

# Organoidi mozga u istraživanju bolesti živčanog sustava

---

**Salopek, Tihana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:535918>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Tihana Salopek**

**Organoidi mozga u istraživanju bolesti živčanog sustava**

**Diplomski rad**



Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u laboratoriju Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr.sc. Dinko Mitrečić, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2021./2022.

Popis kratica

cm<sup>2</sup> – centimetar kvadratni

mm - milimetar

SVZ – subventrikularna zona (engl. subventricular zone)

OSVZ – vanjska subventrikularna zona (engl. outer subventricular zone)

CDK5RAP2 – engl. cyclin dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 2

PTEN – engl. Phosphatase and tensin homolog

CRISPR/Cas – engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein 9

SOX2 – engl. SRY-Box Transcription Factor 2

CTIP2 – engl. COUP-TF-interacting protein 2

TBR1 – engl. T-Box Brain Transcription Factor 1

OGG1 – engl. 8-Oxoguanine DNA Glycosylase

Hsp70 – engl. 70-kDa heat shock protein

DENV2 – virus dengue tip 2 (engl. Dengue virus type 2)

Gy – grej (engl. gray)

TMZ - temozolomid

μM - mikromol

RNA – ribonukleinska kiselina

GSC – matične stanice glioma (engl. glioma stem cells)

GLICO – gliom organoida mozga (engl. cerebral organoid glioma)

BCNU – engl. bis-chloroethylnitrosourea

SNCA – sinuklein alfa (engl. Synuclein Alpha)

LRRK2 – engl. Leucine-rich repeat kinase 2

PINK1 – engl. PTEN-induced kinase 1

PARK2 - Parkinson protein 2

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

BDNF – engl. brain-derived neurotrophic factor

GDNF – engl. glial cell line-derived neurotrophic factor

APP – engl. amyloid precursor protein

ADI – engl. Alzheimer's Disease International

HDAC6 – engl. Histone deacetylase 6

APOE4 - apolipoprotein E4 gen

APOE3 - apolipoprotein E3 gen

SYN1 – sinapsin 1

PSEN1 – presenilin 1

# SADRŽAJ

Sažetak

Summary

1. Uvod .....	1
1.1 Razvoj mozga čovjeka .....	1
1.2 Metode istraživanja bolesti živčanog sustava .....	4
2. Organoidi mozga .....	6
2.1 Postupci dobivanja i uzgoja .....	6
2.2 Prednosti .....	8
2.3 Nedostatci .....	10
3. Primjena organoida mozga .....	13
3.1 Istraživanje mikrocefalije uzrokovane zikavirusnom infekcijom .....	13
3.2 Glioblastom .....	16
3.3 Parkinsonova bolest .....	19
3.4 Alzheimerova bolest .....	23
4. Zaključak .....	28
5. Zahvale .....	29
6. Literatura .....	30
7. Životopis .....	38

## SAŽETAK

Organoidi mozga u istraživanju bolesti živčanog sustava

Tihana Salopek, 2022.

Organoidi mozga specifične su trodimenzionalne kulture koje oblikuju komadiće tkiva povezivanjem stanica i na taj način imitiraju male dijelove mozga. Budući da se sastoje od nekoliko vrsta stanica organiziranih na način da oponašaju citoarhitekturu mozga *in vivo*, predstavljaju najvjerniji *in vitro* model mozga.

Organoidi mozga mogu se uzgojiti od embrionalnih matičnih stanica i induciranih pluripotentnih matičnih stanica koje se zatim mogu na nekoliko načina potaknuti na diferencijaciju u stanice živčanog sustava i oblikovanje trodimenzionalnih struktura.

Organoidi mozga dosad su pokazali svoj potencijal u istraživanju razvojnih i neurodegenerativnih poremećaja mozga, kao i tumora. Također, imaju kapacitet za otkrivanje i testiranje novih oblika terapije i lijekova. Zbog karakteristika sličnih mozgu *in vivo*, kao što su trodimenzionalnost, sastav od različitih vrsta stanica te specifična citoarhitektura i mikrokoliš, organoidi mozga imaju mnogo prednosti u odnosu na tradicionalne dvodimenzionalne kulture i životinjske modele. Istovremeno, organoidi imaju i mnogo nedostataka, kao što je nepostojanje vaskularizacije koje ograničava njihov rast te nedostatan razvoj moždanih vijuga što otežava istraživanje kompleksnijih bolesti kore mozga.

U ovom su diplomskom radu prikazane prednosti i mogućnosti uporabe organoida mozga, kao i njihovi nedostaci i ograničenja, s naglaskom na studije o zikavirusnoj infekciji, glioblastomu, Alzheimerovoj i Parkinsonovoj bolesti.

**Ključne riječi:** organoidi mozga, matične stanice, modeli bolesti, zika virus, glioblastom, Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest

## SUMMARY

Brain organoids in research of neurological diseases

Tihana Salopek, 2022.

Brain organoids are specific three-dimensional cultures that by connecting cells form pieces of tissue and in that way imitate small parts of the brain. Since they consist of several types of cells organized in such a way as to mimic the cytoarchitecture of the brain *in vivo*, they represent the most faithful *in vitro* model of the brain.

Brain organoids can be grown from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, which can then be induced in several ways to differentiate into nervous system cells and form three-dimensional structures.

Brain organoids have so far shown their potential in the research of developmental and neurodegenerative disorders of the brain, as well as tumors. They also have the capacity to discover and test new forms of therapy and drugs. Due to brain-like characteristics *in vivo*, such as three-dimensionality, composition of different cell types, and specific cytoarchitecture and microenvironment, brain organoids have many advantages over traditional two-dimensional cultures and animal models. At the same time, organoids have many disadvantages, such as the absence of vascularization, which limits their growth, and the insufficient development of cerebral gyri, which makes it difficult to research more complex diseases of the cerebral cortex.

This thesis presents the advantages and possibilities of using brain organoids, as well as their disadvantages and limitations, with emphasis on studies on Zika virus infection, glioblastoma, Alzheimer's and Parkinson's disease.

**Keywords:** brain organoids, stem cells, disease modeling, Zika virus, glioblastoma, Alzheimer's disease, Parkinson's disease



# 1. UVOD

## 1.1 Razvoj mozga čovjeka

Odrasli se ljudski mozak sastoji od otprilike 86 bilijuna neurona koji su raspodijeljeni u kori velikog mozga, malom mozgu i subkortikalnim jezgrama (1). Cerebralni korteks sadrži oko 20% svih neurona (oko 16 bilijuna) i čini oko 80% mase mozga zbog velikih neurona, velikog broja dendrita, aksona i sinapsi (2). Cerebralni korteks ima ukupnu površinu od  $1843 \pm 196 \text{ cm}^2$  (3). Debljina mu je u prosjeku 2.6 mm, ali varira ovisno o kortikalnom području (4).

Ljudski mozak započinje svoj razvoj iz neuralne cijevi. Neuralna se cijev sastoji od prekursora progenitornih stanica koje se nazivaju neuroepitelne stanice (5). Zatvaranjem se neuralne cijevi rostralno formiraju tri primarna mjehurića, prednji, srednji i stražnji, dok se iz kaudalnog dijela razvija kralježnična moždina (6). Prednji se i stražnji mjehurić dijele na sekundarne mjehuriće, telencephalon/diencephalon i myelencephalon/metencephalon, koji kasnije oblikuju specifične moždane strukture, dok se cerebralni korteks uglavnom razvija iz dorzalnog dijela telencephalona (6).

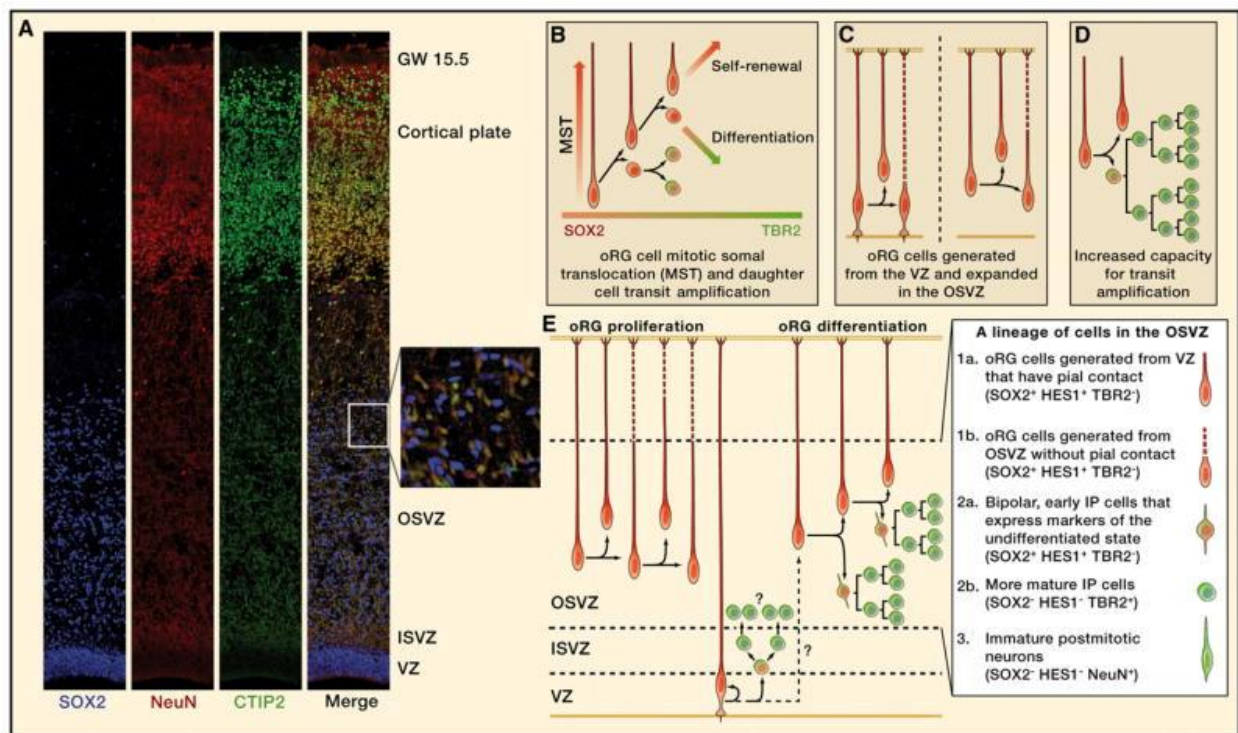
U neuralnoj se cijevi nalazi šupljina ispunjena tekućinom koja se kasnije razvije u moždane komore (7). Apikalni dio neuralne cijevi, koji se nalazi uz komore, mitotički je aktivan i mora proći interkinetičku nuklearnu migraciju, proces tijekom kojeg se jezgre stanica neuralnog epitela pomiču prema apikalnoj strani neuroepitela (8). Prije neurogeneze neuroepitelne stanice postaju stanice radijalne glije (5). Neurogeneza započinje u 5-6 tjednu gestacije (9). U to vrijeme stanice radijalne glije počinju proizvoditi bazalne progenitorske stanice (intermedijarne progenitorske stanice i bazalne stanice radijalne glije) koje migriraju prema bazalnoj strani neuroepitela gdje će stvoriti subventrikularnu zonu. Upravo je ta zona mnogo veća u ljudi u usporedbi s drugim vrstama (7). Sve vrste neuralnih progenitorskih stanica stvaraju neurone koji migriraju bazalno pomoću izdanaka stanica radijalne glije te se smještaju u organiziranim slojevima na način da su najstariji neuroni u najdubljim slojevima. Tako u konačnici nastaje kortikalna ploča koja se sastoji od šest slojeva stanica (7).

Cerebralni je korteks kompleksna struktura koja sadrži različite vrste neurona posložene u šest slojeva i organizirane po regijama u visoko specijalizirana područja (6). Kortikalni se slojevi pojavljuju tijekom embrionalnog razvoja na način iznutra prema van kako se progenitori prednjeg

mozga dijele i proliferiraju (6). Stanice radijalne glije, koje potječu od stanica neuroepitela, prekursori su kortikalnih progenitora i na početku kortikogeneze povećavaju svoj broj umnažanjem (6). Kako kortikogeneza napreduje, kortikalni progenitori postupno prolaze kroz dijeljenje kako bi ili generirali neurone direktno (direktna neurogeneza) ili indirektno putem stvaranja intermedijarnih progenitora koji se dalje dijele (indirektna neurogeneza) (6). Sudbina je stanica radijalne glije regulirana tijekom cijele kortikogeneze i ovisi o vanjskim signalima i ekspresiji intrinzičnih faktora (6).

