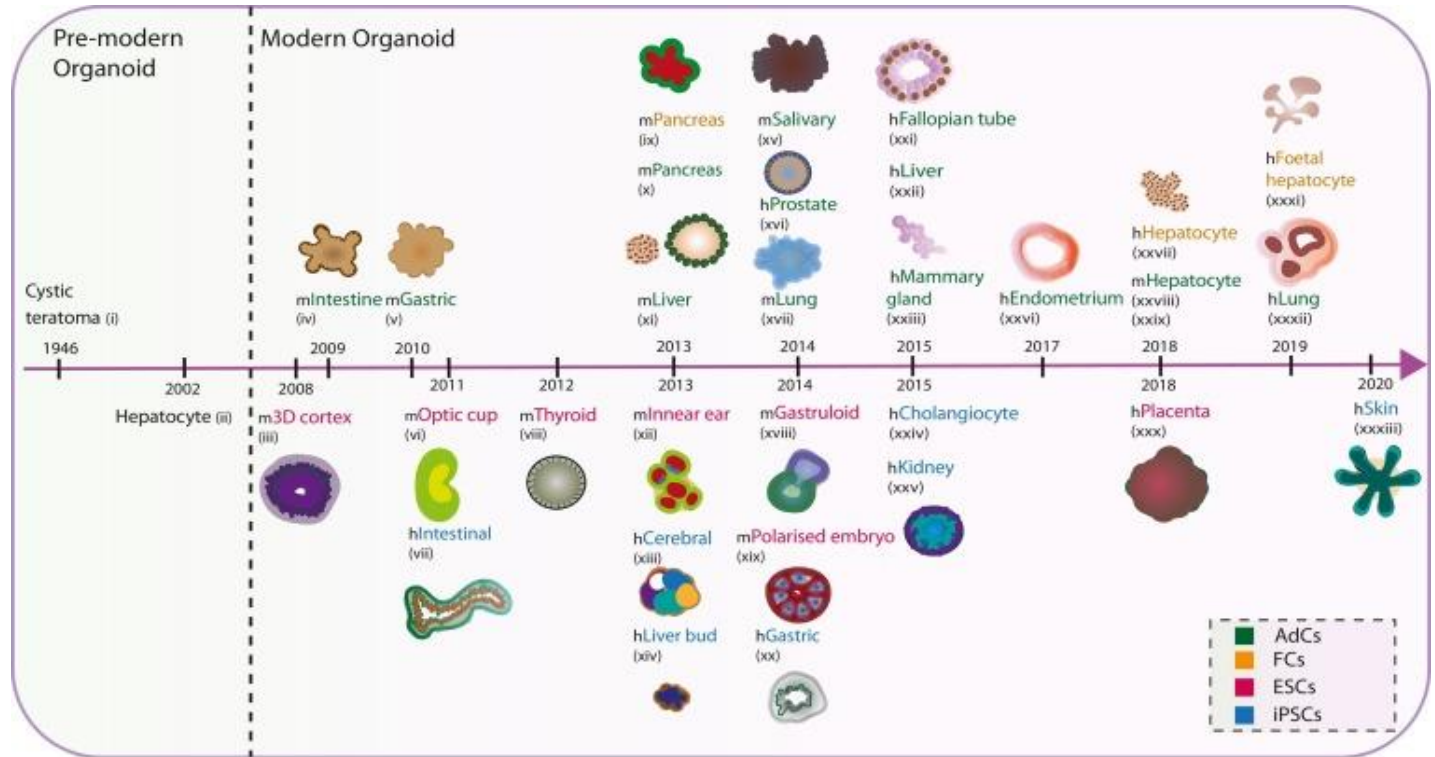
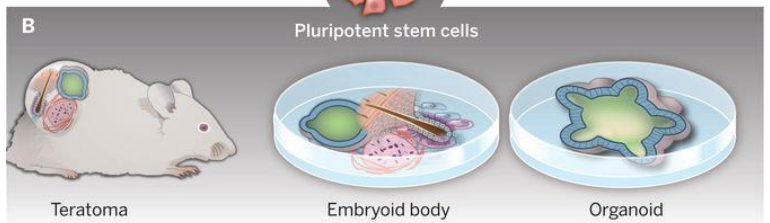
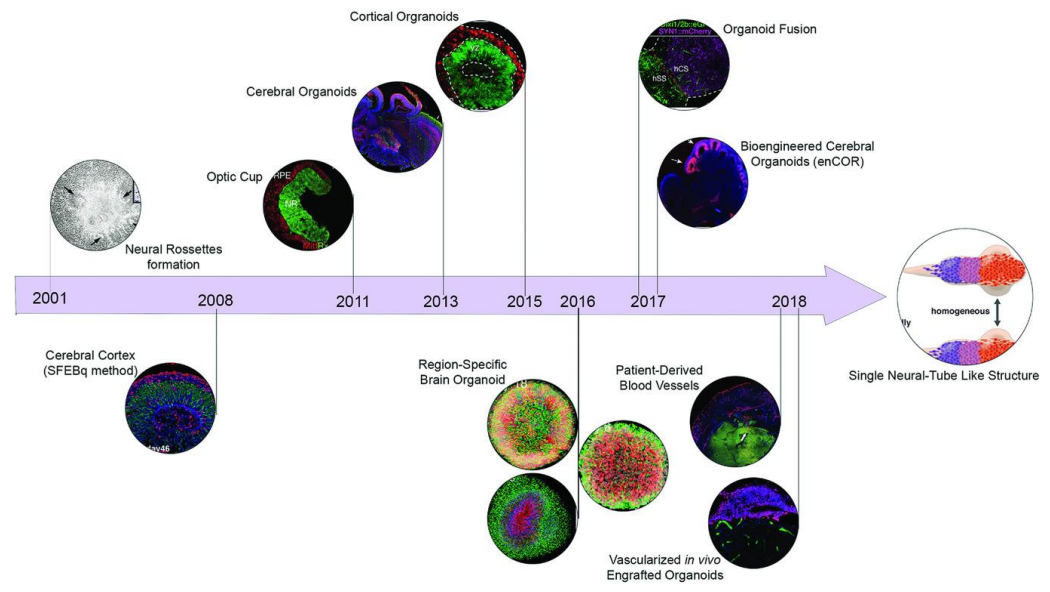
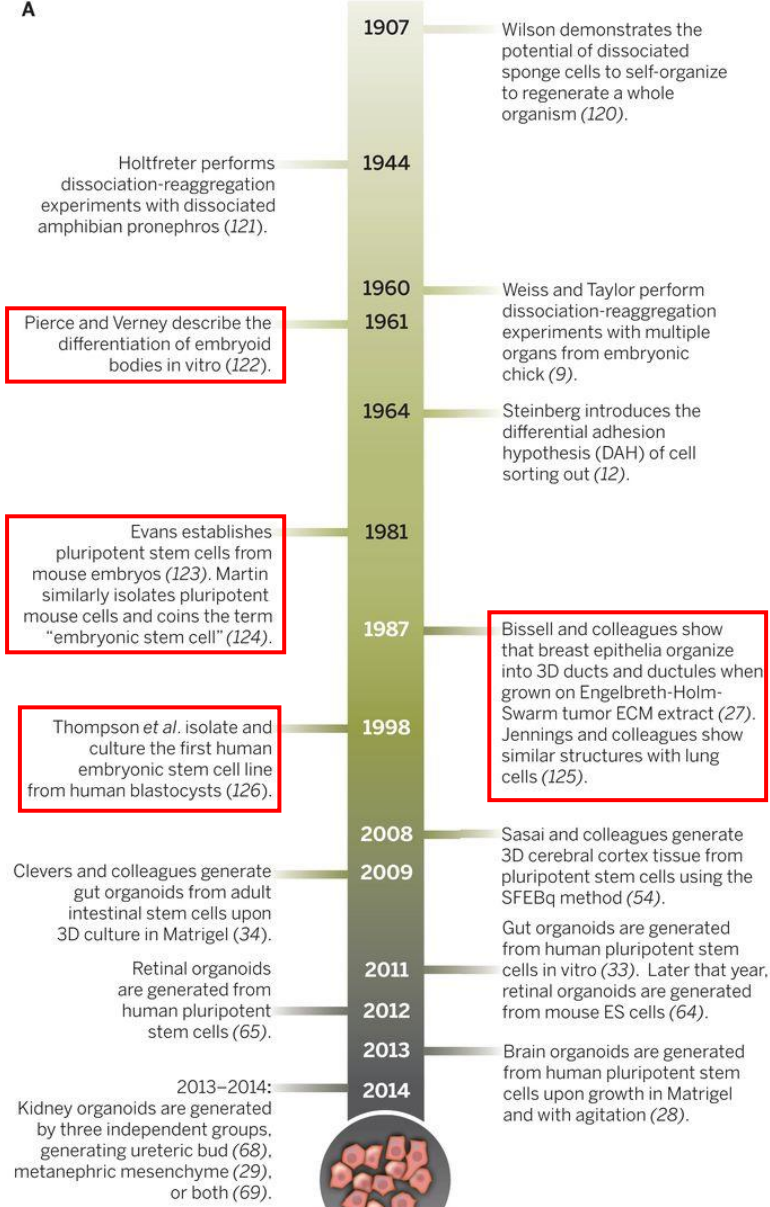


B Spatially restricted lineage commitment

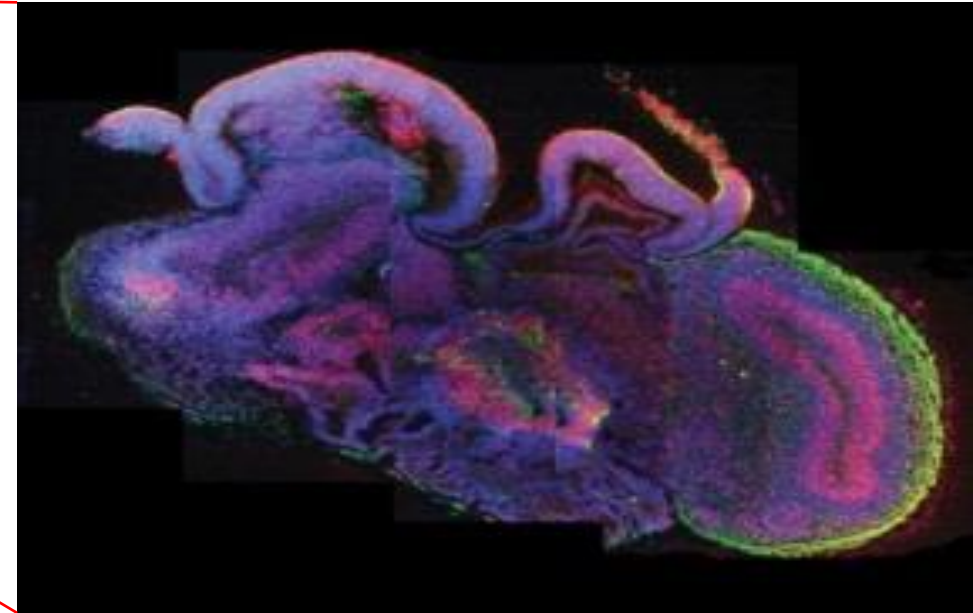
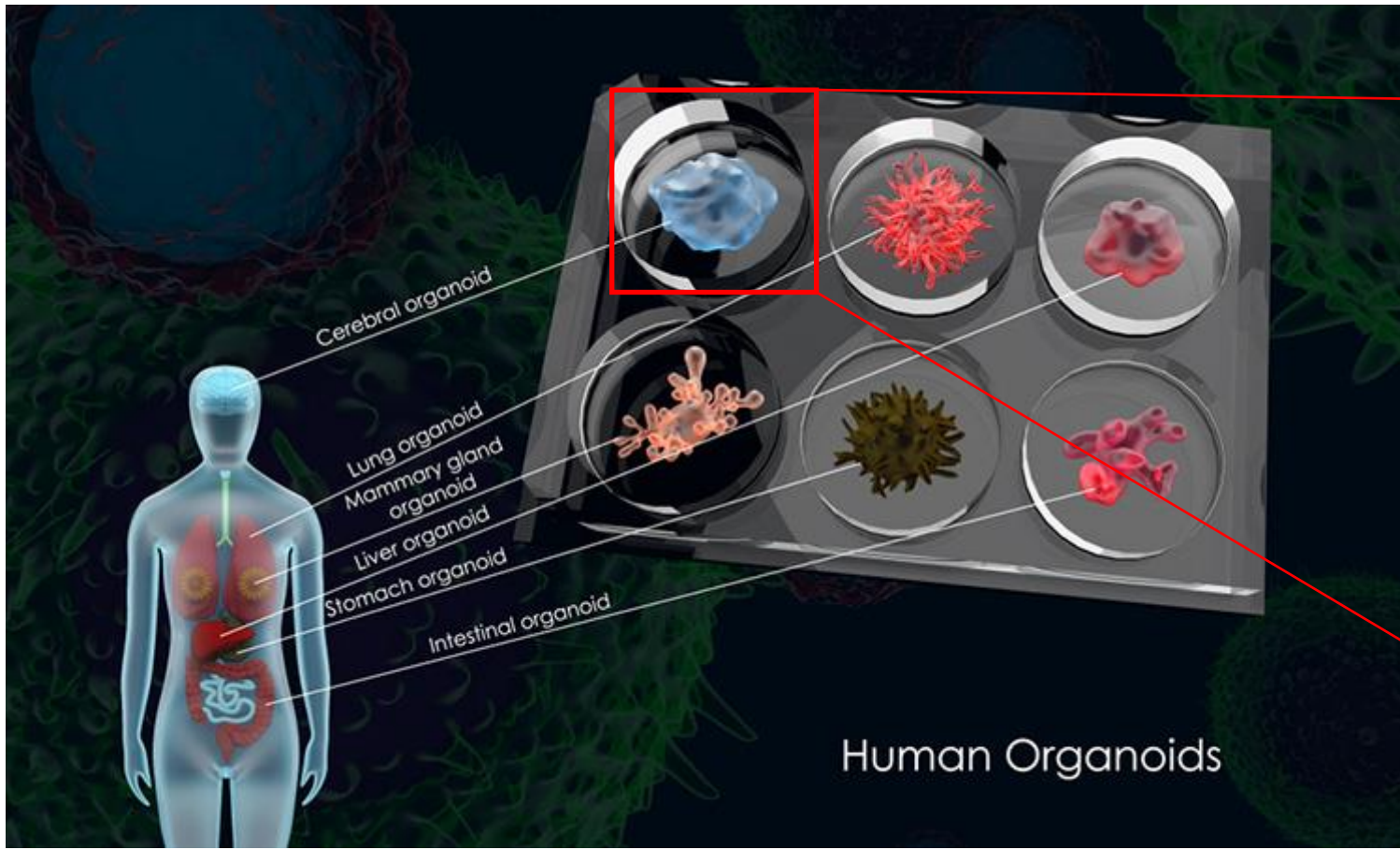


