

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE

**Cilvēka aizkuņģa dziedzera organoīdu raksturošana:
vizualizācijas un kvantificēšanas metožu pielāgošana**

BAKALAURA DARBS

Autors: **Gundega Gangnusa**

Studenta apliecības Nr.: gg19034

Darba vadītājs: Dr.Pharm., vadošais pētnieks Vadims Parfejevs

RĪGA 2022

ANOTĀCIJA

Organoīdi ir pašorganizējošas 3D šūnu struktūras, kuru uzbūve un šūnu hierarhija atgādina to izcelsmes audus. Šī līdzība ļauj tos izmantot dažādos pētījumos. Darba mērķis ir raksturot aizkuņģa dziedzera organoīdus, izmantojot mikroskopēšanas metodes un pielietot attēlu kvantificēšanas programmas attēlu analīzei. Organoīdu attēlu analīze ir netriviāla, jo organoīdiem ir atšķirīgas formas un izmēri, bet šūnas tajos atrodas dažādās plaknēs. Salīdzinot veselu organoīdu iezīmēšanas metodi ar imūnfluorescenci uz kriotoma griezumiem metodi, kvalitatīvāku informāciju sniedz veselu organoīdu iezīmēšanas metode. Neskatoties uz to, abas pieejas apstiprina izveidoto aizkuņģa dziedzera kanāliņu fenotipu. Darbā izmantotās automātiskās kvantificēšanas metodes ļauj atpazīt un saskaitīt organoīdus, bet iegūtie rezultāti nav precīzi – ir nepieciešama attēlu iegūšanas procesa standartizēšana un turpmāka programmu pilnveidošana, lai būtu iespējams tās pielietot aizkuņģa dziedzera organoīdu attēlu apstrādē.

Atslēgvārdi: aizkuņģa dziedzera organoīdi, imūnfluorescence, veselu organoīdu iezīmēšana, kvantificēšana.

ABSTRACT

Organoids are self-organizing structures of 3D cells whose structure and cell hierarchy resemble the tissues of origin. This similarity allows them to be used in a variety of studies. This work aims to characterize pancreatic organoids using microscopy methods and to apply image quantification programs for image analysis. The analysis of organoid images is non-trivial because organoids have different shapes and sizes, but the cells are in different planes. When comparing the whole mount staining method with the immunofluorescence method, better and more qualitative information is provided by the whole-mount staining method. Nevertheless, both approaches confirm the phenotype of the established pancreatic duct. The automatic quantification methods used at work allow for the identification and counting of organoids, but the results obtained are not accurate – standardization of the imaging process and further development of programs are necessary to enable them to be applied in the processing of images of pancreas organoids.

Keywords: pancreatic organoids, immunofluorescence, whole-mount staining, quantification.

SATURS

ANOTĀCIJA.....	2
ABSTRACT	3
APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. Aizkuņģa dziedzera raksturojums	8
1.2. Aizkuņģa dziedzera patoloģijas	8
1.2.1. Akūts pankreatīts	8
1.2.2. Hronisks pankreatīts	9
1.2.3. Iedzimts pankreatīts	9
1.2.4. Cistiskā fibroze.....	9
1.2.5. Aizkuņģa dziedzera vēzis.....	10
1.3. Pētījumu metodes	12
1.3.1. Peļu līnijas.....	12
1.3.2. Zebrzivtiņas.....	13
1.3.3. 2D šūnu līnijas.....	14
1.3.4. 3D šūnu līnijas.....	15
1.4. Organoīdi	16
1.4.1. Aizkuņģa dziedzera organoīdi.....	17
1.5. Organoīdu vizualizācijas un kvantificēšanas metodes	17
2. MATERIĀLI UN METODES.....	21
2.1. Veselu organoīdu iezīmēšana ar antivielām.....	22
2.2. Imūnfluorescence uz griezumiem	24
2.2.1. Organoīdu sasaldēšana un griešana ar kriotomu	24
2.2.2. Organoīdu iezīmēšana ar antivielām	24
2.3. Kvantificēšanas metodes.....	24
2.3.1. Protokols aizkuņģa dziedzera organoīdu kvantificēšanai ar FIJI	25
2.3.2. Protokols aizkuņģa dziedzera organoīdu kvantificēšanai ar CellProfiler	25
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	27

3.1.	Veselu organoīdu iezīmēšana ar antivielām.....	27
3.2.	Imūnfluorescence uz kriotoma griezumiem.....	29
3.3.	Kvantificēšanas metožu salīdzinājums	31
3.3.1.	Organoīdi izretinātā kultūrā	31
3.3.2.	Organoīdi blīvā kultūrā	33
	SECINĀJUMI	36
	PATEICĪBAS	37
	IZMANTOTĀ LITERATŪRA	38
	DOKUMENTĀRĀ LAPA	43

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

2D – divdimensiju

3D – trīsdimensiju

CDH 1 – E kadherīns

CDKN 2A – ciklīna atkarīgās kināzes inhibitors 2A

CFTR – cistiskās fibrozes transmembrānas vadītspējas regulators

EGF – epidermālais augšanas faktors

FGF – fibroblastu augšanas faktors

K19 – keratīns 19

MUC – mucīns

NADPH – nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāts

PDX1 – aizkuņģa dziedzera un divpadsmitpirkstu zarnas transkripcijas faktors 1

PPN – pseido papilāra neoplazma

PTF1 α – aizkuņģa dziedzera transkripcijas faktors 1 α

SOX9 – *SRY Box* transkripcijas faktors 9

TP53 – audzēja proteīns P53

IEVADS

Organoīdi ir 3D daudzšūnu šūnu struktūras, ar kuru palīdzību ir iespējams labāk atdarināt attiecīgo orgānu *in vivo*, sniedzot iespēju to tālāk izmantot dažādos pētījumos. Salīdzinot ar 2D kultūrām, kultivēšana organoīdos nodrošina šūnām fizioloģiski atbilstošākus apstākļus un ļauj iegūt *in vivo* apstākļiem pietuvinātus rezultātus. Šis ir daudzsološs modelis, lai veicinātu personalizētu medicīnu, kā arī, lai ierobežotu dzīvnieku izmantošanu pētījumos. (13,16).

Atkarībā no kultivēšanas apstākļiem, organoīdi, kas iegūti no aizkuņģa dziedzera var sastāvēt gan no eksokrīnijām šūnām, kas ir kanāliņa šūnas un acinārās šūnas, gan no endokrīnajām šūnām, kas ir alfa, beta, delta un aizkuņģa dziedzera polipeptīdu veidojošas šūnas. Modelis, kas izmantots darbā, atdarina aizkuņģa dziedzera kanāliņu fizioloģiju. Svarīgs šo organoīdu potenciālais pielietojums ir personalizētās medicīnas jomā, kas ļautu zāļu pārbaudi periodā pirms vai paralēli klīniskās terapijas noteikšanai (18,20).

Izmaiņas organoīdu morfoloģijā, skaitā un izmērā var izmantot, lai izvērtētu zāļu atbildes reakciju. Organoīdu attēlu analīze nav triviāla, jo tie atrodas dažādās plaknēs, tiem ir dažādi izmēri un formas, tie atrodas vai nu ļoti blīvi vai izretoti. Attēlu apstrāde manuāli ir laikietilpīga un ne vienmēr sniedz precīzus rezultātus, tādēļ ir nepieciešama attēlu analīzes programma, kas ir piemērota 3D attēlu apstrādei un sniedz ticamus rezultātus (44,45,46).

Darba mērķis: Raksturot aizkuņģa dziedzera organoīdus, izmantojot mikroskopēšanas metodes un pielietot attēlu kvantificēšanas programmas attēlu analīzei.

Darba uzdevumi:

1. Raksturot aizkuņģa dziedzera organoīdus izmantojot aizkuņģa dziedzera kanāliņa marķierus un priekštečšūnu marķierus.
2. Izveidot aizkuņģa dziedzera organoīdu attēlus ar gaiša redzeslauka un fluorescences mikroskopu. Salīdzināt rezultātus no dažādām paraugu iezīmēšanas metodēm – veselu organoīdu un kriotoma griezumumu iezīmēšanas.
3. Pielāgot un optimizēt paraugu sagatavošanu aizkuņģa dziedzera organoīdu paraugiem.
4. Pielāgot un izveidot algoritmu FIJI programmā, izmēģināt CellProfiler programmu aizkuņģa dziedzera organoīdu kvantificēšanai.
5. Izvērtēt iegūtos rezultātus.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Aizkuņģa dziedzera raksturojums

Aizkuņģa dziedzeris ir orgāns, kas morfoloģiski sastāv no 4 daļām: galvas, kakla, ķermeņa un astes, tas atrodas vēdera dobumā un veic gan eksokrīnās, gan endokrīnās funkcijas. Galvenās funkcijas ir hormonu insulīna, glikagona un somatostatīna sekrēcija un gremošanas enzīmu sintēze. Galvenās eksokrīnās sekrēcijas izplūst pa vairākiem maziem kanāliem, kas sākas astē. Aizkuņģa dziedzeri apņem plāns iršanu saistaudu slānis, kas veido kapsulu un starpsienas, kas veido aizkuņģa dziedzera lobaino izskatu. Katra daiva sastāv no dažādām serozām sekrēcijas vienībām, ko sauc par acinārajām šūnām (1). Acinārās šūnas veido aizkuņģa dziedzera eksokrīno daļu, tie izdala vairākus fermentus, kas ir aktīvi olbaltumvielu, tauku un ogļhidrātu sadalīšanā, piemēram, tripsīns, lipāze un amilāze, kuri tālāk tiek izvadīti divpadsmit pirkstu zarnā (1,2). Katra acinārā šūna sastāv no piramīdveida serozām šūnām, kuru virsotne ieskauj centrālo kanālu lūmenu. Starp acinārajām šūnām atrodas Langerhansa saliņas, kas atbild par endokrīno funkciju. Saliņas sastāv no alfa šūnām, kas izdala glikagonu, beta šūnām, kuras sastāda 40-60% no endokrīnajām šūnām un izdala insulīnu, delta šūnām, kuras izdala somatostatīnu un aizkuņģa dziedzera polipeptīdu šūnām, kuras izdala aizkuņģa dziedzera polipeptīdu (1,2,3). Kā arī nesēn tika aprakstīta piektā grelīnu izdalošo ε šūnu populācija, kas atrodama arī kuņģī. Grelīns ir galvenais apetītes un enerģijas līdzsvara regulators un tam ir svarīga loma glikozes homeostāzē. Tam ir sarežģīta ietekme gan tieši, gan netieši uz beta šūnām (3). Papildu endokrīnie šūnu veidi, kas atrodami saliņās ir atbildīgi par citu hormonu, piemēram, vazoaktīvo zarnu peptīda, mitolīna un serotonīna sekrēciju (1).

1.2. Aizkuņģa dziedzera patoloģijas

1.2.1. Akūts pankreatīts

Akūts pankreatīts ir bieži sastopams klīniskais stāvoklis, ko izraisa akūts aizkuņģa dziedzera ievainojums, kas izraisa tālāk ejošu iekaisumu, ko raksturo sāpes vēderā un paaugstināts aizkuņģa dziedzera enzīmu līmenis serumā (1,3). Akūtu pankreatītu izraisa vairākas etioloģijas, no kurām visizplatītākās ir žultsakmeņi, kas veido līdz 40% gadījumu un alkohols, kas izraisa aptuveni 30% gadījumu, citi cēloņi ir medikamenti, piemēram, angiotenzīnu konvertējošā enzīma inhibitori, furosemīds, azatioprīns, valproāts; infekcijas, piemēram, A un E hepatīts, koksakivīruss B; iedzimtas mutācijas katjonu tripsinogēnā vai cistiskā fibroze; mehāniskas etioloģijas, piemēram, vēdera trauma, aizkuņģa dziedzera vēzis un

vielmaiņas cēloņi, piemēram, hipertrigliceridēmija un hiperkalciēmija. Neatkarīgi no rašanās veida, akūts pankreatīts ir acināro šūnu bojājumu un enzīmu izdalīšanās sekas, kas izraisa intraacīna zīmogēna aktivāciju un šūnu autofāgiju. Enzīmi tripsīns, himotripsīns, elastāze, fosfolipāze A2 un lipāze noārda audu membrānas, izraisot apaptozi, nekrozi, tūsku, asinsvadu bojājumus, asiņošanu un sekojošu lokalizētu un sistemātisku iekaisuma reakciju (1).

1.2.2. Hronisks pankreatīts

Hronisks pankreatīts ir ilgstošs aizkuņģa dziedzera iekaisuma, kas izraisa neatgriezenisku strukturālu bojājumu, ko raksturo fibroze un kanālu struktūras, kas savukārt izraisa neatgriezenisku aizkuņģa dziedzera eksokrīnās un endokrīnās funkcijas samazināšanos. Hroniska pankreatīta etioloģiju ietekmē vairāki faktori, visizplatītākie provokatīvie faktori ir alkohola lietošana, kas veido 50% gadījumu. Pētījumi liecina, ka alkohola lietošanai un tabakas smēķēšanai ir sinerģiska darbība. Citi etioloģiskie faktori ir ģenētiskās mutācijas katjonu tripsinogēnāna gēnā, serīna peptidāzes inhibitorā Kazal tipa 1 un cistiskās fibrozes transmembrānas regulatorā. Aizkuņģa dziedzera fibroģenēzes sākumu hroniskam pankreatītam izraisa intersticiālo mezenhimālo šūnu, kanālu šūnu un/vai acināro šūnu bojājumi, atkarībā no cēloņsakarības faktora, bojājumi izraisa eksokrīno un endokrīno mazspēju. Samazinoties lipāzes un proteāzes sekrēcijai, attīstās malabsorbcija un tālāk svara zudums. Glikozes nepanesamība var rasties insulīna deficīta dēļ, cukura diabēts bieži ir vēlīnas sekas endokrīnās sistēmas disfunkcijai. Cilvēkiem, kas cieš no hroniska pankreatīta ir lielāks hipoglikēmijas attīstības risks, papildu komplikācijas ir pseidocistu veidošanās, žultsvada vai divpadsmitpirkstu zarnas obstrukcija, aizkuņģa dziedzera kanāla darbības traucējumi, kas izraisa ascītu, liesas vēnu tromboze (1,3).