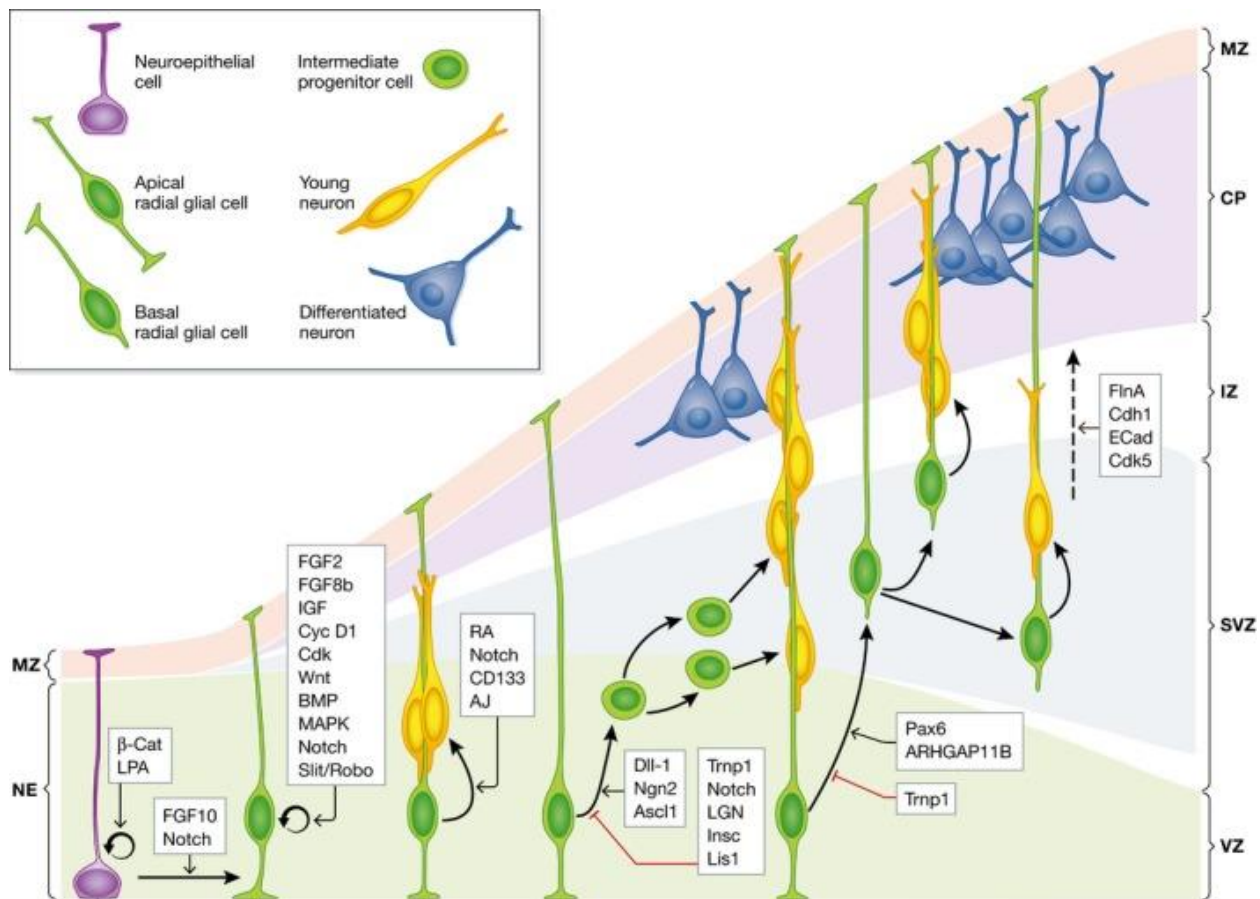
Evolucija se neokorteksa smatra najvažnijim dijelom evolucije mozga jer je omogućila značajan napredak u kognitivnim funkcijama (10). Neokorteks se značajno razlikuje u obliku, veličini i broju neurona između vrsta što ovisi o organizaciji neuralnih progenitorskih stanica tijekom embrionalnog razvoja (10). Cerebralni je korteks dominantna struktura mozga ljudi i ima važnu ulogu u raznim oblicima ponašanja, uključujući percepciju, voljne pokrete, kogniciju, memoriju i emocije te je vitalan za sposobnosti kao što su jezik i uporaba alata (2). Nedavni su modeli razvoja neokorteksa većinom temeljeni na znanstvenim studijama na miševima i štakorima čiji neokorteks pokazuje ključne značajke neokorteksa sisavaca, kao što je organizacija u šest slojeva i podjela na senzorni, motorni i asocijativni dio. Međutim, budući da je neokorteks glodavaca malen i ne sadrži vijuge (lisencefalija), ne može poslužiti kao vjerodostojan model većih i girencefaličnih neokorteksa, kao što je onaj u Homo sapiensa (10).

Kortikalna ekspanzija i preklapanje korteksa ključan su proces u mozgu sisavaca za razvoj i povećanje intelektualnih sposobnosti (11). To je kompleksan proces reguliran brojnim faktorima, proteinima i signalnim putovima koji imaju specifičnu spaciotemporalnu ekspresiju (11).



Slika 1. Karakteristike razvoja neokorteksa ljudi. Prema Lui JH i suradnici, 2011, Figure 2 (10)

U vrsta koje imaju moždane vijuge (girencefaličan mozak) kao što su ljudi i majmuni, količina apikalnih stanica radijalne glije puno je veća nego u vrsta s glatkim korteksom, kao što su miševi, što je rezultat veće količine neuroepitelnih stanica u ranijim stadijima (11). Uz veliku ventrikularnu zonu, najvažnija je odlika vrsta s girencefaličnim mozgom zadebljana SVZ u kojoj se nalazi veliki broj bazalnih progenitora, ponajviše u kasnijim fazama neurogeneze kada su brojniji od apikalnih progenitora (11). Zbog velikog broja bazalnih progenitora i zadebljanja subventrikularne zone, dolazi do njena razdvajanja u unutarnji i vanjski sloj te takva podjela izdvaja kortikogenezu primata od kortikogeneze drugih vrsta, npr. nije nađena u miševa (11). OSVZ sadrži veliki broj različitih progenitorskih stanica s velikim potencijalom za amplifikaciju što omogućuje kortikalnu ekspanziju i presavijanje i ima važnu ulogu u razvoju mozga viših sisavaca (11).



Slika 2. Matične stanice u razvoju cerebralnog korteksa girencefaličnog mozga i njihova molekularna regulacija. Prema Fernández V i suradnici, 2016., Figure 1 (11)

## 1.2 Metode istraživanja bolesti živčanog sustava

Razvoj svakog novog postupka s potencijalom liječenja bolesti živčanog sustava vrlo je dugotrajan i kompleksan. Sve započinje bazičnim-pretkliničkim istraživanjima u kojima se testiraju početne ideje i traži neki novi postupak koji ima terapijski potencijal.

Kao i u drugim područjima biomedicine, pretklinička se istraživanja služe *in vitro* i *in vivo* pristupom. U *in vitro* istraživanjima najčešće se koriste dvodimenzionalne kulture stanica. Stanične se kulture koriste od početka 20. stoljeća i vrlo su česta metoda zbog brojnih razloga: uzgoj raznih vrsta stanica razmjerno je jednostavan, a mnoge vrste stanica nisu financijski zahtjevne. Budući da se stanice nalaze u identičnim kontroliranim uvjetima, varijacije su u rezultatima minimalne. Budući da u jedan inkubator stanu deseci posuda za uzgoj, statistička se

obrada radi na mnogo većim brojevima u odnosu na one koji se rabe u radu sa životinjama. Nadalje, unapređenje metoda vizualizacije živih stanica omogućuje promatranje unutarstaničnih zbivanja u realnom vremenu. Također je bitno da stanice uglavnom ne nose etičke dvojbe te se mogu jednostavno genetički manipulirati i na taj način omogućiti istraživanje rijetkih bolesti i bolesti koje se ne očituju u životinjama.

Međutim, stanične kulture imaju i svoje nedostatke. Dobiveni se rezultati ne mogu lako poistovjetiti s procesima u ljudskom organizmu zbog njihove jednostavnosti, manjka citoarhitekture, dvodimenzionalnosti te nedostatka interakcija između stanica te stanica i okoliša.

S druge strane, *in vivo* istraživanja su bliža testiranju na ljudima, dobar su model fiziologije i kompleksnosti živog organizma, ali su zato i mnogo skuplja i vremenski zahtjevnija. Također postoje i velike etičke dvojbe. Treba uzeti u obzir i da su životinjski modeli ograničeni specifičnostima svoje vrste i da postoje mnoge razlike između njih i ljudi, pogotovo u kompleksnom organu kao što je mozak (npr. vanjska subventrikularna zona, koja ima važnu ulogu u razvoju ljudskog mozga, nedostaje u mozgu miševa) (12). Također je teško prikazati heterogenu ljudsku populaciju na uzgojenim životinjama određenih i sličnih karakteristika (12).

Za daljnji je napredak u istraživanju mozga potreban model koji bi posjedovao prednosti i dvodimenzionalnih staničnih kultura i životinjskih modela uz što veću sličnost mozgu *in vivo* i veliku primjenjivost na ljudski organizam. Većinu tih karakteristika imaju organoidi.

## 2. ORGANOIDI MOZGA

Termin organoid označava skupinu različitih vrsta stanica koje rastu i razvijaju se u trodimenzionalnom okolišu *in vitro* (13). Organoidi mozga imaju anatomski i fiziološka svojstva različitih regija mozga i najvjerniji su *in vitro* model ljudskog mozga dosad. Sastoje se od više vrsta stanica koje se mogu naći u moždanom tkivu, kao što su progenitorne stanice, neuroni i stanice glije. Trodimenzionalnost im omogućava razvoj kompleksnijih struktura i organizaciju u slojeve, što nije moguće u dvodimenzionalnim kulturama. Mogu se uzgojiti od embrionalnih matičnih stanica, induciranih pluripotentnih matičnih stanica i neonatalnih ili adultnih matičnih stanica (13).

Kao jedan od pokazatelja koliko su organoidi slični živom mozgu je elektroencefalografijom dokazana spontana živčana aktivnost slična onoj u mozgu nedonoščadi (14). Isto tako, fotosenzitivni neuroni retine u organoidima mozga mogu reagirati na svjetlosne podražaje (15). Također, analiza ekspresije gena pokazala je veliku sličnost između kortikalnih organoida i moždanog tkiva pa je tako obrazac ekspresije gena u organoidima prednjeg mozga nakon 100 dana u kulturi jako sličan onom prefrontalnog korteksa u 22. gestacijskom tjednu (16).

Organoidi mogu imati značajke različitih dijelova mozga. Tako su dosad uzgojeni organoidi retine, dorzalnog korteksa, koroidnog pleksusa, hipokampusa i srednjeg mozga. Organoidi se mozga mogu koristiti u istraživanju razvoja mozga, neuroloških bolesti, novih lijekova te u razvoju personalizirane i regenerativne medicine (12). Zasad su se koristili u istraživanju nasljednog oblika mikrocefalije uzrokovanog mutacijom CDK5RAP2 gena, mikrocefalije uzrokovane zika virusom, nasljednog oblika lizencefalije, tumora kao što je glioblastom, poremećaja iz spektra autizma te neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest (13).

### 2.1 Postupci dobivanja i uzgoja organoida

Organoidi mozga, kao i organoidi općenito, mogu se uzgojiti od embrionalnih matičnih stanica, induciranih pluripotentnih matičnih stanica i neonatalnih ili adultnih matičnih stanica (13). Te stanice mogu biti od zdravih pojedinaca ili od pacijenata s određenom bolesti čija je patologija u tom slučaju prikazana u organoidu.

Dvije su metode razvijene za uzgoj organoida mozga, a to su nevođene metode („unguided methods“) i vođene metode („guided methods“) (16). Glavna je razlika što se nevođene metode

temelje na intrinzičnoj signalizaciji i spontanjoj morfogenezi humanih pluripotentnih matičnih stanica oponašajući mozak u razvoju, dok se vođene metode oslanjaju na vanjske faktore rasta kako bi se matične stanice vodile u smjeru diferencijacije prema određenim tipovima stanica (16).

Nevođene metode za razvoj gastrointestinalnih organoida inspirirale su grupu koju je vodio Knoblich (17) da razviju protokol za razvoj organoida mozga na sličan način. Metoda započinje razvojem embrioidnih tjelešaca koja se kasnije ugrade u kapljice Matrigela kako bi se stanicama dala potrebna potpora (12). Nakon određenog vremena kulture u zdjelici, kapljice Matrigela premjestili su u vrteći bioreaktor kako bi se poboljšao prijenos nutrijenata i kisika te potaknulo širenje tkiva i neuralna diferencijacija (16). U nevođenoj je metodi vanjsko interferiranje minimalno pa takvi organoidi imaju veliku slobodu za razvoj i sastoje se uglavnom od heterogenog i manje organiziranog tkiva zbog čega imaju obilježja različitih regija mozga. Sastoje se od stanica različitog podrijetla u rasponu od prednjeg, srednjeg i stražnjeg mozga do retine, koroidnog pleksusa i mezoderma (18, 19).

Za vođenu su metodu zaslužni Sasai i suradnici koji su razvili seriju protokola temeljenih na kulturama embrioidnih tjelešaca bez seruma (20,21,22,23,24,25). Budući da se u vođenim metodama koriste različiti faktori rasta u različitim fazama razvoja organoida oponašajući određene uvjete tijekom razvoja mozga, takve stanice organoida imaju mnogo usmjerenija i određenija obilježja te uglavnom imitiraju jednu regiju mozga, kao što je cerebralni korteks, hipokampus i srednji mozak (26, 27, 28, 29, 30). U vođenoj se metodi vanjski faktori rasta mogu primijeniti i samo u ranoj fazi diferencijacije kako bi se progenitorske stanice usmjerile s ciljem minimalne heterogenosti organoida (16). Nakon toga se vanjski faktori ukanjaju i daljnja diferencijacija slijedi intrinzične programe slične onima u *in vivo* razvoju mozga (16). Takvi se organoidi nazivaju i sferoidi i specifični su za određene dijelove mozga te se oni mogu spajati i stvarati asembloide koji služe kao modeli interakcija između različitih dijelova mozga, npr. sferoidi koji se sastoje od stanica korteksa i talamusa, koji zatim spajanjem pokazuju interakcije tih regija (16).