Διαφορετικά είδη οργανοειδών – Διαφορετική κυτταρική προέλευση

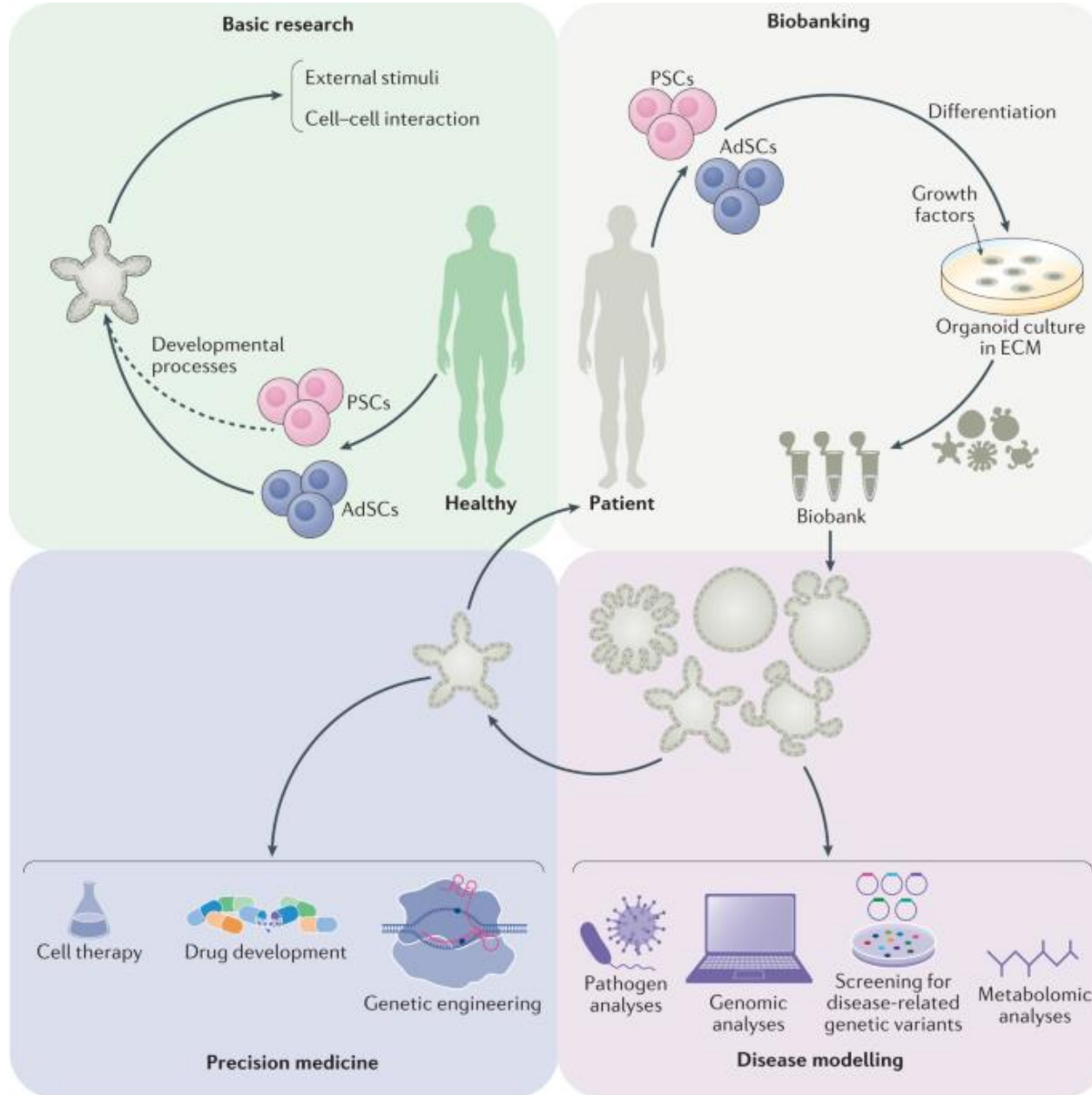




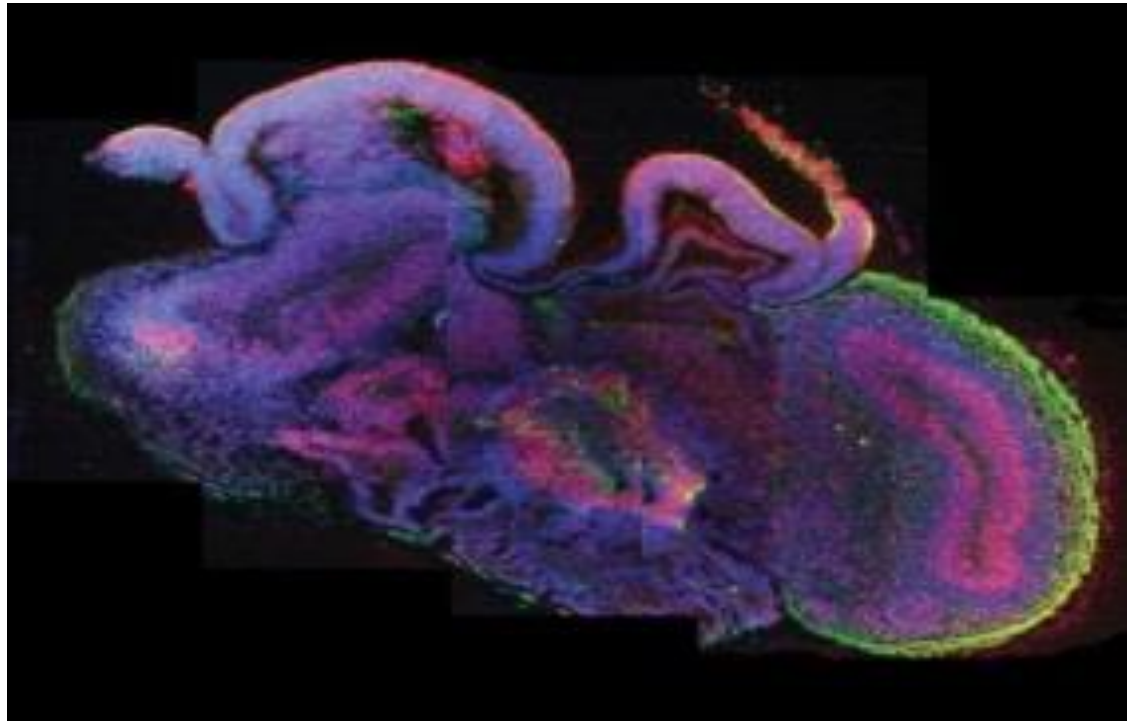
Διαφορετικά είδη οργανοειδών



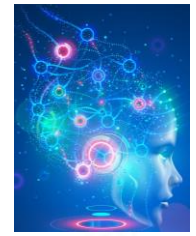
Εφαρμογές των οργανοειδών



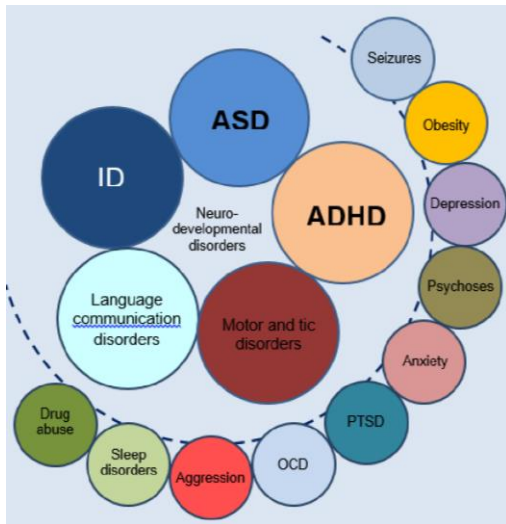
Το παράδειγμα των εγκεφαλικών οργανοειδών



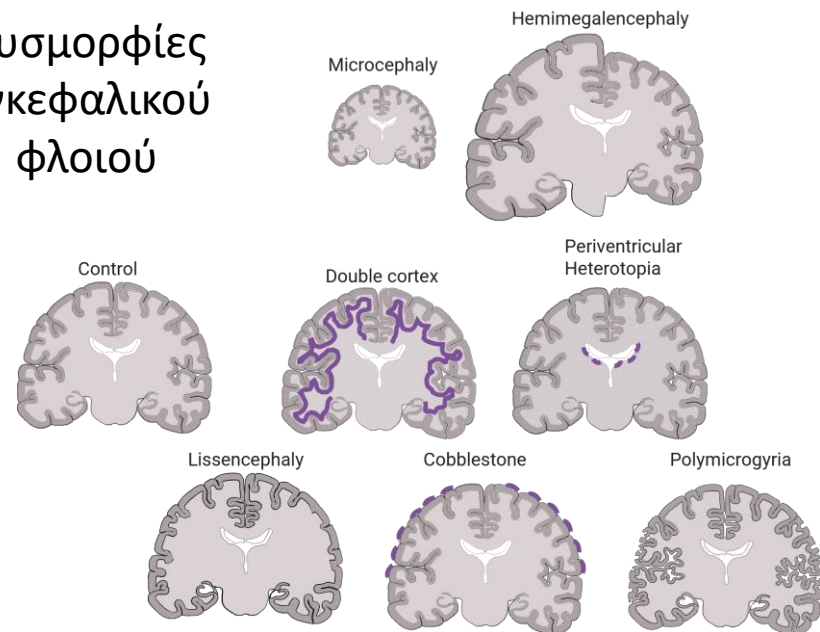
Κατασκευάζοντας τον ανθρώπινο εγκέφαλο



Νευροαναπτυξιακές ασθένειες

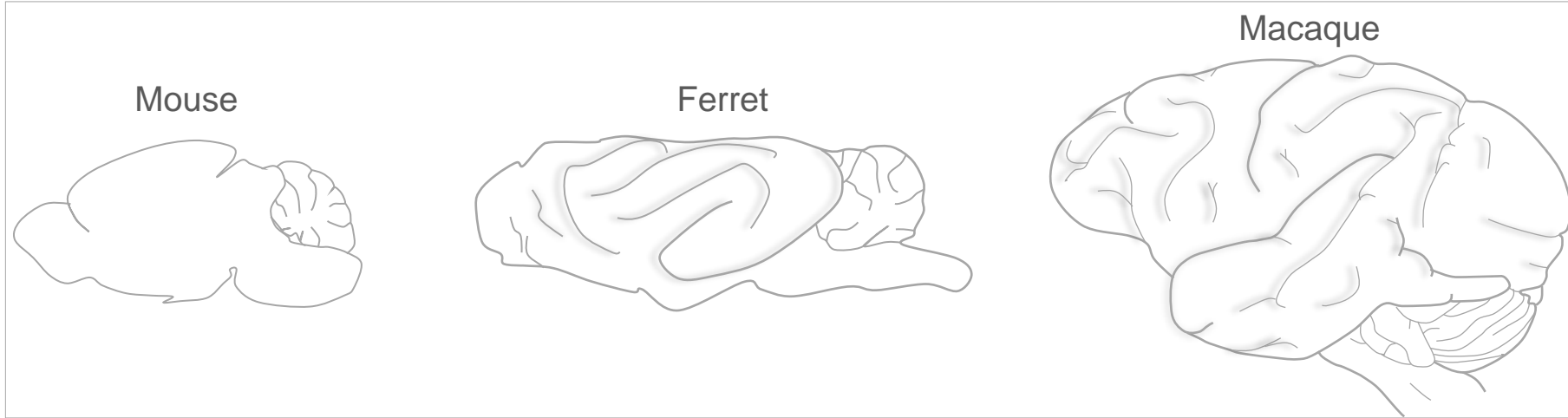


Δυσμορφίες εγκεφαλικού φλοιού

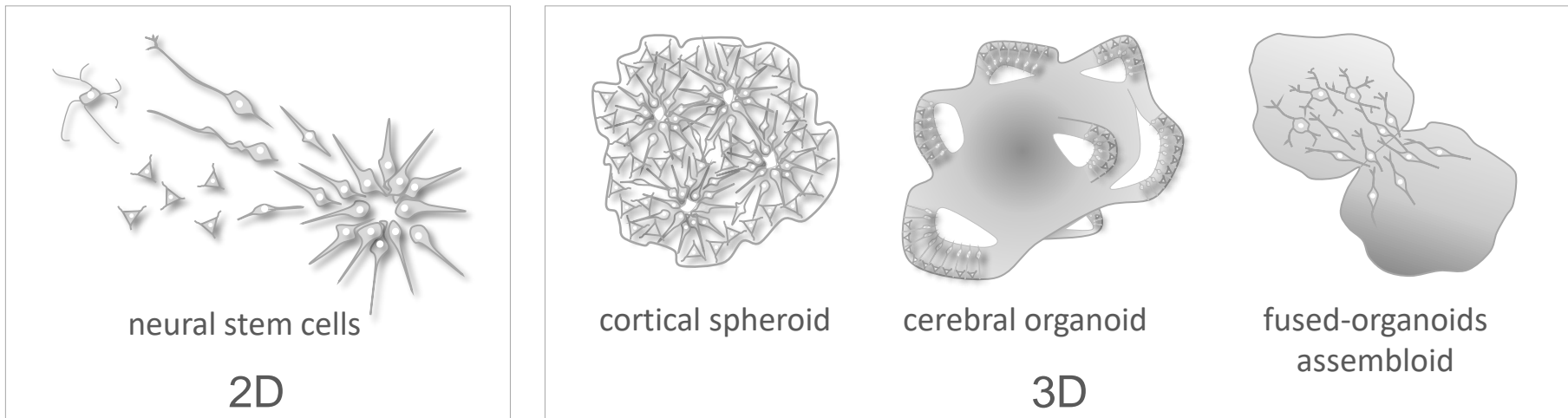


In vivo and *in vitro* μοντέλα ανάπτυξης του ανθρώπινου εγκεφάλου Και ασθενειών αυτού