1.2.3. Iedzimts pankreatīts

Iedzimts pankreatīts ir reta forma agrīnā stadijā, tas ir autosomāli dominējošs traucējums ar mainīgu slimības izpausmi. Personām, kuras skārusi šī problēma, slimības gaita var atšķirties no ļoti vieglas līdz smagai, kā arī ir paaugstināts aizkuņģa dziedzera vēža risks, mutācijas traucējumi izraisa nepareizu proteīna salocīšanos, kas noved pie endoplazmātiskā tīkla stresa, kā rezultātā rodas acināro šūnu bojājumi un pankreatīts (3).

1.2.4. Cistiskā fibroze

Cistiskā fibroze ir autosomāli recesīva ģenētiskā slimība, ko raksturo daudzu orgānu patoloģijas, kā arī ievērojami samazināts paredzamais dzīves ilgums, ko izraisa mutācijas

cistiskās fibrozes transmembranālās vadītspējas regulatora gēnā. Tā funkcijas traucējumi rada defektu elektrolītu transportēšanā caur membrānu, īpaši ietekmējot plaušas un aizkuņģa dziedzeri, 83% no visiem cistiskās fibrozes pacientiem ir nepieciešama aizkuņģa dziedzera enzīmu aizstājterapija. Normālā aizkuņģa dziedzerī acinārās šūnas izdala salīdzinoši maz šķidrums, taču cistiskās fibrozes gadījumā, izdalītais aizkuņģa dziedzera šķidrums daudzums ir ievērojami zemāks, kā rezultātā aizkuņģa dziedzera kanālos rodas biezas gļotas, kas izraisa kanālu nosprostošumu ar mukoproteīda aizbāžņiem, kalcifikāciju, acināro šūnu iznīcināšanu, aizkuņģa dziedzera cistu veidošanos un visbeidzot fibrozi. Pankreatīts var būt pirmā cistiskās fibrozes pazīme. Klīniskie simptomi cistiskajai fibrozei ir sāpes vēderā, gremošanas traucējumi un pazemināts ķermeņa masas indekss (3,4).

1.2.5. Aizkuņģa dziedzera vēzis

Aizkuņģa dziedzera vēzis ir attiecināms uz karcinomu, kas rodas no aizkuņģa dziedzera kanāla šūnām. Aizkuņģa dziedzera kanāla adenokarcinoma (PDAC – *pancreatic ductal adenocarcinoma*) un tās varianti veido 90% no visām aizkuņģa dziedzera karcinomām (8). PDAC ir viena no nāvējošākajiem ļaundabīgajiem audzējiem, iemesls tam ir novēlota diagnoze. Prognozējamā dzīvildze ir zem 1 gada, 5 gadu dzīvildzes rādītājs ir zem 9% (7, 15). Aizkuņģa dziedzera vēža riska faktori: smēķēšana, vecums virs 55 gadiem, diabēts, aptaukošanās, hronisks pankreatīts, aknu ciroze, *helicobacter pylori* infekcija, darbs ar ķīmiskām vielām ķīmiskās tīrīšanas un metālapstrādes nozarē, vīriešus skar biežāk nekā sievietes, biežāk sastopams afroamerikāņiem, ģimenes vēsture (7,8). 10% gadījumu ir ģenētisks cēlonis, piemēram, ģenētiskas mutācijas, vienā vai vairākos no četriem gēniem *KRAS*, kas sastopams apmēram 90% gadījumu, *CDKN2A* (49-98%), *TP53* (20-76%), *SMAD4* (19-50%). Ir novērota arī saistība ar iedzimtiem sindromiem, piemēram, Linča sindromu (6,7,19). Pastāv arī citas gēnu mutācijas, taču to izplatība nav tik bieža. Viens audzējs spēj veidot vairākas mutācijas, tādējādi ir grūtības ar mērķterapijas izstrādi (19). Pašlaik PDAC tiek ārstēts ar gemcitabīnu/nab-paklitakselu vai FOLFIRINOX (5-fluoruracilu, leukovorīnu, irinotekānu un oksaliplatīnu), kā arī, ja ir iespējams, to kombinē ar operāciju (28). Lielākajai daļai pacientu tiek diagnosticēta lokāli progresējoša vai metastātiska slimība, kur tikai 10-20% ir piemēroti ķirurģiskai rezekcijai. Pacienti ar robežslimību tiek ārstēti ar neoadjuvantu citotoksisku ķīmijterapiju pirms ķirurģiskas rezekcijas, lielākā daļa saņem adjuvantu ķīmijterapiju (19).

Reti sastopama adenoskvamozas karcinoma, kas veido 1-4% eksokrīno ļaundabīgo audzēju. Īpaši biopsijās, negaidītas plakanšūnu izmaiņas var radīt metastāžu iespaidu vai citu audzēju veidu. Citoloģijā un histoloģijā šīs karcinomas diferenciācija izceļas ar bazālā tipa keratīnu diferenciālo ekspresiju, kā arī P63 un/vai P40 (22). Vēl viena kategorija ir

osteoklastiskā milzšūnu karcinoma, ko arī bieži, bet ne vienmēr pavada PDAC. Šis veids ir reti sastopams un veido 1-4% invazīvo aizkuņģa dziedzera vēzi. Šim audzējam ir arī atšķirīgs molekulārais profils, kas ir kā atsevišķs klasteris profilēšanas pētījumos. Sarkomatoīdā karcinoma, kurā audzēja šūnas piesaista osteoklastus, kas ir kaulu rezorbijas šūnas. Tie ir norobežoti audzēji, kas parasti rodas saistībā ar mucinozām cistiskām neoplazmām vai intraduktālu papilāru gļotādas neoplazmu (22).

Koloidālā karcinoma ir rets audzējs, 1-3% gadījumu ļaundabīga eksokrīnā aizkuņģa dziedzera vēža gadījumā. Tam ir kanāla izcelsme, tehniski PDAC “radnieks”, bet ar 5 gadu dzīvildzi virs 55%. Ražotais mucīns aprij audzēja šūnas un kalpo kā faktors, kas novērš audzēja šūnas no izplešanās. Svarīgi, ka koloidālā aizkuņģa dziedzera karcinoma ir audzējs ar skaidru diferenciaciju, uzrādot izkļiedētu transkripcijas faktoru CDX2 (*Caudal type homeobox 2*) un MUC2 marķieri, kur abi nav nolasāmi nevienā citā aizkuņģa dziedzera audzējā (22).

Vēl viena karcinoma, kas var rasties aizkuņģa dziedzerī un ir kanāla izcelsmes, ir medulārā karcinoma. Šis audzējs atrodas divpadsmitpirkstu zarnā vai apakšējā gremošanas traktā, ko raksturo mezglains sincitālās augšanas modelis, iekaisuma infiltrācija un bieži – ir saistība ar paaugstinātu DNS mutāciju slogu (22).

Lielākā daļa PDAC rodas *de novo*, iespējams un parasti saistībā ar mikroskopiskām, nejaušām displāzijas formām, kuras aizkuņģa dziedzerī sauc par aizkuņģa dziedzera intraepitēlija neoplāziju. 4% PDAC no labdabīga intraepitēliāliem veidojumiem, proti, no kanāliņu gļotainām cistiskām neoplazmām (IPMN – *intraductal papillary mucinous neoplasm*). Invazīvās karcinomas, kas rodas no IPMN var būt vai nu PDAC vai koloidālās karcinomas veidiem. Koloidālā karcinoma parasti ir saistīta ar zarnu tipa IPMN, ar abiem audzējiem, kam raksturīga zarnu cilmes šūnu marķieru MUC2 un CDX2 ekspresija. IPMN onkocītiskais variants (intraduktālā onkocītiskā papilāra neoplazma) bieži izpaužas kā ļoti sarežģīts, daļēji cistisks un daļēji cietas masas, un to bieži nav iespējams izoperēt. Parasti tas tiek nepareizi diagnosticēts kā adenokarcinoma. Neskatoties uz sarežģītību, tie ir ķirurģiski ārstējami audzēji. Šiem audzējiem trūkst mutāciju *KRAS* un *GNAS* gēnos (22).

Aizkuņģa dziedzera neuroendokrīni audzēji tiek iedalīts divās apakškategoriās: labi diferencēti audzēji, ko dēvē arī par saliņu šūnu audzējiem/ karcinomām un slikti diferencēta neuroendokrīnā karcinoma, kas atrodas plaušās ar mazām šūnām, bet daudz variantos. Labi diferencēti audzēji ir zemas pakāpes ļaundabīgi audzēji, kurus ir iespējams ārstēt ķirurģiski. Pat tad, ja tie ir metastātiski, tie aug lēni, bet tie nereaģē uz terapiju (22).

Acināro šūnu karcinomas ir salīdzinoši reti sastopamas. Šūnas šajos audzējos atgādina acinārās šūnas, uzrāda fermentatīvās granulas histoloģiski, tām ir monotoni kodoli ar atsevišķiem izteiktiem kodoliņiem. Acinārās karcinomas var uzskatīt par vidējas pakāpes aizkuņģa

dziedzera vēzi, tam ir agresīva uzvedība, bet vidējā dzīvildze ir 5 gadi, kas ir vairāk nekā PDAC. Parasti tie ir lieli, kompakti, norobežoti audzēji, kas saistīti ar nekrozi (22).

Pankreatoblastoma ir atšķirīgs audzēja veids, kas rodas aizkuņģa dziedzerī, kura pazīmes ir plakanšūnu asinsķermenīšu klātbūtne, ko parāda kodola beta katenīna uzkrāšanās. Tā bieži tiek nepareizi diagnosticēta kā neuroendokrīnais audzējs vai acinārs audzējs. Pankreatoblastomas var būt saistītas ar ģimenes adenomatozo polipozi un ar to saistītajiem sindromiem, tostarp Gārdnera. Tā ir līdzīga acināro šūnu karcinomai gan pēc morfoloģijas, gan molekulārā profila, gan uzvedības (22).

Pseido–papilāra neoplazma (PPN) ir savdabīgs audzējs, kas raksturīgs aizkuņģa dziedzerim. PPN izcelsmes šūnas nav skaidras. PPN var būt ļoti grūti atšķirt no neuroendokrīniem audzējiem gan klīniskā, gan patoloģiskā līmenī, tāpēc parasti tas ir nepareizi diagnosticēts. Imūncistoķīmiski – beta katenīns parāda difūzu kodolmateriāla marķējumu, keratīns un hromogranīns parasti abi ir negatīvi vai fokāli pozitīvi. Lai gan PPN tiek uzskatīts par ļaundabīgu, faktiski tas tā ir ļoti reti, pat metastāzes aknās var būt ārstējamas. PPN izdzīvošanas rādītājs ir >95% (22).

Viens no vissarežģītākajiem patoloģijas aspektiem aizkuņģa dziedzera vēža klasifikācijā un pareizā ārstēšanā ir problēma to atšķiršanā no sekundārajiem ļaundabīgiem audzējiem. Divpadsmitpirkstu zarnas un žultsvadu vēzis bieži vien metastāzē un parādās sekundāri kā aizkuņģa dziedzera primārais audzējs. Īpaši limfomas, nieru dziedzera karcinomas un kuņģa vēzi mēdz diagnosticēt nepareizi kā primāro aizkuņģa dziedzera adenokarcinomu (22).

1.3. Pētījumu metodes

1.3.1. Peļu līnijas

Dzīvnieku modeļi ir noderīgi preklīniskajos pētījumos, lai prognozētu pretvēža zāļu efektivitāti un toksicitāti (9). Peļu līnijas ir viena no visbiežāk izmantotajām modeļu sistēmām, lai pētītu slimības. Kā trūkumus var minēt prasības pēc dārgām dzīvnieku telpām, kurās peles ir jāuztur, būtiskas atšķirības starp cilvēka un peles fizioloģiju, kā arī ētikas apsvērumus, kas saistīti ar dzīvnieku izmantošanu pētījumos (16).

Ksenografta modelis ir viena no pieejām onkoloģijā, kas kļūst arvien populārāka. Tā ietver vēža šūnu ksenotransplantāciju no pacienta audzēja peles modeļos, pārbaudot zāļu efektivitāti. Šie ksenotransplanāti saglabā oriģinālā audzēja struktūru, morfoloģiju un molekulārās īpašības. Svarīgi ir tas, ka tos ir iespējams izmantot primārās šūnu līnijas atvasināšanā. Šī metode ļauj novērtēt neoplazijas progresēšanu, sniedz iespēju identificēt

jaunus potenciālos biomarkķierus. Priekšrocības ir, ka paraugi atspoguļo konkrētu pacientu audzēja īpašības. Tie *in vivo* sistēmā, kurā ir iespējams novērot dažas ģenētiskās novirzes, kuras parasti netiek atklātas, tādējādi sniedzot iespēju personalizētai terapeitiskai pieejai. Trūkumi ir augstās izmaksas un laikietilpīgais process, kas ierobežo šādas pieejas izmantošanu klīniskajos pētījumos (19,24).

Ģenētiski modificētie peļu modeļi. Izmantojot gēnu inženierijas metodes, ir iespējams izraisīt specifiskas gēnu mutācijas primārajos onkogēnos vai audzēja nomācošos gēnos pelēm, izraisot audzēja attīstību. Šāda veida modelis, kas pazīstams kā ģenētiski modificēts peles modelis tiek plaši izmantos audzēju progresēšanas pētījumos, piemēram, no pirmsvēža bojājumiem – (aizkuņģa dziedzera intraepitēlija neoplāzijas) līdz pilnīgai karcinomai. Aizkuņģa dziedzera gadījumā, visplašāk izmantotā ir KPC pele, kurā audzējs tiek ģenerēts ar specifisku onkogēno $Kras^{G12D}$ un $Trp53^{R172H}$ alēļu ekspresiju, izmantojot aizkuņģa dziedzera specifisko promoteri PDX1. KPC audzējiem ir raksturīga stipra fibroze un tie ātri veido metastāzes. Trūkums ir lielas izmaksas, kā arī fakts, ka audzējs ir peļu izcelsmes, tāpēc rodas grūtības to izmantot, lai salīdzinātu ar cilvēka organismu. Šie šūnu modeļi aug no šūnām, kurām ir ierobežots skaits definētu mutāciju, paliek neskaidrs cik labi tiek atspoguļots pakāpenisks onkogēnais process (19).