Uzgoj se organoida mozga još može podijeliti ovisno o tipu i obliku medija za kultivaciju. Organoidi mogu imati strukturalnu potporu kako bi se mogli razviti u trodimenzionalne kulture bez fizičkog kontakta s posudom (13). To se postiže biološkim ili sintetičkim hidrogelom sličnog sastava kao ekstracelularni matriks (13). Najčešće tu ulogu ima Matrigel koji je želatinozna smjesa

proteina koju izlučuju Engelbreth-Holm-Swarm stanice sarkoma miša i sastoji se od adhezivnih proteina kao što su kolagen, entaktin, laminin i heparin sulfat proteoglikani što pruža strukturalnu potporu stanicama i omogućuje prijenos faktora rasta (31, 13). Drugi je način uzgoja bez strukturalne potpore koji uključuje kultiviranje stanica u kapljicama određenog medija tako da na njih djeluju gravitacija i površinska napetost (32).

## **2.2 Prednosti korištenja kultura organoida**

Organoidi mozga posjeduju mnoge ključne značajke ljudskog mozga u razvoju na molekularnoj, staničnoj, strukturalnoj i funkcionalnoj razini (16). U usporedbi s tradicionalnim kulturama stanica, organoidi pokazuju izraženije interakcije između stanica i između stanica i matriksa te bolje prikazuju stanične funkcije i signalne puteve u tkivima (12). Također, ne postoje odstupanja koja se javljaju u životinjskim modelima zbog razlika u vrsti. Iz tih su razloga organoidi mozga pokazali značaj kao vjerodostojan model u istraživanju više različitih bolesti. Posebno su korisni u modeliranju kongenitalnih malformacija mozga koje nastaju zbog genetičkih mutacija ili zaraznih bolesti (16). Jedna je od tih bolesti nasljedni oblik mikrocefalije zbog mutacije gena CDK5RAP2. Organoidi mozga uzgojeni od induciranih pluripotentnih matičnih stanica osoba s tom mutacijom pokazivali su poremećaj u dijeljenju stanica i smanjenu veličinu organoida, što je slično karakteristikama mikrocefalije nađenim i *in vivo* (33, 34, 19), dok se mozak miševa s tom mutacijom nije se razlikovao od mozga miševa bez te mutacije (35, 36, 37). Suprotno tome, delecija tumor supresorskog gena PTEN u humanim pluripotentnim matičnim stanicama rezultira prekomjernom proliferacijom i odgođenom neurogenezom stanica u organoidima te su zbog toga organoidi mozga bili značajno veći oponašajući makrocefalije (38).

Organoidi mozga pokazuju i veliki potencijal u modeliranju psihijatrijskih poremećaja kao što su autizam i shizofrenija zbog formirane neuralne mreže, iako još uvijek ima mnogo mjesta za razvoj kompleksnosti tih međustaničnih mreža (16). Ipak, organoidi prednjeg mozga dobiveni od stanica osoba s poremećajem iz spektra autizma pokazuju nesrazmjer i promjene u broju ekscitatornih i inhibitornih neurona (27, 41). Sličnost s *in vivo* patologijom su i defekti u migraciji neurona primijećeni u asemblidima prednjeg mozga osoba s Timothyjevim sindromom čije je obilježje mutacija gena za L-tip kalcijevih kanala (42). Također, organoidi hipotalamusa obećavajući su model metaboličkih poremećaja i pretilosti (43, 44). Nadalje, organoidi mozga predstavljaju bolji model neuroloških bolesti od tradicionalnih staničnih kultura jer su za istraživanje patofiziologije



bolesti kao što su Parkinsonova bolest, poremećaji iz spektra autizma, Alzheimerova bolest i bipolarni poremećaj često potrebne mutacije više gena te dolazi do zahvaćanja više vrsta stanica i više regija mozga što je prekomplikirano za reproduciranje u dvodimenzionalnim kulturama, dok organoidi u tome pokazuju uspjeh (12). Daljnji se potencijal organoida mozga istražuje u modeliranju ishemije mozga u zamjenu za životinjski model kod okluzije srednje cerebralne arterije (12). Uspjeh bi tada u kliničkim ispitivanjima bio veći zbog zaobilaska razlika između vrsta, a i etički aspekt je povoljniji (12).

Organoidi mozga dobiveni od induciranih pluripotentnih matičnih stanica pacijenata predstavljaju odličan model neurorazvojnih bolesti koje u svojoj podlozi imaju poremećaje u regulaciji progenitornih stanica, kao što je njihova prerana diferencijacija, smanjena proliferacija i disrupcija staničnog ciklusa (16). Također, vrlo su dobar model za bolesti i poremećaje koji se zbog komplicirane etiopatogeneze ili razlike među vrstama teško mogu replicirati u životinjskim modelima i tradicionalnim kulturama stanica (12). Posebno su uspješni u prikazivanju patoloških promjena u ranim razvojnim stadijima zbog velike sličnosti s mozgom rane i srednje gestacijske dobi, mozgom koji je u toj dobi teško dostupan znanstvenicima (16).

Organoidi mozga također pružaju mogućnost boljeg razumijevanja razvoja i evolucije ljudskog mozga u usporedbi s drugim vrstama (16). Tako se organoidi mozga ljudi mogu usporediti s organoidima mozga čovjekolikih majmuna, čiji uzorci mozga, kao i oni od ljudi, nisu inače lako dostupni (16).

Moguća je daljnja manipulacija organoida pomoću CRISPR/Cas sustava ili virusnih vektora kako bi se promijenio genetički materijal „zdravog“ ili „bolesnog“ organoida mozga u skladu s tijekom istraživanja. Također, na taj je način moguće ispitivanje funkcije točno određenih proteina i patoloških mehanizama u uvjetima sličnim onima *in vivo* (16).

Iako su mnoge supstance pokazivale potencijal u liječenju neuroloških bolesti u glodavaca i u klasičnim staničnim kulturama, ipak su odbačene u kliničkim ispitivanjima (12). Kompleksnost mozga, time i neuroloških bolesti, te njihova multifaktorska etiopatogeneza koja se temelji na brojnim genetskim i okolišnim čimbenicima, otežava pronalazak novih i učinkovitih oblika terapije, a pri tome ne pomažu ni nepouzdana modeli za ispitivanje lijekova. Organoidi mozga kao trodimenzionalne strukture s anatomskim i fiziološkim karakteristikama mozga predstavljaju povoljniji model za ispitivanje terapijskih metoda. Također, mogućnost njihova uzgoja od stanica

dobivenih od pacijenata značajan je pomak u razvoju personalizirane medicine i bržeg pronalaska individualizirane terapije, a time i većeg preživljenja pacijenata.

Organoidi mozga bi još jednu ulogu mogli naći i u regenerativnoj medicini. Budući da se organoidi sastoje od matičnih stanica i imaju potencijal razvoja u cijele organe, mogu poslužiti kao izvor tkiva za transplantaciju (12). Već su se izvele transplantacije nekih organoida, kao što su gastrointestinalni organoidi i organoidi jetre, i to s velikim uspjehom (12). Iako nije bilo puno takvih studija s organoidima mozga, smatra se da imaju veliki potencijal u regenerativnoj medicini zbog velikog broja neuralnih progenitorskih stanica (12). Također, zbog velikog broja različitih i potpuno funkcionalnih stanica, mogli bi naći primjenu u liječenju neurodegenerativnih bolesti, npr. transplantacija organoida srednjeg mozga s dopaminergičkim neuronima u Parkinsonovoj bolesti (12).

Biobanka organoida mozga, tj. kolekcija raznih patološki promijenjenih organoida dobivenih od stanica pacijenata s različitim neurološkim bolestima, bila bi neprocjenjiv izvor informacija o različitim patološkim mehanizmima bolesti i potencijalnim metama terapije (45). Budući da je tkivo mozga teško dostupno i da još uvijek postoji puno nepoznanica o neurološkim poremećajima, biobanke bi uz tehnologiju organoida bile veliki korak naprijed u znanosti.

### **2.3 Nedostatci primjene organoida mozga**

Iako organoidi mozga posjeduju mnoge ključne značajke ljudskog mozga u razvoju, neki aspekti razvoja mozga, kao što je formiranje kortikalnih neuralnih slojeva, stvaranje vijuga i razvoj kompleksnih veza između neurona, nisu u potpunosti prisutni (16). Iako su ekscitatorni i inhibitorni neuroni kortikalnih organoida funkcionalni, manje su zreli u usporedbi s odraslim neuronima (16). Budući da su kortikalni organoidi modeli ranih i srednjih faza embrionalnog razvoja, ta se pojava uspoređuje s razvojem i sazrijevanjem neuralnih funkcija tijekom embrionalnih faza *in vivo*, ali, ipak, neuroni u zrelijim organoidima pokazuju znatno spontano ekscitacijsko izbijanje (16).

Još je jedan problem s organoidima mozga nedostatak ne-neuralnih stanica koje se inače nalaze u mozgu, kao što su glija stanica, imunološke i vaskularne stanice, zbog čega u ovom trenutku nije moguće modelirati poremećaje posredovane interakcijama između ne-neuralnih stanica ili ne-

neuralnih i neuralnih stanica (45). Iz tog razloga manjak imunskih stanica otežava modeliranje bolesti u kojima postoji neuroinflamatorna komponenta. Manjak vaskularizacije predstavlja veliko ograničenje u rastu i razvoju organoida pa tako organoidi mozga mogu narasti do 4 mm u promjeru, ali samo one stanice koje se nalaze dovoljno blizu površini mogu primiti dovoljno kisika i nutrijenata difuzijom (16). Kako organoid raste i kako se vanjski slojevi šire, tako se više metabolički zahtjevni progenitori u središtu s vremenom iscrpe nakon oko 100 dana inicijalne kulture te dolazi do nekroze središta organoida, što je posebno vidljivo u kasnijoj fazi neurogeneze (12, 16, 46). Manji broj progenitora znači smanjenje proliferacije i manji broj novih stanica zbog čega dolazi do strukturne dezorganizacije u dugotrajnim kulturama (16). Taj se problem u organoidima mozga može riješiti po uzoru na pokušaje s drugim organoidima (12). Tako su kokultivacijom mezenhimalnih matičnih stanica iz koštane srži i endotelnih stanica iz pupkovine, endotelne stanice formirale zrele vaskularne mreže *in vivo* nakon 4 do 7 dana (12). Bioprintanje, kojim se u organoid unose slojevi stanica koje oblikuju krvne žile, drugi je način na kojim se pokušava uspostaviti vaskularizacija (12).

Još je jedan nedostatak organoida izostanak kortikalnog preklapanja, tj. stvaranja girusa i sulkusa (16). U girincefaličnih se sisavaca povećanje kortikalne neurogeneze u vanjskoj subventrikularnoj zoni smatralo poticajem za girifikaciju, ali kortikalni organoidi koji imaju razvijenu oSVZ ne pokazuju znakove girifikacije (16). Mogući razlog za to je nedostizanje razvojnog stadija u kojem dolazi do tih promjena *in vivo* jer se primarni girusi stvaraju u 23. tjednu gestacije, a sekundarni u trećem trimestru (16). Unatoč brojnim pokušajima poticanja girifikacije u organoidima, nijedan nije bio uspješan (16).

Najveći je problem u razvoju organoida što se ne odvija u identičnim uvjetima kao razvoj mozga *in vivo* što znači da nedostaju esencijalni razvojni čimbenici koji su potrebni za razvoj u potpuno formiran i zreo organ (46). Manjak osovine djeluje na organoide tako da, iako se razvijaju određene regije mozga, nisu organizirane na način kao *in vivo* (46). Također, prisutan je i tzv. batch syndrome što znači da se različite serije organoida razlikuju u kvaliteti i razvijenim regijama mozga zbog razlika u uvjetima uzgajanja (17). Kako bi se to izbjeglo, moraju se detaljno definirati „zlatni standardi“ i najbolji protokoli kultiviranja organoida tako da se mogu imitirati i ponoviti u drugim studijama te kako bi se rezultati takvih studija mogli usporediti (47). Varijabilnost među organoidima može biti posljedica načina izoliranja i pročišćavanja stanica dobivenih iz primarnih

tkiva, npr. klinički uzorci mogu imati drugačije vrijeme uzorkovanja prije upotrebe, proteaze korištene za disocijaciju tkiva mogu biti različito učinkovite te se uvjeti sortiranja stanica mogu razlikovati, ili problem mogu biti uvjeti u kojima se organoidi kultiviraju, kao što su različiti faktori rasta i različita izloženost kisiku, stoga je važno da se svi tehnički detalji uključe u protokole i definiraju (47).