In vivo animal
model systems

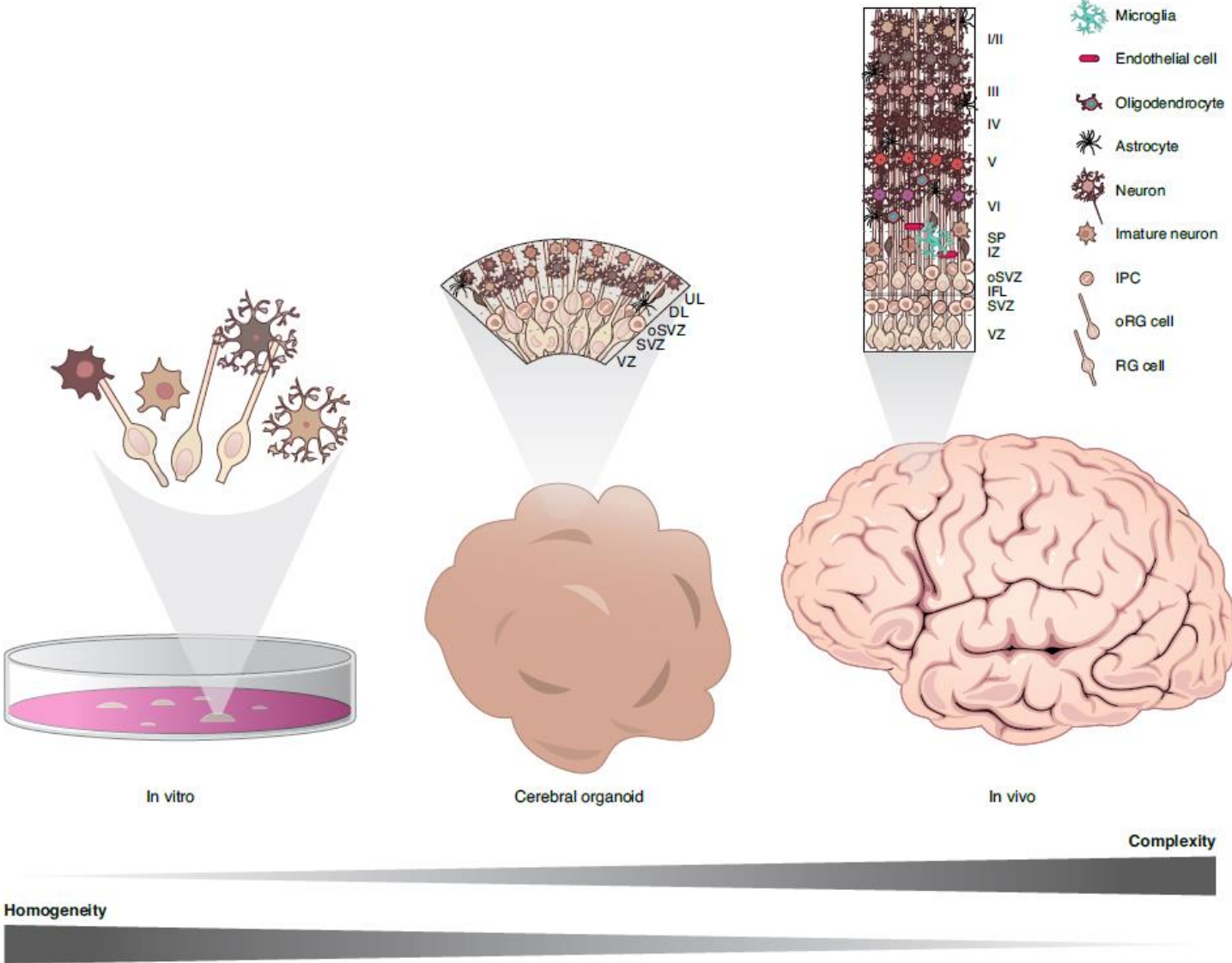


In vitro human
model systems

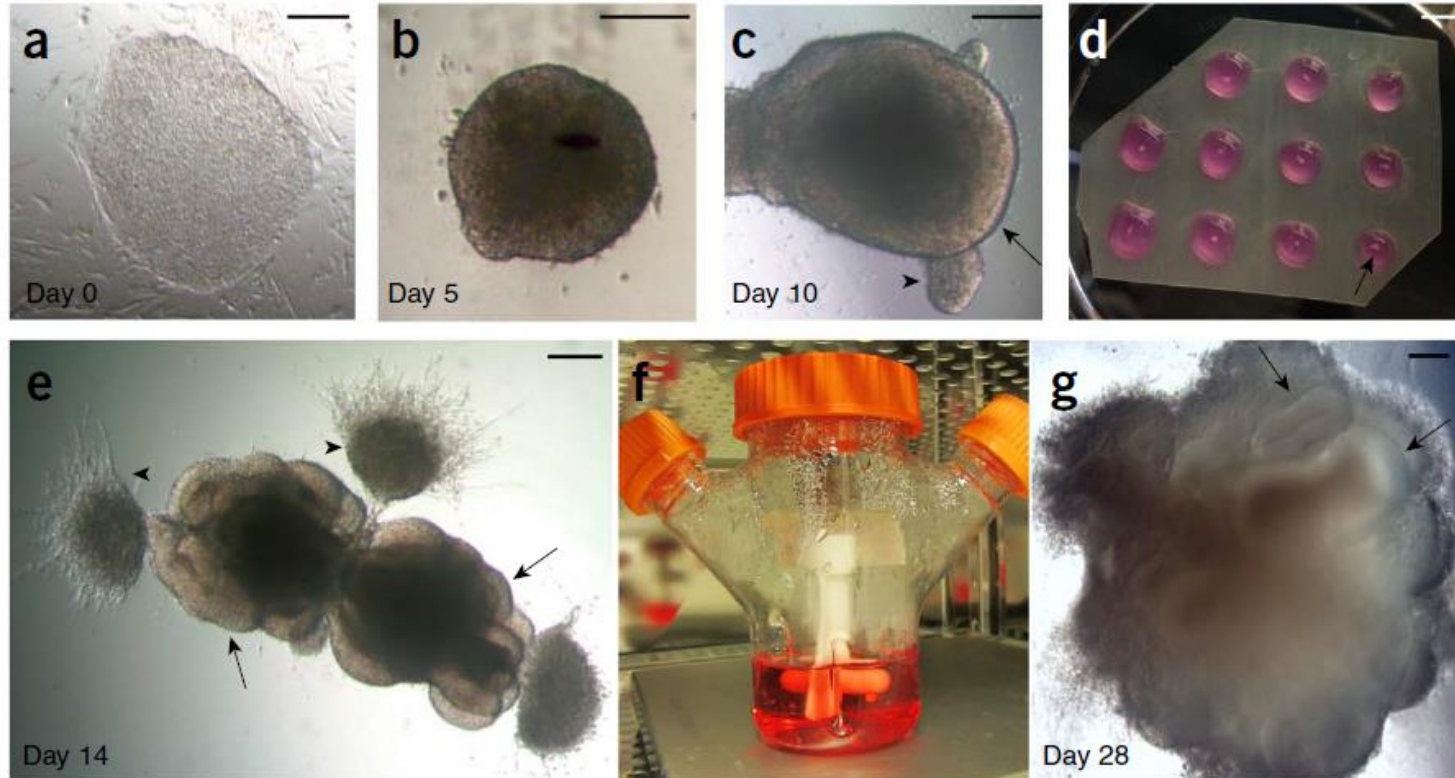


Complexity

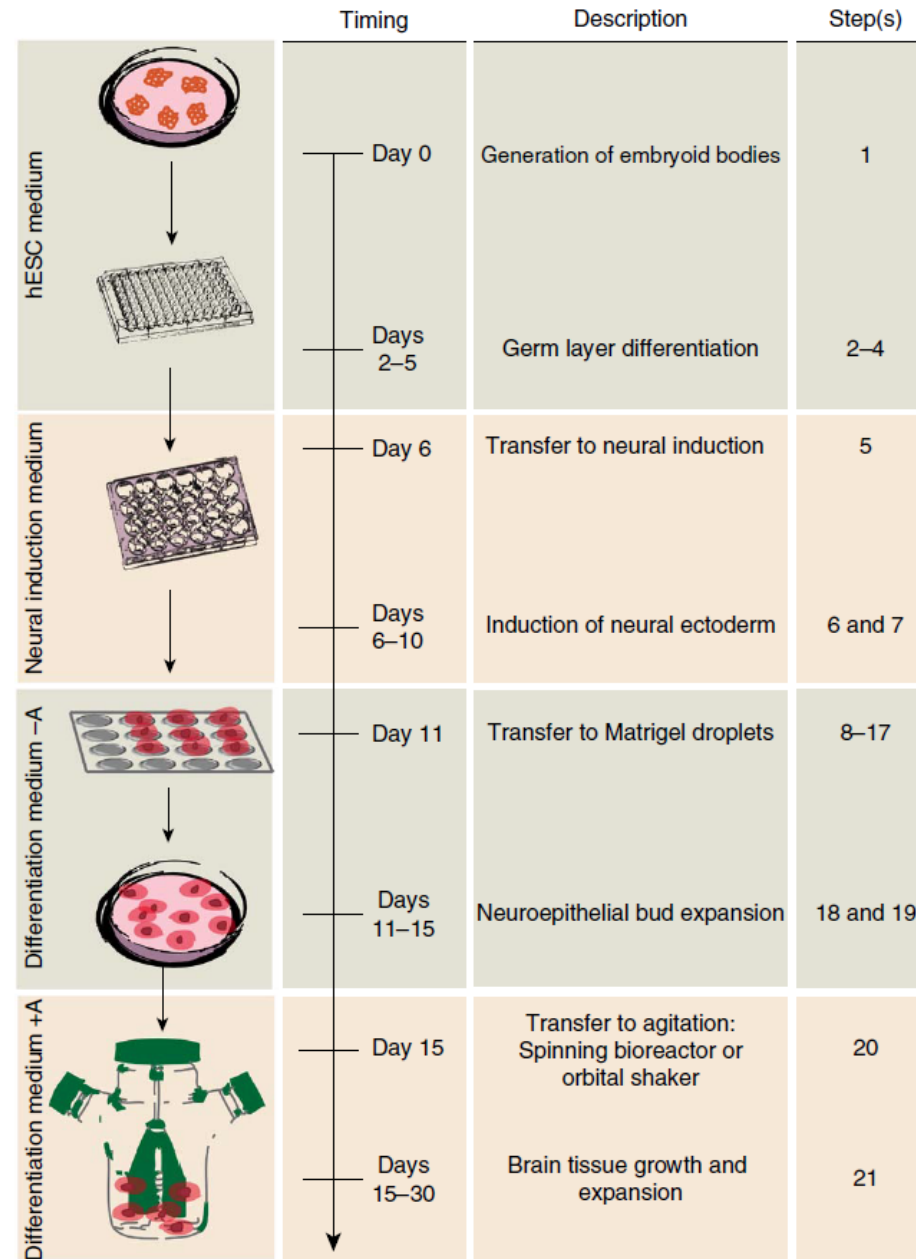
Εγκεφαλικά οργανοειδή στο μεταίχμιο μεταξύ *in vivo* and *in vitro*



Εγκεφαλικά οργανοειδή αναπτυσσόμενα από iPSCs

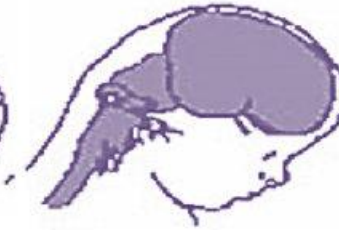


Εγκεφαλικά οργανοειδή – Πειραματικός σχεδιασμός πρωτοκόλλου



Εγκεφαλικά οργανοειδή: ομοιότητα με τον αναπτυσσόμενο ανθρώπινο εγκέφαλο

Brain developmental stages



embryonic

early fetal

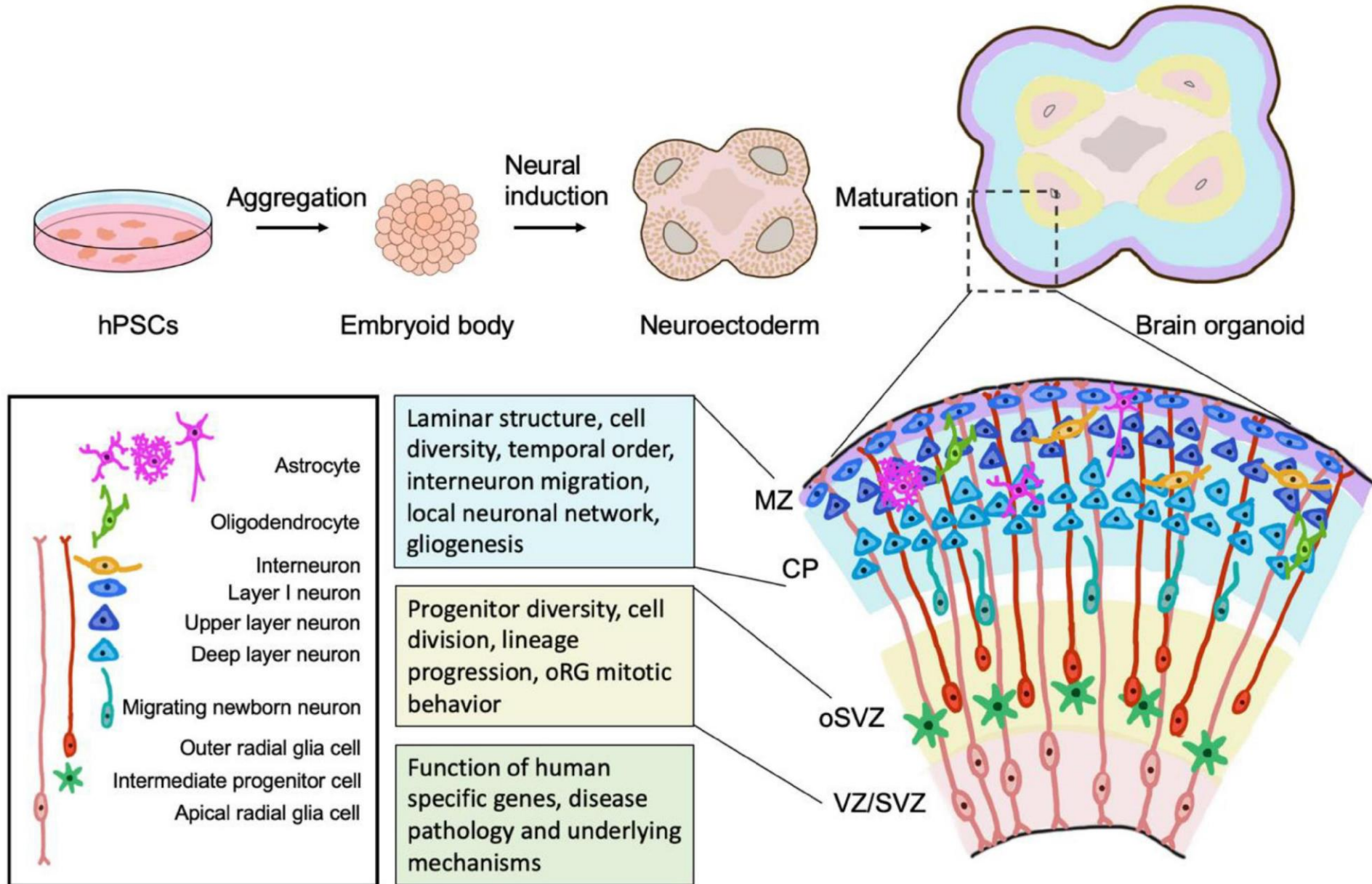
early mid fetal

late mid fetal



Brain organoids

Εγκεφαλικά οργανοειδή: ομοιότητα με τον αναπτυσσόμενο ανθρώπινο εγκέφαλο

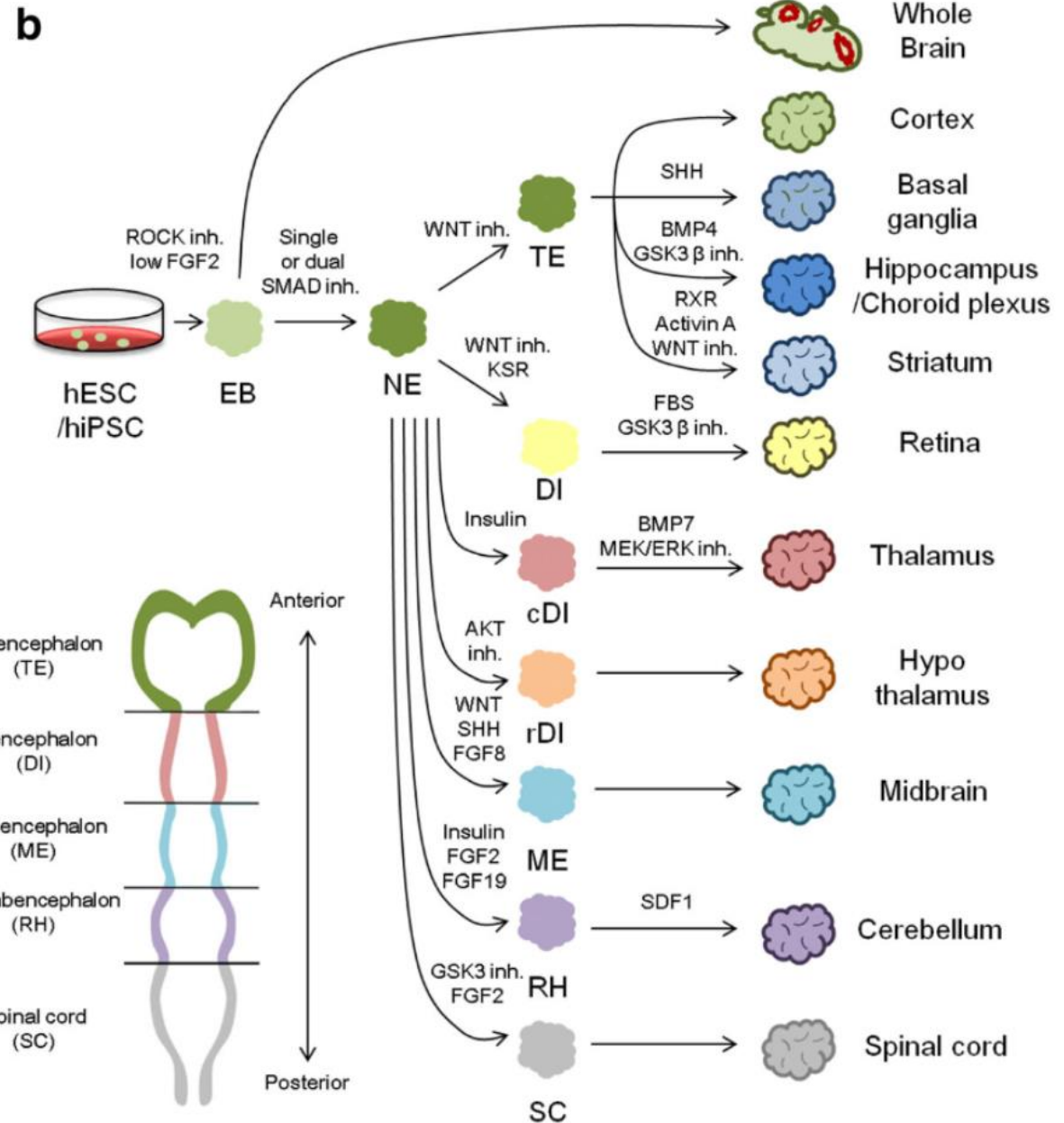
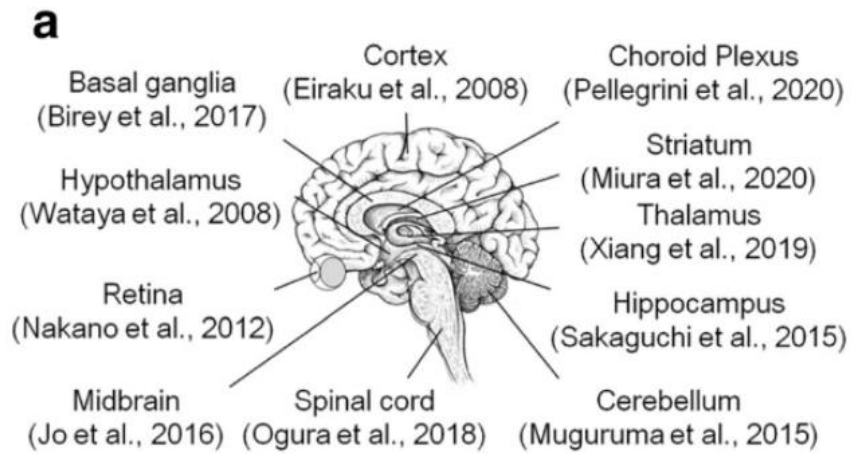


