

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS MAĢISTRA STUDIJU PROGRAMMA

**CILVĒKA AIZKUŅĀ DZIEDZERA ORGANOĪDU 3D MODEĻA
IZVEIDE
MAĢISTRA DARBS**

Autore: **Karīna Goluba**

Studenta apliecības Nr.: kg19068

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

RĪGA 2021

ANOTĀCIJA

Pareizos kultivēšanas apstākļos, pieauguša organisma epitēlijšūnas spēj pašorganizēties un veidot organoīdus. Šādas 3D šūnu kultūras, spēj labāk atdarināt audu struktūru un funkcijas, kas piemīt attiecīgajam orgānam, paverot iespēju šajā darbā, pētīt aizkuņģa dziedzera fizioloģisku un patoloģisku procesu norisi.

Maģistra darba mērķis ir izveidot aizkuņģa dziedzera organoīda modeli, tālākai aizkuņģa dziedzera slimību izpētei.

Darba gaitā tika izveidotas Wnt3A un Rspo-1 kondicionētas barotnes, organoīdu kultūras no cilvēka aizkuņģa dziedzera normālu audu un audzēja rezekcijas pēcoperācijas materiāla. Tika izveidoti arī peļu aizkuņģa dziedzera organoīdi, veikta to fenotipiska raksturošana un kopkultūru izveides mēģinājums ar peļu nerva fibroblastu kultūru un neuroblastomas šūnu līniju SHSY5Y.

Atslēgvārdi: organoīdi, aizkuņģa dziedzeris, kopkultūras, gaismas mikroskopija, imūnfluorescence, SHSY5Y

ABSTRACT

Under the right culture conditions, adult epithelial cells are able to self-organise and form organoids. Such 3D cell cultures can better mimic the structure and function of the tissues of a given organ, making it possible, in this work, to study physiological and pathological processes in the pancreas.

The aim of this master's thesis is to develop a model of a pancreatic organoid for further study of pancreatic diseases.

In the course of this work, Wnt3A and Rspo-1 conditioned media were developed. Organoid cultures were established from normal human pancreatic tissue and post-operative tumour resection material. Mouse pancreatic organoids were also established, phenotypically characterised and co-cultured with mouse nerve fibroblast culture and neuroblastoma cell line SHSY5Y.

Keywords: organoids, pancreas, co-cultures, light microscopy, immunofluorescence, SHSY5Y

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS	8
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	10
1.1. Aizkuņģa dziedzeris, raksturojums, iespējamās slimības.....	10
1.2. Organoīdu 3D modelis, izveide un potenciāls.....	11
1.3. Aizkuņģa dziedzera 3D organoīdu modeļi no peles un cilvēka audiem.....	14
1.4. Aizkuņģa dziedzera vēzis un organoīdu 3D modelis.....	16
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	20
2.1. Wnt3A šūnu kondicionētas barotnes izveidošana.....	22
2.2. Rspo-1 šūnu kondicionētas barotnes izveidošana.....	23
2.2.1. Luciferāzes reportiera tests (<i>Top/Flash assay</i>).....	24
2.3. Peles aizkuņģa dziedzera organoīdu modeļa izveide.....	25
2.3.1. Organoīdu sasaldēšana.....	28
2.3.2. Organoīdu iezīmēšana ar antivielām.....	29
2.3.3. Organoīdu atkausēšana.....	29
2.3.4. Kopkultūru izveidošana.....	30
2.4. Organoīdu 3D modeļa izveide no cilvēka modeļa aizkuņģa dziedzera normāliem un audzēja audiem	30
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	35
3.1. Wnt3A un Rspo-1 kondicionēto barotņu pagatavošana, HEK 293 transfekcija un Wnt signāla nolasīšana	35
3.2. Peles aizkuņģa dziedzera organoīdu izveide.....	37
3.3. Peles aizkuņģa dziedzera organoīdu raksturošana un kopkultūru izveidošana ...	39
3.4. Cilvēka aizkuņģa dziedzera organoīdu izveidošana	42

SECINĀJUMI.....	44
PATEICĪBAS.....	45
IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI.....	46
DOKUMENTĀRĀ LAPA.....	50

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

BMP- kaulu morfogēnie proteīni

CDKN2A - ciklīna atkarīgās kināzes inhibitors 2A

CFTR- cistiskās fibrozes transmembrānas vadītspējas regulators

DPC4- audzēja supresora gēns 18q21 hromosomā

EGF- epidermālais augšanas faktors

FGF- fibroblastu augšanas faktors

FGF-10- fibroblastu augšanas faktors 10

G1/S - šūnu cikla posms uz robežas starp G1 fāzi, kurā šūna aug, un S fāzi, kurā notiek DNS replikācija

GATA 6- transkripcijas faktors, kas veic HCC šūnu fenotipisko pārprogrammēšanu

GTP- guanozīna-5'-trifosfāts

HEPES- cviterjonu sulfonskābes buferis (4-(2-(2-hidroksietil)-1-piperazīntetānsulfonskābe)

HGF- hepatocītu augšanas faktors

Y27632- Rho proteīnkināzes inhibitors

K19- citokeratīns-19

KRAS- gēns, kas ir daļa no RAS/MAPK signālceļa, piedalās K-Ras proteīna izveidē

Lgr5- Leicīna bagātu atkārtojumu saturošs G-proteīnu saistītais receptors 5

P38 MAPK - p38 mitogēnu aktivizētās proteīnkināzes

PCŠ- pluripotentās cilmes šūnas

PDGF- trombocītu augšanas faktors

PDX1+- aizkuņģa dziedzerā un divpadsmitpirkstu zarnas transkripcijas faktors 1

PVD- Pārtikas un veterinārais dienests

RAS - mazās guanozīna trifosfatāzes (GTPāzes), kas regulē šūnu augšanu, diferenciaciju un apoptozi.

Rspo-1- izdalīts proteīns, ko cilvēkiem kodē 1. hromosomā atrodamais Rspo1 gēns

SARS-CoV-2- smaga akūta respiratorā sindroma koronavīruss 2

SMAD4- TGF-β signāla transdukcijas mediators

TGT- transformējošais augšanas faktors

TGTβ- transformējošais augšanas faktors β

TP53- audzēja proteīns P53

Wnt- signālu pārneses ceļu grupa, kas pārraida signālus šūnā, izmantojot olbaltumvielu saistīšanos ar šūnu virsmas receptoriem

IEVADS

Aizkuņģa dziedzerim piemīt būtiska loma gastrointestinālās sistēmas normālas funkcionēšanas nodrošināšanā gan kā endokrīnam, gan eksokrīnam orgānam. Dažādu ārējo un iekšējo faktoru bojājumu rezultātā, orgāna fizioloģiskie procesi var tikt bojāti, kas var veicināt kādas slimības attīstību. Diemžēl vieni no letālākajiem un diezgan bieži sastopamiem aizkuņģa dziedzera saslimšanas veidiem ir audzēji, kuru diagnosticēšanai trūkst efektīvu metožu un ārstēšanai- efektīvu terapiju, tāpēc, kā vieni no potenciāliem izpētes modeļiem šajā sakarā var kalpot organoīdi.

Šādi modeļi var atdarināt dažādu fizioloģisko un patoloģisko procesu norisi, sniedzot iespēju pētīt orgānu attīstību, reakcijas uz ārējiem faktoriem un stresa signāliem, šūnu savstarpējo mijiedarbību kā arī dažādas slimības un to potenciālos ārstēšanas terapijas veidus. Zināmā mērā organoīdi var atdarināt orgāna audu organizāciju, un ilgstoši saglabāties ģenētiski stabili. Līdz ar to, to spēja kalpot par miniaturizētu orgāna versiju, sniedz iespēju izpētīt organismā notiekošos procesus un attīstīt dažādas pētniecību jomas, piemēram biomedicīnas - reģeneratīvajā terapijā, orgānu transplantācijā, meklējot arvien jaunus veidus organoīdu modeļa potenciāla pielietošanai.

Darba mērķis: Izveidot aizkuņģa dziedzera organoīdu modeli, tālākai aizkuņģa dziedzera slimību pētīšanai.

Darba uzdevumi:

1. Izveidot Wnt3A un Rspo-1 kondicionētas barotnes.
2. Izveidot peles aizkuņģa dziedzera organoīdu kultūras.
3. Fenotipiski raksturot peles aizkuņģa dziedzera organoīdus un izmēģināt kopkultūru izveidošanu ar peļu nerva fibroblastu kultūru un neuroblastomas šūnu līniju SHSY5Y.
4. Izveidot cilvēka aizkuņģa dziedzera organoīdu kultūras no audzēja rezekcijas pēcoperācijas materiāla.
5. Izvērtēt iegūtos rezultātus un organoīdu modeļa attīstības potenciālu tālakai pētniecībai.

Darbs sastāv no zinātniskās literatūras apskata daļas un pētījuma daļas. Zinātniskās literatūras apskata daļā, īsumā ir raksturots aizkuņģa dziedzeris un tā iespējamās slimības, organoīdu 3D modeļa izveide no cilvēka un peles audiem, to pielietojums, kā arī organoīdu modeļa potenciāls aizkuņģa dziedzera vēža gadījumā.

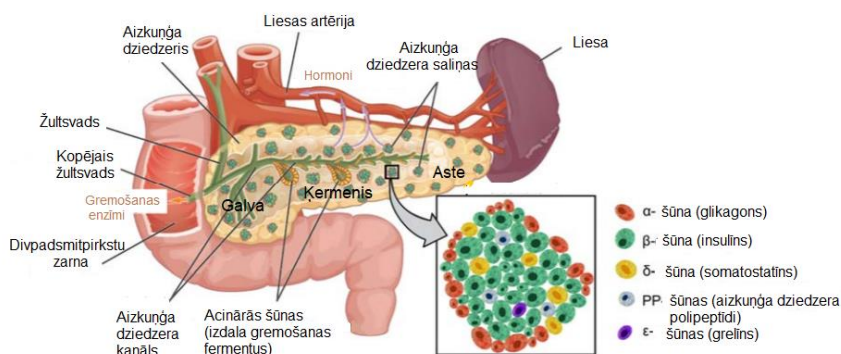
Pētījuma daļā tiek izveidotas Wnt3A un Rspo-1 kondicionētas barotnes, organoīdu kultūras no cilvēka aizkuņģa dziedzera normālu audu un audzēja rezekcijas pēcoperācijas materiāla, izveidoti arī peļu aizkuņģa dziedzera organoīdi, veikta to fenotipiska raksturošana un kopkultūru izveides mēģinājums ar peļu nerva fibroblastu kultūru un neuroblastomas šūnu līniju SHSY5Y.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Aizkuņģa dziedzeris, raksturojums, iespējamās slimības

Aizkuņģa dziedzeris ir daļa no gastrointestinālās sistēmas, kas sekretē un izdala gremošanas fermentus (šķeļ olbaltumvielas, ogļhidrātus un taukus) divpadsmitpirkstu zarnā kā eksokrīnais orgāns un kā endokrīnais orgāns producē un izdala asinīs hormonus. Eksokrīnā daļa, kurā ietilpst acinārās un duktālās šūnas ar saistītajiem saistaudiem, asinsvadiem un nerviem veido vairāk nekā 95% aizkuņģa dziedzera masas, kamēr endokrīnā daļa kurā ietilpst neuroendokrīnās jeb Langerhansa saliņu šūnas, veido tikai 1-2% aizkuņģa dziedzera masas (1,2). Acinārās šūnas ražo un izdala dažādus proenzīmus jeb neaktīvus fermentu prekursorus, kas tiek transportēti pa aizkuņģa dziedzera kanāliņu sistēmu uz divpadsmitpirkstu zarnu, kur tie veicina barības vielu gremošanu, savukārt endokrīnās šūnas apvienojoties Langerhansa saliņās, veido α -šūnas, β -šūnas, δ -šūnas un aizkuņģa dziedzera polipeptīdu (PP) šūnas, kas attiecīgi ražo glikagonu, insulīnu, somatostatīnu un aizkuņģa dziedzera polipeptīdus, regulējot glikozes līmeni asinīs un veicinot enerģijas vielmaiņu. Embrionālajā periodā attīstās arī greļina šūnas (ϵ šūnas), izdalot hormonu greļīnu (regulē izsalkuma sajūtu) (3,4). Gan endokrīnās, gan eksokrīnās šūnas rodas no ventrālās un dorzālās PDX1+ priekšējās zarnas endodermas, kas saplūstot veido aizkuņģa dziedzera anatomisko izskatu (1).

Anatomiski aizkuņģa dziedzeris (1.1.1. attēls) ir raksturojams ar trīs galvenajām daļām- galvas, ķermeņa un astes daļu, kuru atrašanās vietas un šūnu sastāvs ir pamats gan orgāna normālu funkciju veikšanai, gan dažādu nozīmīgu slimību attīstībai (1,5).