Nadalje, *in vitro* je potpora organoida relativno jednostavna i nedostaju razni faktori, dok je *in vivo* ponašanje matičnih stanica strogo i detaljno određeno mikrookolišem (12). Neki suplementi koji se koriste za razvoj organoida mozga potječu od životinja, kao što je fetalni bovini serum u proizvodnji embrioidnih tjelešaca i Matrigel koji se dobiva iz Engelbreth-Holm Swarm stanica sarkoma miša (12). Utjecaj životinjskih suplemenata na organoide mozga nije poznat te je moguće da pridonosi njihovoj heterogenosti (12).

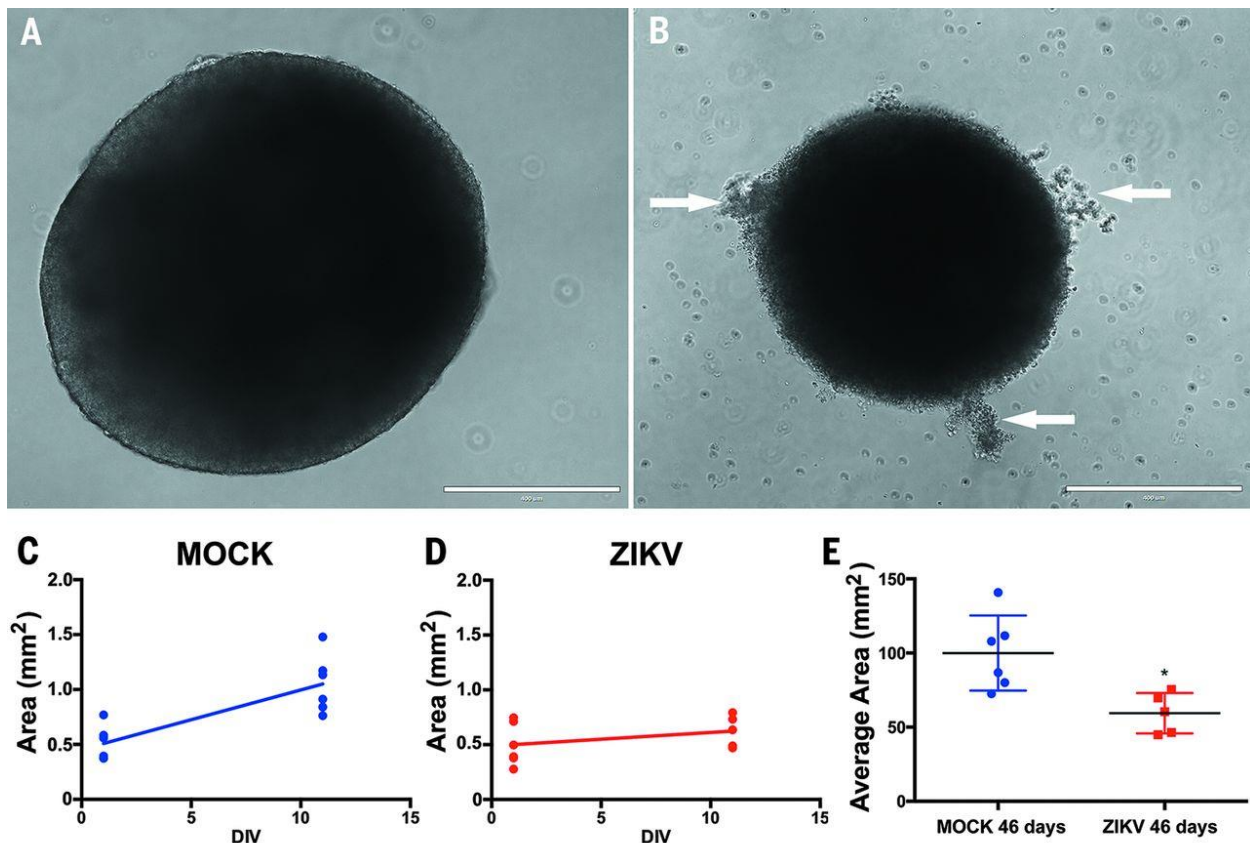
Budući da su organoidi samo kultura stanica koja predstavlja samo dio mozga, pomoću njih nije moguće istaživati kompleksne funkcije mozga u cjelini te u odnosu na cijeli organizam (47). U usporedbi sa životinjskim modelima, organoidi nude samo aproksimaciju biologije jednog organa, a ne ulogu tog organa naspram cijelog organizma (47). Također, nedostaju im važne *in vivo* značajke kao što je definirana os tijela, funkcionalni imunski sustav i potpuna fiziologija, stoga se rezultati studija provedenih na organoidima trebaju uspoređivati s ljudskim razvojem mozga, organizacijom tkiva i fiziologijom *in vivo* (47).

### 3. PRIMJENA ORGANOIDA MOZGA

#### 3.1 Istraživanje mikrocefalije uzrokovane zikavirusnom infekcijom

Zika je virus arbovirus iz porodice Flavivirusa (39). Srodan je virusu žute groznice, virusu dengue i virusu zapadnog nila (48). Prvi se puta opisuje u literaturi 1947. kada je otkriven u uzorcima krvi febrilnih Rhesus majmuna u Zika šumi u Ugandi tijekom studije o žutoj groznici (39, 49). Iako su zaražene osobe najčešće asimptomatske ili s blagim simptomima, zabrinutost izaziva povezanost infekcije zika virusom s fetalnom mikrocefalijom (40). Mikrocefalija je teška malformacija kojoj je glavna značajka smanjen ospeg mozga. Pacijenti imaju niz poremećaja koji zahvaćaju motorne i kognitivne funkcije te sluh i vid (50). Mikrocefaliju fetusa tijekom trudnoće može uzrokovati niz genetičkih faktora i mnogi vanjski uzroci koji ugrožavaju razvoj mozga *in utero*, npr. kao u ovom slučaju razne infekcije (50). Iako je brazilski soj zika virusa pronađen u placenti i amnijskoj tekućini dviju žena čiji su fetusi imali mikrocefaliju te u moždanom tkivu i retini novorođenčadi s mikrocefalijom, što upućuje na povezanost između infekcija zika virusom i mikrocefalije (39), ostalo je nejasno kako virus uzrokuje ovu konkretnu malformaciju.

Organoidi mozga omogućili su prikazivanje patoloških karakteristika ovog poremećaja te smanjenje veličine kao najznačajnije. Garcez i suradnici (50) proveli su studiju koja se sastojala od 6 ljudskih organoida mozga zaraženih zika virusom i 6 koji su bili kontrolne skupine. Njihova se veličina mjerila tijekom perioda od 11 dana *in vitro* razvoja. Primijetili su smanjenje veličine organoida zaraženih zika virusom za 40% u usporedbi s kontrolnim skupinama. Iste su rezultate dobili i Qian i suradnici (43) koji su izložili organoide prednjeg mozga afričkom soju zika virusa. Ishod je bio smanjenje veličine organoida i povećanje lumena ventrikula zbog izražene stanične smrti i supresije proliferacije.



Slika 3. Smanjenje brzine rasta organoida mozga uzrokovano zikavirusnom infekcijom. A – kontrola, B – zaraženi organoid. Prema Garcez PP i suradnici, 2016., Figure 4 (50)

Osim praćenja promjena u opsegu, moguće je analizirati i koje su točno vrste stanica zahvaćene i u kojim zonama organoida (40). Gabriel i suradnici (51) proveli su istraživanje s američkim i azijskim sojem zika virusa na organoidima mozga te primijetili da virus ima tropnost prema proliferativnoj ventrikularnoj zoni. Kao glavni fenotipski efekt naveli su preranu diferencijaciju neuralnih progenitora povezanu s neispravnim centrosomima što dovodi do neučinkovite neurogeneze i stanjivanja korteksa. Qian i suradnici (42) izložili su zika virusu organoide mozga koji su imali i progenitorni i neuralni sloj. Kao rezultat zikavirusna je infekcija dovela do značajnog smanjenja debljine i ventrikularne zone i neuralnog sloja što korelira s patološkim promjenama u mikrocefaliji. Također, otkrili su kako većinu zaraženih stanica u njihovim organoidima mozga čine SOX2 pozitivne živčane matične stanice što upućuje na afinitet zika virusa prema određenim tipovima stanica.

Osim gore navedenih istraživanja, neka su uključivala i genetičke manipulacije koje mogu pomoći razjasniti kako pojedini protein zika virusa ili nekodirajuća RNA utječu na organoid mozga, tako i na sam mozak *in vivo*, i na njegov razvoj (40). Naime, smatralo se da AXL receptor tirozin kinaze ima funkciju receptora za zika virus jer je izrazito izražen u ljudskim stanicama radijalne glije (52). Kako bi testirali tu hipotezu gen AXL je izbačen, ali to nije imalo utjecaja na infekciju organoida čime je dokazano da AXL nema funkciju u infekciji zika virusom (53).

Organoidi mozga također su se koristili kao model u usporedbi zikavirusne infekcije s infekcijama drugih virusa i virusa koji također uzrokuju morbiditet novorođenčadi. Kod usporedbe djelovanja zika virusa i herpes simplex virusa koje su proveli Marrazzo i suradnici (54) uočeno je da su oba virusa glavna meta neuroprogenitorne stanice. Zikavirusna je infekcija rezultirala smanjenjem lumena, dok je infekcija herpes simplex virusom uzrokovala veća oštećenja i povećanje lumena. Oba su virusa umanjila interferonski odgovor, i to jače u organoidima nego u dvodimenzionalnim staničnim kulturama, što korelira sa smanjenom imunosnom reakcijom u mikrocefaličnih pacijenata zaraženih zika virusom. Moguća je i usporedba virusa iz iste porodice te su, kako bi otkrili sličnosti i razlike srodnijih virusa, Garcez i suradnici (50) usporedili infekciju neurosfera i cerebralnih organoida zika virusom i virusom dengue 2 (DENV2). Njihovi su rezultati pokazali da zika virus, ali ne i virus dengue, usporava rast neuralnih progenitora, što znači da to nije generalna značajka porodice Flavivirusa.

Organoidi mozga drugih vrsta također su poslužili u razumijevanju sposobnosti prilagodbe zika virusa i razlika između sojeva virusa, pogotovo jer je prvi put nađen u majmuna, a tek kasnije u ljudi. Kako bi istražili adaptivni potencijal brazilskog i afričkog soja, Cugola i suradnici (39) izložili su im organoide mozga od stanica čimpanzi. Nakon 24 i 96 sati, uočili su da brazilski soj nije smanjio broj TBR1 i CTIP2 pozitivnih stanica, dok se virus afričkog soja replicirao bez poteškoća u stanicama čimpanzi. Također zarazili su ljudske organoide mozga brazilskim i afričkim sojem zika virusa i usporedili ih nakon istog perioda. Organoidi zaraženi brazilskim sojem imali su smanjen broj TBR1 i CTIP2 pozitivnih stanica i manju debljinu kortikalne ploče nego organoidi zaraženi afričkim sojem što upućuje na značajne razlike između sojeva virusa i na njihovo različito značenje u ljudskoj epidemiologiji.

Organoidi mozga korišteni su i za procjenu novih i mogućih antiviralnih lijekova. Jedan od njih je OGG1 inhibitor koji djeluje na Hsp70 šaperone i interferira sa životnim ciklusom zika virusa te na

taj način onemogućava oslobađanje čestica virusa (54). Uz to, terapija enoksacinom pokazala je interferiranje s RNA molekulama prevenirajući gubitak stanica i smanjenje organoida mozga zaraženih zika virusom (55). Krenn i suradnici (56) dodatno ističu učinkovitost interferona  $\beta$  u ublažavanju fenotipa organoida zaraženih zika virusom. Štoviše, metilensko modrilo, koje se prije koristilo u liječenju malarije, inhibira aktivnost proteina NS2B-NS3 te se pokazalo učinkovito protiv infekcije organoida zika virusom tako da uzorci u kojih je primijenjen 1.5  $\mu$ M metilenskog modrila nisu pokazivali znakove produkcije viriona (54).