Τι είδους εγκεφαλικά οργανοειδή μπορούμε να δημιουργήσουμε;

Πως μπορούμε να τροποποιήσουμε τα εγκεφαλικά οργανοειδή;

Τι είδους ερωτήματα μπορούμε να απαντήσουμε με τη χρήση τους;

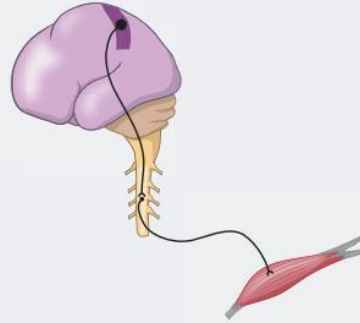
Επισκόπηση των διαφόρων πρωτοκόλλων δημιουργίας οργανοειδών του εγκεφάλου



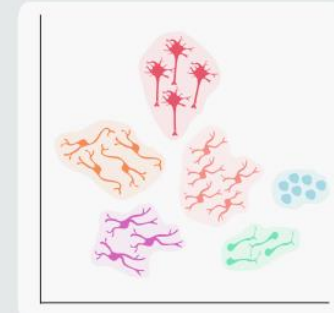
Assembloids

μετανάστευση διάμεσων νευρώνων

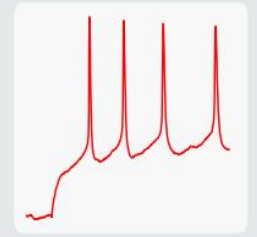
Human cortico-spinal-muscle pathway



Generation of hiPS cell-derived region-specific organoids: hSpS

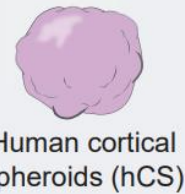


Single-cell RNAseq



Electrophysiological recordings

hiPS cells



Human cortical spheroids (hCS)

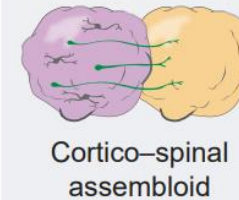


Human spinal spheroids (hSpS)

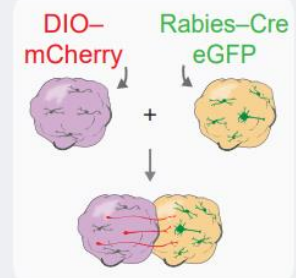


Human skeletal muscle spheroids (hSkM)

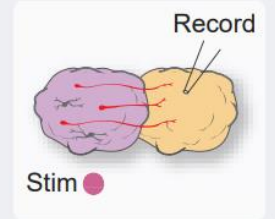
Corticofugal projections in cortico-spinal assembloids



Cortico-spinal assembloid

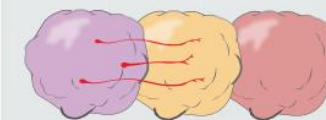


Retrograde rabies tracing



Optogenetics and patch clamping

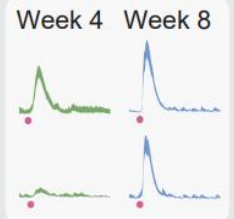
Stimulation of cortical neurons controls muscle contraction in cortico-motor assembloids



Cortico-motor assembloid

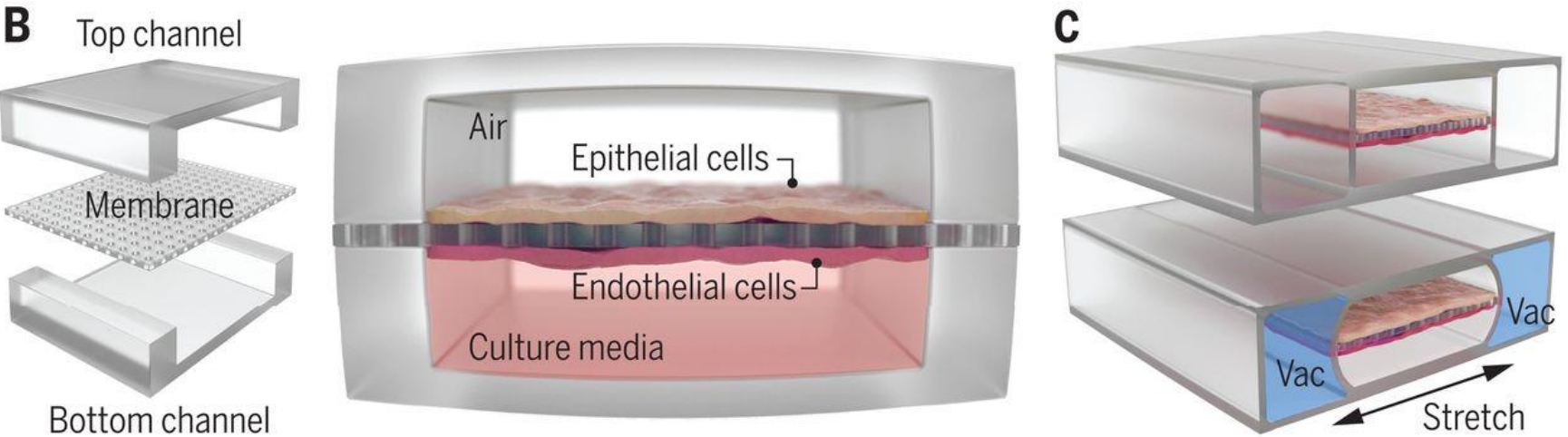
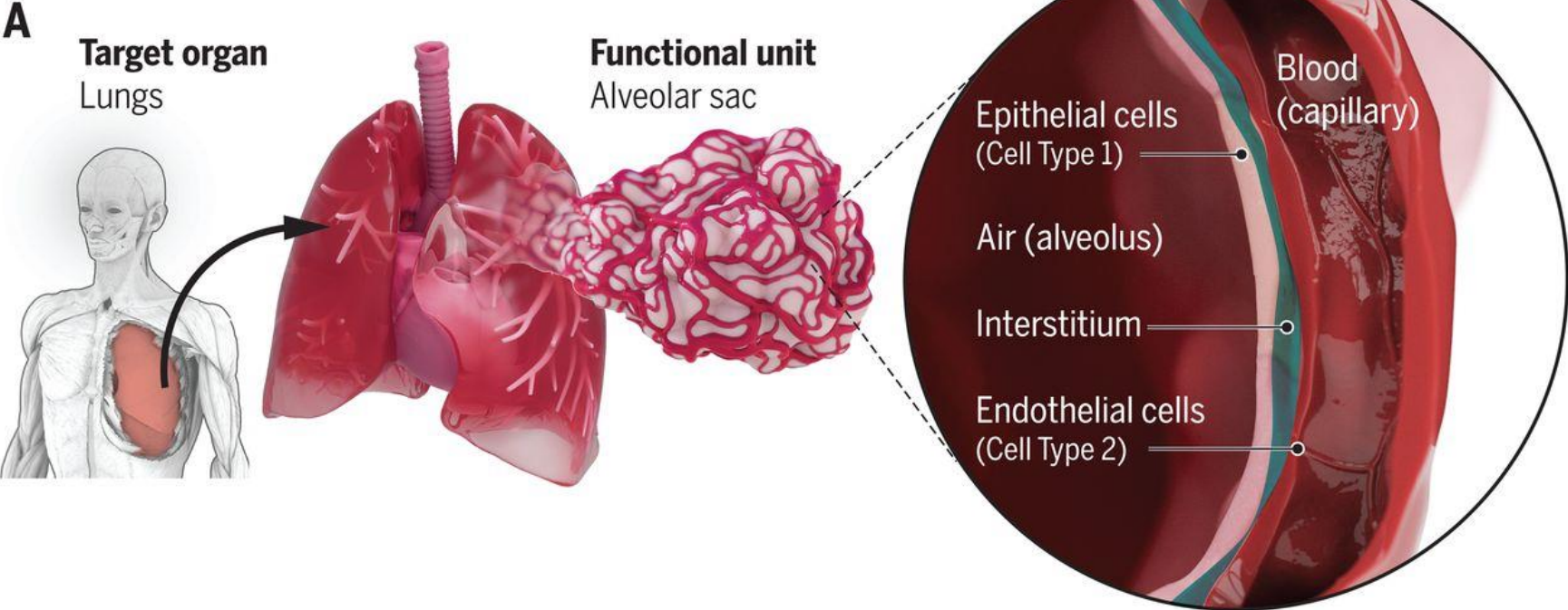