1.1.1. att. Aizkuņģa dziedzera anatomiskā uzbūve un sastopamie šūnu veidi. Attēls ir pielāgots no avota (Mühlemann M., 2018) (6)

Aizkuņģa dziedzeris, tāpat kā citi orgāni, ir pakļauts dažādu iekšējo un ārējo faktoru ietekmei, kas var izjaukt normālu šūnu un orgāna iekšējās vides homeostāzi, sekmējot dažādu saslimšanu un patoloģisku procesu attīstību. Tas var būt saistīts gan ar ģenētisko iedzimtību un atsevišķu gēnu mutācijām, gan ar ārējo vides faktoru izraisītām izmaiņām laika gaitā. Biežākā sastopamā saslimšana ir 1.tipa (autoimūni tiek iznīcinātas aizkuņģa dziedzera endokrīnās β šūnas) un 2.tipa (rezistence pret insulīnu vai β šūnu samazināta insulīna sekrēcija (7)) cukura diabēts (8). Otra biežākā aizkuņģa dziedzera saslimšana ir akūts vai hronisks pankreatīts, kas raksturojas ar iekaisuma procesu, ko visbiežāk izraisa žultsakmeņi vai pārmērīga alkohola lietošana (9). Eksokrīnā aizkuņģa dziedzera nepietiekamība jeb eksokrīno aizkuņģa dziedzera enzīmu trūkums, izraisa malabsorbciju, kam par iemeslu kalpo parasti jau pamatā esoša slimība, piemēram hronisks pankreatīts vai cistiskā fibroze (10). Pie iedzimtām saslimšanām pieder cistiskā fibroze, kam ir raksturīga CFTR gēna mutācija, kas ekspresējas epitēlija šūnās, tajā skaitā arī aizkuņģa dziedzera (11) un *Pancreatic divisum* iedzimta anomālija, kur neizveidojas viens aizkuņģa dziedzera kanāls, bet saglabājas divi un tā ir reti sastopama, apmēram 4-14% populācijas (5,12). Viena no letālākajām saslimšanām ir aizkuņģa dziedzera audzēji, no kuriem sastopamākā ir aizkuņģa dziedzera duktāla adenokarcinoma, apmēram 90% gadījumu (13).

Lai labāk varētu izprast aizkuņģa dziedzera gan normālu, gan patoloģisku procesu norisi var tikt pielietoti vairāki pētniecības modeļi, daži no tiem ietver- zemādas ksenotransplantāta (audu fragmenti tiek implantēti zemādā), ortotopiskos ksenotransplantāta (izmanto orgānā pārstādītus audus.), ģenētiski modificētus (visbiežāk audzēja) modeļus (14) un uz šūnu līnijām balstītas *in vitro* modeļu sistēmas (15), kā arī organoīdu 3D modeļu tehnoloģiju (3). Pētījumos visbiežāk pielieto peles, kāmjū, žurku, cūku, suņu, (16), zebas zivs (anatomiski optiska skaidrība ļauj vizuāli identificēt mutācijas, kas ietekmē morfoloģiju un funkcijas (17)) u.c. dzīvnieku modeļus.

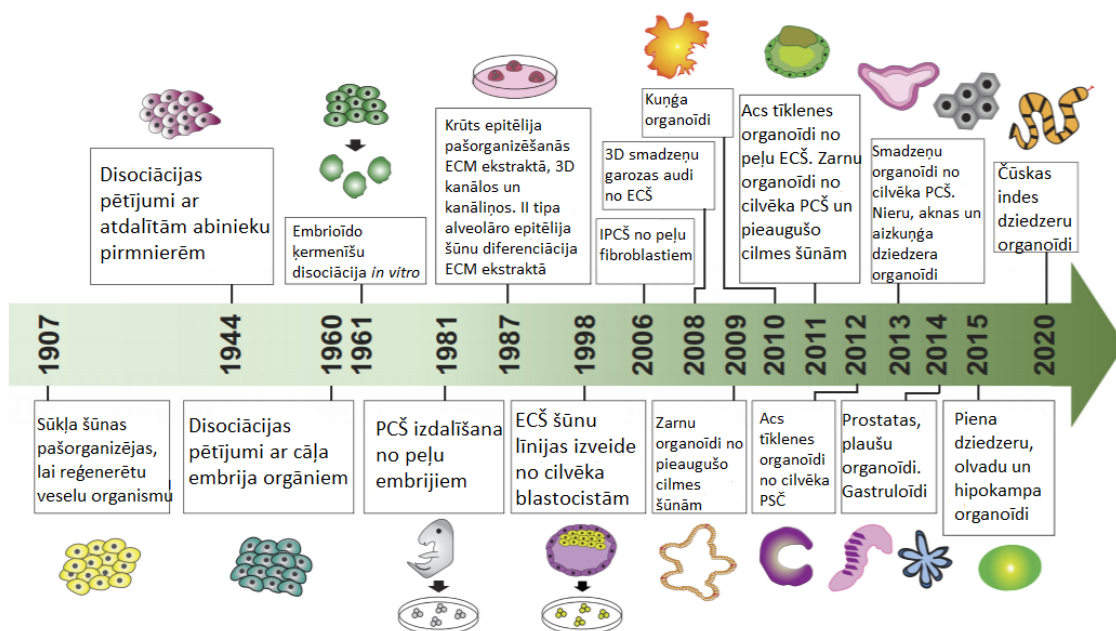
1.2. Organoīdu 3D modelis, izveide un potenciāls

Cilvēka organisms satur vairāku dažādu audu specifiskas pieaugušo cilmes šūnu populācijas. Šīs šūnas spēj pašatjaunoties un radīt visus šūnu tipus attiecīgajā orgānā, tādējādi tām ir būtiska loma audu homeostāzē un atjaunošanās procesā. Pateicoties organoīdu 3D modeļa attīstībai ir kļuvis iespējams kultivēt pieaugušo cilmes šūnas *in vitro* un audzējot tās noteiktos apstākļos, radīt

to orgānu miniaturizētas versijas, kuros tās kādreiz atradās. Šie cilmes šūnu organoīdi satur daudzus šūnu tipus, kas ir orgānā no kura tie ir iegūti un, tie var zināmā mērā atdarināt tā telpisko organizāciju, izskatu un ilgstoši saglabājas ģenētiski stabili (18).

Attēlojot mikroskopiskā līmenī, organoīds ir miniaturizēta apaļas vai cistiskas formas struktūra, kas izveidojusies *in vitro* trīsdimensiju kultūrā. Tos var iegūt no vienas vai dažādām audu šūnām, embrionālām cilmes šūnām (ECŠ), inducētām pluripotentām cilmes šūnām (IPCŠ) vai pieaugušo cilmes šūnām (PCŠ), kas pareizi nodrošinātos apstākļos var pašorganizēties kultūrās, pateicoties to pašatjaunošanās un diferenciacijas spējām (19,20). Organoīds spēj atdarināt struktūru un funkcijas, kas piemīt attiecīgajam orgānam, no kura šis modelis ir izveidots, paverot plašas iespējas dažādu zinātņu nozaru pētniecībā (20). Tie spēj ne tikai attainot konkrētus cilvēka orgānu attīstības mehānismus, bet arī atklāt dzīvnieka modeļu saglabātās iezīmes un galvenās atšķirības procesu norisēs (3).

Organoīdu modelis jau izsenis ir bijis potenciāls izpētes objekts, ko jau vēsturiski nejaušā kārtā ir izdevies atklāt, izveidot un pilnveidot līdz tādai metodei kādu to var pazīt šodien. Organoīdu pētījumu pirmsākumi (1.2.1. attēls) ir meklējami 1907.gadā, kad Harijs Van Peters Vilsons aprakstīja pirmo organismu reģenerācijas *in vitro* mēģinājumu, novērojot, ka sūkļu šūnas spēja pašorganizēties un izveidot veselu organismu. Nozīmīgāko pavērsienu organoīdu izveidē un izpētē izpelnījās cilmes šūnu pētniecības sākums, kad no peļu embrijiem pirmo reizi tika izolētas un izveidotas pluripotentās cilmes šūnas (19).



1.2.1. att. Organoīdu modeļa pētniecības attīstība dažādos laika posmos (19)

Balstoties uz atziņām par orgānu attīstību un atjaunošanu, kā arī par vēža gadījumos mutētajiem signālu ceļiem, līdzīgas ilgtermiņa pieaugušo cilmes šūnu radītas organoīdu kultūras vēlāk tika izveidotas daudziem citiem orgāniem. To vidū ir peļu un cilvēku smadzeņu, acs tīklenes, vairogdziedzera, piena dziedzeru, aknas, aizkuņģa dziedzera, kuņģa, zarnu, olvadu, endometrija, urīnpūšļa, prostatas, nieru, plaušu, asinsvadu, garšas kārpiņu un siekalu dziedzeru organoīdi (18,20). Svarīgi, ka organoīdu tehnoloģija ir universāla: kultūras var sākt audzēt no nelieliem audu paraugiem, kas tiek iegūti biopsijas vai ķirurģiskā ceļā, tos var izveidot gan no pacienta normālajiem audiem, gan no dažādu audzēju veidiem un nav nepieciešama cilmes šūnu attīrīšana (18,21).

Visos gadījumos organoīdu veidošanās process ietver trīs būtiskus posmus. Pirmkārt, tiek aktivizēti vai inhibēti galvenie signalizācijas ceļi, kas regulē modeļa attīstības veidošanos (izmantojot komerciāli pieejamus morfogēnus un signalizācijas inhibitorus, aizkuņģa dziedzera gadījumā tiek inhibēti TGF, BMP un aktivēti Wnt, EGF, FGF), lai cilmes šūnu diferenciācijas laikā izveidotos pareiza struktūra. Otrkārt, tiek izveidotas barotnes, kas organoīdā ļauj pareizi diferencēt vēlamos šūnu veidus. Visbeidzot, kultūras audzē tā, lai tās varētu paplašināt trīs dimensijās, ko panāk, vai nu apvienojot šūnas 3D struktūrās, vai iestrādājot kultūras 3D matricā -specifiskā gelā (20).

Spēja audzēt organoīdus no pacienta iegūtiem veseliem vai slimiem audiem, ļauj pētīt orgānu attīstību, audu homeostāzi un reakcijas uz ārējiem faktoriem, stresa signāliem, šūnu savstarpējo mijiedarbību kā arī dažādas slimības un to potenciālos ārstēšanas terapijas veidus (18).

Slimību modelēšana sniedz iespēju izprast slimību procesus, piemēram, infekcijas slimības, vīrusus, iedzimtus ģenētiskus traucējumus, vēža mehānismus, izmantojot dažādas laboratorijas metodes, skrīninga analīzes. Infekciju slimību izpētē no pieaugušām cilmes šūnām iegūti kuņģa organoīdi ir sekmējuši *Helicobacter pylori* izpēti. Organoīdu un baktēriju kopkultūras pieaugušo cilmes šūnu organoīdos ir izmantotas arī vīrusu infekciju modelēšanai- peļu un cilvēku zarnu organoīdos tika modelēta rotavīrusu infekcija un pretvīrusu terapija. Vēl viens spilgts organoīdu un vīrusu kopkultūras piemērs ir IPCŠ radītu smadzeņu organoīdu izmantošana, lai pētītu Zikas vīrusa (ZIKV) infekcijas ietekmi uz smadzeņu attīstību (18). Organoīdu modelis ir bijis noderīgs arī SARS-CoV-2 izpētes procesā. Vairākas pētnieku grupas ir veiksmīgi pierādījušas, ka SARS-CoV-2 var inficēt un pavairoties primārajos cilvēka organoīdos, kas iegūti no aknas un zarnām, kā arī no pluripotentām cilmes šūnām iegūtos organoīdos, modelējot asinsvadus, aknu un nieres. SARS-CoV-2 iekļūšanai saimnieka šūnās izmanto to pašu olbaltumvielu - vīrusa receptoru

angiotenzīnu konvertējošo enzīmu 2 (AKE2), ko SARS-CoV vīruss. AKE2 ir izteikts vairākos audos un šūnu tipos, kas ļauj vīrusam inficēt ne tikai plaušu, bet arī citus audus. Šī vīrusa spēja inficēt dažādus orgānus tika modelēta ar cilvēka organoīdiem (20,22).

Biobankas izveide sniedz iespēju glabāt izveidoto organoīdu paraugus kā resursu turpmākajiem pētījumiem, īpaši audzēju gadījumos biobankas ir ļoti daudzsološas, lai atklātu likumsakarības, kas nosaka audzēja ģenētikas korelāciju ar atbildes reakciju uz zālēm (19).