### 3.2 Glioblastom

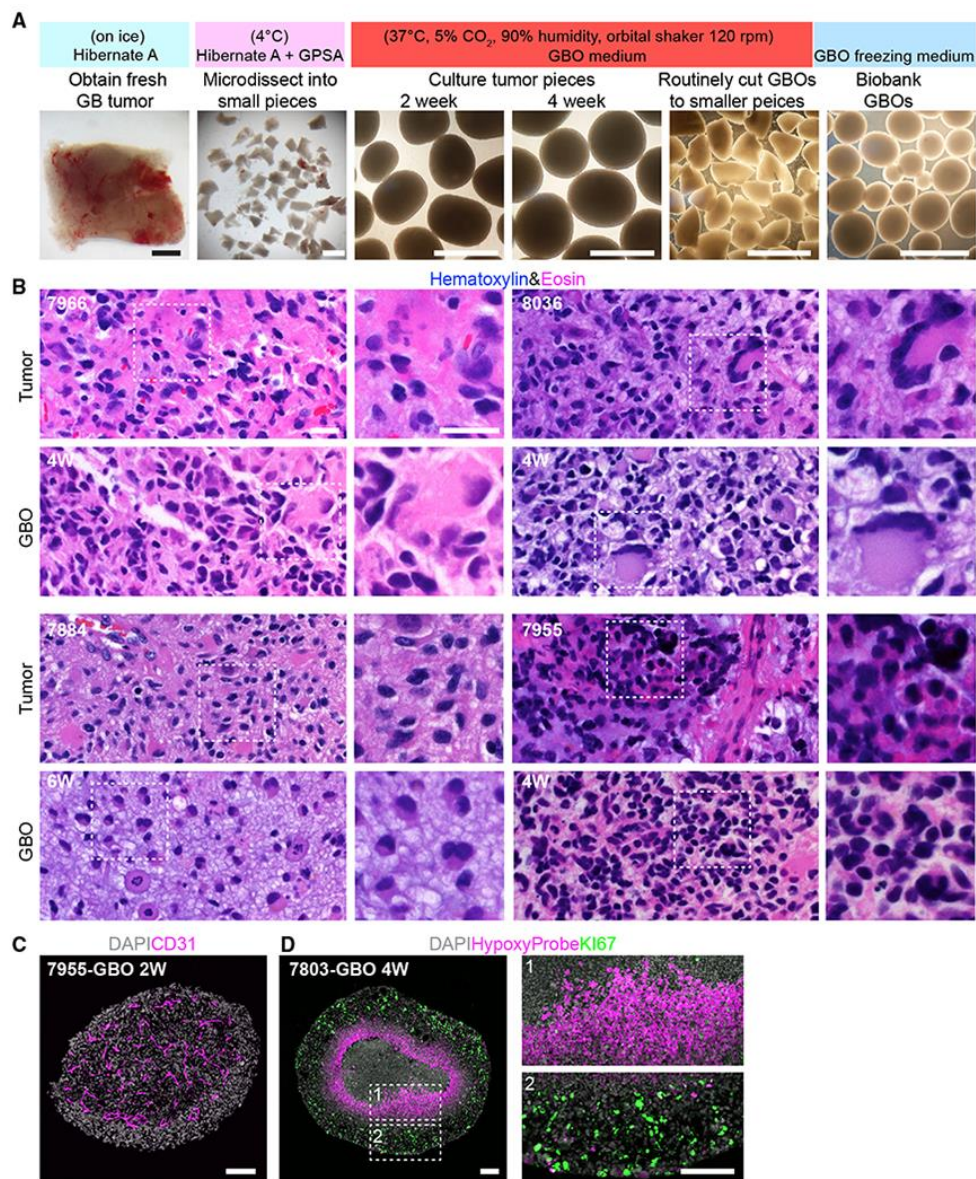
Glioblastom je najčešći i najagresivniji primarni moždani tumor (57). Unatoč desetljećima intenzivnog istraživanja, prosječno je vrijeme preživljavanja 12 do 15 mjeseci nakon dijagnoze (57). Više od desetljeća standardan je oblik terapije maksimalna resekcija popraćena kemoterapijom temozolomidom i radioterapijom (58). Kirurška je resekcija rijetko potpuna jer tumor agresivno infiltrira mozak te se stanice povezuju dugim protruzijama membrane („microtubes“) te tako nastala mreža omogućava međustaničnu komunikaciju i povećava izdržljivost tumora na uništenje stanica i radioterapiju (57). Budući da je petogodišnje preživljavanje manje od 5%, hitno su potrebni novi modeli za razvoj terapije (59).

Glavna je karakteristika glioblastoma velika genetička, epigenetička i transkripcijska inter- i intratumorska heterogenost (57,60) što znatno ograničava trenutačne *in vitro* modele koji ne pokazuju toliku raznolikost. Također, problem je i manjak vjerodostojnog modela koji bi prikazao invaziju u okolno tkivo mozga (58). Budući da su se organoidi dosad koristili kao model raznih tumora, uključujući pankreasa, prostate, jetre, dojke, jajnika i gastrointestinalnog sustava (61, 62, 63, 64, 65, 66, 67), počinju se koristiti i u istraživanju glioblastoma. Organoidi glioblastoma imaju histološka svojstva, staničnu raznolikost, ekspresiju gena i mutacijski profil svojih parentalnih tumora (57). Mogu se generirati brzo s velikom učinkovitošću i pokazuju brzu i agresivnu infiltraciju nakon transplantacije u mozak odraslog glodavca (58).

Jedno od primjera istraživanja koje to dokazuje je ono koje su proveli Jacob i suradnici (58) tako što su uzgojili organoide glioblastoma iz svježih uzoraka tumora. Važno je naglasiti da su ti organoidi pokazivali inter- i intratumorsku heterogenost te posjedovali glavne značajke svojih



parentalnih tumora. Zatim su organoide glioblastoma uspješno transplantirali u mozgove odraslih imunodeficientnih miševa te je nađena značajna ispilateralna i kontralateralna infiltracija stanica organoida u okolno tkivo mozga. Također, gotovo su svi ksenografti organoida glioblastoma razvili vlastitu vaskularnu mrežu od endotelnih stanica domaćina 2 mjeseca nakon transplantacije, što je u skladu s velikom sposobnosti glioblastoma za angiogenezu uočenoj u pacijenata.



Slika 4. Histološki prikaz organoida glioblastoma i sličnosti s njihovim parentalnim tumorima. Prema Jacob F i suradnici, 2020, Figure 1 (58)

Još je jedan mogući način proučavanja glioblastoma pomoću matičnih stanica glioma koje se kokultiviraju s organoidima mozga te se takve strukture nazivaju GLICO modeli. Važnost su takvog modela dokazali Linkous i suradnici (59) koji su kokultivirali fluorescentno obilježene matične stanice glioma s potpuno formiranim organoidima mozga. Nakon jednog tjedna matične su stanice glioma invadirale normalno tkivo, i to na morfološki sličan način opažen u pacijenata od kojih potječe taj uzorak. Kako bi dalje utvrdili sličnost između glioblastoma pacijenata i njihovih GLICO modela, Linkous i suradnici analizirali su fosforilaciju 49 različitih receptora tirozin kinaze te su im rezultati pokazali da postoji velika sličnost između uzoraka signalizacije između GLICO modela i njihovih parentalnih tumora.

Drugi je način primjene matičnih stanica glioma proučavanje njihove interakcije s organoidima mozga u različitim okolnostima. Takvo su istraživanje proveli Goranci-Buzhala i suradnici (68) kako bi demonstrirali drugačije metode invazivnog ponašanja glioblastoma u organoidima te su njihove metode uključivale simultanu kokulturu GSC-a s organoidima, dodavanje GSC-a u obliku raspršenih stanica organoidima i fuziju GSC-a kao kompaktnih sfera s organoidima. Pri tome su koristili matične stanice glioma dobivene od tri primarna i tri rekurentna tumora. Matične su stanice glioma bile više difuzno raspoređene u prvoj metodi, dok su u druge dvije tvorile nakupine. Na taj su način otkrili da su prisutni različiti oblici invazije kao što je difuzija, integracija i interakcija s organoidima. Također, uočena je razlika u invazivnoj sposobnosti primarnih i rekurentnih tumora.

Osim toga, organoidi mozga omogućuju proučavanje pojedinih komponenti specifičnih za glioblastome kao što je sustav mikrocijevi. Točno to su napravili Krieger i suradnici (57) tako što su organoide mozga kokultivirali sa stanicama glioblastoma dobivenih od pacijenata. Tumorske su stanice invadirale organoide i formirale su protruzije prema drugim stanicama što je u korelaciji s formiranjem mikrocijevi opaženim u reseciranim primarnim tumorima i u miševa *in vivo*. Stanice s većim invazivnim kapacitetom pokazivale su duže mikrocijevi što je povezano s nalaskom *in vivo* da mikrocijevi omogućuju lakšu diseminaciju tumora tako što stanice glioblastoma izmjenjuju citoplazmatske molekule. Ovakvi rezultati i nađena sličnost s ponašanjem tumorskih stanica *in vivo* potvrđuju da su organoidi mozga u kokulturi s tumorskim stanicama glioblastoma dobar model za invaziju i formiranje mikrocijevi.

Osim istraživanja patofiziologije glioblastoma, organoidi mozga također pokazuju potencijal u testiranju lijekova, uključujući i razvoj personalizirane terapije. Jacob i suradnici (58) izložili su organoide glioblastoma jednostrukoj dozi zračenja od 10 Gy s istovremenom primjenom temozolomida (50  $\mu$ M) tijekom jednog tjedna. Terapijski se učinak mjerio određivanjem postotka stanica koje izražavaju biljeg KI67 koji se povezuje s preživljavanjem pacijenata. Dio organoida glioblastoma pokazivao je smanjene postotke KI67 pozitivnih stanica nakon takve terapije. Jacob i suradnici napominju da su potrebne daljnje studije s većim broj ispitanika i uzoraka kako bi se bolje utvrdila veza i sličnosti između odgovora pacijenta i organoida glioblastoma na terapiju. Linkous i suradnici (59) su, kako bi istražili razliku između odgovora GLICO modela i dvodimenzionalnih staničnih kultura na ionizirajuće zračenje i kemoterapeutike (TMZ i BCNU), primijenili različite doze Gy, TMZ-a i BCNU-a na oba tipa kulture i zapazili značajno manju učinkovitost smanjenja rasta i proliferacije stanica tumora u GLICO modelima nego u dvodimenzionalnim kulturama. Takav je učinak na GLICO modele sličniji onom *in vivo* te su zbog toga organoidi vjerodostojniji model ispitivanja moguće terapije.

Kao važan izvor podataka o patologiji glioblastoma i odgovoru na liječenje predstavljaju biobanke koje sadrže organoide glioblastoma različitih pacijenata. Proučavanje tih organoida, kao i mogućnost testiranja različitih oblika terapije na njima, omogućuju bolje razumijevanje glioblastoma i razvoj personalizirane terapije, što je iznimno važno s obzirom na veliku heterogenost tumora i nisku stopu preživljavanja.

### **3.3 Parkinsonova bolest**

Parkinsonova je bolest kronična i progresivna neurodegenerativna bolest koja se prezentira velikim brojem motornih (bradikinezija, tremor u mirovanju, rigor, i posturalna nestabilnost) i nemotornih simptoma (poremećaji autonomnog živčanog sustava, poremećaji spavanja, neuropsihijatrijski poremećaji, demencija) (69, 70). Predstavlja drugu najčešću neurodegenerativnu bolest, a, s obzirom na to da se uglavnom javlja u starijih osoba, postaje sve veći problem i opterećenje zdravstvenog sustava zbog globalnog starenja stanovništva (69). Otprilike 10% slučajeva Parkinsonove bolesti nastaje zbog genetske mutacije koja se prenosi u obitelji, dok su ostali slučajevi nejasne etiologije. Obiteljski se slučajevi povezuju s mutacijama gena SNCA, LRRK2, PINK1, PARK2 i GBA1 (71). Glavne patološke promjene mozga specifične za Parkinsonovu

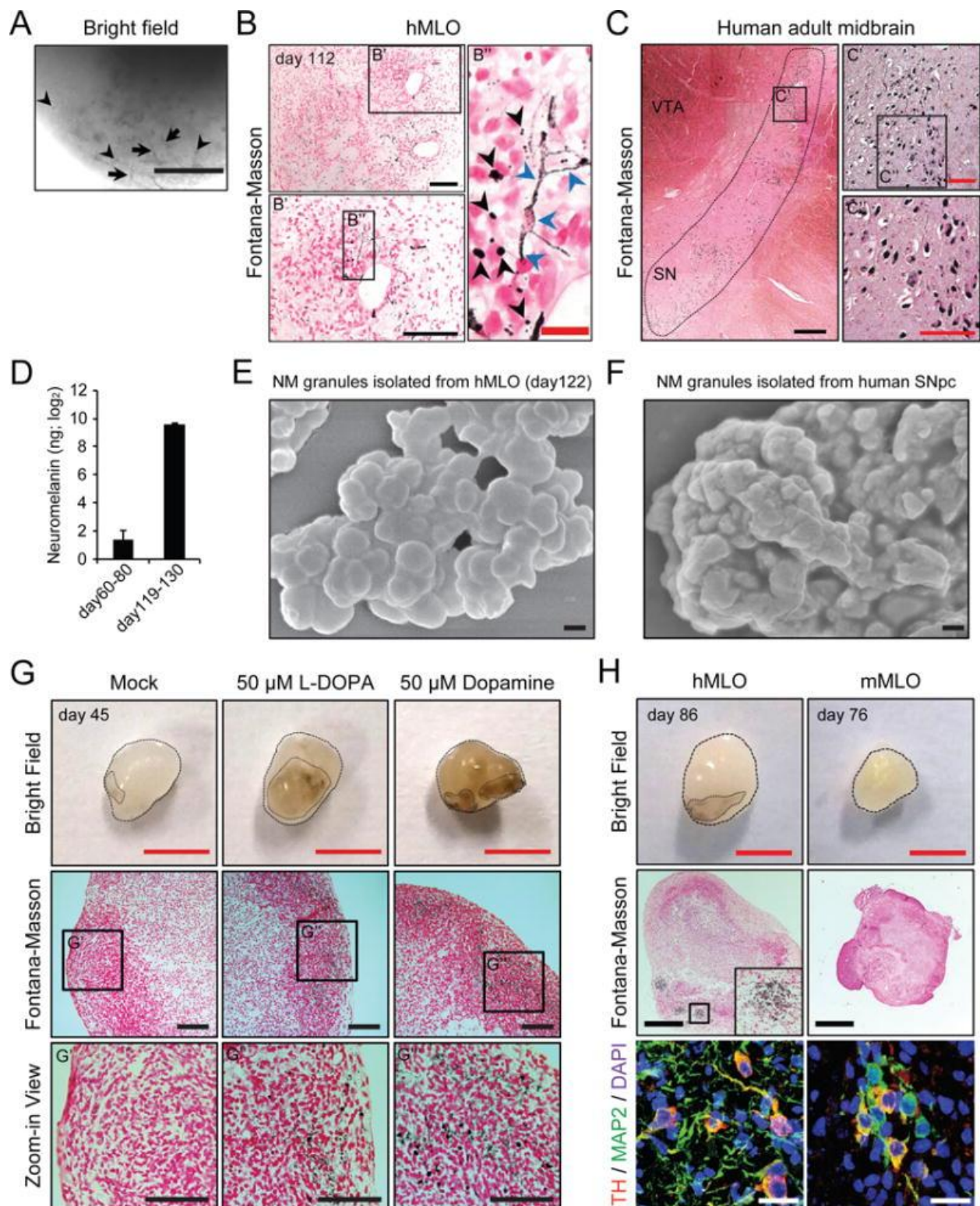
bolest su degeneracija i gubitak dopaminergičkih neurona nigrostrijatalnog puta te prisutnost Lewyjevih tjelešaca koja se sastoje od  $\alpha$ -sinukleina (69).