Optogenetics and calcium imaging

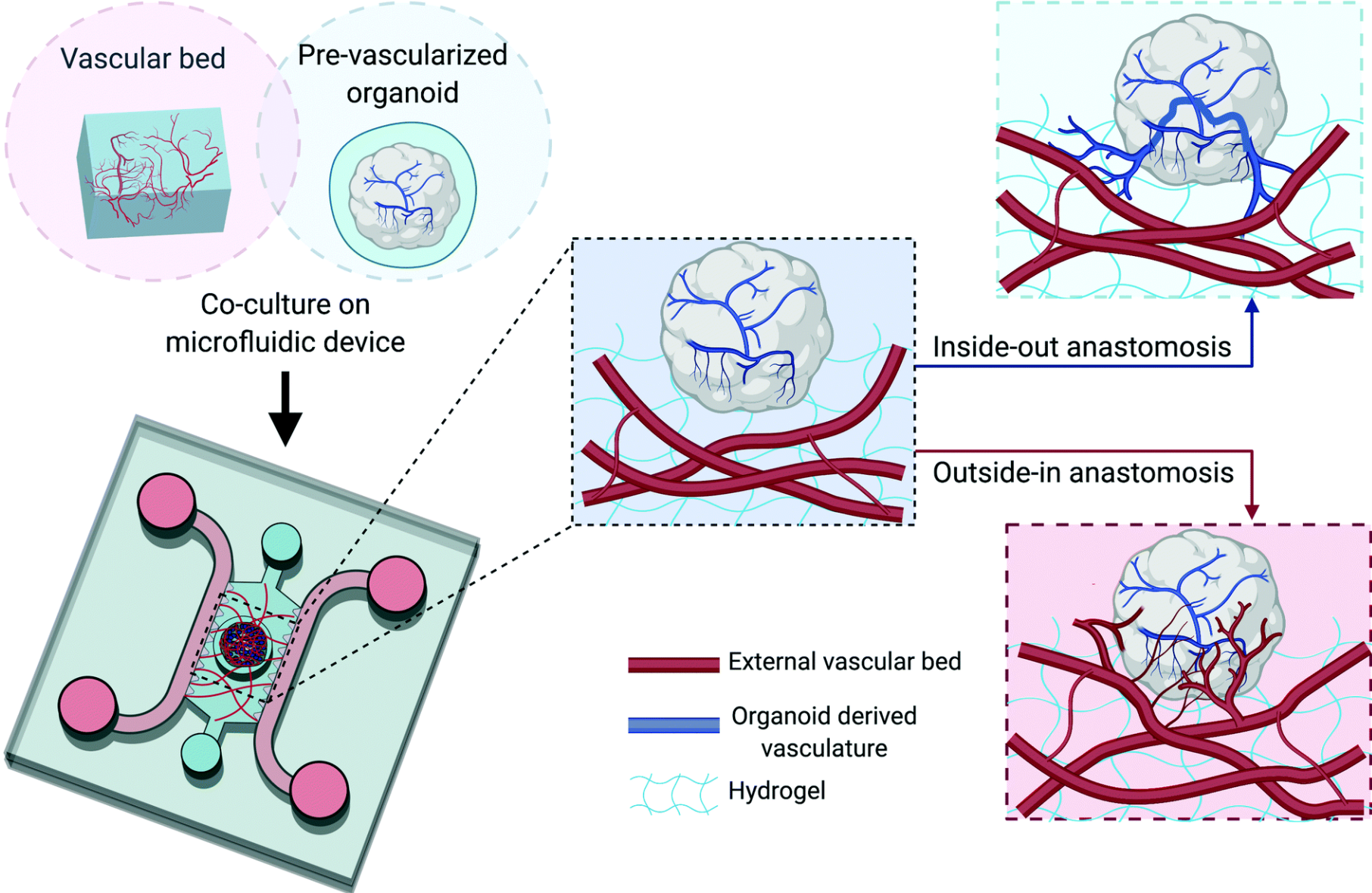


Long term *in vitro* functionality

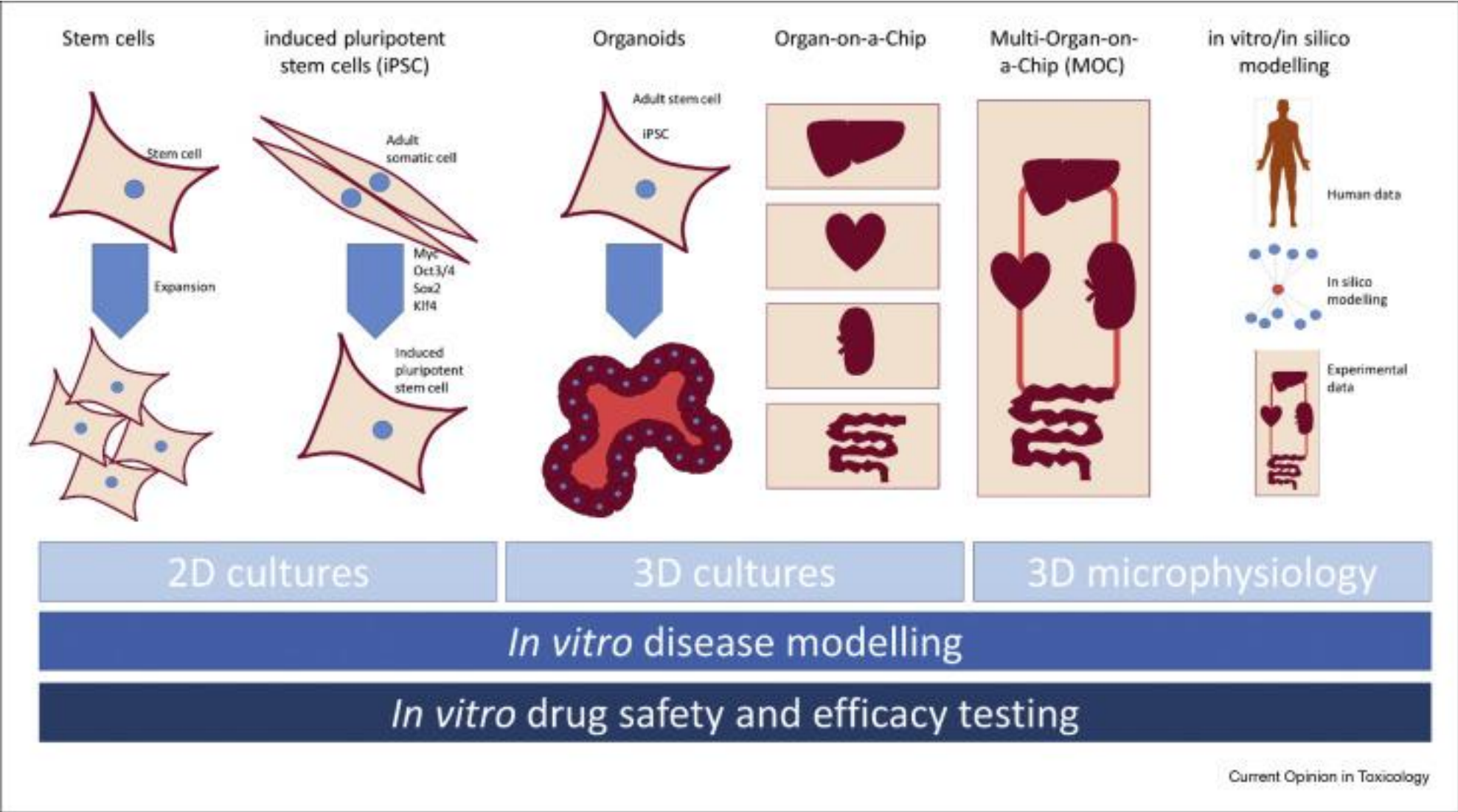
Organoids-on-a-chip



Organoids-on-a-chip



Organoids-on-a-chip



Τι είδους εγκεφαλικά οργανοειδή μπορούμε να δημιουργήσουμε;

Πως μπορούμε να τροποποιήσουμε τα εγκεφαλικά οργανοειδή;

Τι είδους ερωτήματα μπορούμε να απαντήσουμε με τη χρήση τους;

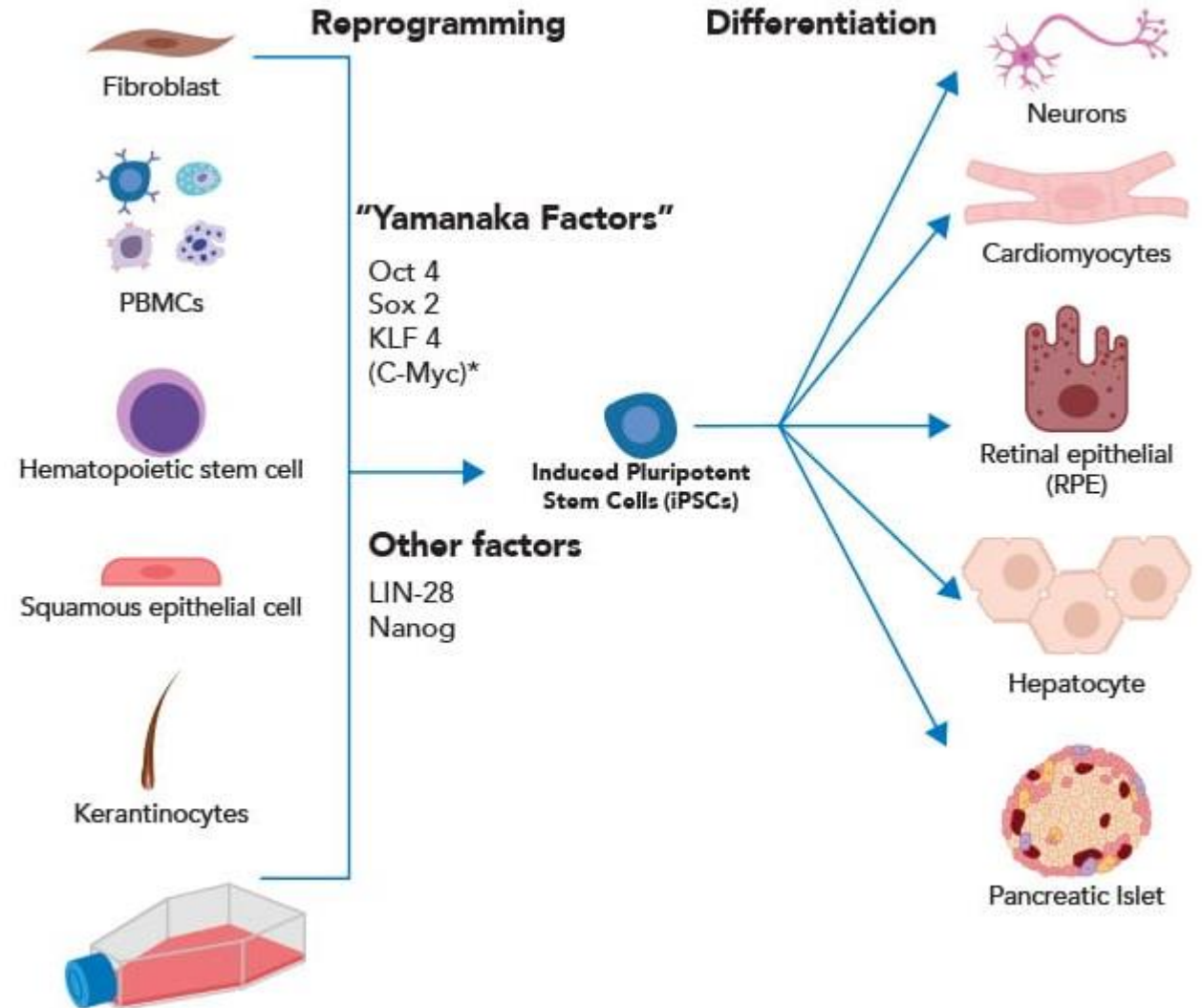
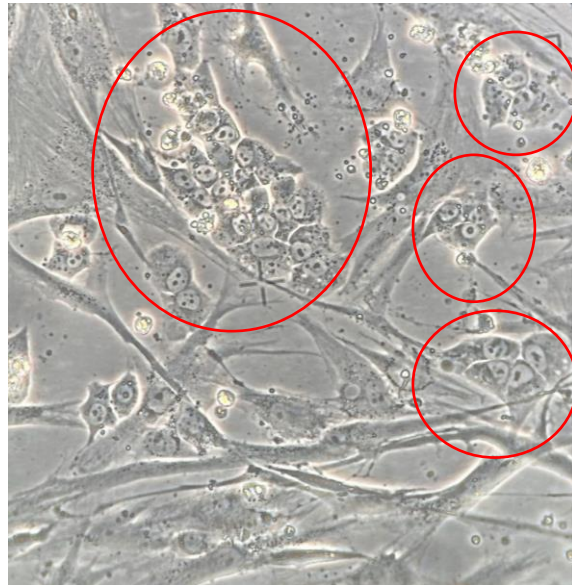
Μόνιμη αλλαγή γονιδιακής έκφρασης

Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων κυττάρων – Δημιουργία μεταλλαγμένων

εγκεφαλικών οργανοειδών

Απομόνωση κυττάρων από ασθενείς

Επαναπρογραμματισμός των ανθρώπινων κυττάρων σε iPSCs με τους Yamanaka factors

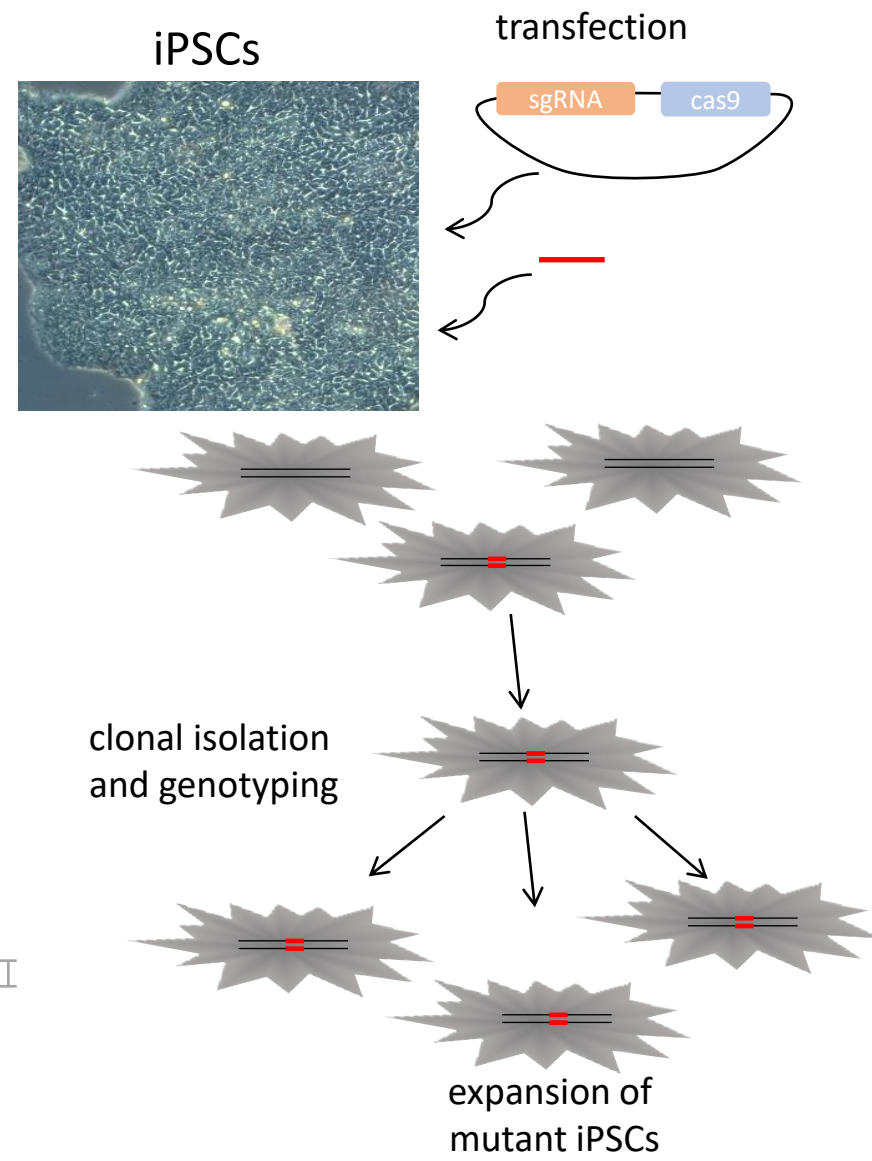
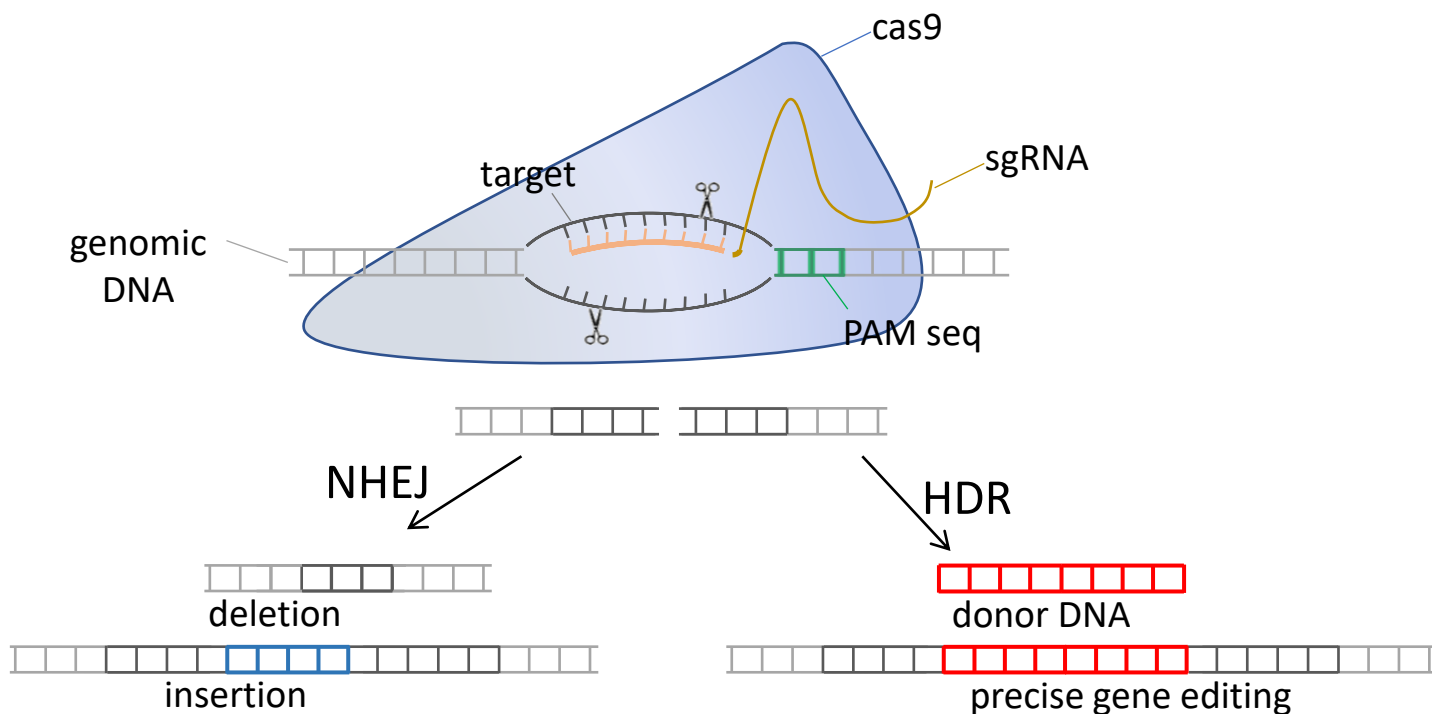