1.3.2. Zebrzivtiņas

Zebrzivtiņas kā mugurkaulnieku modelis tika ieviests pateicoties liela mēroga ģenētiskjiem pētījumiem jau 1990. gadā. Salīdzinot ar peles modeli, zebrzivtiņu embrijs ir caurspīdīgs, kā arī izmaksas ir zemākas. Zebrzivtiņu izmantošanu kavē sarežģīts genoms un kā arī šī modeļa ierobežota bioloģiskā līdzība ar cilvēka organismu (16). Zebrzivtiņu audzēju modeļiem ir tādas pašas īpašības kā cilvēka audzējam, piemēram, genoma nestabilitāte un metastāzes. Tā kā embrijs ir caurspīdīgs, transgēna marķēšana ar fluorescējošu proteīnu ļauj novērot audzēju progresēšanu un invāziju. Tas arī ļauj uzraudzīt zāļu efektivitāti *in vivo* un vizuāli novērtēt konkrētā fenotipa smagumu (23). Salīdzinot ar citām mugurkaulnieku modeļu sistēmām, zebrzivtiņu embrijiem ir vairākas priekšrocības: liels pēcnācēju skaits, iepriekš jau minētais caurspīdīgums, mazais izmērs, kas kopumā padara šo modeli par praktiskāku un lētāku laboratorijas *in vivo* modeli. Izmantojot ksenotransplantātu, zebrzivtiņām ir iespēja pārvarēt trūkumus, kas radušies izmantojot peļu modeļus, piemēram, ir iespējams iegūt lielāku audzēja šūnu skaitu (apmēram 1 miljonu). Izmantojot šo modeli personalizētajā medicīnā, nav nepieciešama audzēja šūnu paplašināšanās un ķīmiskās jutības testa rezultātus ir iespējams iegūt jau pēc dažām dienām. Testu atšķirības laika skalā, ir skaidrojamas ar mazo izmēru salīdzinoši ar pelēm, tāpēc injekcijas veikšanai ir nepieciešams samazināts šūnu skaits. Mazāks

PDAC šūnu daudzums ļauj veikt lielāku skaitu ksenotransplantātu, kas nodrošina spēcīgu statistisko analīzi. Vēl viena no priekšrocībām šim modelim ir ūdens vide, kas sniedz iespēju zāļu vielas pievienot tieši ūdenim, izvairoties no zāļu ievadīšanas katram dzīvniekam individuāli. Taču ir svarīgi noteikt toksicitātes līkni katram savienojumam pirms ksenotransplantāta pētījuma uzsākšanas. Zebrzivtiņu modeli ir iespējams pakļaut atbilstoši zāļu koncentrācijai un laika gaitā novērot vēža progresēšanu attiecībā uz šūnu poliferāciju, migrāciju un angiogēnēzi (24).

1.3.3. 2D šūnu līnijas

Šūnu līnijas sniedz iespēju izprast šūnu bioloģiju, audu morfoloģiju, slimības mehānismus, zāļu iedarbību, proteīnu ražošanu un audu inženierijas attīstību. Visbiežāk šūnu līnijas tiek izmantotas zāļu preklīniskajos pētījumos, vēža pētījumos un pētījumos, kas saistīti ar gēnu darbību (11).

Adherentās 2D šūnu kultūras aug vienā slānī kultivēšanas flakonā vai Petri trauciņā. Priekšrocības ir saistītas ar zemām izmaksām un vieglu funkcionālo testu veikšanu. Galvenie trūkumi: 2D kultivētās šūnas neatdarina audu vai audzēju dabiskās struktūras, nav iespējams attēlot šūnu – šūnu, šūnu – ekstracelulārās vides mijiedarbības audzējā. Šīs mijiedarbības ir atbildīgas par šūnu diferenciāciju, proliferāciju, vitalitāti, gēnu un proteīnu ekspresiju, reakciju uz stimulantiem, zāļu metabolismu un citām šūnu funkcijām. Pēc izolācijas no audiem un pārnesšanas uz 2D apstākļiem, tiek mainīta šūnu morfoloģija, kas var ietekmēt to darbību, šūnu iekšējo struktūru organizāciju, sekrēciju, kā arī tiek mainīts šūnu dalīšanās veids. Vēl viens trūkums ir tas, ka adherentās kultūras parasti ir monokultūras un sniedz iespēju pētīt tikai vienu šūnu tipu, kā rezultātā trūkst audzēja mikrovides, kas *in vivo* nepieciešamas vēzi iniciējošām šūnām. Neskaitāmo trūkumu dēļ nepieciešams atrast alternatīvas, kas varētu labāk atdarināt dabisko audzēju, piemēram, 3D kultūras sistēmas (11).

Šūnu līnijas eksperimenti ir devuši progresu ģenētiskajā izpratnē par aizkuņģa dziedzera vēzi, bet tie neapkopu fizioloģiski nozīmīgo slimības statusu pacientiem pēc ortotopiskas transplantācijas un nespēj paredzēt terapeiskās sekas (17).

Aizkuņģa dziedzera vēža šūnu līnijas ir tradicionāls vēža izpētes līdzeklis; tās ir viegli audzējamas, taču tām ir daudz trūkumu un ierobežojumu. Viens no trūkumiem ir šūnu audzēšana monoslānī uz plastmasas neatdarina fiziskos apstākļus audzējos, kur šūnas ir pakļautas lielam spiedienam un mehāniskai slodzei. Otrs – šūnu līnijām trūkst stromas šūnu, tāpēc tās neatspoguļo fizioloģiskos apstākļus. Kā arī šūnu līnijas iegūst arvien lielāku skaitu mutāciju, šūnu līnijas atšķiras pēc fenotipa un genotipa. Tādējādi šūnu līnijas kļūst par sliktu

sākotnēja audzēja parauga attēlojumu. Sarežģījumus rada tas, ka normālas aizkuņģa dziedzera kanāliņa šūnas ir grūti kultivējamas (19).

1.3.4. 3D šūnu līnijas

Viena no pirmajām trīsdimensiju kultūrām tika izgatavota mīkstā agara šķīdumā, ko veica Hamburgs un Salmons 1970.gadā. Tika dokumentētas līdzības starp šūnu morfoloģiju un uzvedību audzēja masā un šūnās, kas kultivētas 3D apstākļos. Pēc sagatavošanas metodēm 3D modeļus var iedalīt: suspensijas kultūras uz zemas adhēzijas kultivēšanas platēm, kultūras koncentrētā vidē vai želejveida vielās, kultūras uz 3D polimēru matricām. 3D sfēru koncepcija ir balstīta uz sferoīdu struktūru izveidi, kurā šūnas veido dažādus slāņus. Šī struktūra attēlo audzēja masas fizikālās un bioķīmiskās īpašības. Dažām šūnām zemas adhēzijas apstākļos ir samazināta šūnu – šūnu, šūnu – matricas mijiedarbība, tās nepiesaistās pie virsmas, dalās un izveido sfēras. Šūnas no donora audiem tiek kultivētas daudzšūnu, trīsdimensiju struktūrās. Šī modeļa iezīmes ir precīzas šūnu – šūnu, šūnu-vides mijiedarbības atdarināšana, kas ļauj iegūt audu struktūras imitāciju. 3D kultūrās tiek saglabāta šūnu morfoloģija un polaritāte un tās var atjaunot šūnās, kas iepriekš tika kultivētas 2D. Dažās 3D sistēmās, piemēram, acinārajām šūnām līdzīgiem sferoīdiem ir novērota specifiska iekšējā struktūra ar lūmena veidošanu. Tas ir šūnu apoptozes rezultāts sferoīdu centrālajā daļā. Šūnu proliferācija ir atkarīga no šūnu atrašanās vietas un ir augstāka 3D struktūru perifērajā daļā. Visas šīs funkcijas rada iespējas, ko var izmantot vēža ierosinātāju bioloģijas, invāzijas un metastātisku procesu izpētei, kā arī zāļu testēšanai vai šūnu reakcijai uz apstarošanu (11).

3D suspensijas kultūras sistēmas plaši tiek izmantotas kā paraugs pētījumos, piemēram, vēža ierosinātāju šūnu populācijas palielināšanai. Šī metode ļauj veikt vienkāršus un zemu izmaksu bioloģiskos pētījumus. Audzēja šūnas ir mazāk jūtīgas pret zālēm 3D formātā nekā 2D kultūrā, šo efektu, iespējams izraisa samazināta piekļuve barotnē esošajiem savienojumiem vai patofizioloģiskas atšķirības hipoksijas dēļ, vai izmaiņas šūnas ciklā. Papildus izmantošanai vēža pētījumos, šo audu kultūru var izmantot arī audu inženierijā, farmakoloģiskajos pētījumos, šūnu fizioloģijas pētījumos (11, 12).

3D formāta šūnu līnijas neļauj šūnām pieķerties pie kultivēšanas trauka virsmas. Sferoīdi labāk nekā 2D šūnu modeļi atdarina fizioloģiskos apstākļus, ļaujot modelēt šūnu savstarpējo mijiedarbību. Tā pat kā ar jebkuru šūnu līniju modeli, arī sferoīdi atspoguļo tikai daļu no molekulārās daudzveidības, kas atrodama reālos audos un audzējos (19). Daudzās 3D metodēs efektivitāte, kalpošanas laiks, atkārtojamība, darbība ir zemāka nekā 2D šūnu līnijās. Bieži sastopama problēma/ trūkums ir sfēru veidošanās nevis no vienas šūnas, bet no vairākām

šūnu kopām (11). 3D modeļi ievērojami samazina izmaksas un eksperimentālās sarežģītības, kas saistītas ar dzīvnieku izmantošanu pētījumos (12).

1.4. Organoīdi

Hansa Klevers laboratorija bija pirmā, izstrādājot 3D sistēmu, kurā epitēlija organoīdi tiek iegūti no pieauguša cilvēka audiem, saglabājot sākotnējo audu identitāti. Pirmie 3D organoīdi tika iegūti no peles tievās zarnas un pakāpeniski paplašinājās līdz citiem peles un cilvēka kuņģa – zarnu trakta epitēlija audiem (20).

Organoīdu kopīgā iezīme – tie tiek iegūti no pluripotentām cilmes šūnām, piemēram, embrionālajām cilmes šūnām vai inducētām pluripotentām cilmes šūnām, vai pieaugušo cilmes šūnām (audu cilmes šūnas), kā arī no primāriem un metastātiskiem audzējiem (10,13,29). Jaunākajos pētījumos pierādīts, ka organoīdus ir iespējams atvasināt ne tikai no cilmes šūnām, bet arī no diferencētām šūnām, piemēram, holangiocītiem (29).

Salīdzinot ar 2D kultūru, 3D organoīdi gēnu un olbaltumvielu ekspresijas, vielmaiņas funkcijas un mikromēroga audu uzbūves ziņā labāk spēj atveidot orgānu. Organoīdi ir daudzsolšs modelis, lai veicinātu personalizētu medicīnu un nākamās paaudzes zāļu skrīningu un ierobežotu vajadzību pēc eksperimentiem ar dzīvniekiem. Organoīdi spēj veikt orgāna funkcijas, piemēram, zarnu organoīdi var ražot gļotas, absorbēt un izdalīt biomolekulas un uzraudzīt epitēlija barjeras integritāti (13,16).

Viens no šķēršļiem ir, ka organoīdu izveides un kvalitātes protokoli nav globāli standartizēti, kā arī izmaksas ir dārgas; organoīdi maksā mazāk nekā peļu vai zivju modeļi, taču tie ir dārgāki salīdzinoši ar tradicionālajām šūnu līnijām, mušu, rauga vai tārpu modeļiem (13, 16). Izaicinājumus rada arī fakts, ka šīs kultūras ir sarežģītākas par *in vitro* modeļiem, pie kuriem pētnieki ir pieraduši. Organoīdiem trūkst daudzu sastāvdaļu; parasti trūkst asinsvadi un imūnās šūnas. Tas nozīmē, ka tie ir ierobežoti cik lieli tie var izaugt bez šūnu nāves un tos nevar izmantot, lai pētītu procesus, kuriem nepieciešami šie komponenti (14).

Organoīdi nodrošina ātrus un stabilus rezultātus, ir vieglāk pieejami un nodrošina gan precīzāku audu attēlojumu, gan lielāku materiālu daudzumu. Turklāt organoīdu kultūru ir iespējams izveidot dažu nedēļu vai mēneša laikā. Kad tā ir izveidota, ir plašas iespējas liela mēroga genoma un zāļu skrīningam (16). Atšķirībā no viena slāņa šūnu līnijām, šīs kultūras var iegūt ar augstu efektivitāti no netransformētām šūnām un tās var viegli pavairot noteiktos kultivēšanas apstākļos (17).

Organoīdi varētu būt potenciāls donora audu avots turpmākai autotransplantācijai, viens no svarīgākajiem organoīdu pielietojumiem ir to izmantošana ksenotransplantātos. Organoīdi

var nodrošināt iespēju atsevišķu zāļu testēšanai īsā laika periodā pirms vai paralēli klīniskās terapijas noteikšanai (20).

1.4.1. Aizkuņģa dziedzera organoīdi

2013.gadā Huch ar kolēģiem aprakstīja 3D organoīdu sistēmu no peles aizkuņģa dziedzera kanāliņa audiem (20). 2015.gadā Boj un kolēģi ziņoja par pirmo 3D organoīdu modeli no peles un cilvēka aizkuņģa dziedzera adenokarciomas. Aizkuņģa dziedzera organoīdi pilnībā sastāv no kanāliņu šūnām (SOX9+, KRT19+), kas ekspresē embrija cilmes šūnu marķieri Pdx1. Lai aizkuņģa dziedzera organoīdu kultūras ilgtermiņā pavairotu, ir nepieciešama EGF, Rspo1, FGF10 un Noggin faktoru klātbūtne (25).

Kultivēšanā tiek izmantots serumu nesaturošs Matrigels, kam tiek pievienoti vairāki augšanas faktori, lai pavairotu peļu aizkuņģa dziedzera šūnas (20). Iegūtie organoīdi ir fizioloģiski līdzīgi sākotnējiem audiem; organoīdiem ir kanāla epitēlija šūnu marķieri, bet tiem trūkst gēnu, kas reprezentē acināro un endokrīno šūnu līniju (19,20). Veselīgu šūnu gadījumā, organoīdi bieži kļūst dobi ar skaidru luminālo–apikālo izvietojumu, kas atgādina aizkuņģa dziedzera kanāla struktūras, savukārt vēža šūnas veido gan kompakts, gan dažāda izmēra dobas struktūras (19).