Mērķētu zāļu terapiju izstādei, no pacientiem iegūtos organoīdus var izmantot, lai prognozētu reakciju uz zālēm un kā resursus reģeneratīvajai medicīnai apvienojumā ar gēnu inženieriju (20,23).

Reģeneratīvā terapijā organoīdi potenciāli varētu kalpot kā neierobežots avots bojātu audu aizstāšanai. Tas var papildināt donoru orgānu izmantošanu, novēršot imūnreakcijas rašanos pēc transplantācijas, ja tiek izmantoti organoīdi, kas iegūti no veseliem tā paša cilvēka audiem. Šādi pētījumi jau ir sekmīgi veikti peļu modeļos- peļu resnās zarnas organoīdi, kas *in vitro* paplašināti no vienas cilmes šūnas, pēc transplantācijas vairākās bojātās peļu resnās zarnās var ieaugt un attīstīties par funkcionālām kriptām. Zīmīgi, ka transplantētajām pelēm pilnībā atjaunojās epitēlija barjeras funkcija. Līdzīgi rezultāti tika iegūti, izmantojot no pieaugušo cilmes šūnām iegūtus vai no embrija priekštečšūnām iegūtus tievo zarnu organoīdus (18,24).

Nākotnes iespējas paredz, ka kombinatoriāli CRISPR modificēti cilvēka organoīdi varētu kalpot kā vērtīgs, augstas veiktspējas rīks, lai novērtētu potenciāli onkogēnas mutācijas, kas novērotas genoma sekvenēšanā, izmantojot, piemēram, Vēža genoma atlantu (*The Cancer Genome Atlas (TCGA)*) un Starptautisko vēža genoma konsorciju (*International Cancer Genome Consortium (ICGC)*) (18).

1.3. Aizkuņģa dziedzera 3D organoīdu modeļi no peles un cilvēka audiem

Aizkuņģa dziedzera organoīdu izveidošanu var veikt gan no peles, gan cilvēka audu vai cilmes šūnu materiāliem. Vairumā gadījumu vispirms tika izveidota peles organoīdu kultūru sistēma un pēc tam tika pielāgota cilvēka šūnām. Līdzīgi tika iegūti arī peļu aizkuņģa dziedzera duktālu šūnu organoīdi no epitēliālo cilmes šūnu marķiera Lgr5 pozitīvām priekštečšūnām (25). Peles modeļa anatomiskā aizkuņģa dziedzera uzbūve un struktūra mazliet atšķiras no cilvēka

modeļa, tāpēc ir svarīgi izprast to anatomiskās atšķirības, lai varētu gūt pietiekamu priekšstatu par notiekošajiem procesiem pētāmajā orgānā. Atšķirības starp grauzēju un cilvēku modeļiem ir gan agrīnā (embrionālā) aizkuņģa dziedzera attīstībā, gan orgānu morfoloģijā, endokrīno šūnu savstarpējās attiecībās, salīņu šūnu sastāvā, struktūrā un fizioloģijā. Piemēram peļu modelī aizkuņģa dziedzeris ir salīdzinoši kompakts liesas segmentā, bet divpadsmitpirkstu zarnas segments ir izkļaidēts mezentērijā (vēdera plēves daļā) (18).

Aizkuņģa dziedzera organoīdi sastāv no dukstālām (SOX9+, KRT19+) šūnām, kas ekspresē embrionālo priekštečšūnu marķieri PDX1. Lai izveidotu atbilstošus organoīdu augšanas apstākļus, svarīgi ir apzināt signālceļu procesus, kas veido audiem un orgānam specifisku vidi. Aizkuņģa dziedzera gadījumā augšanai svarīgi faktori ir FGF, HGF, Wnt, BMP, RA un TGF β , kas veicina priekštečšūnu proliferāciju, migrāciju un izdzīvošanu (26).

Pirmo aizkuņģa dziedzera organoīdu no peles modeļa izveidoja Huch *et.al.*, izpētot cilmes šūnu marķiera Lrg5 ekspresijas un Wnt signālceļa nozīmi aizkuņģa dziedzera organoīdu izveides procesā. Daļēja dukstālā kanāla nosprostošana (ligatūras) bojājuma rezultātā Wnt signālceļš tiek spēcīgi aktivēts un tiek novērota Lrg5 ekspresijas parādīšanās. *In vitro* peļu šūnās novēroja, ka *R-Spondin-1* (Rspo-1) augšanas faktora klātbūtnē, aizkuņģa dziedzera kanāliņu fragmenti sāk ekspresēt Lrg5 un attīstās par cistām līdzīgiem veidojumiem (organoīdiem). Atsevišķi izolētas dukstālās šūnas var kultivēt arī kā aizkuņģa dziedzera šūnu organoīdus, kas satur Lrg5 priekštečšūnu šūnas ar paplašināšanās (klonēšanas) potenciālu. Klonētos aizkuņģa dziedzera organoīdus var inducēt, lai tie diferencētos kā kanāla, tā arī endokrīnās šūnas, piemēram pēc transplantācijas, tādējādi pierādot to biopotenciālismu (25), šajā sakarā Loomans *et. al.*, izdevās transplantēt imūndeficītu izraisītām pelēm, no cilvēka aizkuņģa dziedzera izveidotus organoīdus, kas pēc 1 mēneša deva insulīna ražojošas šūnas, kā arī insulīnpozitīvo šūnu skaits pēc transplantācijas, salīdzinot ar sākotnējo šūnu populāciju bija palielinājies (27).

Lai sekmīgi izveidotu aizkuņģa dziedzera dukstālo šūnu organoīdus, tiem ir nepieciešama dažādu faktoru, piemēram – EGF, Rspo-1, FGF10 un Noggin10 klātbūtnē, kā arī ekstracelulāras matricas gels, piemēram Matrigel vai BME-2 (26). Optimālai barotnei būtu jāsaturs iepriekšminētās vielas, kam pievienots Forskolīns (FSK) un Prostglandīns E2 (PGE2) ar paaugstinātu Rspo-1 koncentrāciju (nepieciešams Wnt signālceļa bloķēšanai (25)) (28). Papildu komponenti, kas bieži nepieciešami cilvēka kultūru augšanai, salīdzinot ar peļu kultūrām, ir TGF β ceļa inhibitors (piemēram, A83-01) un p38 MAPK inhibitors (piemēram, SB202190). Tāpat kā peļu organoīdus, arī cilvēka organoīdus var iegūt no minimāla audu biopsijas daudzuma (optimālā gadījumā vismaz

1cm³, kas jāuzglabā aukstā vidē +4°C) un tos var kultivēt neierobežotu laiku, tādējādi veidojot pamatu dzīvu biobanku veidošanai, kas ir svarīgs resurss biomedicīnas pētniecībā (20). Pareizi nodrošinātas barotnes apstākļos aizkuņģa dziedzera kanāla šūnas regulē cilmes šūnu marķieri Lgr5 (Rspo-1 receptoru) un atjaunojas, vienlaikus saglabājot savu ģenētisko stabilitāti (25).

Kultivējot organoīdus, var ņemt vērā vairākus raksturlielumus, piemēram, koloniju veidošanās efektivitāti (organoīdu skaits), organoīda lielumu, šūnu proliferācijas ātrumu, organoīda morfoloģiju un gēnu ekspresiju (28).

Iegūtos organoīdus tālāk var izmantot histoloģiskās analīzēs, fiksējot ar 4% paraformaldehīdu un iezīmējot ar antivielām (28). Ar plūsmas citometriju, gēnu ekspresijas analīzi, pārstādot dzīvniekos var analizēt organoīdu šūnu sastāvu un funkcionalitāti (29).

1.4. Aizkuņģa dziedzera vēzis un organoīdu 3D modelis

Dažādu ārējo faktoru un ģenētisko mutāciju mijiedarbību rezultātā, tiek izjaukta normāla šūnu darbība, kas var veicināt audzēju attīstību.

Aizkuņģa dziedzera duktāla adenokarcinoma (*Pancreatic ductal cell adenocarcinoma PDAC*) ir viens no agresīvākajiem un nāvējošākajiem ļaundabīgajiem audzējiem, kas slikti padodas tradicionālajiem ārstēšanas veidiem kā ķirurģija, radiācija un ķīmijterapija. Gandrīz visos gadījumos audzēja iznākums ir letāls, jo trūkst agrīnas diagnostikas iespējas un iespējami pozitīva atbildes reakcija uz ārstēšanas terapijām, kuru efektivitāte ir ierobežota dēļ plašo ģenētisko mutāciju esamības. Ārstēšana un imūnterapijas pielietošana ir izaicinoša, jo šāda veida audzējam piemīt neimunogēna, imūnsupresīva un terapijai izturīga mikrovide. Vidējais dzīvildzes rādītājs piecu gadu laikā ir mazāks par 10%, savukārt metastātiskā vēža gadījumā mazāk nekā 20% pacientu izdzīvo pēc pirmā gada beigām (30).

Aizkuņģa dziedzera neoplazmas tiek iedalītas pēc to histoloģiskās diferenciacijas kā epitēlijveida (eksokrīni, endokrīni) vai neepitēlijveida audzēji duktālo, acināro vai neuroendokrīno šūnu (13). Adenokarcinoma pieder pie eksokrīnajiem audzējiem un tā ir visbiežāk sastopamā aizkuņģa dziedzera vēža forma 90% gadījumu (13). Pārējie ļaundabīgie biežāk sastopamie aizkuņģa dziedzera audzēji ir neuroendokrīnie audzēji, kas attīstās no hormonālām un nervu sistēmas šūnām un tiek dēvētas arī kā "saliņu šūnu karcinomas", veidojot aptuveni 5% no visiem gadījumiem. Kā

piemērus var minēt aizkuņģa dziedzera neuroendokrīnos audzējus (*Pancreatic neuroendocrine tumors- PanNET*)- insulinomu, gastrinomu, somatostatīnomu, u.c. (31), aizkuņģa dziedzera neuroendokrīno karcinomu (*Pancreatic neuroendocrine carcinoma- PanNEC*), kā arī iedzimtos un sporādiska rakstura audzējus. 1-2% sastāda acināro šūnu audzēji- aizkuņģa dziedzera acināro šūnu karcinoma (*Pancreatic acinar cell carcinoma- PACC*), pseidopapilārā neoplazma (*Solid-Pseudopapillary Neoplasm*). Pankreatoblastoma ir biežāk sastopama pediātriskajā populācijā, kas ir 25% gadījumā, savukārt pieaugušo populācijā sastopamība ir zema- mazāk par 1% (2). Visbiežāk PDAC attīstās proksimālajā jeb aizkuņģa dziedzera galvas daļā, retāk- ķermeņa vai astes daļā (13).

Audzēja etioloģija ir sarežģīta, tās pamatā ir mijiedarbība starp ģenētisko mutāciju un ārējo vides faktoru iedarbību, piemēram saskarsme ar toksiskām vielām, kas izraisa DNS bojājumus- tabakas smēķēšana, alkohols, saskarsme ar ķīmiskām vielām, kā arī hronisku pamatslimību attīstība- hronisks pankreatīts, prediabēta stāvoklis un citi modificējami apstākļi (32). Šo dažādo apstākļu ietekmē veidojas dažādi gļotādas un duktālo kanālu bojājumi, trīs no tiem ir agrāk identificēti kā intraduktālās papilārās gļotādas jaunveidojumi (*Intraductal papillary mucinous neoplasms-IPMN*), gļotādas cistiskie jaunveidojumi (*Pancreatic mucinous cystic neoplasm -MCN*) un aizkuņģa dziedzera intraepiteliālā neoplāzija (*Pancreatic intraepithelial neoplasia-PanIN*) un tie ir invazīva vēža priekšvēstneši (2).

Mikroskopiski PDAC struktūra sastāv no atipiskiem, neviendabīgiem cauruļveida dziedzeriem, kas atgādina vidēja lieluma vai mazākus aizkuņģa dziedzera kanālus un var ietvert necauruļveida komponentus, piemēram, gaiššūnu (*clear-cell*), kribriformas (*cribriform*) vai giriformas (*gyriform*) komponentus (13). Audzēja neregulārie dziedzeri bieži ir ieslēgti izteiktā desmoplastiskā stromā, kas sastāv no stromālajām šūnām, iekaisuma šūnām un ekstracelulārās matricas proteīniem, veicinot šī audzēja agresīvo bioloģisko uzvedību (13).

Histoloģiski PDAC ir raksturīga ievērojama desmoplāzija (saistaudu veidošanās un proliferācija), kuru veido 10-30% vēža šūnas un 80% ekstracelulārās matricas (*ECM*) proteīni, miofibroblastiskās aizkuņģa dziedzera zvaigžņveida šūnas (*myofibroblastic pancreatic stellate cells*) un imūnās šūnas (31), izveidojot blīvu saistaudu stromu, kam ir būtiska nozīme audzēja veidošanās, progresēšanas, invāzijas un metastāžu veidošanās procesā. Tā īpatnējā spēja ir veicināt imunosupresīvas audzēja mikrovides veidošanos, kas ierobežo pretvēža terapiju efektivitāti un samazina audzēja veiksmīgas ārstēšanas iespējas (2).