Μόνιμη αλλαγή γονιδιακής έκφρασης

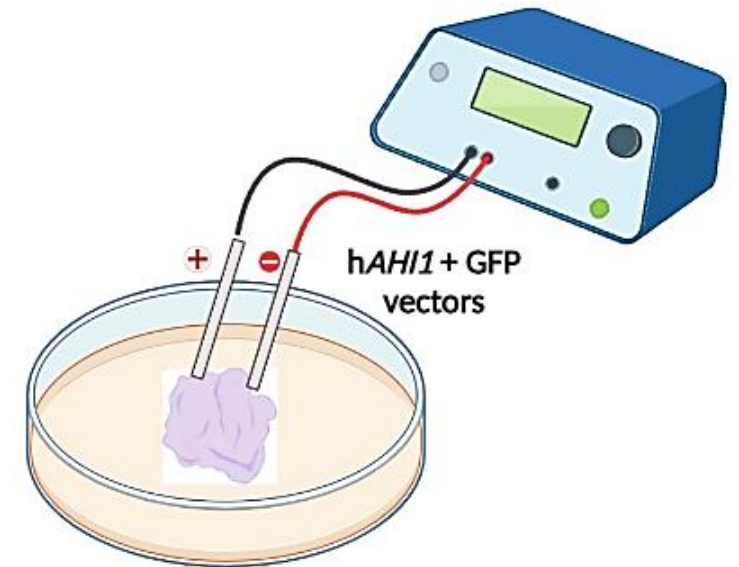
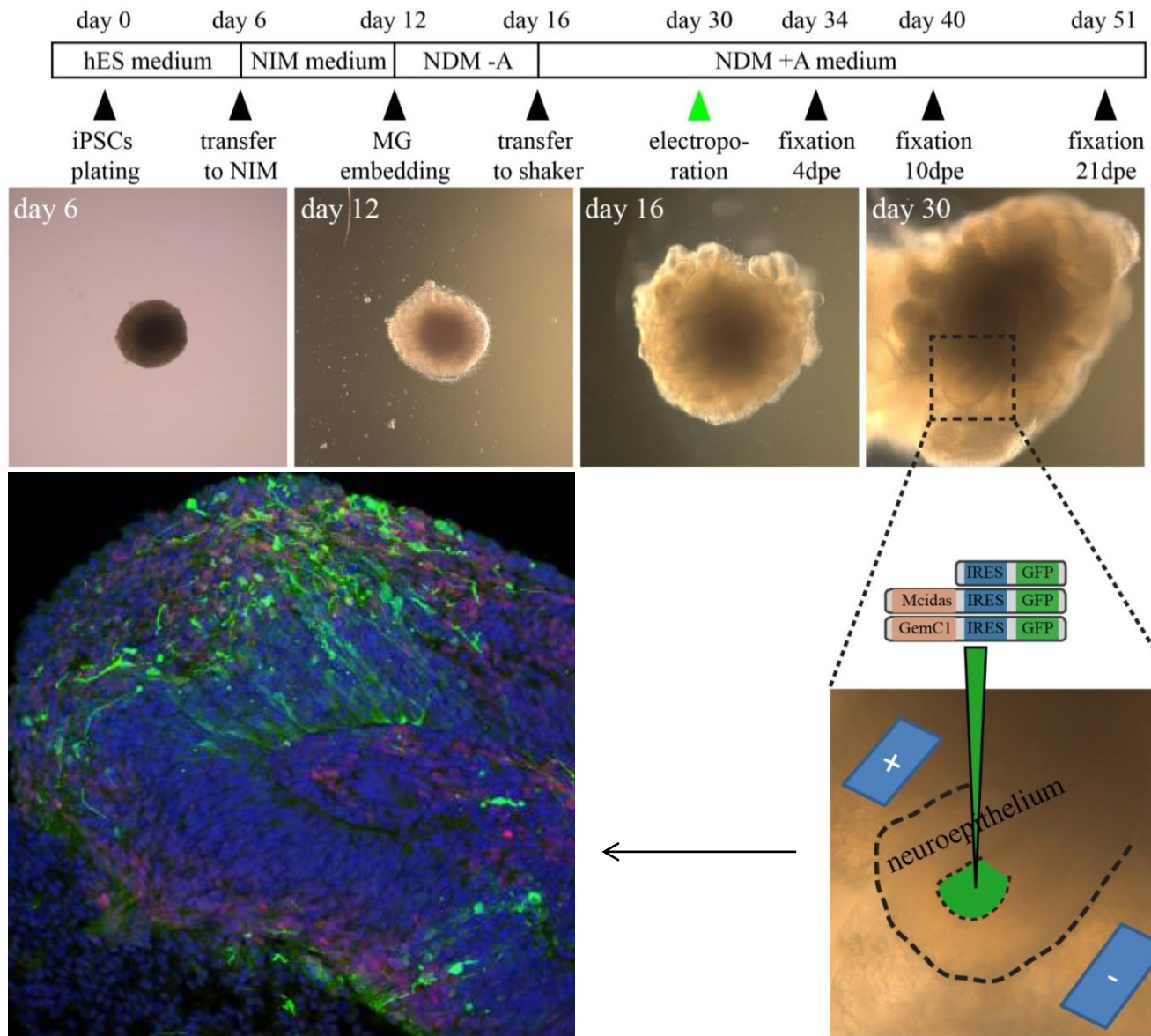
Επεξεργασία γονιδιώματος μέσω crispr/cas9 – Δημιουργία μεταλλαγμένων

εγκεφαλικών οργανοειδών

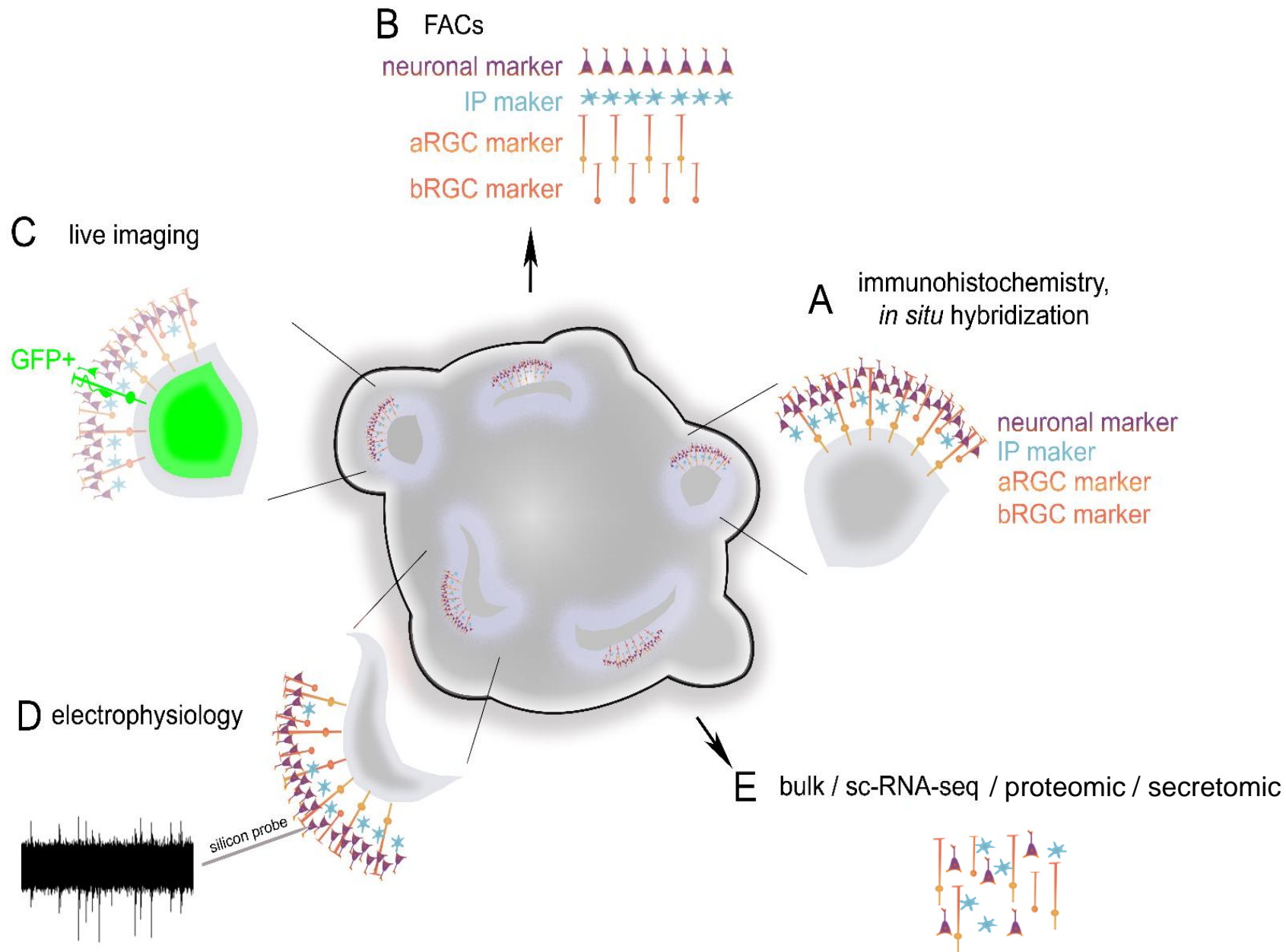
Δημιουργία μεταλλαγμένων κυττάρων από φυσιολογικές κυτταρικές σειρές



Εκτωπική αλλαγή γονιδιακής έκφρασης Electroporation – Χειρισμός έκφρασης γονιδίων-στόχων



Ανάλυση εγκεφαλικών οργανοειδών



Τι είδους εγκεφαλικά οργανοειδή μπορούμε να δημιουργήσουμε;

Πως μπορούμε να τροποποιήσουμε τα εγκεφαλικά οργανοειδή;

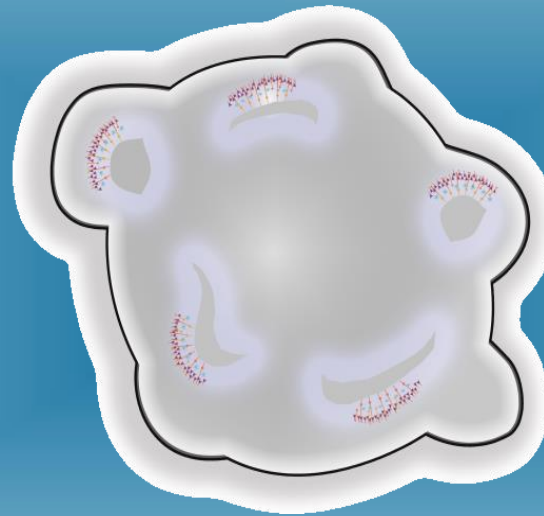
Τι είδους ερωτήματα μπορούμε να απαντήσουμε με τη χρήση τους;

Φυσιολογική ανάπτυξη εγκεφάλου και εξέλιξη

Μέγεθος εγκεφαλικού φλοιού
Δημιουργία αυλακώσεων εγκεφαλικού φλοιού
Ποικιλομορφία κυτταρικών τύπων

Αναπτυξιακές διαταραχές

Μικροκεφαλία
Λειεγκεφαλία
Νευρωνικές Ετεροτοπίες



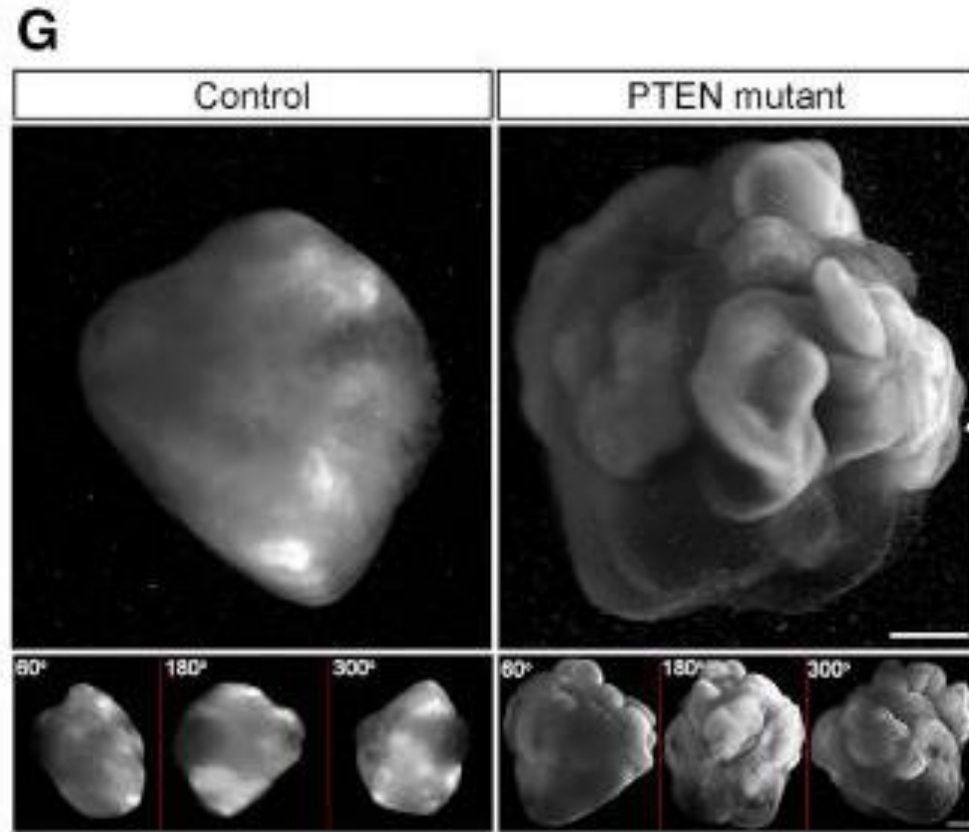
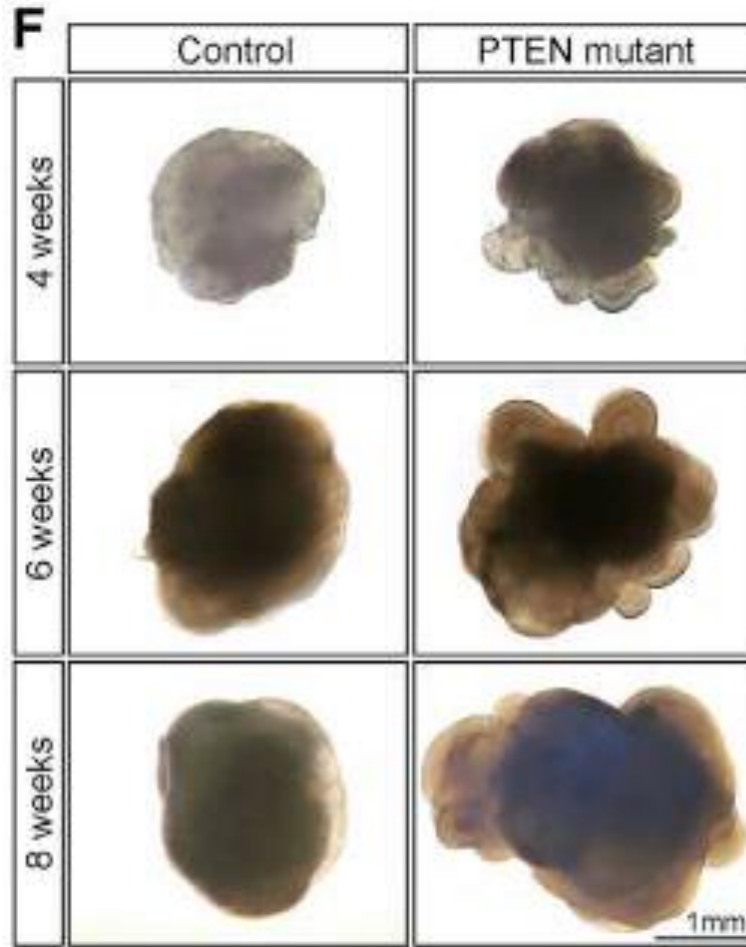
Ψυχιατρικές διαταραχές