Zbog komplicirane etiopatogeneze Parkinsonove bolesti, raznovrsnosti simptoma te manjka i nepouzdanosti modela za istraživanje, trenutne terapijske opcije za liječenje Parkinsonove bolesti nisu zadovoljavajuće (69).

Organoidi nalik srednjem mozgu prvi su se puta uspješno razvili 2016. godine i otad su u središtu pozornosti kao mogući modeli Parkinsonove bolesti (26). Jo i suradnici (26) pri tome su koristili humane matične stanice embrija. Velika je sličnost uočena 35. dan razvoja kada su nađena sva tri sloja (proliferativna ventralna zona, intermedijarna i mantle zona) koja se nalaze u ranim razvojnim stadijima mozga koji se razvija *in vivo*. Važno su otkriće crno-smeđi depoziti pozitivni na Fontana-Masson bojanje u organoidima nakon 2 mjeseca te se njihov broj s vremenom još više povećavao. Elektronskom su se mikroskopijom tih depozita uočile morfološke sličnosti s granulama neuromelanina iz ljudskih postmortalnih uzoraka mozga što je od velike važnosti za daljnja istraživanja Parkinsonove bolesti jer se takve granule nisu uspjele dokazati u klasičnim dvodimenzionalnim kulturama dopaminergičkih neurona i u humanim cerebralnim organoidima.

Daljnja su istraživanja na organoidima pokazala da imaju sposobnost proizvodnje neuromelanina i stvaranja funkcionalnih neuralnih mreža (71). Tako su Monzel i suradnici (72) napravili model za proučavanje etiopatogeneze Parkinsonove bolesti pomoću neuroepitelnih matičnih stanica za razvoj organoida koje su već usmjerene prema razvoju u srednji mozak. Njihovi su se organoidi pokazali kao vjerodostojan model Parkinsonove bolesti jer su se sastojali od dopaminergičkih neurona, stvarali su funkcionalne sinaptičke veze, pokazivali spontanu neuralnu aktivnost te sadržavali oligodendrocite i astrogliju zbog čega imaju veliki potencijal u otkrivanju razvojnih poremećaja i karakteristika Parkinsonove bolesti koje se ne mogu otkriti u dvodimenzionalnim kulturama (71).





Slika 5. Analiza neuromelanina u humanim organoidima srednjeg mozga. Prema Jo J i suradnici, 2016, Figure 3 (26)

Upotreba genetičke manipulacije organoida srednjeg mozga pridonijela je razjašnjavanju mutacija povezanih s razvojem Parkinsonove bolesti. Jedna je od tih mutacija G2019S mutacija u LRRK2 genu koju su proučavali Kim i suradnici (73) prvo ju izazvavši pomoću CRISPR/Cas9 sustava u humanim induciranim pluripotentnim stanicama koje su onda poslužile za razvoj organoida. Kim i suradnici odlučili su se za tu mutaciju jer su besmislene mutacije u LRRK2 genskom lokusu najčešći poznati uzrok kasne obiteljske i sporadične Parkinsonove bolesti (73), ali nijedan životinjski model ni dvodimenzionalna kultura s tom mutacijom nisu pokazivali patologiju Parkinsonove bolesti (74) što predstavlja problem u modeliranju te mutacije. Organoidi u studiji koju su provodili Kim i suradnici pokazivali su iste patološke značajke kao i mozak pacijenata s tom mutacijom kao što je povećano nakupljanje  $\alpha$ -sinukleina i njegovo nepotpuno uklanjanje te smanjena ekspresija markera dopaminergičkih neurona.

Budući da je Parkinsonova bolest karakteristična za stariju dob, problem u prikazivanju specifičnih patoloških promjena u organoida njihova je sličnost s mozgom fetalnog razdoblja. Kako bi zaobišli tu poteškoću i postigli veću sličnost mozgu starijih osoba, Kim i suradnici (73) držali su organoide srednjeg mozga u BDNF i GDNF bez antioksidansa tijekom 60 dana. Uzgojeni su organoidi od 45. dana pokazivali veliku sličnost sa zrelim srednjim mozgom, a 60. je dan nađena značajna količina neuromelanina u organoidima, povećana ekspresija gena koji su inače izraženi u mozgu starijih osoba te fosforilacija histona, koja je marker oštećenja DNA povezan sa starenjem. Takvi rezultati znatno reduciraju ograničenja upotrebe organoida u istraživanjima Parkinsonove bolesti, ali i drugih neuroloških bolesti povezanih sa starenjem.

Organoidi koji imitiraju Parkinsonovu bolest isto se tako koriste za testiranje terapije. Tako su se Jo i suradnici (26) odlučili na tretman organoida nalik srednjem mozgu s 50  $\mu$ M L-dope ili 50  $\mu$ M dopamina. Tretman je trajao 10 dana, nakon čega su se mjerili rezultati te je primijećen povećan broj i gusta raspodjela neuromelanina. Za razliku od toga, u organoidima nalik srednjem mozgu koji nisu tretirani l-dopom ili dopaminom i organoidima mozga tretiranih l-dopom nisu uočene granule melanina. Kim i suradnici (73) testirali su još jedan oblik potencijalne terapije. Primijenili su inhibitore LRRK2 kinaze na organoide s LRRK2 mutacijom. Na taj je način značajno smanjena akumulacija fosforiliranog  $\alpha$ -sinukleina te se ekspresija markera dopaminergičkih neurona djelomično obnovila.

Iz prikazanih se istraživanja može zaključiti da su organoidi pouzdan model za istraživanje etiopatogeneze i patologije Parkinsonove bolesti, kao i za testiranje novih oblika terapije.

### **3.4 Alzheimerova bolest**

Alzheimerova je bolest najčešći oblik demencije karakteriziran progresivnim gubitkom pamćenja i kognitivnom disfunkcijom povezanom s raznim promjenama mozga kao što su poremećaji u funkciji sinapsi, smrt neurona, inflamatorne promjene u mozgu i akumulacija proteina u obliku ekstracelularnog beta-amiloidnog plaka i intracelularnih neurofibrilarnih čvorova koji se sastoje od hiperfosforiliranog tau proteina 1 (75, 76, 77).

Oko 95% slučajeva Alzheimerove bolesti čini kasni sporadični oblik koji je uglavnom nejasne etiologije, a rizičnim se faktorima smatraju starija životna dob i mnogi genetski faktori (77). Ostalih 5% čine pacijenti s obiteljskim oblikom Alzheimerove bolesti koja je povezana s mutacijama gena, uključujući gene za presinilin 1 i 2 te APP gen (77).

Incidencija je Alzheimerove bolesti u porastu zbog globalnog starenja populacije i postala je jedan od glavnih zdravstvenih problema modernog društva (77). U 2019. je godini Alzheimer's Disease International (ADI) procijenilo da je broj oboljelih na globalnoj razini veći od 50 milijuna ljudi, dok će do 2050. godine taj broj biti do 152 milijuna (77).

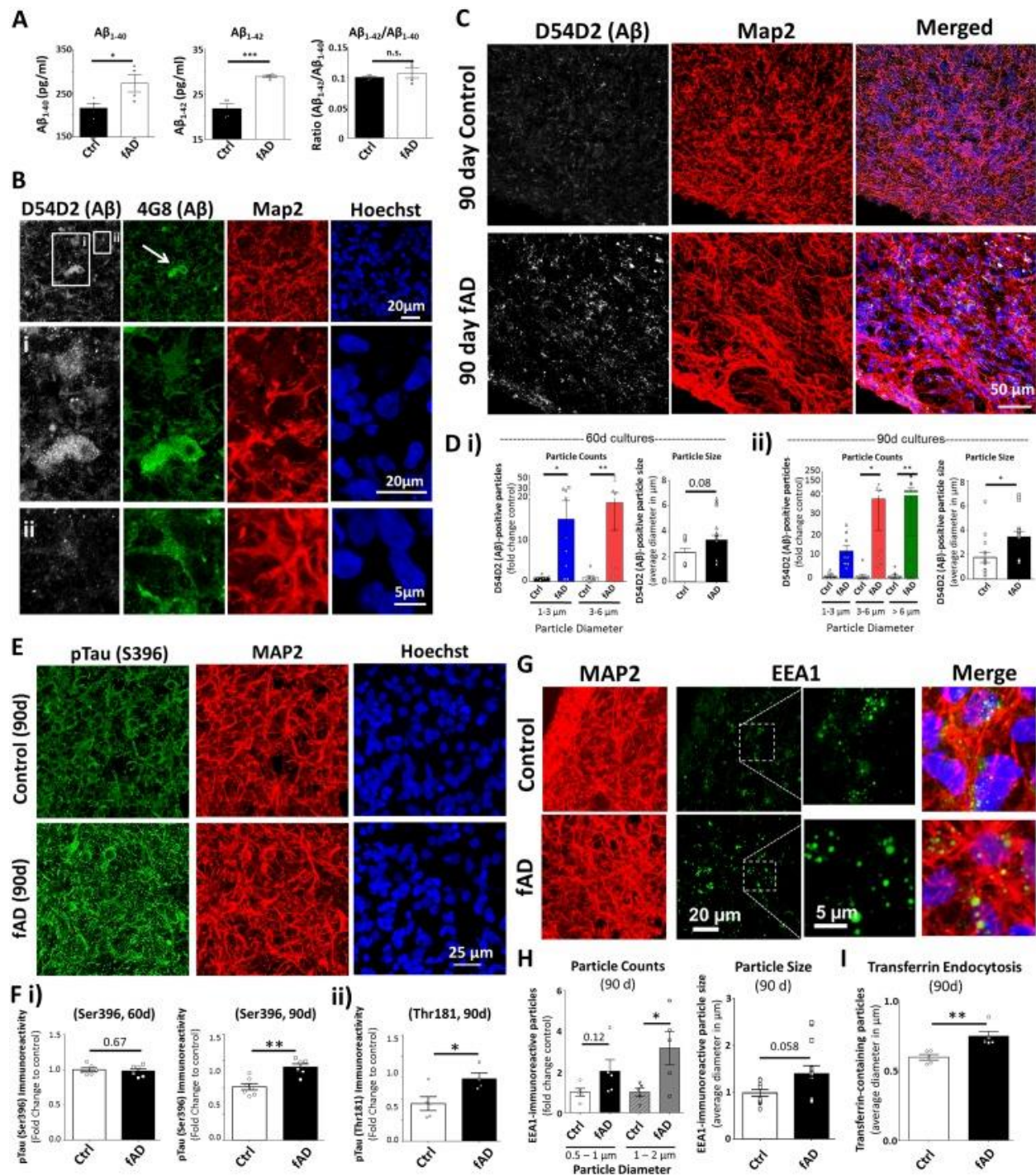
Trenutačna je terapija samo palijativna jer ne zaustavlja ni usporava napredovanje bolesti (75). Mnoge su kliničke studije imale nezadovoljavajuće rezultate nakon pozitivnog učinka u pretkliničkim studijama (75). Otkrivanje patoloških mehanizama i razvoj učinkovitih lijekova još su uvijek problematični jer dostupni životinjski modeli i stanične kulture ne mogu u potpunosti prikazati sve patološke promjene Alzheimerove bolesti, stoga postoji potreba za eksperimentalnim modelom koji će u potpunosti imati osnovne patološke osobine nađene u ljudskim stanicama (75, 77).