Zvaigžņveida šūnām (*myofibroblastic pancreatic stellate cells*) ir liela loma ECM olbaltumvielu, citokīnu un augšanas faktoru ražošanā, veicinot labvēlīgu vidi vēža šūnu augšanai.

Tās aktivizē transformējošo augšanas faktoru $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), fibroblastu augšanas faktoru (FGF), trombocītu izcelsmes augšanas faktoru (PDGF) un diferencējas par miofibroblastiem, kas aktīvi izdala kolagēnu un citas ekstracelulārās matricas sastāvdaļas (2). ECM olbaltumvielu (tostarp I un V tipa kolagēna, fibronektīna un hialuronskābes (2)) pieaugums un desmoplāziski sekretēto augšanas faktoru savstarpējā mijiedarbība ar PDAC vēža šūnām, aktivizē intracelulārus signālus, kas padara vēža šūnas izturīgas pret bojāeju. Ar vēzi saistītie fibroblasti (*CAF- Cancer-associated fibroblasts/ PSCs-pancreatic stellate cells*) un aizkuņģa dziedzera duktālās šūnas kopā regulē ECM izgulsnēšanos, angiogēnēzi un traucētu imūnās uzraudzības procesu (33,34). Aizkuņģa dziedzera zvaigžņveida šūnām ir arī būtiska loma kā aizkuņģa dziedzera audzēja metabolisma modifikatoriem, izdalot neesenciālās aminoskābes un jo īpaši alanīnu, kas samazina audzēja atkarību no glikozes un no seruma iegūtām barības vielām (2).

Iespējamais mehānisms, kā desmoplāzija veicina PDAC, ir no stromas nākošo ECM proteīnu un augšanas faktoru tieša iedarbība uz vēža šūnām. Gan ECM proteīni (piemēram, laminīns un fibronektīns), gan augšanas faktori (piemēram, insulīnam līdzīgais augšanas faktors-1) veicina aizkuņģa dziedzera vēža šūnu izdzīvošanu un novērš to nāvi. Laminīna un fibronektīna iedarbību izraisa to mijiedarbība ar vēža šūnu integrīnu receptoriem. Saistoties ar ECM olbaltumvielām, integrīnu receptori transaktivē galveno augšanas faktora receptoru (insulīnam līdzīgā augšanas faktora-1 receptoru), kas mediē intracelulāros notikumus, kuri veicina vēža šūnu izdzīvošanu un augšanu (33).

Visbiežāk mutētie gēni ir KRAS (90%), CDKN2A (p16, 90%), TP53(70%), SMAD4/DPC4 (55%) Lielākā daļa PDAC gadījumu ir sporādiski, un nav zināma ģenētiska predispozīcija (32). Jones *et.al.* 2008. gadā ziņoja par pilnīgu aizkuņģa dziedzera vēža eksoma analīzi: aizkuņģa dziedzera adenokarcinomām tika sekvencēti > 29 000 gēnu kodējošie reģioni, atklājot vidēji 63 genoma izmaiņas, lielākoties punktveida mutācijas (izmaiņas vienā nukleotīdā, kas izmaina kodonu). No tiem nozīmīgākie bija KRAS signalizācija, G1/S šūnu cikla pārejas regulācija, TGF- β signalizācija, integrīnu signalizācija, šūnu invāzijas regulācija, un GTPāzes atkarīgā signalizācija (2,34). Mutēta KRAS gēna transkripcija, aktivizē RAS proteīna (kodē RAS gēnu, kas atbild par šūnu augšanas un diferenciacijas signālu pānesi GTP (35)) veidošanos, aktivizējot proliferācijas un izdzīvošanas ceļus. SMAD4 mutācijas gadījumā ir novērojama sliktāka audzēja prognoze un lielāka metastazēšanās iespēja (26).

Organoīdi, kas ir izveidoti un iegūti no pacienta audzēja audiem biopsijas vai ķirurģiskas operācijas ceļā, spēj precīzi atveidot sākotnējā audzēja struktūru, transkriptomu un mutāciju īpašības,

individuāli katra pacienta materiālam (26), kas var nodrošināt precīzi mērķētās terapijas iespējamo pozitīvo efektu un dzīvildzes pagarinājumu konkrēta vēža tipa gadījumā, piemeklējot efektīvāko medikamentu vai ārstēšanas veidu, sākumā to pārbaudot 3D organoīda modelī (21).

Else Driehuis *et.al.*, aprakstīja organoīdu aizkuņģa dziedzera tehnoloģijas potenciālu, balstoties uz organoīdu biobankas pielietošanu. Izveidotie organoīdi un atbilstošie primārie audi tika histoloģiski novērtēti un salīdzināti pēc molekulārajām īpašībām un pēc ģenētiskās raksturošanas tie tika pakļauti dažādu terapeitisko līdzekļu iedarbībai, meklējot kopsakarības, kas efektīvi iznīcinātu aizkuņģa dziedzera audzēja šūnas. Tika konstatēts, ka SMAD4 ekspresija organoīdos nav nosakāma ar imūnhistoķīmijas metodi, kas iespējams, ir saistīts ar BMP/TGF β inhibējošo vielu Noggin un A83-01 klātbūtni organoīdu vidē no kā varēja secināt, ka barotnes sastāvs var ietekmēt šūnu uzvedību, tāpēc tā izvēle ir ļoti būtiska (21).

Seino *et al.*, 2018 gadā aprakstīja Wnt signālceļa aktivācijas nozīmi organoīdu kultūrā, uzsverot Wnt un R-spondīna nozīmīgumu. Wnt signālceļa gēni PDAC bija reti mutēti, bet to mutācijas varētu kalpot kā audzēja supresori aizkuņģa dziedzerī, ņemot vērā to, ka β -katenīna mutācijas aizkavēja KRAS mediētu aizkuņģa dziedzera audzēju attīstību ģenētiskā peles modelī. PDAC organoīdu transkriptomu analīze atklāja gēnu ekspresijas pazīmes, kas saistīja Wnt nišas apakštīpus ar GATA6 atkarīgiem gēnu ekspresijas apakštīpiem. Turklāt uz CRISPR-Cas9 balstīta PDAC vadošo gēnu (KRAS, CDKN2A, SMAD4 un TP53) genoma rediģēšana parādīja, ka aizkuņģa dziedzera audzēju veidošanās laikā Wnt nav ģenētiska rakstura (36).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

Cilvēka audu materiāla fragments tika iegūts no audzēja rezekcijas pēcoperācijas materiāla sadarbībā ar Paula Stradiņa Klīniskās universitātes (PSKUS) ārstiem un atbilstoši PSKUS ētikas atļaujai. Peļu audu paraugi tika iegūti sadarbībā ar LU MF farmakoloģijas katedras laboratoriju. Darbā tiek izmantoti peļu tēviņu (18-21.g. šķirne- C57BL/6NHsd, LR PVD izmēģinājuma dzīvnieku ētikas atļauja Nr.100) aizkuņģa dziedzeru audi.

Maģistra darba pētījuma daļa tika izstrādāta LU Zinātņu mājas MF 432. laboratorijā.

Sterili laboratorijas materiāli, kas nepieciešami darba izstrādei: adherento šūnu kultivēšanas plates (24, 96 lauciņu), suspensijas šūnu kultivēšanas plates (24 lauciņu); 15ml centrifugēšanas stobriņi; 50ml koniskie stobriņi; seroloģiskās pipetes (5,10,25ml); šūnu kultivēšanas flakoni (T25, T75, T125, T500), Ependorfa stobriņi 1,5 un 2 ml; pipešu uzgaļi 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl; saldēšanas stobriņi (viss no Sarstedt); 500ml filtrkausiņi SteriCup (Merck). Saldēšanas kamera (Nalgene); *Parafilm* plēve (Sigma-Aldrich); priekšmetstikliņi un segstikliņi (ThermoFisher); folijs; DakoPen pildspalva (Agilent);

Darbā izmantotās iekārtas: digitālais invertētais gaismas mikroskops (AMG-Evos XL); šūnu CO₂ inkubators (Mettler); laminārās plūsmas skapis, centrifūga (Biosan); ūdens vanna (Stuart SBS40); šūnu skaitīšanas ierīce (LUNA-II); horizontālais kratītājs ar termostatu (Biosan); elektroniskie svāri (Radwag); mikroplašu lasītājs (Infinity M200 Pro); kriotoms (Leica CM1850); konfokālais mikroskops (Nikon C2).

Darbā izmantotās šūnu līnijas priekš kultivēšanas ir aplūkojamas 2.1. tabulā. Vielas, reaģenti un šūnu iezīmēšanas marķieri, alfabētiskā secībā, ir apkopoti 2.2. tabulā. Barotņu receptes organoīdu izveidošanai un kultivēšanai ir uzskaitītas katrā attiecīgajā apakšnodaļā.

2.1.tabula

Darbā izmantotās šūnu kultūras

Šūnu līnija	Ražotājs, kataloga numurs
L-Wnt-3A (ATCC [®] CRL-2647 [™])	ATCC, kat.nr. CRL-2647
Cultrex HA-R-Spondin1-Fc 293T Cells	Culturex, kat.nr. 3710-001-01
293 [HEK-293] (ATCC [®] CRL-1573 [™])	ATCC, kat.nr. CRL-157
SHSY-5Y	ATCC, kat.nr. CRL-2266

Vielas, antivielas, plazmīdas un šūnu kultivēšanas reaģenti, kas nepieciešami šūnu kultivēšanai un darba izstrādei

Vielas	Ražotājs, kataloga numurs
A83	Tocris Bioscience, kat.nr. 2939/10
B27	Gibco, kat.nr.12587010
BSA - liellopu seruma albumīns (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	Sigma-Aldrich, kat.nr.A9576-50ML
BME-2 - samazinātas koncentrācijas augšanas faktoru bazālās membrānas matrikss (<i>Culturex, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix Type 2</i>)	R&D Systems, kat.nr. 3533-005-02
Dispāze II proteāze	Sigma-Aldrich, kat.nr. D4693-1G
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich, kat.nr. D0822-500ML
Dimetilsulfoksīds (DMSO)	Sigma-Aldrich, kat.nr. 472301
<i>Dnase I</i>	Sigma-Aldrich, kat.nr. 11284932001
Dual-Glo®	Promega, kat.nr. E2920
EGF	Gibco, kat.nr. PHG0313
Fetālais teļa serums (<i>Fetal bovine serum- FBS</i>)	Gibco, kat.nr.16141079
FGF10	PeproTech, kat.nr. 100-26
Formaldahīds 35%	Sigma-Aldrich, kat.nr. 15513
Forskolīns	Sigma-Aldrich, kat.nr. 1099/10
Fosfātu sāļu šķīdums (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>) PBS	Sigma-Aldrich, kat.nr. D8537-1L
G-418	Sigma-Aldrich, kat.nr. A1720-1G
Glicerīns (100%)	Sigma-Aldrich, kat.nr. G9012
GlutaMAX (200mM)	Gibco, kat.nr. 35050061
HEPES	Sigma-Aldrich, kat.nr. H4034-25G
Hoechst 33342 (20mM)	Thermo Scientific, kat.nr. 62249
Invitrogen Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 555	Thermo Fisher, kat.nr. A32794
Ieslēgšanas šķīdums imūnfluorescencei Ultramount	ThermoFisher, kat.nr. TA-060-UM
Y27632 (ROCK inhibitors),	Tocris Bioscience, kat.nr. 1254/1
K19 (Keratin 19)	Atlas, kat.nr. HPA002465
Kolagenāze I	Sigma-Aldrich, kat.nr. SCR103
Kolagenāze II	Gibco, kat.nr. 17101015
Litija hlorīds	Sigma-Aldrich, kat.nr. 310468-5G
N2	Gibco, kat.nr. 17502048
N-acetilcisteīns	Sigma-Aldrich, kat.nr. A7250-5G

Nikotīnamīds	Sigma-Aldrich, kat.nr. N0636-100G
Noggin	PeptoTech, kat.nr. 120-10C
OCT šķīdums paraugu saldēšanai un griešanai (<i>Optimal cutting temperature compound</i>)	VWR, kat.nr. 361603E
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/mL)	Gibco, kat.nr. 15070063
PGE2	Tocris Bioscience, kat.nr. 2296/10
Phalloidin-488	Thermofisher, kat.nr. A12379
Primocīns (transportēšanas šķīdumam)	InvivoGen, kat.nr. ant-pm-1
pTK-Green Renilla plazmīdas	Thermofisher, kat.nr. 16154)
Rspo-1 kondicionētā barotne	Paštaisīts
STF (SuperTopFlash, M50) plazmīdas	Addgene, kat.nr. 12456
Tripsīna inhibitors	Gibco, kat.nr. R007100
Tripsīns EDTA	Gibco, kat.nr. 25300062
TripsīnsLE	Gibco, kat.nr. 12605010
Triton X	Sigma-Aldrich, kat.nr. X100-500
TurboFect™ transfekcijas reaģents	Thermofisher, kat.nr. R0534
Uzlabots DMEM/F-12	Gibco, kat.nr. 12634010
Wnt3A kondicionēta barotne	Paštaisīts
Zeocīns	InvivoGen, kat.nr. ant-zn-1p