Αυτισμός
Προγεννητικό στρες
Σχιζοφρένεια

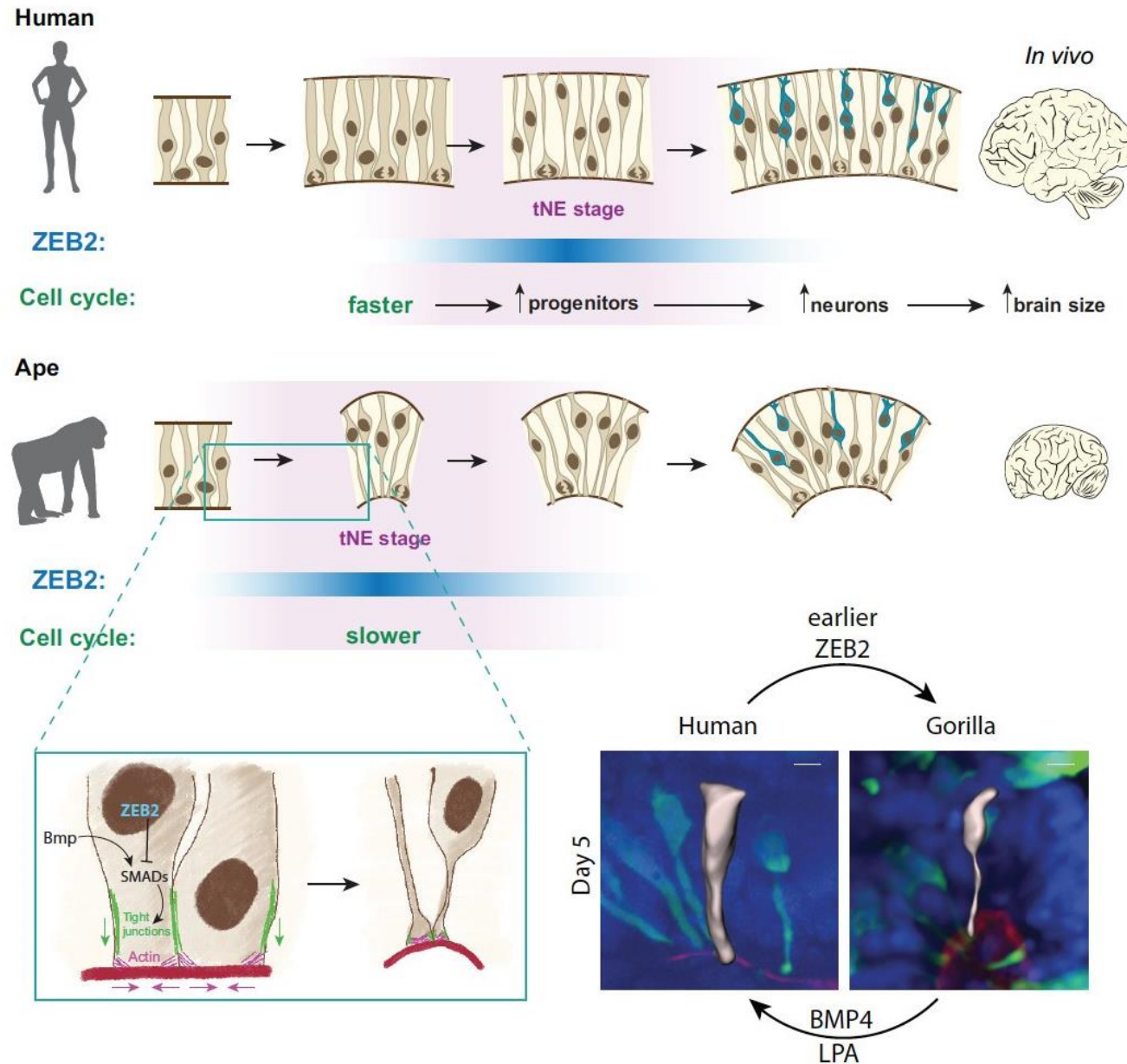
Δοκιμές φαρμάκων

Ιοί – Zika, SARS-CoV-2
Εμβόλια

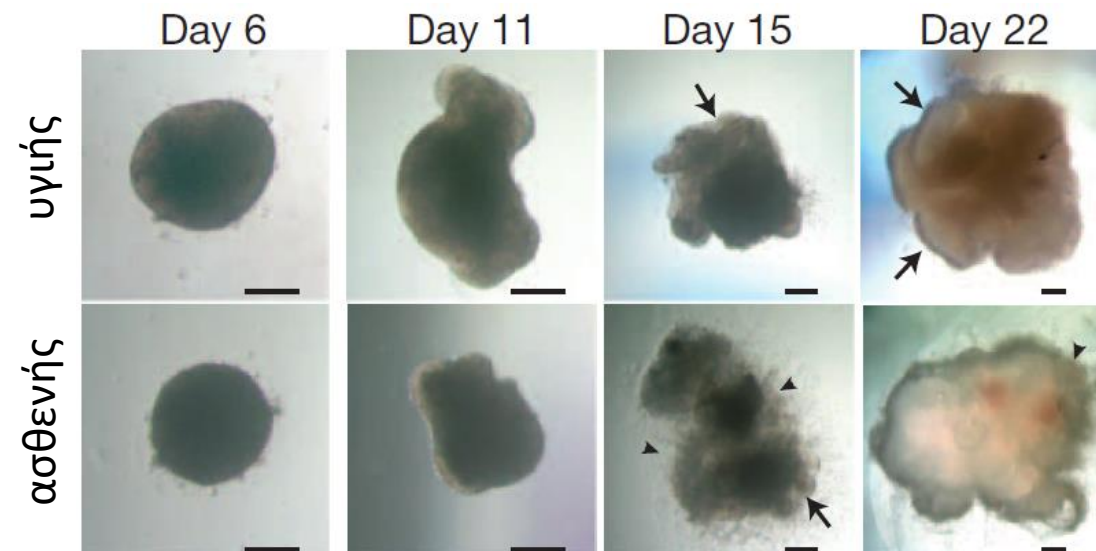
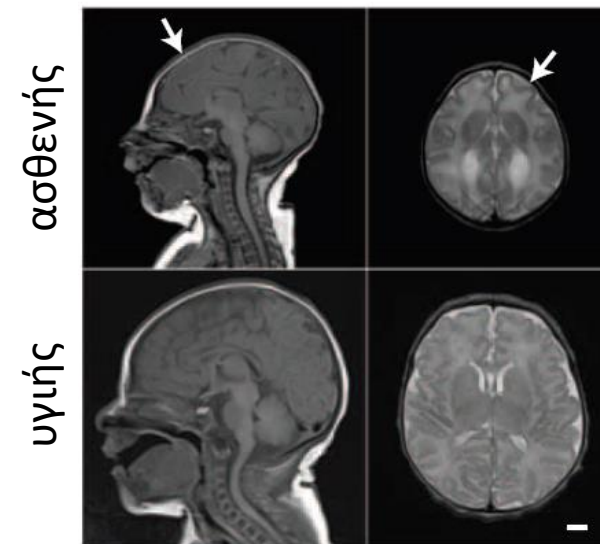
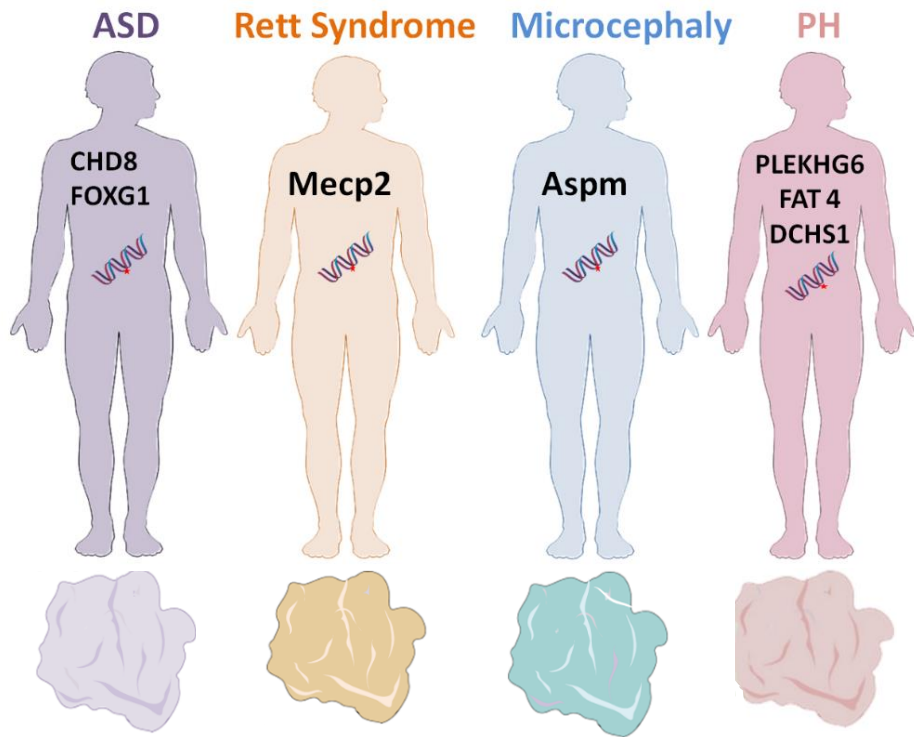
Χρήση εγκεφαλικών οργανοειδών για τη μελέτη σχηματισμού του ανθρώπινου φλοιού



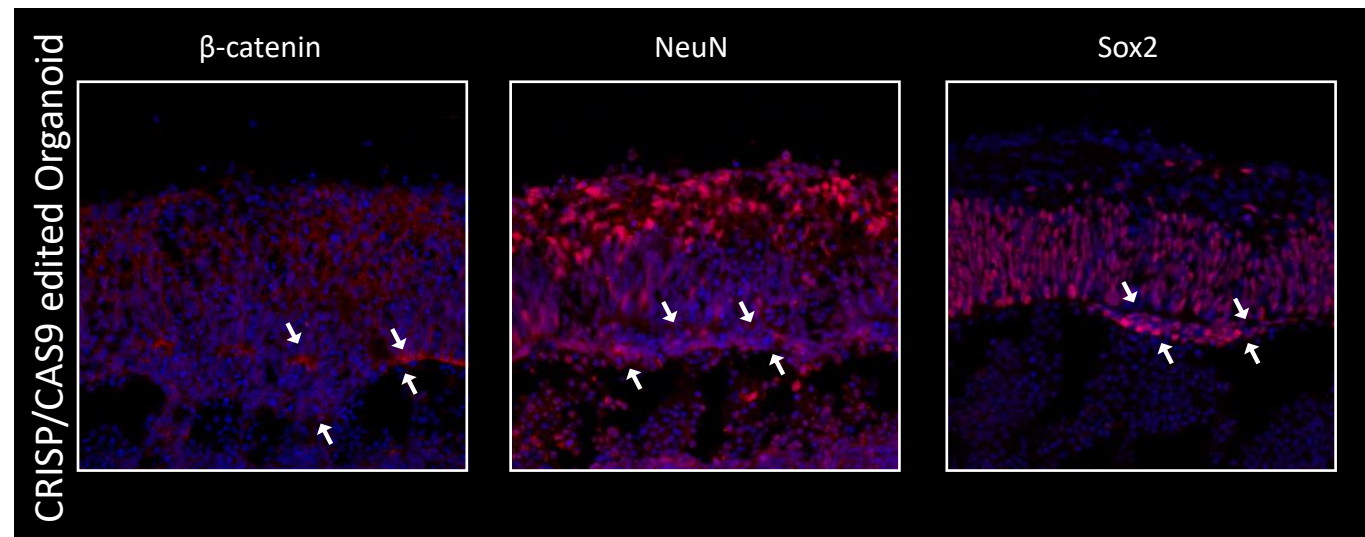
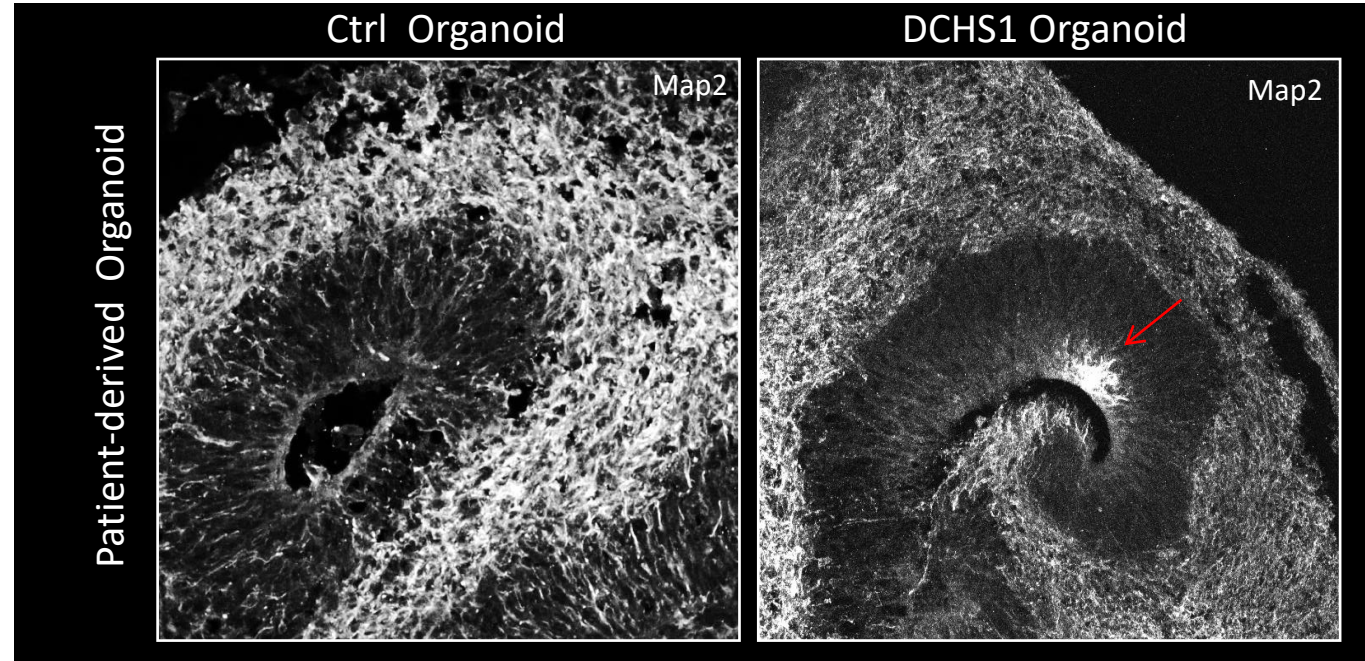
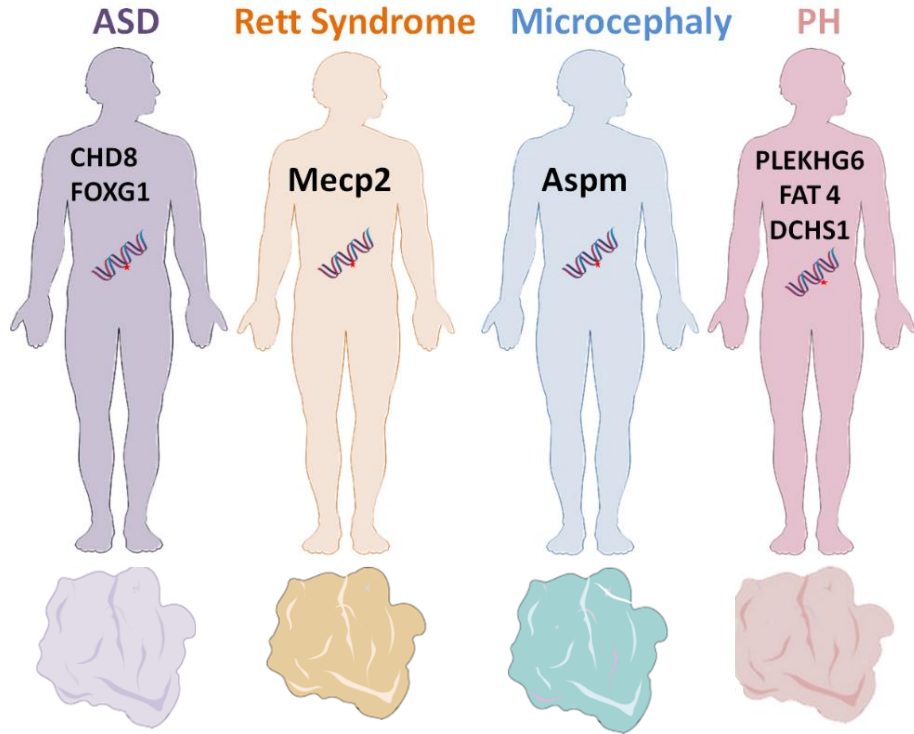
Χρήση οργανοειδών για τη μελέτη ανάπτυξης και εξέλιξης του εγκεφάλου