Kā iepriekš minēts, aizkuņģa dziedzeris funkcionāli sastāv no divām atšķirīgām daļām: eksokrīnās, kas ietver kanālus un acinārās šūnas, un endokrīnās daļas, kas sastāv no Langerhansa saliņām (18). Ir identificētas arī endokrīnās cilmes šūnu populācijas no peles aizkuņģa dziedzera. Šajās šūnās nav ekspresēti endokrīno šūnu marķieri, tām piemīt EMT (*epithelial to mesenchymal transition*) īpašība un uz to virsmas notiek Procr (*Protein C receptor*) ekspresija. *In vivo*, Procr+ saliņu šūnas tiek pakļautas klonālai pavairošanai homeostāzes laikā un tiek iegūti visu četru endokrīno šūnu tipi (30).

Procr+ saliņu šūnas tiek izolētas un pārklātas ar serumu nesaturošu barotni, un papildinātas ar B27, ITS, EGF, heparīnu un FGF2. *In vitro*, izolētas Procr+ saliņu šūnas spēj izaugt saliņām līdzīgos organoīdos, kas ietver visus endokrīno šūnu tipus un spēj atpazīt glikozi un izdalīt insulīnu. (30).

Svarīgs aizkuņģa dziedzera organoīdu pielietojums ir vēža organoīdu izveide no atsevišķiem pacientiem. Šo organoīdu kultivēšana ļauj veikt zāļu skrīningu, kas var veicināt individuālās terapijas attīstību (26).

1.5. Organoīdu vizualizācijas un kvantificēšanas metodes

Attēlveidošana ir svarīga, lai izprastu šūnu sastāvu, formu, savstarpējo mijiedarbību. Divas galvenās analīzes organoīdu attēliem ir kvantitatīvā noteikšana, kas ir šūnu un to

komponentu skaitīšana, marķēšanas intensitātes mērīšana, un morfoloģiskie mērījumi, kas ir, piemēram, izmērs, forma utt. (21).

Spilgta lauka mikroskopija. Spilgta lauka mikroskopiju izmanto, lai noteiktu organoīdu formu un izmērītu divdimensiju parametrus, piemēram, garumu un laukumu. Paraugiem nav nepieciešama specifiska apstrāde. Organoīdu kultūras ir iespējams pārbaudīt bez krāsošanas un apgaismojums nemaina parauga patiesās krāsas. Izmērs tiek novērtēts pēc diametra, perimetra vai laukuma, kas var noderēt pie organoīdu augšanas vai dažādu kultūru salīdzināšanas. Trūkums ir, ka gaismas avots atrodas zem parauga un kontrastu rada gaismas absorbcija paraugā. Kad kontrasts ir pārāk augsts, novērošanas kvalitāte pasliktinās, kā rezultātā attēls tiek sabojāts, taču, kad kontrasts ir pārāk zems, lielākā daļa šūnu ir neredzamas, jo tās nav krāsotas (21).

Fluorescences mikroskopija. Fluorescences mikroskopijā par gaismas avotu izmanto noteiktu gaismas viļņa garumu, lai apstarotu paraugu un izsauktu fluorescenci, pēc tam novēro formu un objekta novietojumu zem mikroskopa. Tā tik plaši izmantota bioloģisko paraugu strukturālajā un funkcionālajā attēlveidošanā. Dažas vielas šūnās, piemēram, NADPH var izstarot fluorescenci ultravioletajā starojumā, taču dažas vielas pašas nevar, tāpēc tā ir jāiekrāso ar fluorescencējošu krāsvielu vai jāiezīmē ar antivielu. Fluorescences attēlveidošanas galvenā priekšrocība ir , ka tas var vizualizēt audus, šūnu tipus, konkrētas biomolekulas un gēnu ekspresiju ar lielu specifiku. Lielākajā daļā pētījumu ir jāizmanto invazīvā fluorescences, kā rezultātā pēc attēlveidošanas, paraugi vairs netiek izmantoti. Citi trūkumi ir fotobalināšana un fototoksicitāte, ko galvenokārt izraisa fluorofori. Uzbudināti fluorofori var radīt reaktīvas skābekļa sugas, kas reaģē ar viegli oksidējamiem komponentiem, izraisot fluorescences signāla zudumu un šūnu cikla apstāšanos vai šūnas nāvi. Risinājums ir gaismas devas samazināšana, taču samazinoties gaismas devai, attēla kvalitāte pasliktinās (21).

Lāzerskenējošā konfokālā mikroskopija (LSCM – Laser Scanning Confocal Microscopy). LSCM ir visplašāk izmantotais organoīdu attēlveidošanas rīks, kas veido optiskās sekcijas, skenējot paraugu punktu pa punktam ar lāzera staru, kas fokusēts uz paraugu un izmanto mazus caurumiņus, lai izslēgtu defokusētu fona fluorescenci. Organoīdu attēli, kas iegūti ar LSCM, tiek analizēti, lai izmērītu dažādus parametrus subcelulārā līmenī, piemēram, intensitāti, formu, virsmu, šūnu sadalījumu, trīsdimensiju rekonstrukciju. Saskaitot šūnas, biomarķierus un kodolus, ir iespēja kvantitatīvi noteikt organoīdu aktivitāti un izsekot to augšanu un attīstību. LSCM ir iespēja izmantot arī daudzos slimību pētījumos, četrdimensiju dzīvu šūnu attēlveidošanā, piemēram, lai noteiktu laukumu vai tilpumu, lai uzraudzītu morfoloģiskās izmaiņas u.c.. Kombinācijā ar *fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)* to var izmantot, lai analizētu organoīdu metabolismu. Šī metode sniedz iespēju pētīt

intracelulārus procesus organoīdos, piemēram, pūslīšu transportēšanu vai citoskeleta pārveidošanu (21).

Daudzfotonu mikroskopija. Daudzfotonu mikroskopijā tiek izmantoti impulsa infrasarkanā lāzera avoti, kas vienlaikus izstaro vairāk nekā vienu zemas enerģijas fotonu, lai ierosinātu fluoroforus. Apvienotā enerģija ir pietiekama, lai paceltu elektronus ierosinātā stāvoklī un tādējādi stimulētu fluorescenci. Infrasarkanajai gaismai ir spēcīgāka iespiešanās (līdz 1 nm) nekā redzamajai gaismai audos, tāpēc daudzfotonu mikroskopija ir piemērotāka, lai veiktu dziļo vielu tomogrāfiju bioloģiskajos audos un paplašinātu pielietojuma jomu. Fotobalināšana un fototoksicitāte ir ierobežota fokusa punkta tuvumā, kas palīdz samazināt parauga autofluorescenci un gaismas izkliedi. Daudzfotonu mikroskopija darbojas labāk dziļajos slāņos nekā LSCM. Daudzfotonu mikroskopijai ir lieliska veiktspēja organoīdos, optiskā metabolisma attēlveidošana ir daudzfotonu mikroskopijas veids, lai pārbaudītu raksturīgās fluorescences intensitātes un vielmaiņas ilgumu, enzīmus, kas var novērtēt izmaiņas organoīdu šūnu metabolismā un pielietot zāļu skrīninga pētījumos. Daudzfotonu mikroskopiju var apvienot ar hiperspektrālo attēlveidošanu un FLIM, lai novērotu šūnu aktivitāti un specifisku molekulāro lokalizāciju, izmantojot fluorescences intensitāti, lai novērotu organoīdu attīstību. Intravitālā daudzfotonu mikroskopija ļauj pētīt dinamiskos procesus vienas šūnas līmenī, ļaujot telpiski novērot patoloģiju, taču spēj attēlot tikai virspusējos audus. Daudzfotonu mikroskopijas attēlu iegūšana parasti ir lēna, jo notiek skenēšana punktu pa punktu visā paraugā (21).

Light Sheet Fluorescence mikroskopija (LSFM). Atšķirība starp tradicionālo mikroskopu un LSFM ir gaismas apgaismojuma režīms. Fluorescences signāls tiek savākts ar noteikšanas objektīvu, kas atrodas perpendikulāri apgaismojuma asij. Pārvietojot paraugu vai to pagriežot ir iespējams attēlot vai fotografēt arī lielus paraugus no vairākiem leņķiem, iegūstot 3D attēlu. Tā kā LSFM ir aprīkots ar augstas kvantu efektivitātes detektoriem, tam ir laba attēla kvalitāte un attēla uzņemšanas ātrums. Šis mikroskopijas veids ļauj izmērīt konkrētu organoīdu konstrukciju biezumu, kā arī var noteikt zāļu absorbciju trīsdimensiju vizualizāciju šūnu līmenī. Tomēr LSFM nepieciešams, lai paraugi būtu pilnībā notīrīti un šķēršļi, piemēram, burbuļi, var radīt ēnas (21).

Apstrādājot iegūtos attēlus var iegūt daudz informācijas un izdarīt secinājumus par eksperimenta norisi. Šajā procesā var noderēt dažādas brīvpieejas attēlu apstrādes programmas un algoritmi.

CellProfiler mēra lielu skaitu funkciju katrai identificētajai šūnai, tostarp laukumu, formu, intensitāti un tekstūru. Tas ietver ne tikai daudzas standarta funkcijas, bet arī sarežģītus mērījumus, piemēram, Zernike formas elementus un Haralick un Gabor tekstūras iespējas. Ir

arī moduļi ar kuriem iespējams izmērīt dažādas attēla iezīmes, piemēram, intensitāti, tekstūru, piesātinājumu u.c.. Cellprofiler spēj pielāgoties jauniem bioloģiskiem atklājumiem, aprēķinot jaunas funkcijas no identificētajām šūnām, tas ļauj ātri izmērīt jaunus šūnu fenotipus, ja tas nepieciešams (31).

ImageJ ir programma, kas atbilst lielākajai daļai attēlu apstrādes un analīzes prasību, kas nepieciešamas šūnu attēlu apstrādei. Tas ietver vairākus attēlu apstrādei noderīgus rīkus, piemēram, histogrammas manipulācijas un standarta attēla filtrus. Papildus parastajām funkcijām, ImageJ ir iespējams veikt mērījumus 3D attēliem (32).

3D sferoīdu un organoīdu kultūrām bieži ir mainīgs izmērs un morfoloģiski fenotipi. Organoīdi, kas audzēti ārpusšūnu matricas hidrogēlos vai uz tiem, neatrodas tajā pašā fokusa plaknē, kas izraisa nevienmērīgu gaismas caurlaidību attēlos (27).

Papildus šīm programmām ir izstrādāti protokoli, kas palīdz kvantificēt organoīdus un pielietot mašīnmācīšanās algoritmus, piemēram, OranoSeg, OrganoID, OrgaQuant, MorgAna. Viens no lietotajam draudzīgajiem algoritmiem ir OranoSeg (44,45,46).

OranoSeg protokols racionalizē liela izmēra morfometrisko profilēšanu, kas nepieciešams pētījumos, kuros ir iesaistītas sferoīdu un organoīdu 3D kultūras. Izvairoties no prasības pēc konfokālas vai augsta kontrasta fluorescences mikrogrāfijām, ar vadlīniju palīdzību iepriekš arhivētie attēli tiek pārveidoti kvantitatīvās datu kopās. Šo programmu izmanto, lai aplūkotu neviendabīgas 3D kultūras kā bioloģisku mainīgo, kas pakļauts parakrīno faktoru un šūnu genotipa modulācijai. OranoSeg algoritms sastāv no trim galvenajiem soļiem: 1. izlīdzināšanas, 2. adaptīvā spilgtuma sliekšņa noteikšanas un 3. pēcsegmentācijas apstrādes (27).

OranoSeg salīdzinājumā ar CellProfiler un ImageJ tika izmantoti MCF10A-5E krūts epitēlija sferoīdi. Sferoīdie attēli tika apkopoti no četrām dažādām laboratorijām, lai fiksētu partijas variācijas, kas izriet no dažādām hidrogēla partijām un spilgta lauka attēlveidošanas iestatījumiem. Programmām tika izveidotas vadlīnijas, lai maksimāli tās pielāgotu OranoSeg, taču tām visām trūka lokāla adaptīva spilgtuma sliekšņa parametru (27). Neskatoties uz progresu automātiskajā attēlu analīzē, tas prasa laika ieguldījumu protokola izstrādē un eksperimentu datu ievākšanas brīdī ir jāpievērš liela uzmanība tam, lai attēli tiktu iegūti ar vienādiem parametriem. Organoīdu kvantifikācija no 2D attēliem arī nav optimāla, jo neļauj precīzi noteikt un analizēt objektus, kas pārklājās un ir ārpus fokusa (44).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1.tabula. Darbā izmantotie reaģenti

Reaģents	Ražotājs, kataloga numurs
OCT <i>mounting media</i>	VWR, kat.nr. 361603E
4% Formaldehīds	Sigma-Aldrich, kat.nr. 252549
Hoechst 33342	Thermo Scientific, kat.nr. 62249
Fluoroshield	Sigma-Aldrich, kat.nr. F6057
0,1% želatīna šķīdums (<i>gelatin from porcine skin</i>)	Sigma-Aldrich, kat.nr. ES-006
Liellopu seruma albumīns (<i>BSA – bovine serum albumin</i>)	Sigma-Aldrich, A9576-50ML
Triton X 100	
DAPI	Thermo Fisher Scientific, kat.nr. P36935
Fosfātu sāļu šķīdums (<i>PBS – Phosphate Buffered saline</i>)	Sigma-Aldrich, kat.nr. D8537-1L
Tween 20	Sigma-Aldrich, kat.nr. P1379
CRS	Sigma-Aldrich, CLS 354253

2.2.tabula. Primārās un sekundārās antivielas

Antiviela	Ražotājs, kataloga numurs
K19 (keratin19)	Signaling Technology, kat.nr. 13092S
CDH1	Biosciences, kat.nr. 610182
MUC	Santa Cruz Biotechnology, kat.nr. sc 7314
SOX9	Sigma – millipore, kat.nr. AB5535
PDX1	Biotechne, MAB 2419
PTF1 α	Biosciences, kat.nr. 564745
CFTR	Biotechne, kat.nr. MAB 1660
Donkey anti – Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 555	Thermo Fisher Scientific, kat.nr. A32794
Donkey anti – Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488	Thermo Fisher Scientific, kat.nr. A21202

Donkey anti – Goat IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 555	Thermo Fisher Scientific, kat.nr. A 21432
---	---

Pagatavojamie šķīdumi:

PBT (0,1%). Lai pagatavotu PBS-Tween, flakonā iepilda 1 ml Tween 20 un uzpilda ar PBS līdz 1000 ml atzīmei (uzglabā 4°C līdz 4 nedēļām) (33).