2.1. Wnt3A šūnu kondicionētas barotnes izveidošana

2.1.1. tabula

Augšanas barotne L-Wnt-3A (ATCC® CRL-2647™) šūnu līnijai

Viela	Koncentrācija
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose</i>)	-
G-418	0,4mg/mL
Fetālais teļa serums (<i>Fetal bovine serum- FBS</i>)	10%
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/mL)	1%
Zeocīns	300 µg/ml

2.1.2. tabula

Savākšanas barotne L-Wnt-3A (ATCC® CRL-2647™) šūnu līnijai

Viela	Koncentrācija
DMEM	-
FBS	10%
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/mL)	1%

- 1) Ūdens vannā uzsilda augšanas barotni (2.1.1. tabula), 35ml pievieno T150 flakonā un izsēj 1.5×10^6 L Wnt-3A šūnu līniju.
- 2) Kad šūnu konfluence sasniegusi ~75%, šūnas tripsinizē- nolej veco barotni, šūnas mazgā ar PBS pievieno 3ml tripsīna (iepriekš uzsildītu ūdens vannā, 37°C) un liek inkubatorā uz 2-3 minūtēm, kamēr šūnas ir atrāvušās no flakona malām, tripsīna darbību bloķē ar 3-5ml kondicionētās augšanas barotnes, pārnēs suspensiju uz 15ml stobriņu, liek centrifūgā uz 5 minūtēm 1200x. Nolej supernatantu un resuspendē šūnas 1ml barotnes. T150 flakonā iesēj 1.5×10^6 , izmantojot 35ml uzsildītu kondicionēto augšanas barotni, šūnas liek 5% CO₂ inkubatorā 37°C.
- 3) Kad ir kultivēti 5-10 T150 flakoni un katrā no tiem konfluence sasniegusi ~75%, 4.5×10^6 šūnas izsēj 500cm² platēs ar 100ml augšanas barotni.
- 4) Kad platēs konfluence ir sasniegusi ~70%, barotni nomaina uz savākšanas barotni (2.1.2. tabula), šūnas inkubē vienu nedēļu.
- 5) Pēc nedēļas savāc no šūnām kondicionēto barotni, pārnēs 50ml stobriņos un centrifugē 5min 500G 8°C.
- 6) Filtrē caur 500ml SteriCup filtrkausiņiem, sajauc kopā un alikvotē 15ml stobriņos.
- 7) Wnt signālceļa aktivācijas spēju barotnēs nosaka ar luciferāzes reportiera (*Top/Flash assay*) testu (28).

2.2. Rspo-1 šūnu kondicionētas barotnes izveidošana

2.2.1. tabula

Augšanas barotne HA-R-Spondin1-Fc 293T šūnu līnijai

Vielas	Koncentrācija
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose</i>)	-
FBS	10%
Zeocīns	150µg/ml

Savākšanas barotne HA-R-Spondin1-Fc 293T šūnu līnijai

Viela	Koncentrācija
Uzlabots DMEM/F-12	-
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/mL)	1%
GlutaMAX (200mM)	1%
HEPES	10mM

- 1) Ūdens vannā (37°C) uzsilda augšanas barotni (2.2.1 tabula). 35ml uzsildītās barotnes iepilda T150 flakonā un izsēj $1.5-2 \times 10^6$ 293T-HA-Rspo1-Fc šūnu līniju.
- 2) Šūnas pārsēj pie 75% konfluences sasniegšanas. Tripsinizēšanu veic kā iepriekš aprakstītajām Wnt3A šūnu līnijām. Tripsinizētās šūnas saskaita un izsēj 1.5×10^6 T150 flakonā, izmantojot 35ml iepriekš uzsildītas augšanas barotnes.
- 3) Kad ir kultivēti 5-10 T150 flakoni un katrā no tiem konfluences sasniegusi ~75%, nomaina barotni uz savākšanas barotni (2.2.2. tabula) un inkubē vienu nedēļu.
- 4) Pēc nedēļas savāc no šūnām kondicionēto barotni, pārnes 50ml stobriņos un centrifugē 5min 500G 8°C, tad filtrē caur 500ml SteriCup filtrkausiņiem, sajauc kopā un alikvotē 15ml stobriņos, uzglabā -20°C līdz 6 mēnešiem.
- 5) Rspo-1 barotnes spēju aktivēt Wnt signālceļu nosaka ar luciferāzes reportiera (*Top/Flash assay*) testu (28).

2.2.1. Luciferāzes reportiera tests (*Top/Flash assay*)

- 1) HEK 293 šūnu līniju pēc atkausēšanas kultivē T25 flakonā, izmantojot augšanas barotni (DMEM +10% FBS). Kad konfluences sasniegusi ~75%, šūnas pārsēj T75 flakonā, izmantojot to pašu augšanas barotni.
- 2) HEK293 šūnu transfekcijai ar *TopFlash* plazmīdām vispirms nolej augšanas barotni un šūnas nomazgā vienu reizi ar 10ml PBS. Tad šūnas tripsinizē, pievienojot 1,5ml tripsīnu (T75 flakonam) vai 1ml (T25 flakonam), inkubē 2-3 minūtes, kamēr šūnas ir atrāvušās no flakona

- malām. Tripsīnu bloķē ar tādu pašu daudzumu augšanas barotnes, pārnes uz 15ml stobriņu, centrifugē 3 minūtes 200x, nolej supernatantu un resuspendē 1ml augšanas barotnes.
- 3) Šūnas izskaita un izsēj pa 3×10^4 šūnu vienā lauciņā (100µl) 96 lauciņu platē DMEM ar 10% FBS bez antibiotikām.
 - 4) Izmantojot DMEM bez FBS un antibiotikām, pagatavo plazmīdu maisījumu nepieciešamajam lauciņu skaitam. Vienam lauciņam – 12 µl DMEM, 80ng STF, 8ng pTK-Green Renilla plazmīdas un 0.16µl TurboFect. Uzreiz pēc Turbofect pievienošanas kārtīgi sajauc un inkubē 15 minūtes istabas temperatūrā. Pievieno maisījumu katrā lauciņā uzreiz pēc šūnu izsēšanas. Plati viegli sakrata, lai barotne un transfekcijas kompleksi sajauktos, šūnas inkubē CO₂ inkubatorā 37° C.
 - 5) Nākamās dienas pēcpusdienā noņem transfekcijas barotni un pievieno kontroles un testējamās kondicionētās barotnes (Wnt3A un Rspo-1 atsevišķi un kopā; DMEM kā kontroles lauciņus un litija hlorīdu, kā pozitīvo kontroli, kas aktivē Wnt signālceļu) – 75µl katrā lauciņā. Liek inkubatorā uz nakti.
 - 6) Nākamajā rītā šūnas lizē, pievieno reaģentus un mēra *firefly* luminescenci mikroplašu lasītājā (Infinity M200 Pro).
 - 7) Pievieno reaģentus un nomēra *renilla* luminescenci.
 - 8) Iegūtos datus apstrādā *Microsoft Excel* programmā (37).

2.3. Peles aizkuņģa dziedzera organoīdu modeļa izveide

2.3.1. tabula

Pamatbarotne audu transportēšanai un uzglabāšanai

Viela	Koncentrācija
Uzlabots DMEM/F12	-
GlutaMAX	1%
HEPES	10mM
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/mL)	1%
Primocīns (transportēšanas šķīdumam)	50µg/mL

Skalošanas šķīdums

Viela	Koncentrācija
DMEM ar augstu glikozes līmeni	-
FBS	1%
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/mL)	1%

Enzimātiskais audu šķelšanas šķīdums

Viela	Koncentrācija
DMEM ar augstu glikozes līmeni	-
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/mL)	1%
Kolagenāze I	1mg/ml
Dispāze II proteāze	0,5μ/ml
<i>Dnase I</i>	0,1mg/ml

Peļu organoīdu augšanas barotne

Viela	Koncentrācija
Uzlabots DMEM/F12	-
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/mL)	1%
GlutaMAX	1%
B27	1x
HEPES	10mM
Rspo-1 kondicionētā barotne	5%
Nikofīnamīds	10mM
N-acetilcisteīns	1mM
Gastrīns	10nM
EGF	50 ng/ml
Noggin	25 ng/ml
Forskolīns	10μM
A83	5μM
Primocīns	50μg/ml
Y27632 (ROCK inhibitors), pievieno pirmās 7 dienas	10μM

Pirms darba sākšanas nosterilizē visus nepieciešamos instrumentus, sagatavo darbam laminārās plūsmas skapi, novieto ūdens vannā vielas, kuras nepieciešams sildīt- enzimātisko audu

šķelšanas šķīdumu, peļu organoīdu augšanas barotni, uz ledus novieto vielas, kam nepieciešams aukstums- skalošanas šķīdums, pamatbarotne audu transportēšanai. Pagatavotajiem vielu šķīdumiem ir jābūt sterili filtrētiem, lai minimizētu kontaminācijas rašanās risku.

- 1) Audu materiālu transportē un uzglabā uz ledus pamatbarotnē (2.3.1. tabula), līdz to tālākai apstrādei.
- 2) Materiālu pārnes uz 100mm petri trauciņu, nosver, nomēra un sasmalcina cik smalki iespējams, lai iegūtu homogēnu maisījumu ar audu fragmentiem ne lielākiem par 0.5mm^3 (sasmalcināšanai var izmantot skalpeli vai šķērītes – instrumentiem ir jābūt iepriekš sterilizētiem).
- 3) Sasmalcinātos audus, ar skalošanas šķīdumā samitrinātu pipeti, pārnes no petri trauciņa uz sterilu 15ml centrifugēšanas stobriņu, pievienojot 10ml ledus aukstu skalošanas (2.3.2. tabula) šķīdumu (pārnest ieteicams sākumā ar 5ml skalošanas šķīdumu, un ar atlikušajiem 5ml nomazgāt audu daļas no petri trauciņa un instrumentiem).
- 4) Ar 10ml seroloģisko pipeti, pipetē augšup un lejup 10 reizes, lai atdalītu taukus un asins komponentus, ļauj audiem nosēsties stobriņa apakšā (2-3 min.), tad noņem apmēram 7.5ml supernatanta, ieskaitot peldošus gabaliņus, un atkārtu darbību vēl vienu reizi, pievienojot 7.5ml skalošanas šķīdumu (seroloģiskās pipetes pirms lietošanas ir ieteicams samitrināt tajā pašā šķīdumā, kas tiks lietots (pipetējot uz augšu un leju), lai izvairītos no audu pielipšanas pie pipetes sienām).
- 5) Noņem visu supernatantu (cik iespējams, neiesūcot audus) un pievieno 10ml iepriekš uzsildītu (37°C) enzimatisko audu šķelšanas šķīdumu (2.3.3. tabula). Paraugu inkubē uz horizontālā kratītāja ar termostatu 37°C 45 minūtes.
- 6) Pēc 45 minūtēm pipetē šķīdumu augšup un lejup un gaismas mikroskopā pārbauda vai nav redzamas aizkuņģa dziedzera kanāliņu struktūras. Ja nav redzams tad turpina inkubēt horizontālajā kratītājā 37°C , pārbaudot katras 20-30minūtes.
- 7) Kad kanāliņu struktūras ir redzamas, paraugu ar enzimatisko audu šķelšanas šķīdumu filtrē sterilā 50ml stobriņā caur 100um filtru. Filtru nomazgā ar 5-10ml skalošanas šķīduma.
- 8) Supernatantu no 50ml stobriņa pārnes 15ml stobriņā un centrifugē 5 minūtes uz 800x. Noņem supernatantu un nogulsnei pievieno 10ml pamatbarotni, centrifugēšanu atkārti.
- 9) Nocentrifugētajam materiālam noņem supernatantu un materiālu liek uz ledus, sajauc ar BME-2 gelu. BME-2 ieteicams noturēt uz ledus vismaz 30 minūtes pirms sajaukšanas ar paraugu. Jāstrādā ir ātri, jo gels istabas temperatūrā sabiezē, tāpēc sajauktais paraugs visu laiku ir jātur uz ledus.