Χρήση οργανοειδών για τη μελέτη ασθενειών του εγκεφάλου

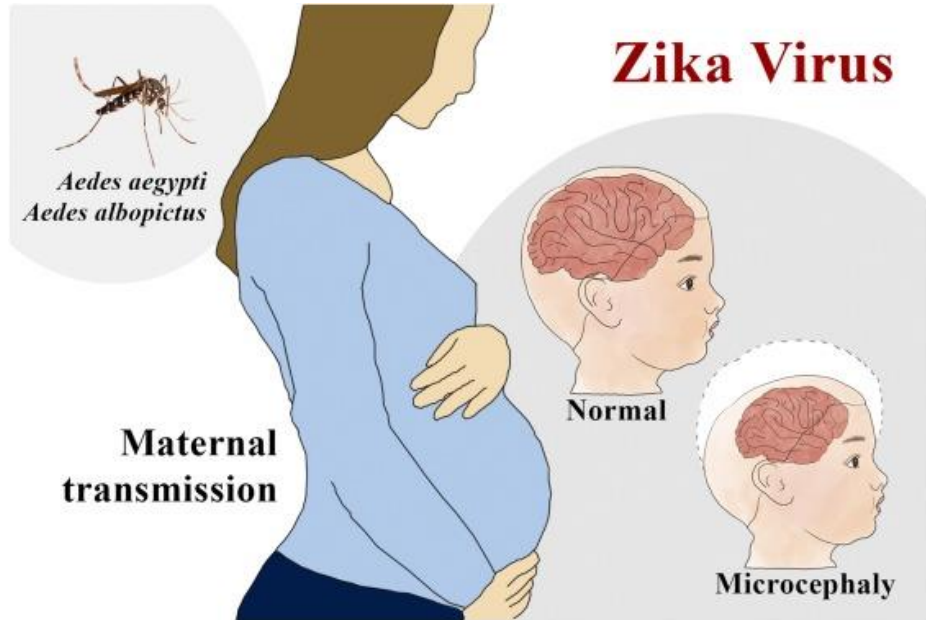


Φλοιώδεις δυσπλασίες σε οργανοειδή που προέρχονται από κύτταρα ασθενών



Χρήση οργανοειδών για τη μελέτη μόλυνσης του εγκεφάλου από ιούς

Μελέτες για τον Zika



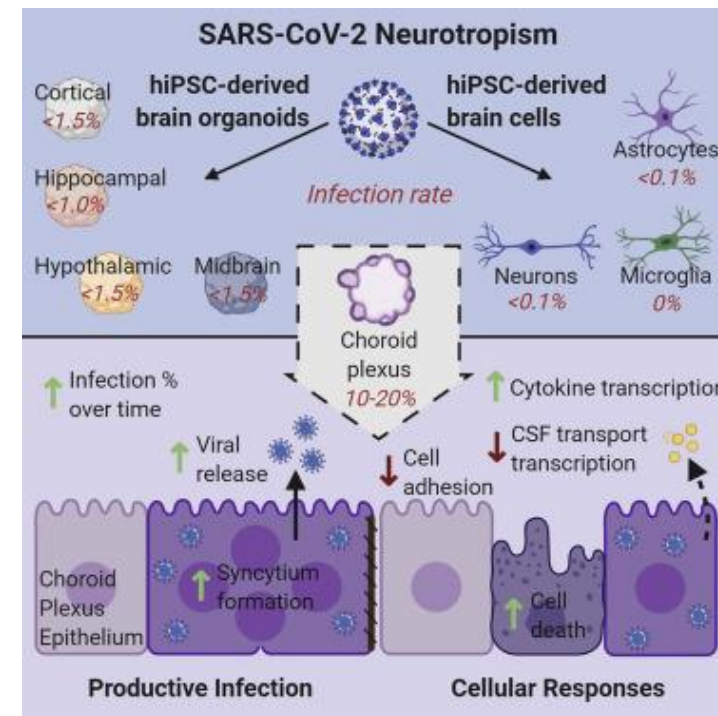
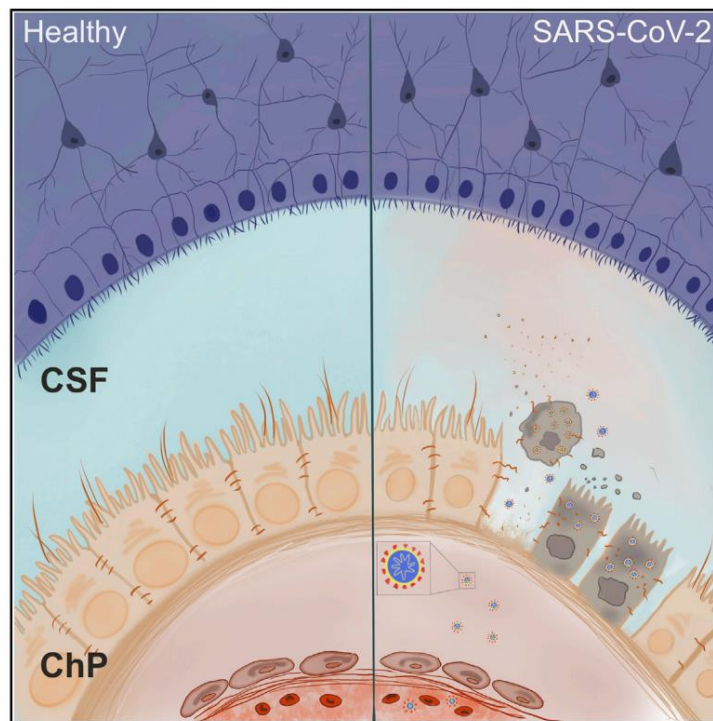
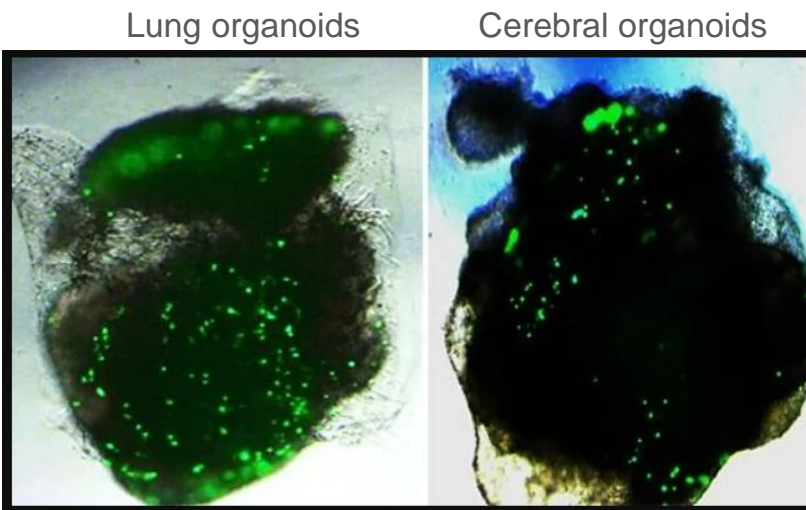
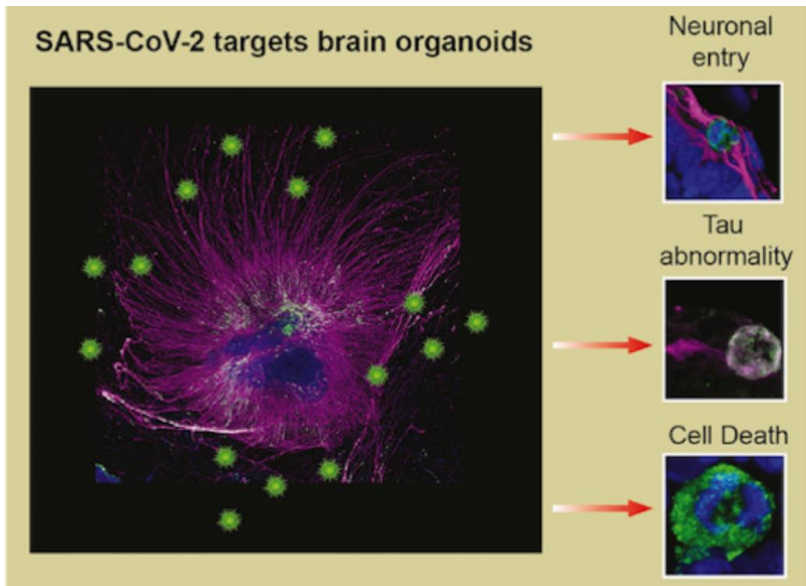
ZIKV^M 1X

Mock

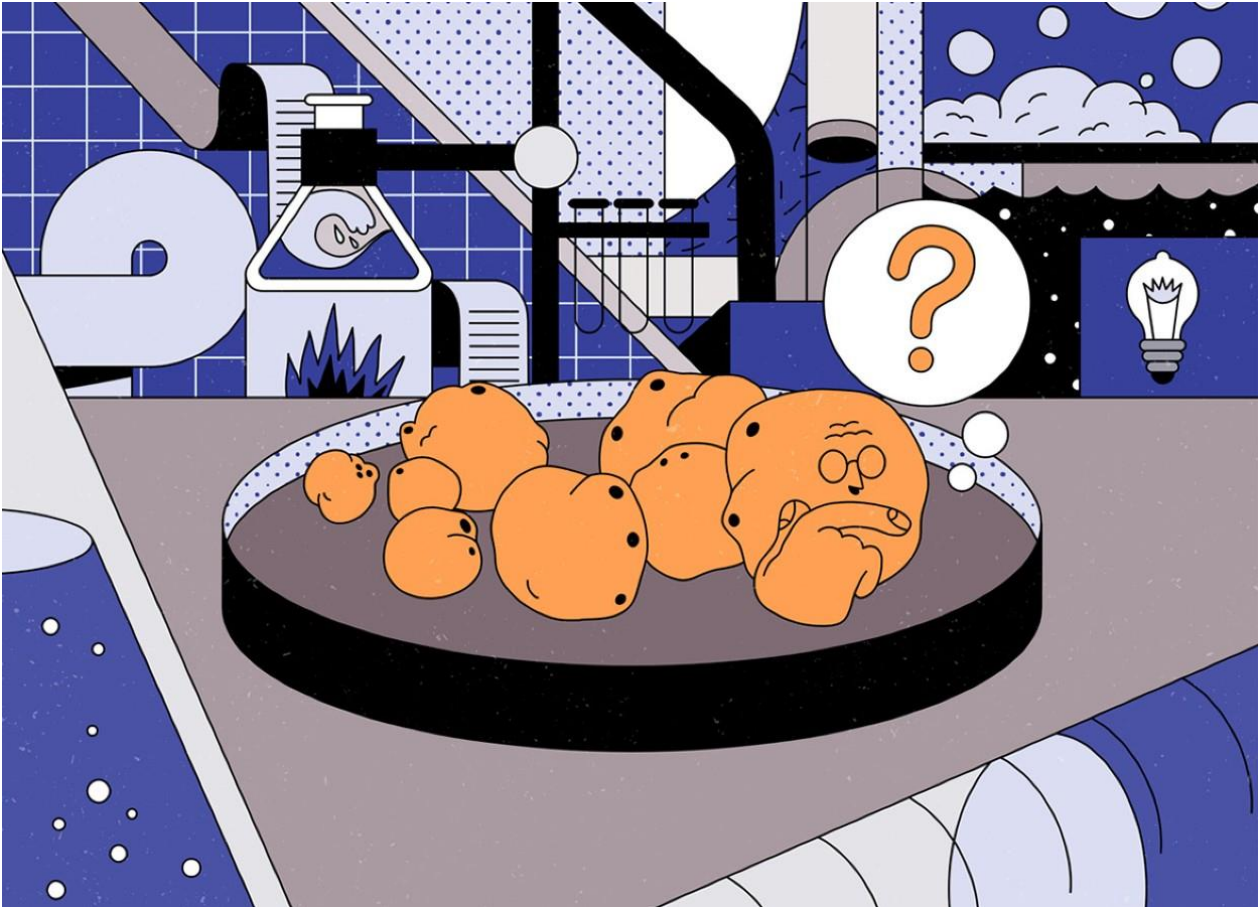
Day 42



Χρήση εγκεφαλικών οργανοειδών για τη μελέτη της αποτελεσματικότητας μόλυνσης του SARS-CoV-2



Μπορούν τα εγκεφαλικά οργανοειδή να αναπτύξουν αίσθηση ή ακόμα και συνείδηση;



Η συνείδηση ορίζεται ως οποιαδήποτε υποκειμενική φαινομενική εμπειρία:

αισθητηριακών αντιλήψεων που προκαλούνται από εξωτερικούς παράγοντες,

εσωτερικά δημιουργούμενων σωματοκεντρικών αντιλήψεων,

συναισθηματικής επίγνωσης,

του εαυτού και της σκέψης,

αναμνήσεων,

μελλοντικών σχεδίων και ονείρων

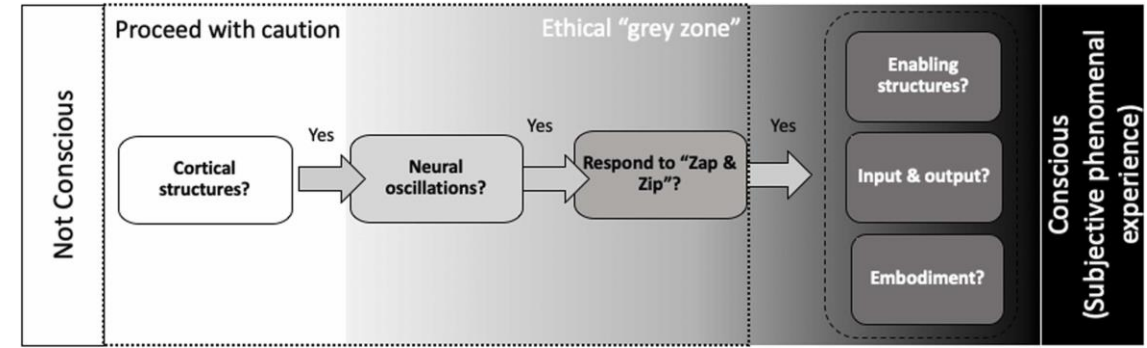
Ηθικές επιπτώσεις της χρήσης εγκεφαλικών οργανοειδών

Facts:

- Organoids recapitulate the mild-fetal prenatal brain
 - Similar cellular composition
 - Similar gene expression
 - Synaptic connectivity
- Neural oscillations spontaneously emerging from organoids

Future:

- They may acquire sensory and even cognitive functions



Questions:

- Is it possible to transmit to cerebral organoids afferent stimulations that might trigger simple sensations?
 - Are brain organoids sentient?
 - Are brain organoids capable of experience?
 - Can consciousness be developed in brain organoids?
- IF so, is the ethical discussion regarding their use in research and clinical practice necessary?

Η έρευνα για τα οργανοειδή και η ανάπτυξη εγκεφαλικών οργανοειδών για λόγους υγείας (διάγνωση, θεραπείες) **δεν πρέπει** να παρεμποδίζεται.

Οι περιορισμοί θα πρέπει να ισχύουν μόνο για πειράματα που στοχεύουν στην «παραγωγή» εξαιρετικά ανεπτυγμένων και εξελιγμένων εγκεφαλικών οργανοειδών ικανών να μιμούνται τις ανώτερες ανθρώπινες γνωστικές λειτουργίες και τα ανθρώπινα συναισθήματα πόνου και αγωνίας

Τα οργανοειδή του εγκεφάλου παράγονται από ανθρώπινα κύτταρα:

- Από ποιον προήλθαν τα κύτταρα; Γνωρίζουν οι συμμετέχοντες για το είδος της έρευνας που πραγματοποιείται;
- Σε τι χρησιμεύουν; Αξίζει να γίνει αυτή η έρευνα; Γιατί είναι ενδιαφέρον;
- Τι θα κάνουμε με τα οργανοειδή; Η καλλιέργεια τους είναι ένα πράγμα, αλλά θα μπορούσαμε να τα μεταμοσχεύσουμε σε ανθρώπους ή σε ζώα και ποιες θα ήταν οι συνέπειες;