OWB *organoid washing buffer*. Lai pagatavotu OWB, pievieno 1ml Triton X 100 un 2 g BSA, papildina ar PBS līdz 1 l (uzglabā 4°C līdz 2 nedēļām) (33).

PBS/BSA (1%). Lai pagatavotu 1% PBS/BSA 1 g BSA izšķīdina 100 ml PBS (uzglabā 4°C līdz 2 nedēļām) (33).

Fruktozes/ glicerīns šķīdums. Lai pagatavotu fruktozes/glicerīna šķīdumu ir nepieciešams 60% glicerīns un 2,5 M fruktoze. Magnētiskajā maisītājā sajauc 330 ml glicerīna, 70 ml destilēta H₂O un 297,2 g fruktozes, istabas temperatūrā (uzglabā 4°C līdz 4 nedēļām) (33).

D – BSA skalošanas šķīdums. Lai pagatavotu D – BSA ir nepieciešams DMEM ar augstu glikozes līmeni, 0,1% BSA un penicilīns/streptomicīns (100 vienības/ml).

Aparatūra un materiāli:

Koniskie stobriņi (15 ml, Sarstedt); *safe – lock* centrifūgas stobriņi 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf); suspensijas šūnu kultivēšanas plates (24 lauciņi) (Sarstedt); folija; pipešu uzgaļi 10µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl (Sarstedt); DakoPen (Agilent); segstikliņi (Marienfeld); gaismas mikroskops (AMG- Evos Thermofischer); centrifūga (Biosan LC 3000 un SIGMA (ar 4C funkciju)); kriotoms (Leica CM 1850); abpusējais skočs; Fluorescences invertētais mikroskops iMIC (Till Photonics); horizontālais kratītājs ar termostatu (Biosan).

2.1. Veselu organoīdu iezīmēšana ar antivielām

Darba gaita:

1. No paraugiem nolej barotni un uzmanīgi mazgā vienu reizi ar 1 ml PBS.
2. Paraugus liek uz ledus un gēla izšķīdināšanai pievieno 0,5 ml ledus auksta CRS un atstāj uz ledus uz horizontālā kratītāja 30-60 minūtes.
3. Noskalo 15ml stobriņu ar PBS-BSA šķīdumu
4. Organoīdus pārnes uz 15 ml stobriņu, lauciņu skalo ar 1 ml ledus auksta PBS-BSA šķīdumu, lai savāktu visus palikušos organoīdus.
5. Stobriņu piepilda līdz 10 ml atzīmei ar aukstu PBS-BSA šķīdumu un liek centrifugēt 70 g – 3 min, 4 °C temperatūrā.

Fiksēšana:

1. Resuspendē paraugu ar 1 ml 4% formaldehīda šķīdumu, ar PBS – BSA 1000 µl uzgali, inkubē 45 minūtes, 4°C temperatūrā (inkubācijas perioda vidū viegli atkārtoti suspendē organoīdus, izmantojot 1000 µl uzgali).
2. Stobriņu piepilda ar 10 ml auksta PBT un inkubē 10 minūtes 4°C temperatūrā. Centrifugē pie 70 g – 5 minūtes, 4°C temperatūrā. Organoīdus 4°C var uzglabāt 48h.
3. Lai organoīdus bloķētu un permeabilizētu, resuspendē 1 ml aukstā OWB šķīdumā un pārnes uz zemas adhēzijas kultivēšanas platēm. Inkubē 15 minūtes 4°C.

Iezīmēšana :

1. Kontrolei vienā no tukšajiem lauciņiem pievieno 200 µl OWB. Tā ir vizuālā tilpuma reference.
2. Noliecot plati 45° leņķī, noņem OWB, atstājot organoīdus 200 µl OWB
3. Pievieno 200 µl OWB ar primārajām antivielām ar divreiz lielāku nepieciešamo koncentrāciju (K19 1:200; CDH1 1:100; MUC 1:50; SOX9 1:250; PDX1 1:100; PTF1 α 1:100), inkubē uz nakti 4°C, ar vieglu kratīšanu – 60 apgriezieni/min.
4. Katram lauciņam pievieno 1ml OWB un tur 3 minūtes, pēc tam noņem 1 ml OWB uzmanīgi, atstājot organoīdus lauciņos.
5. Mazgā ar 1ml OWB, atstāj 2h ar vieglu kratīšanu – 60 apgriezieni/min., 4°C.
6. Mazgāšanu atkārti vēl 2 reizes, galā atstājot 200 µl OWB
7. Pievieno 200 µl OWB ar sekundārajām antivielām ar 2x lielāku koncentrāciju (1:200) un inkubē 4°C ar vieglu kratīšanu uz nakti.
8. Mazgāšanu veic tā pat kā pēc primārajām antivielām.
9. Pēdējā mazgāšanas reizē pievieno Hoechst kodolu iezīmēšanai (1:1000)
10. Organoīdus pārnes uz 1,5 ml stobriņu, ļauj nosēsties.

Optiskā attīrīšana:

1. Noņem visu OWB un pievieno 50 µl fruktozes/ glicerīna šķīdumu. Inkubē 20 minūtes 4°C
2. Ar DakoPen uz priekšmetstikliņa iezīmē 1x2 cm taisnstūri, ārpusē uzlīmē abpusējo skoču, pievieno 20 µl parauga.
3. Pievieno segstikliņu, 1 minūti gaida un tad to piespiež pie skoča (33).

2.2. Imūnfluorescence uz griezumiem

2.2.1. Organoīdu sasaldēšana un griešana ar kriotomu

1. Organoīdiem, kas atrodas platē, noņem barotni, piepilina 0,5 ml auksta 4% formaldehīda un liek 4°C uz 30 minūtēm. Formaldehīds depolimerizē gēlu un atbrīvo organoīdus reizē tos nofiksējot.
2. Nofiksētos organoīdus pārnes 15 ml stobriņā un pievieno 10 ml PBS.
3. Centrifugē uz nelieliem apgriezieniem vai ļauj organoīdiem nosēsties. Noņem visu šķīdumu.
4. Organoīdu nogulsnei pievieno OCT šķīdumu un uzmanīgi resuspendē neizveidojot burbuļus.
5. Inkubē vismaz 2h, 4°C (vēlams inkubēt uz nakti).
6. Saldēšanas formā, vai folija trauciņā iepilda nedaudz OCT un sasaldē -80°C vai uz sausā ledus. Virsu sasalušajam OCT pārnes OCT ar paraugu un sasaldē. Pārklāj ar OCT un sasaldē.
7. Izveidoto paraugu var uzglabāt ilgstoši -80°C.
8. Sasaldēto paraugu griež ar kriotomu (10-12 μm griezumi). Sagrieztos fragmentus uznes uz priekšmetstikliņa, kas pārklāts ar polilizīnu vai želatīnu (41).

2.2.2. Organoīdu iezīmēšana ar antivielām

1. Paraugu vienu reizi mazgā ar PBS šķīdumu un fiksē ar formaldehīdu 5min, istabas temperatūrā.
2. 3x mazgā ar 250 μl 1% BSA/PBS šķīdumu 3minūtes.
3. Permeabilizē un bloķē ar 3% BSA/PBS šķīdumu, kas satur 0,05% Triton X 100.
4. Pievieno primārās antivielas (K19 1:300; PDX1 1:100; SOX9 1:300; CFTR 1:50; PTF1 α 1:100; CDH1 1:100 1% BSA/PBS ar 0,05% Triton X 100), atstāj uz nakti, 4°C. Izmantojot 150 μl antivielu šķīdumu uz katru stikliņu. Stikliņu pārklāj ar Parafilm plēvi.
5. Stikliņu skalo 3x ar 250 μl 1% BSA/PBS šķīdumu ar Triton X 100 3minūtes, pievieno sekundārās antivielas un atstāj uz stundu.
6. Mazgā 3x ar PBS/BSA 3min, ar DakoPen iezīmē taisnstūri apkārt paraugam, pievieno ieslēgšanas šķīdumu, kas satur kodola iezīmi un uzliek segstikliņu.

2.3. Kvantificēšanas metodes

Kvantificēšanai tika izmantoti 5 attēli (3.10.att.), kur aizkuņģa dziedzerā organoīdi ir izretinātā kultūrā un 5 attēli (3.13.att.), kur aizkuņģa dziedzerā organoīdi ir blīvā kultūrā. Tika

izmantots jau gatavs CellProfiler protokols (27) un pašizveidots algoritms jeb Makro priekš FIJI programmas, kur kā referenci izmantojām manuālo skaitīšanu ImageJ programmā.

2.3.1. Protokols aizkuņģa dziedzera organoīdu kvantificēšanai ar FIJI

Makro izretinātai kultūrai:

```
run("8-bit");
run("Subtract Background...", "rolling=50 light sliding");
run("Gaussian Blur 3D...", "x=2 y=2 z=2");
setAutoThreshold("Default dark");
//run("Threshold...");
//setThreshold(245, 255);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=700-Infinity circularity=0.70-1.00 display clear");
```

Makro blīvai kulūrai:

```
run("8-bit");
run("Subtract Background...", "rolling=50 light sliding");
run("Gaussian Blur...", "sigma=2");
setAutoThreshold("Default dark");
//run("Threshold...");
setThreshold(246, 255, "raw");
//setThreshold(246, 255);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
run("Set Measurements...", "area mean standard min redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=700-Infinity circularity=0.70-1.00 display clear");
```

2.3.2. Protokols aizkuņģa dziedzera organoīdu kvantificēšanai ar CellProfiler

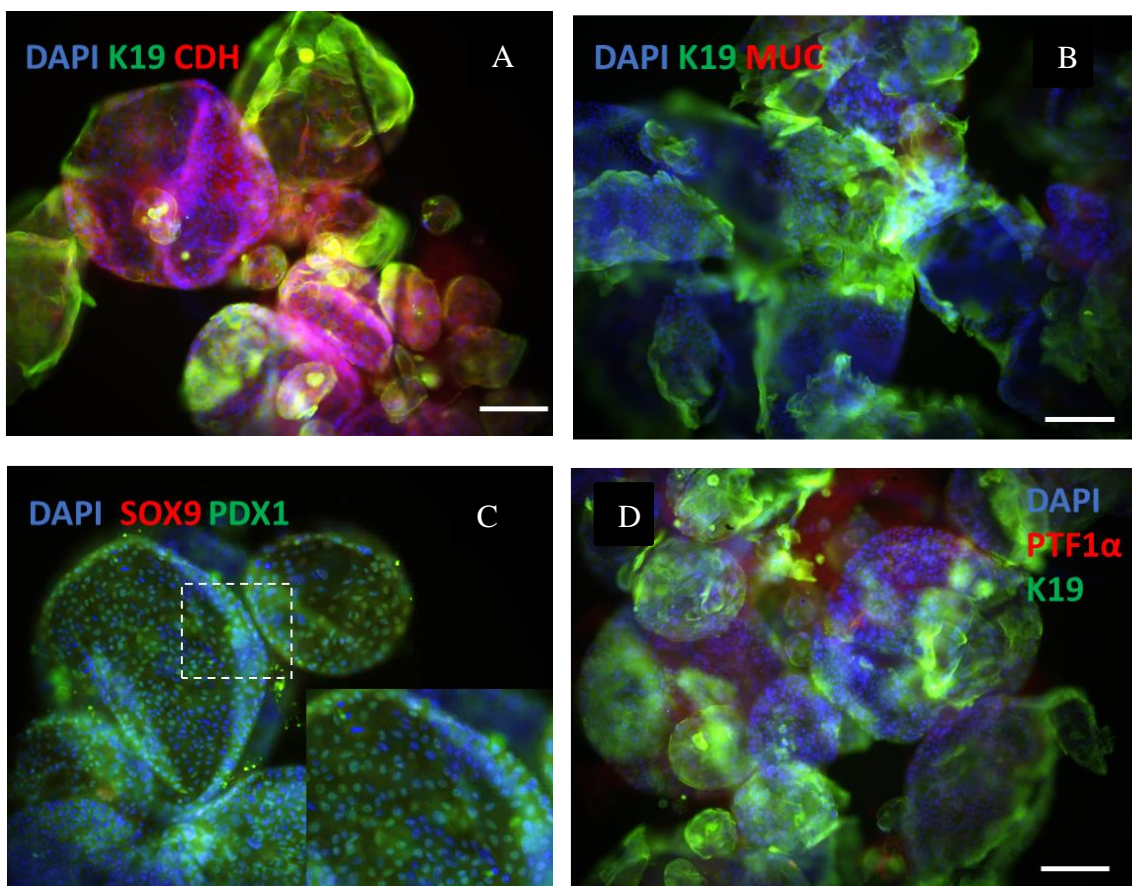
Izmantotais protokols ir ņemts no (27), tas paredz izmantot CellProfiler programmas sekojošās komandas:

CellProfiler izlīdzināšana tiek panākta atverot ar *Morph/open (structuring element= 5 pixel diameter disk)* un aizverot ar *Morph/close (structuring element= 5 pixel diameter disk)*. Tālāk

tiek izmantots Gausa filtrs ar *CorrectilluminationCalculate/GaussianFilter (size= 50 pixels)*. Ar *CorrectilluminationApply (parameter= divide)* Gausa filtra attēls tiek dalīts ar oriģinālo attēlu un tiek segmentēts pēc *Otsus* metodes, izmantojot *IdentifyPrimaryObjects/Global/Otsu (parameters= two – class thresholding, weighted variance minimized)*. Pēc segmentācijas apstrāde ietver caurumu aizpildīšanu ar *IdentifyPrimaryObjects/Fill*, izslēdzot mazus objektus ar *IdentifyPrimaryObjects (1 pixel < diameter of objects < 50000 pixels)*. Mazie objekti tiek atdalīti ar *MesaureObjectSizeShape*, kas mazāki par 10 pikseļiem (27).

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Veselu organoīdu iezīmēšana ar antivielām



3.1. att. **Organoīdu iezīmēšana ar antivielām** A – K19 un CDH1; B – K19 un MUC; C – SOX9 un PDX1; D – PTF1 α un K19. Garuma nogrieznis visos attēlos ir 100 μ m.