- 10) Sajaukto paraugu izsēj pilienos (30-50 μ L vienā lauciņā) 24 lauciņu platē (ieteicams pirms izmantošanas 1h inkubēt 37°C). Plati apgriez otrādi un patur 5 minūtes laminārās plūsmas skapī, lai izvairītos no šūnu nogrimšanas un 2D kultūras izveidošanās.
- 11) Plates apgrieztā veidā papildus inkubē 20min 37°C un tad pievieno katrā lauciņā 500 μ L siltu peļu organoīdu augšanas barotni (2.3.4. tabula), atstāj uz nakti inkubatorā 37°C. Barotni ieteicams nomainīt katru 3-4 dienu (26).

2.3.1. Organoīdu sasaldēšana

- 1) 24 lauciņu platē esošos organoīdus, izņem no inkubatora, sapipetē ar to pašu peļu augšanas barotni, lai izjauktu gela struktūru un pārnes 15ml centrifugēšanas stobriņā (vienā stobriņā ieteicams apvienot ne vairāk kā trīs lauciņus). Tukšos lauciņus noskalo ar 1%BSA+DMEM (jātur uz ledus) un pārnes uz to pašu 15ml stobriņu.
- 2) Ar 1%BSA+DMEM šķīdumu papildina līdz 10ml kopējam tilpumam un ar seroloģisko pipeti pipetē augšup un lejup 10 reizes, lai gels pēc iespējas vairāk atdalītos un liek centrifūgā 5 minūtes uz 800x.
- 3) Cik vien daudz iespējams, ar seroloģisko 10ml pipeti noņem supernatantu, atstājot apmēram 1ml. Ar 1000 μ l pipeti noņem palikušo šķīdumu, uzmanīgi neaizskarot nogulsni.
- 4) Nogulsni resuspendē 1ml 1%BSA+DMEM šķīduma un organoīdu struktūru sašķeļ (pipetē augšup un lejup 5 reizes) ar 1000 μ l pipeti, kam galā ir uzlikts papildus 10 vai 200 μ l uzgalis. Zem gaismas mikroskopa pārbauda vai struktūras ir sašķēlušās.
- 5) Sasmalcinātajiem organoīdiem pievieno 5ml 1%BSA+DMEM šķīdumu un liek centrifūgā 5 minūtes uz 800x. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi noņem supernatantu un liek uz ledus.
- 6) Pievieno saldēšanas barotni (70% peļu organoīdu augšanas barotne + 10%DMSO + 10%FBS), sajauc kopā un iepilda saldēšanas stobriņos, katrā pa 500 μ l, liek saldētavā -80°C (saldēšanas kamerai ir jābūt aukstai, līdz izmantošanas brīdim jāstāv ledusskapī) (38).

2.3.2. Organoīdu iezīmēšana ar antivielām

- 1) No organoīdiem ar skalošanas šķīdumu atmazgā gelu, centrifugē, pievieno 200µl OCT un ienes folija veidnē, kas jau satur OCT. Sasaldē -80°C.
- 2) Sasalušus paraugus ar kriotomu (Leica CM1850) sagriež 15µm biezos fragmentos un uznes uz priekšmetstikliņa.
- 3) Ar DakoPen novelk robežas ap audiem, vienu reizi mazgā ar PBS un fiksē ar 3,5% formaldehīdu 20 minūtes istabas temperatūrā.
- 4) Uzliek 3% BSA+0,05%TritonX+PBS šķīdumu un atstāj uz stundu (priekšmetstikliņu var pārklāt ar parafilmu, lai izvairītos no šķīdumu izžūšanas).
- 5) Pēc stundas nomazgā ar PBS un uznes primārās antivielas (K19 1:300 atšķaidījumā ar 1%BSA +0,05% Triton+PBS), atstāj uz nakti ledusskapī (4°C).
- 6) Nakamajā dienā trīs reizes mazgā ar 1%BSA+0,05%TritonX+PBS šķīdumu un uznes 200 µl sekundārās antivielas (*Donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 555*). Kodolus iezīmē ar Hoechst 33342, atstāj uz vienu stundu, tad mazgā trīs reizes ar PBS šķīdumu, uzliek ieslēgšanas šķīdumu, segstikliņu- un mikroskopē ar konfokālo mikroskopu (Nikon C2).

2.3.3. Organoīdu atkausēšana

- 1) Pagatavo Ad-DF+++ šķīdumu (2.3.4. tabula), sterili nofiltrē un liek sildīties ūdens vannā 37°C.
- 2) Organoīdu sasaldēto stobriņu izņem no saldētavas un ūdens vannā atkausē līdz ir palicis mazs ledus gabaliņš, tad pievieno pa pilienam 500µl siltu Ad-DF+++ šķīdumu.
- 3) Organoīdu kultūru pārnes uz sterilu 15ml centrifugēšanas stobriņu, pievieno pa pilienam pakāpeniski 1ml Ad-DF+++ šķīdumu un pakāpeniski papildina līdz 10ml.
- 4) Liek centrifūgā 5 minūtes uz 900x. Uzmanīgi noņem visu supernatantu, neaizskarot nogulsni un liek uz ledus, kur sajauc kopā ar 200µl BME-2 gelu.
- 5) 24 lauciņu suspensiju platē sajaukto materiālu izsēj 4 lauciņos, katrā pa 12,5µl 4 gela pilienus. Plati apgriež otrādi, patur 5 minūtes istabas temperatūrā un liek inkubatorā uz 20 minūtēm.

- 6) Pēc 20 minūšu inkubācijas perioda, katram lauciņam uzmanīgi pievieno 500µl siltu organoīdu augšanas barotni un liek inkubatorā 37°C (38).

2.3.4. Kopkultūru izveidošana

- 1) Kopkultūru izveidošanai, izmantoja adherentās šūnas – peļu nerva fibroblastu šūnas un SHSY5Y šūnu līniju.
- 2) Organoīdus un adherentās šūnas tripsinizēja, resuspendēja un saskaitīja.
- 3) Modificētajā peļu organoīdu barotnē, kurai pievienoti 10% BME-2 un 5% FBS, sajauca organoīdu šūnas ar adherentajām šūnām attiecībā 1:2 (1×10^4 : 2×10^4 šūnu uz katrām 30 µl barotnes)
- 4) Uz petri plates vāka iekšpusē izveidoja 30µl pilienus šūnu suspensijas un apgriezta vāku.
- 5) Apgrieztā veidā inkubēja nakti 37°C. Nākamajā dienā šūnas no piliena uzmanīgi ar pipeti ielika BME-gelā un vairākas dienas inkubēja modificētajā peļu organoīdu barotnē. Mikroskopā reģistrēja organoīdu izveidošanos.

2.4. Organoīdu 3D modeļa izveide no cilvēka modeļa aizkuņģa dziedzera normāliem un audzēja audiem

2.4.1. tabula

Ad-DF+++ šķīdums transportēšanai un skalošanai

Viela	Koncentrācija
Uzlabots DMEM/F12	-
GlutaMAX	2mM
HEPES	10mM
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/mL)	100 units/mL
Primocīns (pievieno transportēšanas šķīdumam)	50µg/mL

D-BSA skalošanas šķīdums

Viela	Koncentrācija
DMEM ar augstu glikozes līmeni	-
Liellopa seruma albumīns (<i>Bovine Serum Albumine - BSA</i>)	0,1%
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/mL)	100 units/mL

Enzimātiskais audu šķelšanas šķīdums normāliem audiem

Viela	Koncentrācija
Ad-DF+++	-
Kolagenāze II	1mg/mL
Y-27632 (ROCK inhibitors)	10μM
Tripsīna inhibitors	100 μg/mL
Glicerīns (100%)	5%
Primocīns	50μg/mL

Enzimātiskais audu šķelšanas šķīdums audzēja audiem

Viela	Koncentrācija
Ad-DF+++	-
Kolagenāze II	5mg/mL
Y-27632 (ROCK inhibitors)	10μM
Primocīns	50μg/mL

Cilvēka normālu audu organoīdu augšanas barotne

Viela	Koncentrācija
Uzlabots DMEM/F12	-
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/ml)	1%
GlutaMAX	1%
HEPES	10mM
B27	1x
N-acetilcisteīns	1.25 mM
Nikotīnamīds	10mM
Gastrīns	10 nM

Rspo-1 kondicionēta barotne	10%
Noggin	25 ng/ml
FGF10	100 ng/ml
EGF	50 ng/ml
PGE2	3μM
A83	5μM
Forskolīns	10μM
Y27632 (ROCK inhibitors), pirmās 7 dienas	10μM
Primocīns	50μg/ml

2.4.6. tabula

Cilvēka audzēja audu augšanas barotne 1 (bez EGF, ar Wnt3A kondicionēto barotni)

Viela	Koncentrācija
Uzlabots DMEM /F12	-
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/ml)	1%
Wnt3A kondicionēta barotne	40%
GlutaMAX	1x
HEPES	10mM
B27	1x
N2	1x
N-acetilcisteīns	1.25 mM
Nikotīnamīds	10mM
Gastrīns	10 nM
Rspo-1 kondicionēta barotne	10%
Noggin	100 ng/ml
FGF10	100 ng/ml
Forskolīns	1μM
A83	0.5μM
Y27632 (ROCK inhibitors), pirmās 7 dienas	10μM
Primocīns	50μg/ml

2.4.7. tabula

Cilvēka audzēja audu augšanas barotne 2 (bez Wnt3A kondicionētās barotnes, ar EGF)

Viela	Koncentrācija
Uzlabots DMEM/F12	-
Penicilīns/Streptomicīns (10,000 units/ml)	1%
GlutaMAX	1x
HEPES	10mM
B27	1x
N2	1x

N-acetilcisteīns	1.25 mM
Nikotīnamīds	10mM
Gastrīns	10 nM
Rspo-1 kondicionēta barotne	10%
Noggin	100 ng/ml
FGF10	100 ng/ml
EGF	50 ng/ml
Forskolīns	1μM
A83	0.5μM
Y27632 (ROCK inhibitors), pirmās 7 dienas	10μM
Primocīns	50μg/ml

Pirms darba nosterilizē visus instrumentus, sagatavo lamināro plūsmas skapi darbam. Ūdens vannā novieto vielas, kuras nepieciešams sildīt. Pagatavotajiem vielu šķīdumiem ir jābūt sterili filtrētiem, lai minimizētu kontaminācijas rašanās risku.

- 1) Pacienta materiālu transportē un uzglabā Ad-DF+++ (2.4.1. tabula) šķīdumā. Atvesto materiālu ar pinceti pārnes petri traukā, nosver un nomēra. Lai audi neizzūtu, tos pārklāj ar 1-2mL transportēšanas šķīdumu (Ad-DF+++).
- 2) Cik vien iespējams nogriež nost redzamos audus, kas nav nepieciešami- taukus, muskuļus, zarnu epitēliju.
- 3) Izmantojot skalpeli vai asas šķērītes (iepriekš sterilizētus instrumentus), paraugu sīki sasmalcina 1-2mm³ fragmentos vai līdz homogēnai konsistencei.
- 4) Ar 5ml seroloģisko pipeti (pipetes pirms lietošanas ir ieteicams samitrināt tajā pašā šķīdumā, pipetējot uz augšu un leju, lai izvairītos no audu pielipšanas pie pipetes sienām) pievieno 5ml D-BSA skalošanas šķīdumu (2.4.2. tabula) un pārnes sasmalcināto paraugu 50ml stobriņā. Petri trauciņu un instrumentus nomazgā ar papildus 5ml D-BSA un pārnes visu 50ml stobriņā.
- 5) Papildina ar vēl 30mL D-BSA un ar iepriekš samitrinātu 10 ml seroloģisko pipeti desmit reizes pipetē augšup un lejup audu fragmentus, tad ļauj tiem nosēsties stobriņa apakšā (aptuveni 2-3 minūtes). Kad audi ir nosēdušies, noņem liekos 30ml ar D-BSA mazgāšanas šķīdumu un procedūru atkārto kā iepriekš vēl divas reizes.
- 6) Adu paraugus resuspendē 10ml D-BSA un pārnes sterilā 15ml centrifugēšanas stobriņā, ļauj audu fragmentiem nosēsties stobriņa apakšā.
- 7) Noņem supernatantu cik vien iespējams un resuspendē 5ml enzimatisko audu šķelšanas šķīdumā normāliem audiem (2.4.3. tabula) vai audzēja audiem (2.4.4. tabula). Stobriņu liek

horizontālajā kratītājā 37°C uz 45min (ieteicams 140rpm, zemā leņķī, aptuveni 15°). Stobriņa vāciņu var notīt ar parafilmu, lai minimizētu kontaminācijas risku.