Organoidi su dosad pokazali svoj potencijal u istraživanju etiopatogeneze, patologije i mogućih lijekova za Alzheimerovu bolest. Organoidi mozga u mogućnosti su modelirati i sporadične i obiteljske oblike Alzheimerove bolesti. Primjer istraživanja sporadičnog oblika je istraživanje koje su proveli Chen i suradnici (78). Vodili su se teorijom da je propusnost krvno-moždane barijere

rizični čimbenik za sporadični oblik Alzheimerove bolesti te su, kako bi to dodatno istražili, odlučili organoide mozga izložiti ljudskom serumu oponašajući takve uvjete *in vivo*. Izloženost serumu dramatično je povećala A $\beta$  razine u organoidima mozga u usporedbi s kontrolnim organoidima mozga koji nisu bili izloženi. Organoide mozga zatim su obojali za sinapsin-1 kako bi provjerili broj sinapsi. Njihovi su rezultati indicirali da bi izloženost serumu mogla uzrokovati gubitak sinapsi što je važna odlika Alzheimerove bolesti. Ukupno, organoidi mozga izloženi ljudskom serumu u ovom istraživanju pokazivali su patološke promjene slične onima u Alzheimerovoj bolesti uključujući A $\beta$  agregate, fosforilaciju mikrotubula povezanu s razinom tau-proteina, smanjen broj sinapsi i potaknut imunosni odgovor astrocita.

Organoide reprezentativne za obiteljski oblik Alzheimerove bolesti proučavali su Raja i suradnici (79). Stanice za uzgoj organoida mozga dobili su od pacijenata s obiteljskim oblikom Alzheimerove bolesti s duplikacijom amiloid prekursor proteina (APP) ili mutacijom presenilina 1 (PSEN1). Takvi su organoidi pokazivali patološke promjene specifične za Alzheimerovu bolest kao što je agregacija amiloida, hiperfosforilirani tau protein i abnormalnosti endosoma. Ovakve su patološke promjene primijećene u ovisnosti o dobi organoida, a incidencija je patologije bila konzistentna u nekoliko linija organoida koji su imali iste mutacije. Važno je istaknuti da su se u ovom istraživanju modeli dobili bez genetske manipulacije i egzogenih toksina što predstavlja izvrstan temelj za daljnja istraživanja etiopatogeneze.





Slika 6. Organoidi uzgojeni od stanica pacijenata s Alzheimerovom bolesti pokazuju sukladne patološke promjene. Prema Raja WK i suradnici, 2016, Figure 1 (79).

Daljnja istraživanja na organoidima uzgojenim od stanica pacijenata proveli su Gonzalez i suradnici (80). Istraživali su pokazuju li organoidi mozga od pacijenata s obiteljskim tipom

Alzheimerove bolesti i Downovim sindromom patološka obilježja Alzheimerove bolesti kao što su A $\beta$  i p-tau proteinski agregati. Nađene su ekstracelularne A $\beta$  nakupine, dok ih u kontrolnim organoidima nije bilo. Također, usporedili su svoje nalaze s organoidima pacijenata s drugim neurodegenerativnim bolestima, kao što je obiteljski oblik Creutzfeldt-Jakobove bolesti, kao i s organoidima od induciranih pluripotentnih i embrionalnih matičnih stanica miševa. U tom slučaju takvi nalazi nisu nađeni zbog čega Gonzalez i suradnici zaključuju da je za razvoj takve patologije potrebna genetska predispozicija (kao što je u obiteljskom obliku Alzheimerove bolesti i Downovu sindromu). Gonzalez i suradnici ističu da su potrebne daljnje studije s većim brojem pacijenata uključenim i drugačijim mutacijama kako bi se točnije potvrdio ovaj zaključak.

Daljnja istraživanja genetičkih mutacija povezanih s razvojem Alzheimerove bolesti uključivala su i mutaciju APOE4 koja predstavlja najveći rizik za sporadični oblik Alzheimerove bolesti. Takvo su istraživanje proveli Lin i suradnici (81) kako bi utvrdili mogu li APOE4 organoidi pokazivati obilježja slična onima u organoidima od pacijenata s obiteljskim oblikom Alzheimerove bolesti. APOE4 organoidi pokazivali su A $\beta$  akumulaciju i tau fosforilaciju veću u usporedbi s APOE3 organoidima te su iz takvih rezultata Lin i suradnici zaključili da APOE4 varijanta može sama uzrokovati patološke promjene Alzheimerove bolesti. Nakon toga su pomoću CRISPR/Cas9 sustava homozigotne stanice za APOE4 varijantu modificirali u homozigotne za APOE3 kako bi testirali može li takva konverzija ublažiti promjene vezane uz Alzheimerovu bolest. Lin i suradnici dokazali su da je ta mutacija dovoljna za ublažavanje patologije Alzheimerove bolesti u organoidima.

Drugi pokušaji testiranja drugačijih oblika terapije uključuju primjenu raznih supstanci. Jedna je od tih supstanci CKD-504 čiji su terapijski učinak proučavali Choi i suradnici (82). CKD-504 visoko je selektivni inhibitor HDAC6 s mogućnošću prolaska krvno-moždane barijere te je u ovoj studiji uspješno modificirao acetilaciju u organodima mozga. CKD-504 inhibira HDAC6 zbog čega je došlo do promjena u interakcijama tau-proteina sa šaperonima i E3 ligazama te ubrzane proteosomske razgradnje tau-proteina. Iz tih rezultata proizlazi da CKD-504 ima potencijal u mogućem budućem liječenju Alzheimerove bolesti.

Drugi su oblik obećavajuće terapije  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaze koje su proučavali Raja i suradnici (79). Njihov su učinak analizirali nakon tretiranja organoida od 30 dana starosti tijekom 30 dana te su uočili

značajno smanjenje agregata amiloida ovisno o dozi, a zatim i nakon daljnjih 30 dana i smanjenje imunoreaktivnosti p-tau proteina.

#### 4. ZAKLJUČAK

Organoidi mozga zbog svoje kompleksne trodimenzionalne strukture predstavljaju najvjerniji *in vitro* model ljudskog mozga. Prednosti organoida mozga nad dvodimenzionalnim staničnim kulturama i životinjskim modelima, kao što su trodimenzionalnost, velika stanična, strukturna i funkcionalna sličnost ljudskom mozgu te kompatibilnost iste vrste, dosad su dokazane u mnogim istraživanjima. Tako su npr. organoidi mozga donijeli vrlo značajna otkrića u području Parkinsonove i Alzheimerove bolesti te u istraživanjima utjecaja virusa na razvoj mozga. Ipak, organoidi mozga imaju i nedostatke, kao što su potreba za vrlo dugotrajnim, višemjesečnim uzgojem, manjak vaskularizacije i imunskih stanica te izostanak oblikovanja moždanih vijuga. Za očekivati je kako ćemo daljnjim napretkom protokola za dugotrajni uzgoj i povećanjem kompleksnosti uzgajanog tkiva (npr. dodavanjem glija i imunskih stanica) dobiti još bolje *in vitro* modele ljudskog mozga, što će nam omogućiti još brži napredak u razumijevanju bolesti mozga te otkrivanje novih terapijskih postupaka.

## **5. ZAHVALE**

Zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Dinku Mitrečiću na strpljenju i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi stalna podrška u svemu što radim.

## 6. LITERATURA

1. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*. 2009 Apr 10;513(5):532-41.
2. Van Essen DC, Donahue CJ, Glasser MF. Development and Evolution of Cerebral and Cerebellar Cortex. *Brain Behav Evol*. 2018;91(3):158-169.
3. Donahue CJ, Glasser MF, Preuss TM, Rilling JK, Van Essen DC. Quantitative assessment of prefrontal cortex in humans relative to nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 29;115(22):E5183-E5192.
4. Glasser MF, Smith SM, Marcus DS, Andersson JL, Auerbach EJ, Behrens TE, Coalson TS, Harms MP, Jenkinson M, Moeller S, Robinson EC, Sotiropoulos SN, Xu J, Yacoub E, Ugurbil K, Van Essen DC. The Human Connectome Project's neuroimaging approach. *Nat Neurosci*. 2016 Aug 26;19(9):1175-87.
5. Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Oct;6(10):777-88.
6. Agirman G, Broix L, Nguyen L. Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Lett*. 2017 Dec;591(24):3978-3992.
7. Kelava I, Lancaster MA. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev Biol*. 2016 Dec 15;420(2):199-209.
8. Taverna E, Huttner WB. Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron*. 2010 Sep 23;67(6):906-14.
9. Howard BM, Zhicheng Mo, Filipovic R, Moore AR, Antic SD, Zecevic N. Radial glia cells in the developing human brain. *Neuroscientist*. 2008 Oct;14(5):459-73.
10. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*. 2011 Jul 8;146(1):18-36.
11. Fernández V, Llinares-Benadero C, Borrell V. Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *EMBO J*. 2016 May 17;35(10):1021-44.
12. Wang Z, Wang SN, Xu TY, Miao ZW, Su DF, Miao CY. Organoid technology for brain and therapeutics research. *CNS Neurosci Ther*. 2017 Oct;23(10):771-778.
13. Corrò C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020 Jul 1;319(1):C151-C165.
14. Trujillo CA, Gao R, Negraes PD, Gu J, Buchanan J, Preissl S, Wang A, Wu W, Haddad GG, Chaim IA, Domissy A, Vandenberghe M, Devor A, Yeo GW, Voytek B, Muotri AR. Complex

Oscillatory Waves Emerging from Cortical Organoids Model Early Human Brain Network Development. *Cell Stem Cell*. 2019 Oct 3;25(4):558-569.e7.

15. 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.

16. Qian X, Song H, Ming GL. Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development*. 2019 Apr 16;146(8):dev166074.

17. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2014 Oct;9(10):2329-40.

18. 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.

19. 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.

20. 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 combinatory treatment with extrinsic signals. *J Neurosci*. 2011 Feb 2;31(5):1919-33.

21. 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.

22. Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, Soen M, Ando S, Eiraku M, Sasai Y. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 10;110(50):20284-9.

23. Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep*. 2015 Feb 3;10(4):537-50.

24. Sakaguchi H, Kadoshima T, Soen M, Narii N, Ishida Y, Ohgushi M, Takahashi J, Eiraku M, Sasai Y. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat Commun*. 2015 Nov 17;6:8896.

25. Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell*. 2013 May 2;12(5):520-30.

26. Jo J, Xiao Y, Sun AX, Cukuroglu E, Tran HD, Göke J, Tan ZY, Saw TY, Tan CP, Lokman H, Lee Y, Kim D, Ko HS, Kim SO, Park JH, Cho NJ, Hyde TM, Kleinman JE, Shin JH, Weinberger

- DR, Tan EK, Je HS, Ng HH. Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. *Cell Stem Cell*. 2016 Aug 4;19(2):248-257.
27. Mariani J, Coppola G, Zhang P, Abyzov A, Provini L, Tomasini L, Amenduni M, Szekely A, Palejev D, Wilson M, Gerstein M, Grigorenko EL, Chawarska K, Pelphrey KA, Howe JR, Vaccarino FM. FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell*. 2015 Jul 16;162(2):375-390.
28. 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.
29. Sakaguchi H, Kadoshima T, Soen M, Narii N, Ishida Y, Ohgushi M, Takahashi J, Eiraku M, Sasai Y. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat Commun*. 2015 Nov 17;6:8896.
30. Yoon SJ, Elahi LS, Paşca AM, Marton RM, Gordon A, Revah O, Miura Y, Walczak EM, Holdgate GM, Fan HC, Huguenard JR, Geschwind DH, Paşca SP. Reliability of human cortical organoid generation. *Nat Methods*. 2019 Jan;16(1):75-78.
31. Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med*. 1977 Jan 1;145(1):204-20.
32. Timmins NE, Nielsen LK. Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol Med*. 2007;140:141-51.
33. Gabriel E, Wason A, Ramani A, Gooi LM, Keller P, Pozniakovskiy A, Poser I, Noack F, Telugu NS, Calegari F, Šarić T, Hescheler J, Hyman AA, Gottardo M, Callaini G, Alkuraya FS, Gopalakrishnan J. CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *EMBO J*. 2016 Apr 15;35(8):803-19.
34. 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 Nov;8(11):823-833.
35. Barrera JA, Kao LR, Hammer RE, Seemann J, Fuchs JL, Megraw TL. CDK5RAP2 regulates centriole engagement and cohesion in mice. *Dev Cell*. 2010 Jun 15;18(6):913-26.
36. Lizarraga SB, Margossian SP, Harris MH, Campagna DR, Han AP, Blevins S, Mudbhary R, Barker JE, Walsh CA, Fleming MD. Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development*. 2010 Jun;137(11):1907-17.
37. Pulvers JN, Bryk J, Fish JL, Wilsch-Bräuninger M, Arai Y, Schreier D, Naumann R, Helppi J, Habermann B, Vogt J, Nitsch R, Tóth A, Enard W, Pääbo S, Huttner WB. Mutations in mouse *Aspm* (abnormal spindle-like microcephaly associated) cause not only microcephaly but also major defects in the germline. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 21;107(38):16595-600.