Šajā metodē organoīdi netiek griezti, tādējādi tiek saglabāts telpiskums. Iegūtie attēli sniedz priekšstatu par aizkuņģa dziedzera organoīdu struktūru, izmēriem un šūnu lokalizāciju, kas ir nozīmīgi, ja ir organoīdi, kas sastāv no dažādām šūnām (47). Iegūtie attēli ir labas izšķirtspējas ar palielinātiem fragmentiem, kas parāda, ka iekrāsoti ir tieši kodoli (zilā krāsā) vai citoplazmas elementi, piemēram, kā redzams 3.1.att. C, PDX (zaļā krāsā) iezīme ir tieši kodolā.

Aizkuņģa dziedzera organoīdiem ir atšķirīgas formas, kas ļoti labi novērojams 3.1.att. A, kur redzams, ka ne visi aizkuņģa dziedzera organoīdi ir apaļi, te ir arī ovāli un reizēm sazaroti, kā arī ir novērojams atšķirīgs izmērs (3.1.att. D).

Darbā tika izmantotas 6 antivielas: K19 (*keratin 19*), CDH1 (*cadherin*), MUC (*mucine1*), SOX9 (*SRY-box transcription factor 9*), PDX1 (*pancreatic and duodenal homeobox1*) un PTF1 α (*pancreas transcription factor 1 subunit alpha*).

Kā redzams (3.1.att. A, B, D) zaļā krāsā ir iezīmēts K19 – keratīns. K19 ir I tipa keratīns, kuru, piemēram, peles aizkuņģa dziedzeris ekspresē kanāliņa šūnās un acinārajās šūnās (34). Savukārt cilvēkiem, augļa attīstības laikā K19 tiek ekspresēts visās epitēlija šūnās, pēc tam – K19 ekspresija tiek saglabāta aizkuņģa dziedzera kanāliņa un centroacinārajās šūnās (35).

Kā iepriekš minēts PDX1 iezīme ir tieši kodolā (3.1.att. C). PDX1 ir būtiska loma aizkuņģa dziedzera eksokrīno un endokrīno šūnu, tostarp, beta šūnu, attīstībā (38).

3.1.attēlā C vāji izteikta, bet ir novērojama SOX9 iezīme, kas arī ir viens no aizkuņģa dziedzera priekštečšūnu marķieriem (48).

3.1.attēlā D sarkanā krāsā, PTF1 α ir iezīmēts zemā līmenī, tas ir nepieciešams aizkuņģa dziedzera acināro un kanāliņa šūnu veidošanai un ir viens no priekštečšūnu marķieriem (39). Šie novērojumi ļauj secināt, ka šiem organoīdiem ir kanāliņiem līdzīgs fenotips un tiem raksturīga arī orgāna embrionālai attīstībai raksturīgo marķieru ekspresija. Līdzīga marķieru ekspresija cilvēka aizkuņģa dziedzera organoīdiem ir jau iepriekš aprakstīta (49,50).

3.1.attēlā A sarkanā krāsojuma ir novērojams CHD1- kadherīns, kas atrodas epitēlija šūnu membrānā, CDH1 zudums var veicināt rezistences veidošanos pret ķīmijterapiju aizkuņģa dziedzera vēža gadījumā (36,37). Šis marķieris norāda, ka organoīdi ir veidoti no epitēlija šūnām. CDH1 negatīvās (mezenhimālās šūnās kultūrās netika novērotas), tātad ir tīras šūnu kultūras bez fibroblastiem.

MUC (3.1.att. B) neuzrādīja pozitīvu rezultātu. Mucīns ir ārpusšūnas proteīns un, iespējams nepieciešams ilgāk kultivēt šūnās, lai parādītos tā ekspresija. Citos pētījumos mucīns ir novērots pēc organoīdu pārstādīšanas *in vivo* (49).

Metodes priekšrocība ir, ka tiek saglabāta audu integritāte, struktūra. Tā sniedz daudz informācijas; sniedz priekšstatu par telpisku organoīdu parametriem, piemēram, par aizkuņģa dziedzera organoīdu izmēru un sazarojumu. Ar veselu organoīdu iezīmēšanas metodi ir iespējams noteikt, vai noteiktās organoīdu struktūrās ir novērojama heteroģenitāte. Piemēram, zarnu organoīdu gadījumā, ir novērotas ar cilmes šūnām kriptām līdzīgas struktūras (40).

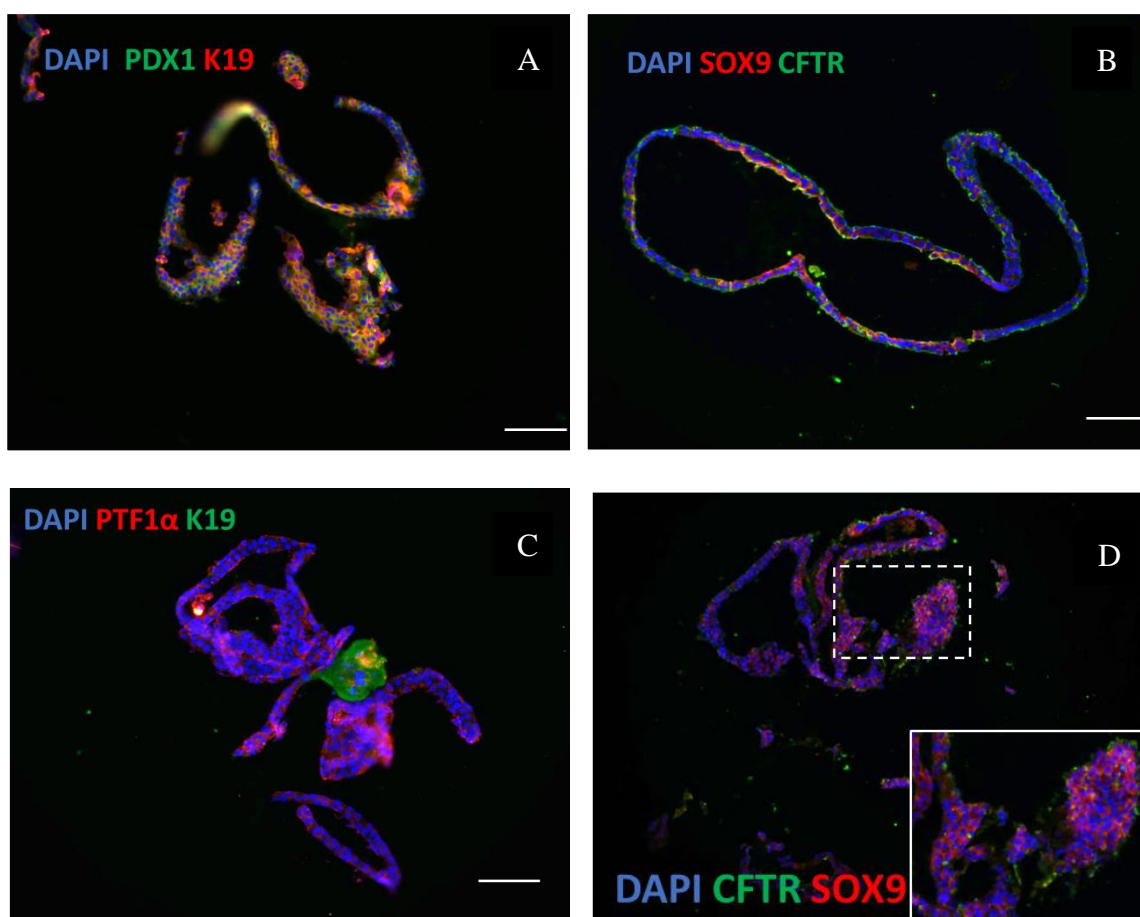
Galvenā šīs metodes priekšrocība ir augstas izšķirtspējas trīsdimensiju attēls ar informāciju par proteīnu un šūnu atrašanās vietu.

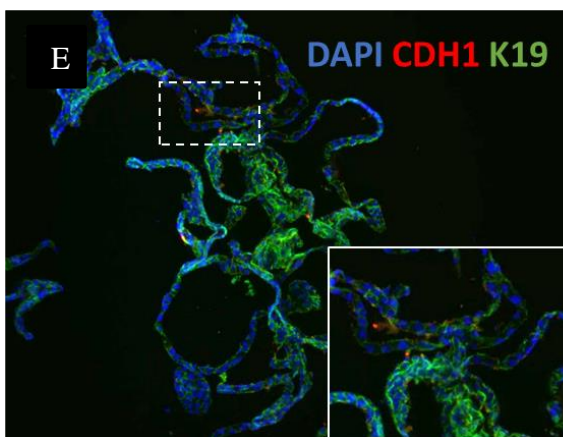
Veselu organoīdu iezīmēšanas metodes trūkumi galvenokārt ir saistīti ar lielu materiāla zudumu iezīmēšanas procesā, līdz ar to iezīmēšanas reakciju tilpums ir lielāks, kas rada lielāku primāro un sekundāro antivielu patēriņu. Metodes ierobežojums ir nepieciešamība pēc kvalitatīva konfokālā vai *Light sheet* fluorescences mikroskopa, kā arī ir nepieciešamas

datorprogrammas, ar kurām iespējams apstrādāt iegūtos attēlus. Kā vēl viens trūkums šai metodei ir sarežģītais kvantificēšanas process, piemēram, kodolu kvantifikācijai šķēršļus rada kodolu atrašanās vairākās attēla z – plaknēs. Kvantifikācijas automatizācija ir īpaši sarežģīta, līdz ar to šī metode nav saderīga ar augstas veiktspējas pētījumiem, piemēram, jaunu aktīvo savienojumu meklējumos.

Tomēr jaunākie pētījumi pierāda, ka 3D vizualizācijas metodes ir iespējams pielietot zāļu skrīningā. Piemēram, pētījumā, kas veikts uz cilvēka prostatas vēža organoīdiem, šīs metodes tika pielietotas, lai pētītu vielu ietekmi uz šo organoīdu dzīvotspēju un morfoloģiju (42).

3.2. Imūnfluorescence uz kriotoma griezumiem





3.2.att. **Organoīdu iezīmēšana ar antivielām krio – griezumos** A – PDX1 un K19; B – SOX9 un CFTR; C – PTF1 α un K19; D – CFTR un SOX9; E – CDH1 un K19.

Kriotoma griezumū sniedz iespēju ietaupīt bioloģisko materiālu, kā arī izmantoto primāro un sekundāro antivielu daudzumu. Ar metodi iegūtie attēli ir piemērotāki šūnu kvantificēšanā, jo visa informācija atrodas vienā plaknē. Metode paredz aizkuņģa dziedzera organoīdu izslēgšanu no gēla jeb gēla izšķīdināšanu, centrifugēšanu un nogulšņu sasaldēšanu OCD šķīdumā.

Iezīmēšanā tika izmantotas 7 antivielas : K19, PDX1, SOX9, CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), PTF1 α un CDH1. Iegūtajos attēlos aizkuņģa dziedzera organoīdi bieži ir deformēti un tie nav ierastajā apaļajā formā. Salīdzinot ar veselu organoīdu iezīmēšanu, ir novērojams, ka krāsojums kodola iezīmēm (SOX9, PDX1, PTF1 α) ir nevis tieši kodolā, bet apkārt tiem (3.2.att. A, B, C, D), iespējams tas ir saistīts ar nepietiekošo paraugu permeabilizāciju.

Tiek novērota CFTR ekspresija, kam ir svarīga loma aizkuņģa dziedzera kanāliņa sekrēcijas funkcijās un patoloģijā (43). Kā redzams 3.2.att. B un D, CFTR ir atpazīts un tas ir iekrāsots zaļā krāsā. K19 (3.2.att. A, C, E), PDX1 (3.2.att. A) un PTF1 α (3.2.att. C) uzrāda augstu līmeni, bet kodola iezīmju specifiskums ir apšaubāms. Ņemot vērā šos rezultātus, tiek secināts, ka iegūtie organoīdi satur aizkuņģa dziedzera kanāliņa šūnas.

Darba gaitā tika secināts, ka Histo – bond slaidi šiem paraugiem nav piemēroti, jo paraugs noskalojās. Piemērotāki ir slaidi ar polilizīna pārklājumu, bet optimālāk ar 0,1% želatīna šķīdumu.

Kad aizkuņģa dziedzera organoīdi tika sagatavoti saldēšanai un kriotoma griešanai, formaldehīds šķietami depolimerizēja gēlu un padarīja to grūti manipulējamu. Tika izmēģinātas dažādas formaldehīda koncentrācijas, kā arī temperatūras. Formaldehīds mazākā koncentrācijā izrādījās saudzīgāks. Savukārt saharoze dehidratēja gēlu un lika tam vairāk pielipt pie plastmasas virsmas, līdz ar to gēla pārvešana uz sasaldēšanas šķīdumu bez

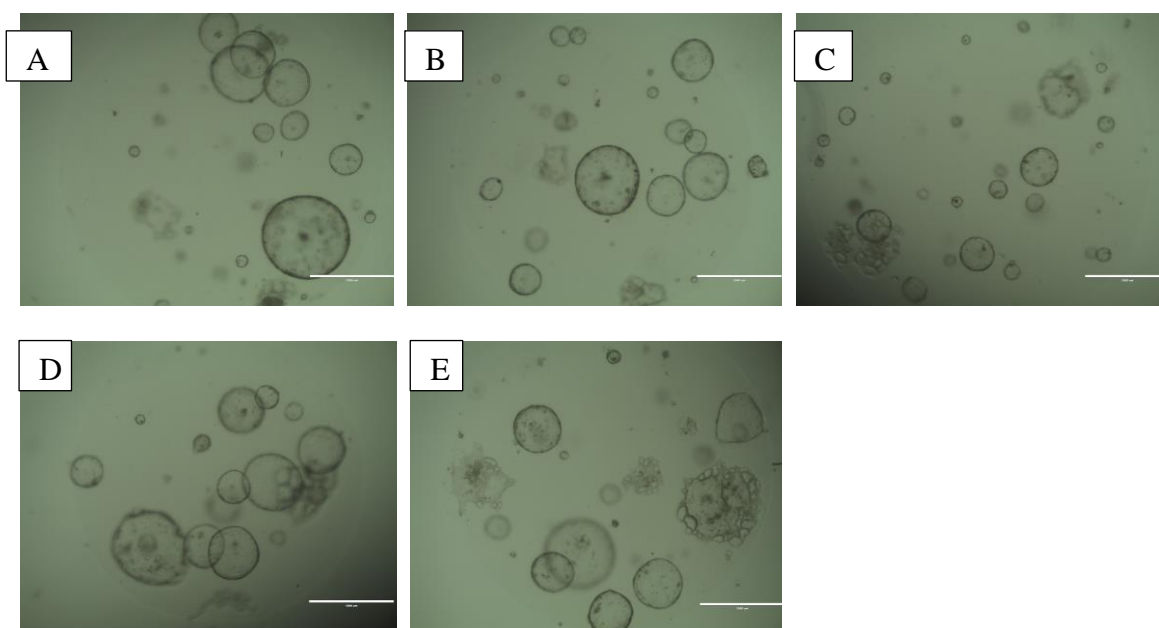
tā izjaukšanas nebija sekmīga. Tika novērots, ka šī metode izrādījās veiksmīgāka uz mazākiem organoīdiem, jo uz lielākiem ir tendence saplakt un zaudēt formu.