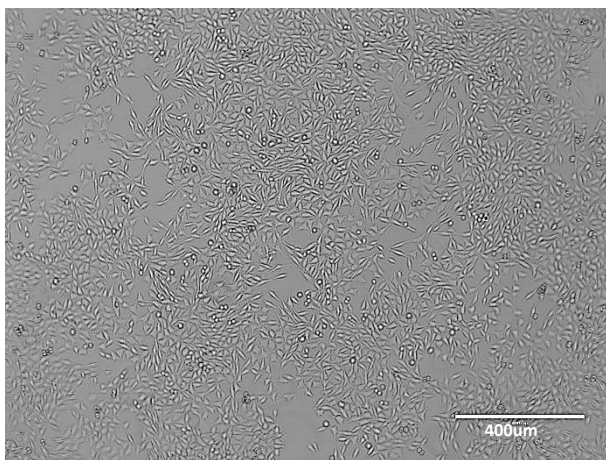
- 8) Pēc 45 minūtēm paraugus pārbauda zem gaismas mikroskopa (normāliem audiem šis process nav ieteicams ilgāk par 2h, savukārt audzēja audus ir ieteicams atstāt maksimums uz diennakti).
- 9) Kad mikroskopā ir redzamas 5-10 šūnu kopas/ kanāliņu struktūras, pievieno 1ml FBS.
- 10) Izmantojot 5ml seroloģisko pipeti, paraugam pievieno 7ml D-BSA. Izmantojot to pašu pipeti, audu maisījumu pipetē augšup un lejup 20 reizes.
- 11) Paraugu centrifugē 5 minūtes 800x. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi noņem supernatantu, atstājot 500µl. Pievieno 10ml D-BSA un centrifugēšanu atkārti 5 minūtes 1000x, uzmanīgi noņem supernatantu, atstājot 500µl.
- 12) Nogulsni resuspendē 7ml D-BSA šķīduma un filtrē caur 100mm filtru sterilā 50 ml plastmasas stobriņā. Filtru mazgā ar 7ml Ad-DFE+++ šķīdumu, pārnes sterilā 15ml stobriņā un centrifugē 5 minūtes 1000x. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi noņem supernatantu un resuspendē 25-30µl cilvēka normālu (vai audzēja) audu organoīdu augšanas barotnē, liek uz ledus un sajauc ar BME-2 (ieteicamais daudzums uz 50µl nogulsnes ir 200µl gela)
- 13) No sajauktā parauga izveido pilienus (30-50µL vienā lauciņā - 4x 12.5µl vai 50µl vienā lauciņā) 24 lauciņu suspensiju platē (ieteicams pirms izmantošanas 1h inkubēt 37°C) 24 lauciņu plati apgriez otrādi un patur 5 minūtes laminārās plūsmas skapī, lai izvairītos no šūnu nogrimšanas un 2D kultūras izveidošanās.
- 14) Plati ievieto inkubatorā 37°C uz 30 minūtēm, ļaujot gelam sabiezēt. Pēc 30min inkubācijas, katram lauciņam pievieno 500µl cilvēka normālu (2.4.5.tabula) vai audzēja (2.4.6. tabula, 2.4.7. tabula)) audu organoīdu augšanas barotni. Audzēja paraugam, pusei lauciņu pievieno audzēja 1 un otrai pusei lauciņu- audzēja 2 barotni (38).

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

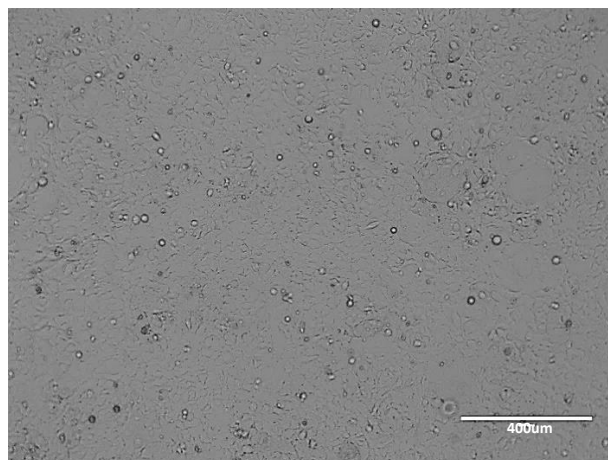
3.1. Wnt3A un Rspo-1 kondicionēto barotņu pagatavošana, HEK 293 transfekcija un Wnt signāla nolasīšana

Aizkuņģa dziedzera organoīdu veiksmīgas izveidošanas un kultivēšanas procesā būtiska loma piemīt augšanas barotņu sastāvdaļām, kas ietver arī Wnt3A un Rspo-1 augšanas faktorus. Šie faktori tiek bieži pievienoti kā kondicionētas barotnes. Pirms organoīdu kultivēšanas šādas barotnes ir jāizveido un jāveic Wnt signālceļa aktivācijas spējas pārbaude HEK 293 šūnās.

Lai to veiksmīgi varētu izdarīt, pirmais solis ietvēr šo šūnu līniju izsēšanu un kultivēšanu. Kondicionētās barotnes iegūšana ir samērā ātra, jo šūnas spēj ātri sasniegt nepieciešamo konfluenci. Wnt3A (3.1.1. attēls) un Rspo-1 veidojošas šūnas tika saņemtas sasaldētā veidā, izsētas un kultivētas līdz 70% konfluencijai, tad pavairotas iegūstot vairākas pasāžas, daļu sasaldējot tālākiem pētījumiem. Iegūtās kondicionētās barotnes tika filtrētas, alikvotētas un uzglabātas tālākai izmantošanai.



3.1.1. att. Wnt3A p2 šūnu līnija



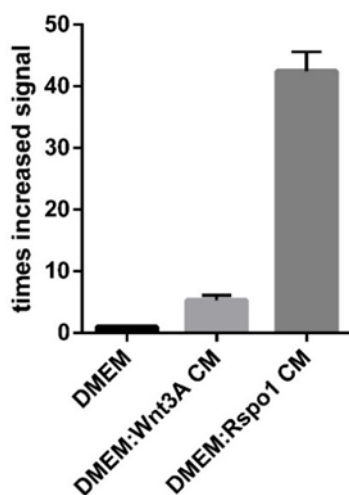
3.1.2. att. HEK 293 šūnu līnija

Wnt3A un Rspo-1 kondicionēto barotnes spējas ierosināt signālceļa aktivāciju, nolasīšanai pielietoja luciferāzes reportiera testu. HEK 293 šūnās (3.1.2. attēls) tika transfektētas ar luciferāzi ekspresējošām plazmīdām STF un pTK Green Rennila. Transfektētām šūnām tika pievienota kontroles barotne, kā arī Wnt un Rspo-1 iegūtās kondicionētās barotnes atsevišķi un kopā (37).

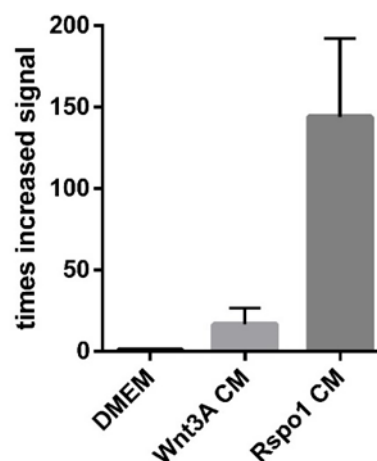
HEK 293 šūnu līnija tika izvēlēta pamatojoties uz to, ka tā ir viegli transfektējama. Pēc tranfekcijas, šūnas satur *firefly* luciferāzes gēnu, ko kontrolē β katenīna/T-šūnu faktora gēnu promoteris un tās var izmantot Wnt / β -katenīna signālu mērīšanai. Tās uzrāda spēcīgu, no devas

atkarīgu atbildes reakciju uz Wnt ligandu (piemēram, Wnt3A, Rspo-1 vai LiCl) pievienošanu (30). Šūnas pirms testa veikšanas tika atkausētas, izsētas un kultivētas līdz sasniedza apmēram 70% konfluenci.

Kondicionēto barotņu izveidošana un Wnt signāla aktivācijas nolasīšana tika veikta divas reizes, janvārī un februārī (3.1.3; 3.1.4. attēls). Janvāra dati atšķiras ar to, ka tajos kondicionētas barotnes tika atšķaidītas ar DMEM 1:1 attiecībā. Balstoties uz literatūras datiem, Wnt3A kondicionētas barotnes spējai aktivēt Wnt signālceļu ir jābūt 10-25 reizes lielākai salīdzinot ar kontroles barotni (28,39). Mūsu gadījumā tā bija 5x janvāra testos un lielāka nekā 10x- februārī. Zemāku aktivitāti janvāra testos var skaidrot ar to, ka Wnt3A kondicionēta barotne tika atšķaidīta ar DMEM. Testa rezultātā Rspo-1 kondicionētās barotnes spējai aktivēt Wnt signālceļu ir jābūt 5-10 reizes lielākai nekā Wnt3A barotnei (28,39). Abos mēģinājumos tā bija lielāka par 5x. Var secināt, ka pagatavotām kondicionētām barotnēm ir pietiekami augsts Wnt3A un Rspo-1 augšanas faktoru saturs, lai tās varētu izmantot organoīdu augšanas barotnēs.



3.1.3. att. Wnt signālceļa aktivācijas bioluminiscences dati 2021. Gada janvāris (CM- conditioned media)

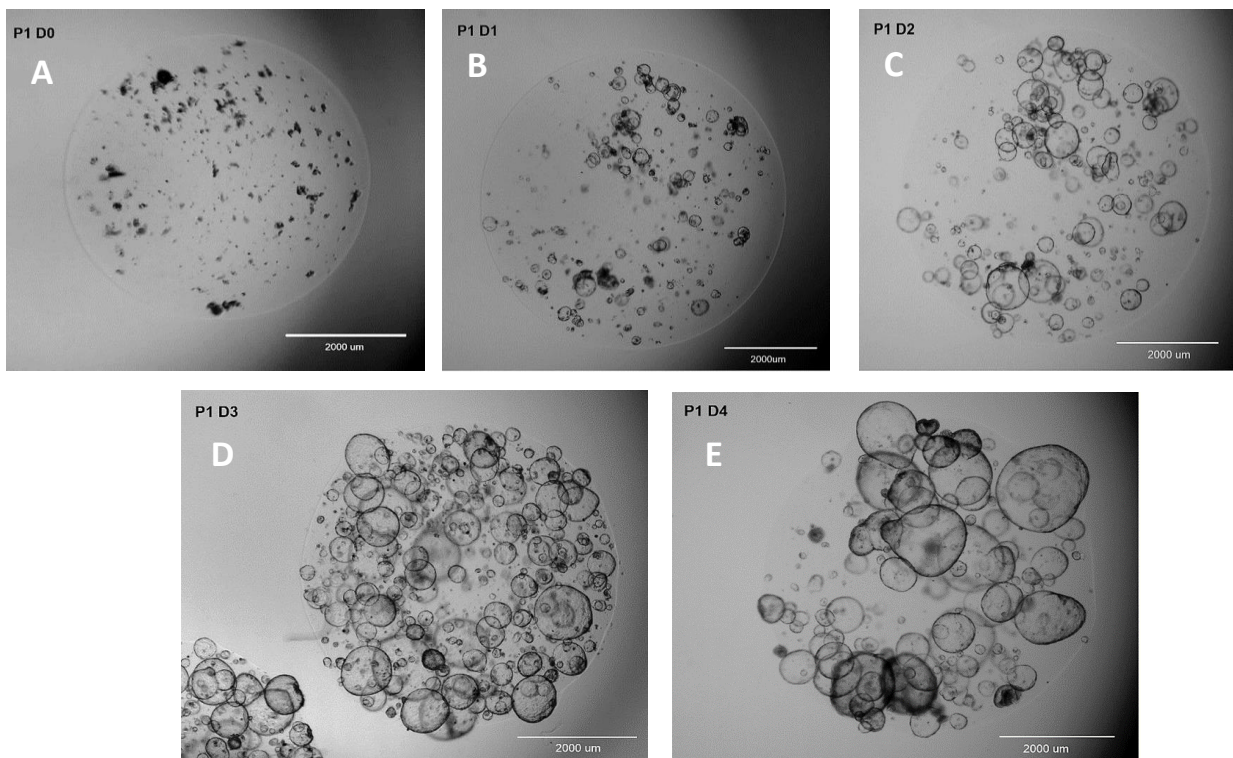


3.1.4. att. Wnt signālceļa aktivācijas bioluminiscences dati 2021. gada februāris