38. Li Y, Muffat J, Omer A, Bosch I, Lancaster MA, Sur M, Gehrke L, Knoblich JA, Jaenisch R. Induction of Expansion and Folding in Human Cerebral Organoids. *Cell Stem Cell*. 2017 Mar 2;20(3):385-396.e3.
39. 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, Buchpigel 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.
40. Qian X, Nguyen HN, Jacob F, Song H, Ming GL. Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly. *Development*. 2017 Mar 15;144(6):952-957.
41. Choi H, Song J, Park G, Kim J. Modeling of Autism Using Organoid Technology. *Mol Neurobiol*. 2017 Dec;54(10):7789-7795.
42. 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.
43. Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, Yao B, Hamersky GR, Jacob F, Zhong C, Yoon KJ, Jeang W, Lin L, Li Y, Thakor J, Berg DA, Zhang C, Kang E, Chickering M, Nauen D, Ho CY, Wen Z, Christian KM, Shi PY, Maher BJ, Wu H, Jin P, Tang H, Song H, Ming GL. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell*. 2016 May 19;165(5):1238-1254.
44. Rajamani U, Gross AR, Hjelm BE, Sequeira A, Vawter MP, Tang J, Gangalapudi V, Wang Y, Andres AM, Gottlieb RA, Sareen D. Super-Obese Patient-Derived iPSC Hypothalamic Neurons Exhibit Obesogenic Signatures and Hormone Responses. *Cell Stem Cell*. 2018 May 3;22(5):698-712.e9.
45. Koo B, Choi B, Park H, Yoon KJ. Past, Present, and Future of Brain Organoid Technology. *Mol Cells*. 2019 Sep 30;42(9):617-627.
46. Kelava I, Lancaster MA. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev Biol*. 2016 Dec 15;420(2):199-209.
47. Lehmann R, Lee CM, Shugart EC, Benedetti M, Charo RA, Gartner Z, Hogan B, Knoblich J, Nelson CM, Wilson KM. Human organoids: a new dimension in cell biology. *Mol Biol Cell*. 2019 May 1;30(10):1129-1137.
48. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015 Oct;21(10):1885-6.
49. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug;14(8):1232-9.

50. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, Nascimento JM, Brindeiro R, Tanuri A, Rehen SK. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 2016 May 13;352(6287):816-8.
51. Gabriel E, Ramani A, Karow U, Gottardo M, Natarajan K, Gooi LM, Goranci-Buzhala G, Krut O, Peters F, Nikolic M, Kuivanen S, Korhonen E, Smura T, Vapalahti O, Papantonis A, Schmidt-Chanasit J, Riparbelli M, Callaini G, Krönke M, Utermöhlen O, Gopalakrishnan J. Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. *Cell Stem Cell*. 2017 Mar 2;20(3):397-406.e5.
52. Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2016 May 5;18(5):591-6.
53. Wells MF, Salick MR, Wiskow O, Ho DJ, Worringer KA, Ihry RJ, Kommineni S, Bilican B, Klim JR, Hill EJ, Kane LT, Ye C, Kaykas A, Eggen K. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. *Cell Stem Cell*. 2016 Dec 1;19(6):703-708.
54. Marrazzo P, Cricca M, Nastasi C. Are the Organoid Models an Invaluable Contribution to ZIKA Virus Research? *Pathogens*. 2021 Sep 24;10(10):1233.
55. Xu YP, Qiu Y, Zhang B, Chen G, Chen Q, Wang M, Mo F, Xu J, Wu J, Zhang RR, Cheng ML, Zhang NN, Lyu B, Zhu WL, Wu MH, Ye Q, Zhang D, Man JH, Li XF, Cui J, Xu Z, Hu B, Zhou X, Qin CF. Zika virus infection induces RNAi-mediated antiviral immunity in human neural progenitors and brain organoids. *Cell Res*. 2019 Apr;29(4):265-273.
56. Krenn V, Bosone C, Burkard TR, Spanier J, Kalinke U, Calistri A, Salata C, Rilo Christoff R, Pestana Garcez P, Mirazimi A, Knoblich JA. Organoid modeling of Zika and herpes simplex virus 1 infections reveals virus-specific responses leading to microcephaly. *Cell Stem Cell*. 2021 Aug 5;28(8):1362-1379.e7.
57. Teresa G Krieger, Stephan M Tirier, Jeongbin Park, Katharina Jechow, Tanja Eisemann, Heike Peterziel, Peter Angel, Roland Eils, Christian Conrad, Modeling glioblastoma invasion using human brain organoids and single-cell transcriptomics, *Neuro-Oncology*, Volume 22, Issue 8, August 2020, Pages 1138–1149.
58. Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, Nguyen PTT, Schnoll JG, Wong SZH, Thokala R, Sheikh S, Saxena D, Prokop S, Liu DA, Qian X, Petrov D, Lucas T, Chen HI, Dorsey JF, Christian KM, Binder ZA, Nasrallah M, Brem S, O'Rourke DM, Ming GL, Song H. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell*. 2020 Jan 9;180(1):188-204.e22.
59. Linkous A, Balamatsias D, Snuderl M, Edwards L, Miyaguchi K, Milner T, Reich B, Cohen-Gould L, Storaska A, Nakayama Y, Schenkein E, Singhanian R, Cirigliano S, Magdeldin T, Lin Y, Nanjangud G, Chadalavada K, Pisapia D, Liston C, Fine HA. Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. *Cell Rep*. 2019 Mar 19;26(12):3203-3211.e5.

60. Rybin MJ, Ivan ME, Ayad NG, Zeier Z. Organoid Models of Glioblastoma and Their Role in Drug Discovery. *Front Cell Neurosci.* 2021 Feb 5;15:605255.
61. Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio II, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvise M, Tiriach H, Spector MS, Gracanin A, Oni T, Yu KH, van Boxtel R, Huch M, Rivera KD, Wilson JP, Feigin ME, Öhlund D, Handly-Santana A, Ardito-Abraham CM, Ludwig M, Elyada E, Alagesan B, Biffi G, Yordanov GN, Delcuze B, Creighton B, Wright K, Park Y, Morsink FH, Molenaar IQ, Borel Rinkes IH, Cuppen E, Hao Y, Jin Y, Nijman IJ, Iacobuzio-Donahue C, Leach SD, Pappin DJ, Hammell M, Klimstra DS, Basturk O, Hruban RH, Offerhaus GJ, Vries RG, Clevers H, Tuveson DA. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell.* 2015 Jan 15;160(1-2):324-38.
62. Broutier L, Mastrogiovanni G, Verstegen MM, Francies HE, Gavarró LM, Bradshaw CR, Allen GE, Arnes-Benito R, Sidorova O, Gaspersz MP, Georgakopoulos N, Koo BK, Dietmann S, Davies SE, Praseedom RK, Lieshout R, IJzermans JNM, Wigmore SJ, Saeb-Parsy K, Garnett MJ, van der Laan LJ, Huch M. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med.* 2017 Dec;23(12):1424-1435.
63. Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquina PJ, Karthaus WR, Gopalan A, Dowling C, Wanjala JN, Undvall EA, Arora VK, Wongvipat J, Kossai M, Ramazanoglu S, Barboza LP, Di W, Cao Z, Zhang QF, Sirota I, Ran L, MacDonald TY, Beltran H, Mosquera JM, Touijer KA, Scardino PT, Laudone VP, Curtis KR, Rathkopf DE, Morris MJ, Danila DC, Slovin SF, Solomon SB, Eastham JA, Chi P, Carver B, Rubin MA, Scher HI, Clevers H, Sawyers CL, Chen Y. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell.* 2014 Sep 25;159(1):176-187.
64. Kopper O, de Witte CJ, Löhmußaar K, Valle-Inclan JE, Hami N, Kester L, Balgobind AV, Korving J, Proost N, Begthel H, van Wijk LM, Revilla SA, Theeuwse R, van de Ven M, van Roosmalen MJ, Ponsioen B, Ho VWH, Neel BG, Bosse T, Gaarenstroom KN, Vrieling H, Vreeswijk MPG, van Diest PJ, Witteveen PO, Jonges T, Bos JL, van Oudenaarden A, Zweemer RP, Snippert HJG, Kloosterman WP, Clevers H. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat Med.* 2019 May;25(5):838-849.
65. Lee SH, Hu W, Matulay JT, Silva MV, Owczarek TB, Kim K, Chua CW, Barlow LJ, Kandath C, Williams AB, Bergren SK, Pietzak EJ, Anderson CB, Benson MC, Coleman JA, Taylor BS, Abate-Shen C, McKiernan JM, Al-Ahmadie H, Solit DB, Shen MM. Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell.* 2018 Apr 5;173(2):515-528.e17.
66. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, Balgobind AV, Wind K, Gracanin A, Begthel H, Korving J, van Boxtel R, Duarte AA, Lelieveld D, van Hoeck A, Ernst RF, Blokzijl F, Nijman IJ, Hoogstraat M, van de Ven M, Egan DA, Zinzalla V, Moll J, Boj SF, Voest EE, Wessels L, van Diest PJ, Rottenberg S, Vries RGJ, Cuppen E, Clevers H. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell.* 2018 Jan 11;172(1-2):373-386.e10.

67. Yan HHN, Siu HC, Law S, Ho SL, Yue SSK, Tsui WY, Chan D, Chan AS, Ma S, Lam KO, Bartfeld S, Man AHY, Lee BCH, Chan ASY, Wong JWH, Cheng PSW, Chan AKW, Zhang J, Shi J, Fan X, Kwong DLW, Mak TW, Yuen ST, Clevers H, Leung SY. A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening. *Cell Stem Cell*. 2018 Dec 6;23(6):882-897.e11.
68. Goranci-Buzhala G, Mariappan A, Gabriel E, Ramani A, Ricci-Vitiani L, Buccarelli M, D'Alessandris QG, Pallini R, Gopalakrishnan J. Rapid and Efficient Invasion Assay of Glioblastoma in Human Brain Organoids. *Cell Rep*. 2020 Jun 9;31(10):107738.
69. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2016 Oct;139 Suppl 1:318-324.
70. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 Mar-Apr;24(2):197-211.
71. Marotta N, Kim S, Krainc D. Organoid and pluripotent stem cells in Parkinson's disease modeling: an expert view on their value to drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2020 Apr;15(4):427-441.
72. Monzel AS, Smits LM, Hemmer K, Hachi S, Moreno EL, van Wuellen T, Jarazo J, Walter J, Brüggemann I, Boussaad I, Berger E, Fleming RMT, Bolognin S, Schwamborn JC. Derivation of Human Midbrain-Specific Organoids from Neuroepithelial Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017 May 9;8(5):1144-1154.
73. Kim H, Park HJ, Choi H, Chang Y, Park H, Shin J, Kim J, Lengner CJ, Lee YK, Kim J. Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids. *Stem Cell Reports*. 2019 Mar 5;12(3):518-531.
74. Byers B, Lee HL, Reijo Pera R. Modeling Parkinson's disease using induced pluripotent stem cells. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012 Jun;12(3):237-42.
75. Gonzalez C, Armijo E, Bravo-Alegria J, Becerra-Calixto A, Mays CE, Soto C. Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids. *Mol Psychiatry*. 2018 Dec;23(12):2363-2374.
76. Choi SH, Kim YH, Hebisch M, Sliwinski C, Lee S, D'Avanzo C, Chen H, Hooli B, Asselin C, Muffat J, Klee JB, Zhang C, Wainger BJ, Peitz M, Kovacs DM, Woolf CJ, Wagner SL, Tanzi RE, Kim DY. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2014 Nov 13;515(7526):274-8.
77. Cenini G, Hebisch M, Iefremova V, Flitsch LJ, Breitkreuz Y, Tanzi RE, Kim DY, Peitz M, Brüstle O. Dissecting Alzheimer's disease pathogenesis in human 2D and 3D models. *Mol Cell Neurosci*. 2021 Jan;110:103568.
78. 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.

79. Raja WK, Mungenast AE, Lin YT, Ko T, Abdurrob F, Seo J, Tsai LH. Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLoS One*. 2016 Sep 13;11(9):e0161969.
80. Gonzalez C, Armijo E, Bravo-Alegria J, Becerra-Calixto A, Mays CE, Soto C. Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids. *Mol Psychiatry*. 2018 Dec;23(12):2363-2374.
81. Lin YT, Seo J, Gao F, Feldman HM, Wen HL, Penney J, Cam HP, Gjoneska E, Raja WK, Cheng J, Rueda R, Kritskiy O, Abdurrob F, Peng Z, Milo B, Yu CJ, Elmsaouri S, Dey D, Ko T, Yankner BA, Tsai LH. APOE4 Causes Widespread Molecular and Cellular Alterations Associated with Alzheimer's Disease Phenotypes in Human iPSC-Derived Brain Cell Types. *Neuron*. 2018 Jun 27;98(6):1141-1154.e7.
82. Choi H, Kim HJ, Yang J, Chae S, Lee W, Chung S, Kim J, Choi H, Song H, Lee CK, Jun JH, Lee YJ, Lee K, Kim S, Sim HR, Choi YI, Ryu KH, Park JC, Lee D, Han SH, Hwang D, Kyung J, Mook-Jung I. Acetylation changes tau interactome to degrade tau in Alzheimer's disease animal and organoid models. *Aging Cell*. 2020 Jan;19(1):e13081.

## **7. ŽIVOTOPIS**

Tihana Salopek rođena je 17.3.1998. u Zagrebu. Svoje je obrazovanje započela u Osnovnoj školi Miroslava Krležu i nastavila u Klasičnoj gimnaziji u Zagrebu. Medicinski fakultet upisuje 2016. godine.

Aktivno se služi engleskim jezikom te poznaje osnove švedskog i francuskog jezika.