Kā alternatīvu tika mēģināts saglabāt un sagriezt gēlu, kurā šūnas aug. Tas būtu nodēriģi, jo ļautu saglabāt aizkuņģa dziedzera organoīdu struktūras, tas būtu ļoti nozīmīgi gadījumos, kas tiek veidotas kopkultūras, kur vairāki šūnu tipi tiek audzēti kopā. Kā piemēru var minēt asinsvadu šūnas, kas veido kapilārus ar organoīdiem, vai švāna šūnas un neironi, kas ar tiem veido kontaktus.

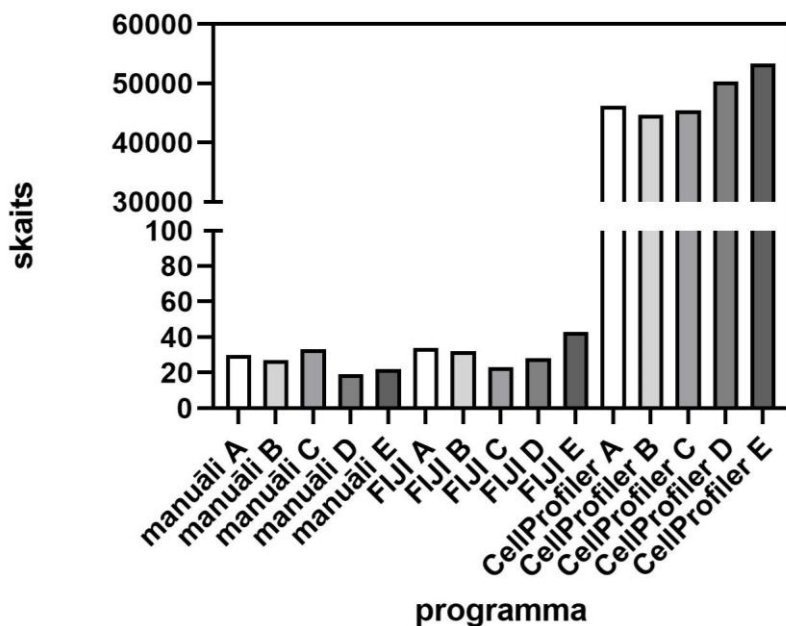
Iezīmēšanai uz kriotoma griezumiem priekšrocības ir mazāk patērētais bioloģiskais materiāls, kā arī reaģenti, primārās un sekundārās antivielas, salīdzinoši ar veselu organoīdu iezīmēšanu, kur materiāls un reaģenti tiek patērēti vairāk. Kā vēl viena priekšrocība ir inkubācijas laiks, kas griezumu gadījumā ir uz pusi mazāks nekā veselu organoīdu iezīmēšanas metodē, taču lai iegūtu līdzvērtīgus rezultātus, iespējams ir jāizmanto stiprāka permeabilizācija. Arī attēla apstrāde ir vieglāka uz griezumiem, taču iegūtā informācija ir tikai no vienas plaknes, kas ir sagriezta, turpretim veselu organoīdu iezīmēšanas gadījumā, informācija ir plašāka. Tiek iegūta informācija par aizkuņģa dziedzera organoīdu formām, izmēriem, kā arī tiek saglabāts telpiskums. Neskatoties uz priekšrocībām, ko sniedz imūnfluorescence uz kriotoma griezumiem, informācija, kas nepieciešama, ir kvalitatīvāka izmantojot veselu organoīdu iezīmēšanas metodi.

3.3. Kvantificēšanas metožu salīdzinājums

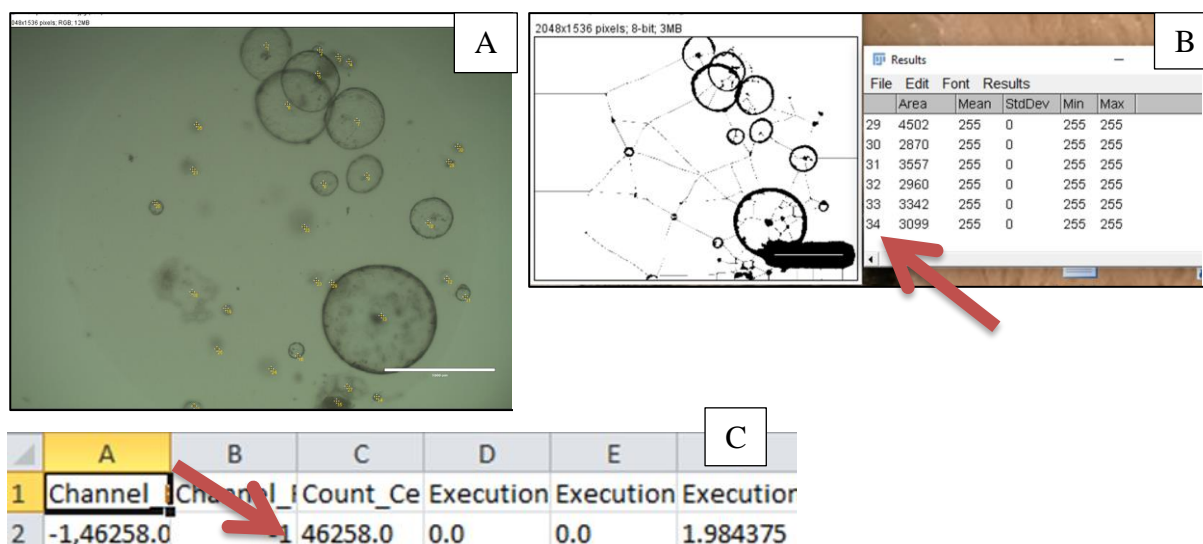
3.3.1. Organoīdi izretinātā kultūrā



3.3.att. Organoīdi izretinātā kultūrā Attēli, kuros tika skaitīti organoīdi.



3.4.att. Organoīdu skaits izretinātā kultūrā

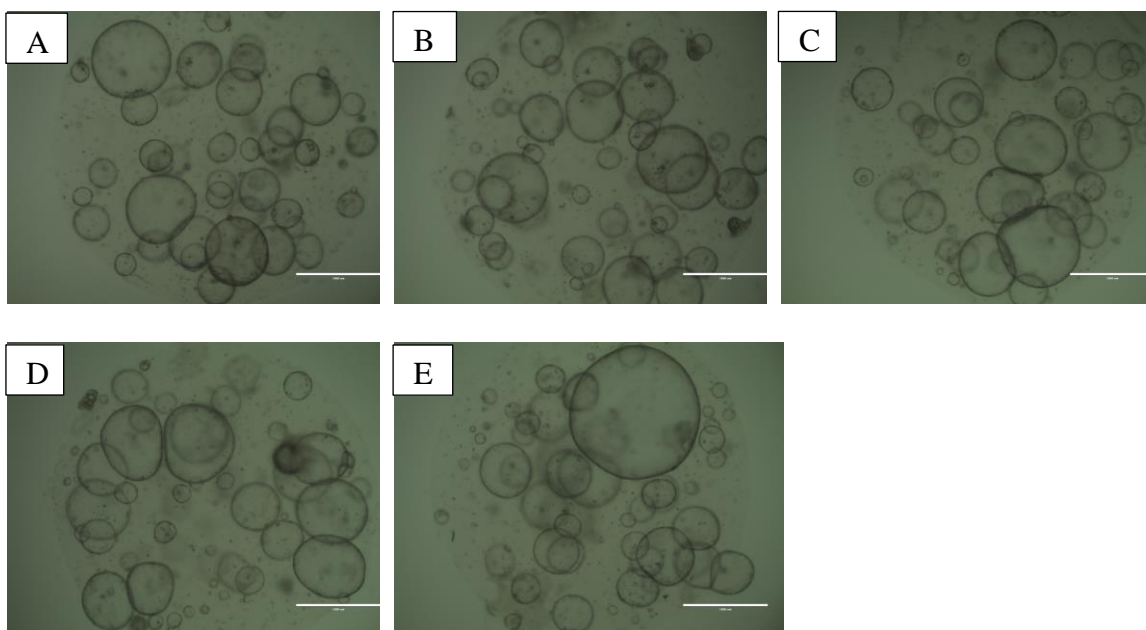


3.5.att. Organoīdu skaits 1A attēlā A – manuāli (ImageJ), B – FIJI, C – CellProfiler.

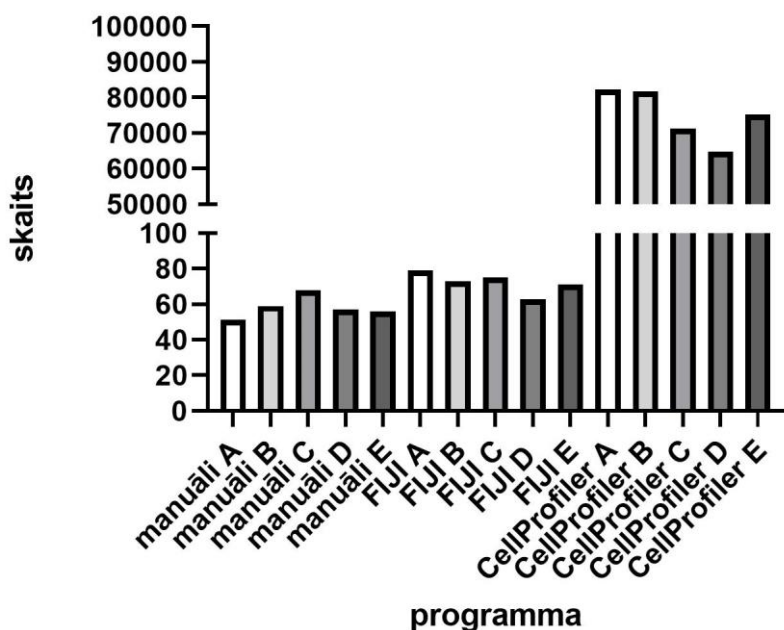
Organoīdu kvantificēšana gaiša lauka attēlos ļauj automatizēt eksperimentu analīzi un atvieglotu pētniecisko procesu. Tika izmēģināti automātiskās kvantificēšanas varianti (ar FIJI un CellProfiler programmām) un tika salīdzināti rezultāti ar manuālās skaitīšanas pieeju (ImageJ programmā). Eksperimentam tika izmantoti attēli, kur aizkuņģa dziedzeri ir dažādos blīvumos. Kvantificēšanai izretinātā kultūrā tika izmantoti 3.3.attēli. FIJI programmai veidotais Makro tika pamatā veidots uz 3.3.att. A, veicot minimālus pielāgojumus pārējos attēlos. CellProfiler gadījumā tika izmantots protokols, kas izveidots balstoties uz zarnu organoīdiem (27).

Kā redzams grafikā (3.4.att.), neviena no programmām nesniedza precīzus rezultātus, salīdzinoši ar manuālo skaitīšanu. Salīdzinot abas programmas, visprecīzākos jeb tuvāk manuāli skaitītajiem rezultātiem, uzrādīja FIJI programma, taču arī šie rezultāti ir ar ievērojamu novirzi no patiesajiem. Vistuvākie rezultāti ir attēlos 3.3.att. A, kur atšķirība ir 4 un 3.3.att. B, kur atšķirība ir 5. Vislielākā atšķirība ir 3.3.att. E, kur tā sasniedz 21. Tabulā redzams, ka CellProfiler iegūtie rezultāti ir ar lielu kļūdu un nav izmantojami. Tas varētu būt saistīts ar to, ka zarnu organoīdiem nav tik dobas struktūras un tie ir ar lielāku kontrastu.

3.3.2. Organoīdi blīvā kultūrā



3.6.att. **Organoīdi blīvā kultūrā** Attēli, kuros tika skaitīti organoīdi.



3.7.att. Organoīdu skaits blīvā kultūrā

Organoīdu kvantificēšanai blīvā kultūrā tika izmantoti 3.6.attēli. FIJI programmā veidotais makro tika veidots uz 3.6.att. A, pārējiem attēliem veicot nelielas izmaiņas un pielāgojumus uzstādījumos.

Tā pat kā ar izretināto kultūru, neviena no programmām nesniedza precīzus rezultātus. Salīdzinot (3.7.att.) abas programmas, augstāku precizitāti uzrādīja FIJI programma. Blīvajā kultūrā šie rezultāti izrādījās mazāk precīzi – vistuvākos manuālajiem rezultātiem FIJI programma ieguva 3.6.att. C un D. Kā jau izretinātā kultūrā, arī blīvā kultūrā CellProfiler ir uzrādījis nepatiesākos rezultātus.

Makro izveidošanā grūtības rada dažādie mikroskopa uzstādījumi, piemēram, gaismas intensitāte. Kā arī organoīdu lokalizācija, izmērs, daudzums, tas ka tie neatrodas vienā plaknē. Ir svarīgi saglabāt vienādus mikroskopa uzstādījumus visu eksperimentu dokumentēšanai, jo vienāds parauga izgaismojums ir fundamentāls. Problēmas rada arī organoīdu nestandarta morfoloģija, kuru var novērot, piemēram, 3.3.att. E ne visi organoīdi ir apaļi. Kā arī fakts, ka organoīdi pārklāj viens otru.

CellProfiler programmā problēmas rada tas, ka mazas daļiņas vai netīrumi tiek atpazīti kā organoīdi, kā arī lielākoties protokoli tiek veidoti blīvu organoīdu kvantificēšanai, kas labi izceļas uz gaiša fona. Aizkuņģa dziedzera gadījumā organoīdi ir dobi un tiem ir tumšas robežas, bet gaišs vidus.

Pētījumā, kas veikts ar MCF 10A-5E krūts epitēlija sferoīdiem, iegūtie rezultāti ir līdzīgi. Tika salīdzinātas OranoSeg (METLAB programmas algoritms), ImageJ un CellProfiler programmas, kur tās tika salīdzinātas ar manuāli iegūtajiem datiem.

CellProfiler uzrādīja viszemāko precizitāti. Visprecīzāk un tuvāk patiesajiem datiem, rezultāti tika iegūti ar OranoSeg un ImageJ programmām (FIJI ir ImageJ paveids). OranoSeg algoritms segmentē spilgta lauka 3D attēlu kultūras attēlus precīzāk nekā pārējās metodes. Visbeidzot tika secināts, ka piemērotākā programma 3D organoīdu un sferoīdu attēlu analizēšanai ir OranoSeg (27).

Šajā pētījumā neviena no izmēģinātajām metodēm nesniedza apmierinošus rezultātus, Makro izveide un pielāgošana ir laikietilpīgs process, CellProfiler gadījumā tika izmantots jau gatavs protokols, taču datu apstrāde arī prasīja salīdzinoši daudz laika. Līdz ar to šādu attēlu automatizāciju būtu lietderīgi turpmāk pilnveidot un izmantot tikai gadījumos, ja ir jākvantificē liels attēlu skaits.

SECINĀJUMI

1. Organoīdu iezīmēšanas rezultātā tika iegūti augstas izšķirtspējas attēli, kuri sniedz informāciju par aizkuņģa dziedzera organoīdu struktūrām un izmēriem. Organoīdi uzrāda aizkuņģa dziedzera kanāliņiem raksturīgo marķieru ekspresiju.
2. Salīdzinot veselu organoīdu iezīmēšanas un imūnfluorescences uz kriotoma griezumiem metodes, vairāk un kvalitatīvāku informāciju ir iespējams iegūt ar veselu organoīdu iezīmēšanas metodi.
3. Protokolu optimizācijas laikā tika noteikts, ka kriotoma griezumu iezīmēšanai ir nepieciešams iepriekš pārklāts stikliņš. Savukārt gēla fiksācijas laikā, tas tiek depolimerizēts, līdz ar to nav nepieciešama gēla šķīdināšana ar ORS.
4. Neviena no darbā pielietotajām automātiskās kvantificēšanas metodēm nesniedz precīzus rezultātus, kas būtu salīdzināmi ar manuālo skaitīšanu. Ir nepieciešama programmu pilnveidošana, lai tās būtu iespējams pielietot aizkuņģa dziedzera organoīdu 3D attēlu apstrādē.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību bakalaura darba vadītājam Dr.Pharm., vadošajam pētniekam Vadimam Parfejevam par atbalstu, padomu sniegšanu, doto iespēju izstrādāt bakalaura darbu laboratorijā un materiālu nodrošināšanu.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Ashraf H, Colombo JP, Marcucci V, Rhoton J, Olowoyo O. A Clinical Overview of Acute and Chronic Pancreatitis: The Medical and Surgical Management. *Cureus*. 2021 Nov 20;
2. Atkinson MA, Campbell-Thompson M, Kusmartseva I, Kaestner KH. Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia*. 2020 Sep 7;63(10):1966–73.
3. Campbell F. *Pathology of the pancreas : a practical approach*. Cham: Springer; 2021.
4. Madácsy T, Pallagi P, Maleth J. Cystic Fibrosis of the Pancreas: The Role of CFTR Channel in the Regulation of Intracellular Ca²⁺ Signaling and Mitochondrial Function in the Exocrine Pancreas. *Frontiers in Physiology*. 2018 Dec 20;9
5. Wilschanski M, Novak I. The Cystic Fibrosis of Exocrine Pancreas. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013 May 1;3(5):a009746–6. Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3633181/>
6. Yana Puckett, Garfield K. *Cancer, Pancreas*. Nih.gov. StatPearls Publishing; 2019. Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518996/>
7. Leroux C, Konstantinidou G. Targeted Therapies for Pancreatic Cancer: Overview of Current Treatments and New Opportunities for Personalized Oncology. *Cancers*. 2021 Feb 14;13(4):799.
8. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2008 Feb;3(1):157–88. Pieejams : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2666336/>
9. Tanaka C, Furihata K, Naganuma S, Ogasawara M, Yoshioka R, Taniguchi H, et al. Establishment of a mouse model of pancreatic cancer using human pancreatic cancer cell line S2-013-derived organoid. *Human Cell*. 2022;35(2):735–44. Pieejams : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8866361/>
10. Kim J, Koo B-K, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020 Oct 1;21(10):571–84. Pieejams: <https://www.nature.com/articles/s41580-020-0259-3#:~:text=Assessing%20interactions%20with%20other%20organs>
11. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*. 2016;14(4).

12. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*. 2014 Sep 29;230(1):16–26.
13. Hofer M, Lutolf MP. Engineering organoids. *Nature Reviews Materials*. 2021 Feb 19;
14. de Souza N. Organoids. *Nature Methods*. 2018 Jan;15(1):23–3.
15. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, et al. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell*. 2018 Mar;22(3):454-467.e6.
16. Kim, J., Koo, B.-K. and Knoblich, J.A. (2020). Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(10), pp.571–584. Pieejams : <https://www.nature.com/articles/s41580-020-0259-3#:~:text=Assessing%20interactions%20with%20other%20organs>.
17. Boj SF, Hwang C-I, Baker LA, Engle DD, Tuveson DA, Clevers H. Model organoids provide new research opportunities for ductal pancreatic cancer. *Molecular & Cellular Oncology*. 2015 Feb 23;3(1):e1014757
18. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo B-K, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nature Protocols*. 2016 Sep 1;11(9):1724–43. Pieejams : <https://www.nature.com/articles/nprot.2016.097>
19. Mäkinen L, Vähä-Koskela M, Juusola M, Mustonen H, Wennerberg K, Hagström J, et al. Pancreatic Cancer Organoids in the Field of Precision Medicine: A Review of Literature and Experience on Drug Sensitivity Testing with Multiple Readouts and Synergy Scoring. *Cancers* . 2022 Jan 1;14(3):525. Pieejams : <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/3/525/htm>
20. Moreira L, Bakir B, Chatterji P, Dantes Z, Reichert M, Rustgi AK. Pancreas 3D Organoids: Current and Future Aspects as a Research Platform for Personalized Medicine in Pancreatic Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2018;5(3):289–98
21. Fei K, Zhang J, Yuan J, Xiao P. Present Application and Perspectives of Organoid Imaging Technology. *Bioengineering* . 2022 Mar;9(3):121. Pieejams : <https://www.mdpi.com/2306-5354/9/3/121>
22. Erbarut-Seven ME. Pathologic classification of “pancreatic cancers”: current concepts and challenges. *Chinese Clinical Oncology* . 2017;6(6). Pieejams : <http://cco.amegroups.com/article/view/17786/18164>

23. Park JT, Leach SD. Zebrafish model of KRAS-initiated pancreatic cancer. *Animal Cells and Systems*. 2018 Oct 8;22(6):353–9.
24. Di Franco G, Usai A, Funel N, Palmeri M, Montesanti IER, Bianchini M, et al. Use of zebrafish embryos as avatar of patients with pancreatic cancer: A new xenotransplantation model towards personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*. 2020 Jun 7; 26(21):2792–809. Pieejams : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7284182/>
25. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo B-K, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nature Protocols*. 2016 Sep 1;11(9):1724–43. Pieejams : <https://www.nature.com/articles/nprot.2016.097>
26. Xu AT, Tong JL, Ran ZH. Organoids derived from digestive tract, liver, and pancreas. *Journal of Digestive Diseases*. 2016 Jan;17(1):3–10
27. Borten MA, Bajikar SS, Sasaki N, Clevers H, Janes KA. Automated brightfield morphometry of 3D organoid populations by OrganoSeg. *Scientific Reports*. 2018 Mar 28;8(1)
28. Driehuis E, van Hoeck A, Moore K, Kolders S, Francies HE, Gulersonmez MC, et al. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019 Dec 9; Pieejams : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31818951/>
29. Marsee A, Roos FJM, Verstegen MMA, Gehart H, de Koning E, Lemaigre F, et al. Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids. *Cell Stem Cell*. 2021 May;28(5):816–32.
30. Wang D, Wang J, Bai L, Pan H, Feng H, Clevers H, et al. Long-Term Expansion of Pancreatic Islet Organoids from Resident Procr+ Progenitors. *Cell*. 2020 Mar;180(6):1198-1211.e19.
31. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang I, Friman O, et al. *Genome Biology*. 2006;7(10):R100. Pieejams : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1794559/>
32. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*. 2007 Jul;43(1S):S25–30.
33. Dekkers JF, Alieva M, Wellens LM, Ariese HCR, Jamieson PR, Vonk AM, et al. High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids. *Nature Protocols*. 2019 May 3;14(6):1756–71. Pieejams : <https://www.nature.com/articles/s41596-019-0160-8>
34. Zhong B, Zhou Q, Toivola DM, Tao G-Z, Resurreccion EZ, Omary MB. Organ-specific stress induces mouse pancreatic keratin overexpression in association with

- NF- κ B activation. *Journal of Cell Science*. 2004 Apr 1;117(9):1709–19. Pieejams : <https://journals.biologists.com/jcs/article/117/9/1709/28087/Organ-specific-stress-induces-mouse-pancreati>
35. Alam1 CM, Toivola1 SB and *Diana M, 2. Intermediate Filament Keratins in The Exocrine Pancreas. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*. 2020 Sep; Pieejams: <https://www.pancreapedia.org/reviews/intermediate-filament-keratins-in-exocrine-pancreas#:~:text=In%20simple%20epithelia%2C%20the%20main>
 36. CDH1 gene: MedlinePlus Genetics. [medlineplus.gov](https://medlineplus.gov/genetics/gene/cdh1/). Pieejams: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/cdh1/>
 37. Kaneta Y, Sato T, Hikiba Y, Sugimori M, Sue S, Kaneko H, et al. Loss of Pancreatic E-Cadherin Causes Pancreatitis-Like Changes and Contributes to Carcinogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2019 Sep 14;9(1):105–19. Pieejams : [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6889596/#:~:text=E%2Dcadherin%20\(Cdh1\)%20is](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6889596/#:~:text=E%2Dcadherin%20(Cdh1)%20is)
 38. Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017 Nov 2;8(1).
 39. PTF1A - Pancreas transcription factor 1 subunit alpha - Homo sapiens (Human) - PTF1A gene & protein. www.uniprot.org. Pieejams : <https://www.uniprot.org/uniprot/Q7RTS3#:~:text=Required%20for%20the%20format ion%20of>
 40. Wu X, Li Z, Zhang H, He F, Qiao M, Luo H, et al. Modeling colorectal tumorigenesis using the organoids derived from conditionally immortalized mouse intestinal crypt cells (ciMICs). *Genes & Diseases*. 2021 Nov 1; 8(6):814–26. Pieejams : <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2352304221000118?token=11E8D665492E265A50F9EDFBB94C79DDC15833D3EBB28B00ABC7F3E1AEBFC1A5D04A4915B2E6EC9D9BFD222DDAFEEF16&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220510111534>
 41. Driehuis E, Gracanin A, Vries RGJ, Clevers H, Boj SF. Establishment of Pancreatic Organoids from Normal Tissue and Tumors. *STAR Protocols*. 2020 Dec 18 [cited 2022 Feb 21];1(3):100192. Pieejams : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666166720301799?via%3Dihub>
 42. Choo N, Ramm S, Luu J, Winter JM, Selth LA, Dwyer AR, et al. High-Throughput Imaging Assay for Drug Screening of 3D Prostate Cancer Organoids. *SLAS*

- Discovery. 2021 Oct; 26(9):1107–24. Pieejams :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8458687/>
43. Ooi CY, Durie PR. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in pancreatitis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2012 Sep;11(5):355–62.
44. Matthews, J., Schuster, B., Kashaf, S.S., Liu, P., Ben-Yishay, R., Ishay-Ronen, D., Shen, L., Weber, C., Bielski, M., Kupfer, S.S., Bilgic, M., Rzhetsky, A. and Tay, S. (2022). OrganoID: a versatile deep learning platform for tracking and analysis of single-organoid dynamics. doi:10.1101/2022.01.13.476248.
45. Gritti N, Lim JL, Anlaş K, Pandya M, Aalderink G, Martínez-Ara G, et al. MOrgAna: accessible quantitative analysis of organoids with machine learning. *Development*. 2021 Sep 8;148(18). Pieejams :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8451065/>
46. Kassis T, Hernandez-Gordillo V, Langer R, Griffith LG. OrgaQuant: Human Intestinal Organoid Localization and Quantification Using Deep Convolutional Neural Networks. *Scientific Reports*. 2019 Aug 28;9(1):12479. Pieejams :
<https://www.nature.com/articles/s41598-019-48874-y>
47. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009 Mar 29;459(7244):262–5. Pieejams :
<https://www.nature.com/articles/nature07935>
48. Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, et al. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Feb 6 [cited 2022 May 12];104(6):1865–70. Pieejams : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1794281/>
49. Georgakopoulos N, Prior N, Angres B, Mastrogiovanni G, Cagan A, Harrison D, et al. Long-term expansion, genomic stability and in vivo safety of adult human pancreas organoids. *BMC Developmental Biology*. 2020 Feb 26;20(1).
50. Loomans CJM, Williams Giuliani N, Balak J, Ringnalda F, van Gurp L, Huch M, et al. Expansion of Adult Human Pancreatic Tissue Yields Organoids Harboring Progenitor Cells with Endocrine Differentiation Potential. *Stem Cell Reports*. 2018 Mar 13 [cited 2022 May 12];10(3):712–24. Pieejams :
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29539434/>

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs

Cilvēka aizkuņģa dziedzera organoīdu raksturošana: vizualizācijas un kvantificēšanas metožu pielāgošana

izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors/e: Gundega Gangnusa _____
(vārds, uzvārds) (paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai
Vadītājs/a: Dr.Pharm., vadošais pētnieks Vadims Parfejevs _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Recenzents/e: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas „Farmācija” Bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2022., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____

(paraksts)