3.2. Peles aizkuņģa dziedzeru organoīdu izveide

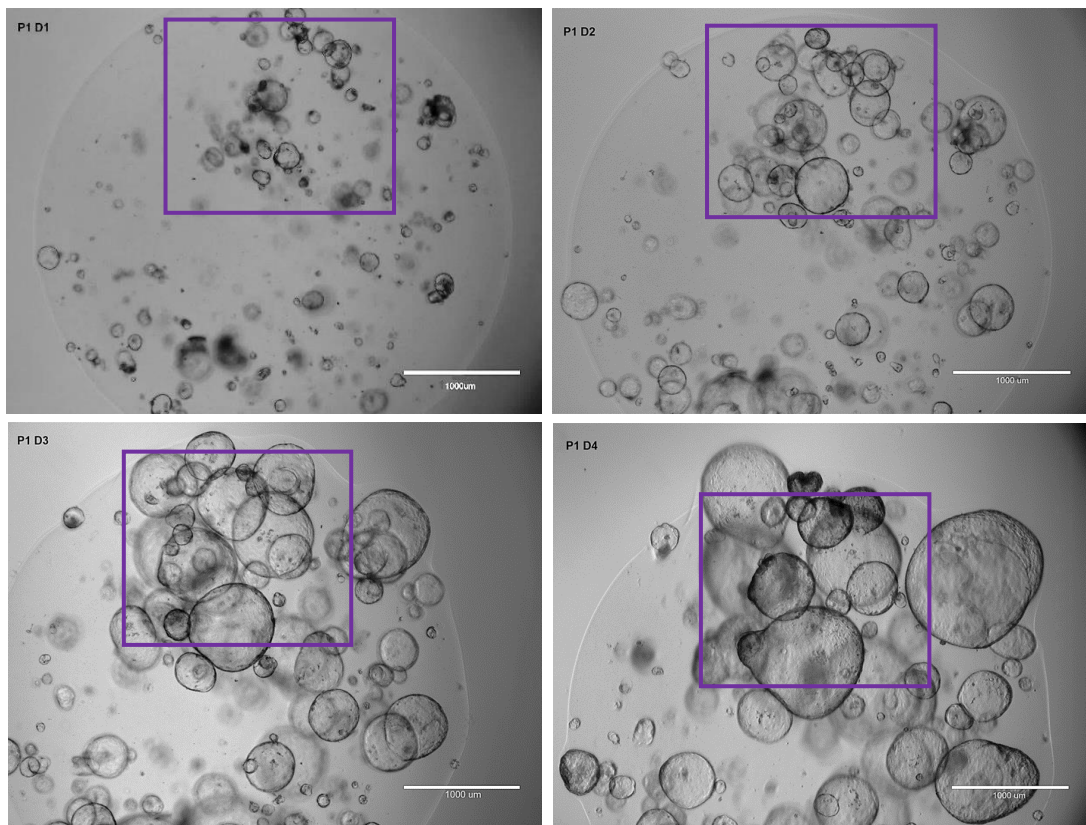
Saņemot aizkuņģa dziedzeru audu paraugus no 5 pelēm, tie tika sasmalcināti, enzimatiski apstrādāti un pilienu veidā ar gelu izsēti 24 lauciņu suspensiju platēs. Sasmalcinātajā materiālā pēc enzimatiskās audu šķelšanas, gaismas mikroskopā bija skaidri saredzamas kanāliņu struktūras, kas ir būtiski, jo no tām tālāk var attīstīties organoīdu kultūras.

Organoīdu kultūras augs strauji – jau pirmajā dienā pēc izsēšanas bija novērojamas pirmās struktūras – apaļu, cistisku veidojumu formā. Otrā un trešā dienā kultūras bija sasniegušas 70% un vairāk konfluenci, tāpēc daļa tika pārsēta un daļa sasaldēta, pamazām veidojot organoīdu bibliotēku tālākiem pētījumiem. Kopumā no 5 peļu aizkuņģa dziedzeriem izdevās veiksmīgi izveidot 4 organoīdu līnijas. Viena parauga gadījumā, sākotnējais materiāls tika izsēts pārāk blīvi un šūnas gāja bojā.



3.2.1 att. Organoīdu attīstības gaita pēc izsēšanas BME-2 gelā. (A) Redzami peļu aizkuņģa dziedzeru audu fragmenti tikko pēc atkausēšanas un izsēšanas BME-2 gelā. **(B)** Pirmā diena pēc atkausēšanas un izsēšanas, redzamas manāmas organoīdu struktūras, apaļu un cistisku veidojumu formā. **(C)** Otrā diena- organoīdu struktūras ir jau manāmi palielinājušās. **(D)** 3. dienā struktūras ir pāraugušas gelu, daži no organoīdiem virzās ārpus gela robežām. **(E)** 4. dienā ir novērojama atsevišķu organoīdu struktūru bojāeja (tumšās, pildītās organoīdu struktūras).

Rūpīgākai organoīdu dinamikas (3.2.2. attēls) attīstības novērošanai tika izsēta 0. pasāžas sasaldētā 5.peles kultūra. Izsētais materiāls tika novērots 4 dienas, līdz organoīdu pakāpeniskai bojāejai. Strauja peles organoīdu augšana varētu būt skaidrojama ar to, ka tiek izmantots vesels orgāns, kas satur daudz dziedzera kanāliņu struktūru.



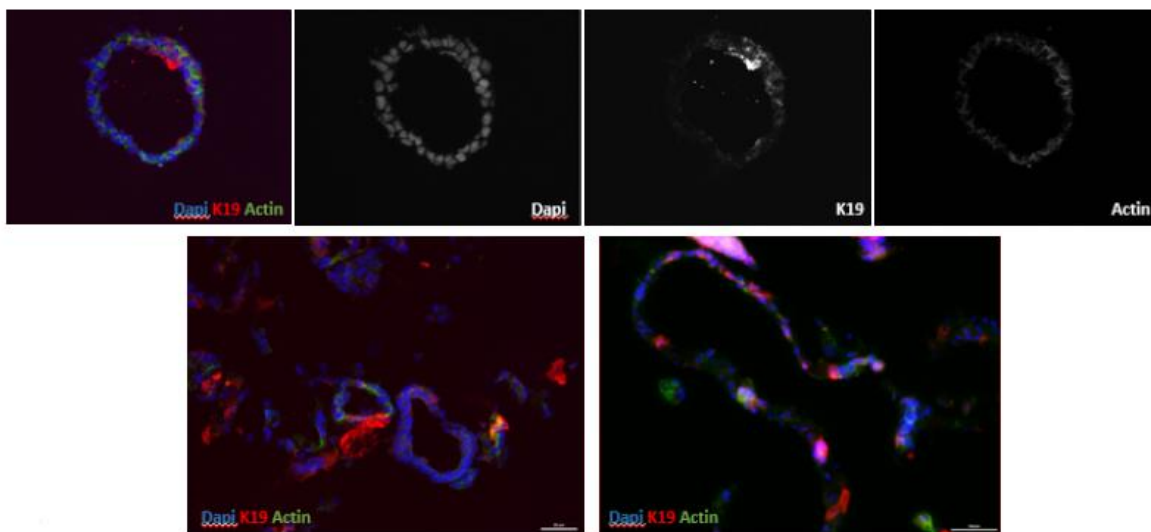
3.2.2. att. **5.peles atsevišķu organoīdu struktūru dinamikas novērošana.** Organoīdu attīstība ir strauja, jau pirmās divas dienas pēc izsēšanas ir novērojams struktūru palielinājums. Trešā un ceturta dienā dažas no struktūrām iet bojā, citas pāraug gela robežas.

Dažos organoīdu paraugos pēc ilgstošas kultivēšanas tika pamanīta kontaminācija. Vizuāli kontaminētie organoīdi bija tumšāki, izskatījās pildīti, nebija novērojamas skaidras, dobas struktūras. Pietuvinot ar gaismas mikroskopu varēja novērot baktēriju kustību. Visbiežāk baktērijas, veidojot kolonijas var augt gelā vai ap gela malām, ja tās aug barotnē (38). Kontaminācija varēja rasties parauga apstrādes vai pārsēšanas laikā vai arī orgāna izdalīšanas laikā, jo aizkuņģa dziedzera audi ir tiešā saskarē ar gastro-intestinālo traktu. Šī ir bieži sastopama problēma ne tika aizkuņģa dziedzera organoīdu gadījumā (17). Lai mazinātu kontamināciju risku atkārtotos, ir iespējams autoklavēt instrumentus, veikt orgānu izdalīšanu zem laminārās plūsmas

un dubultot antimikrobiālo līdzekļu koncentrāciju transportēšanas šķīdumā un pirmo pasāžu kultivēšanas barotnēs.

3.3. Peles aizkuņģa dziedera organoīdu raksturošana un kopkultūru izveidošana

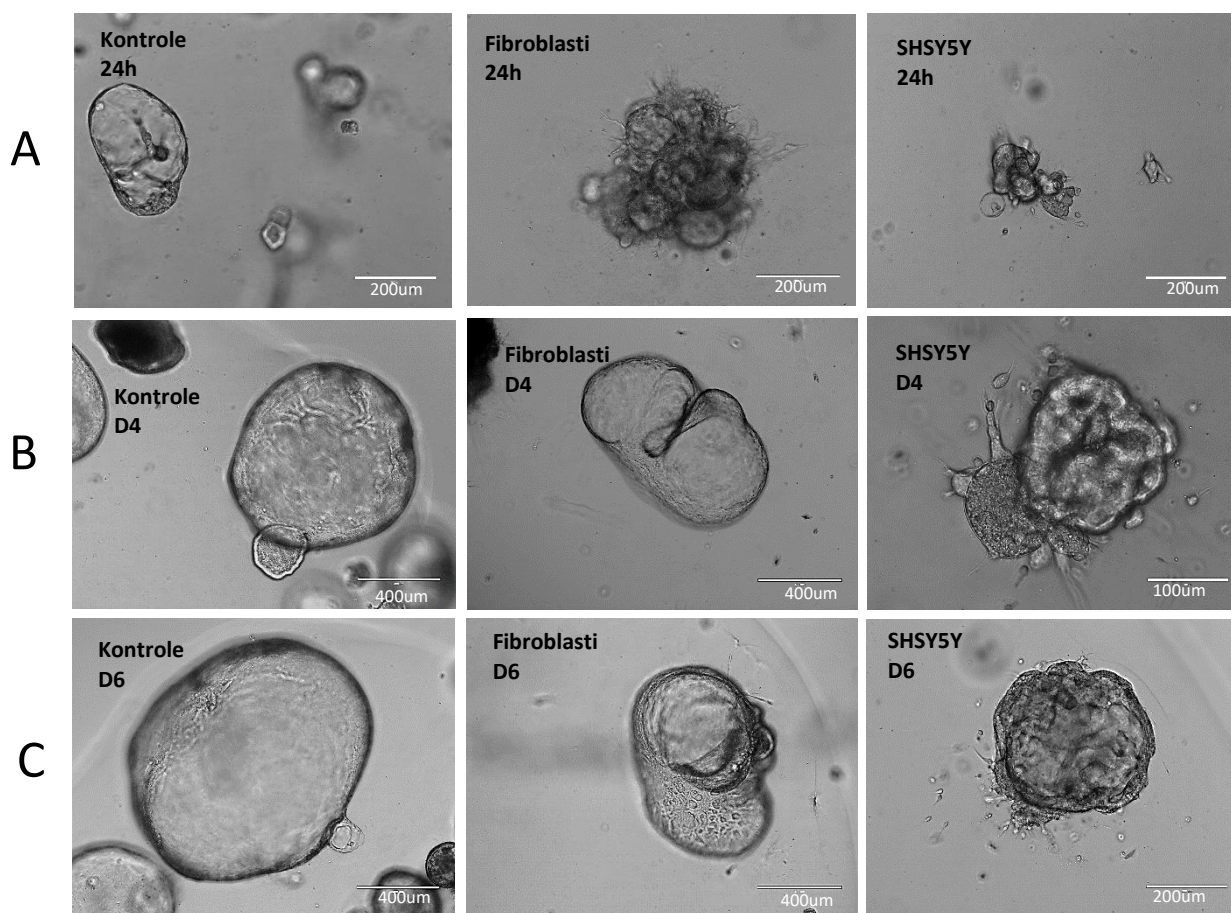
Peļu organoīdu fenotipiskā iezīmēšana tika veikta uz organoīdu krio-griezumiem. Audu fragmentus iezīmēja ar primārājām antivielām pret citokeratīnu (K19), kas ir aizkuņģa dziedera kanāliņu marķieris un tiek izmantots organoīdu raksturošanā (25). Papildus, iezīmēja kodolus ar Hoechst, aktīnu ar Phalloidin-488 un mikroskopēja ar fluorescences mikroskopa palīdzību (3.3.1. attēls). Var novērot, ka K19 anti viela dažādi iezīmē organoīdu struktūras. Dažos gadījumos tā ir vienmērīgi vāja, citos gadījumos ar atsevišķām spēcīgi iezīmētām šūnām. Antivielas specifitāte ir jāparbauda arī uz organoīdu parafīna griezumiem. Iespējams, ka nevienmērīga iezīmēšana ar K19 antivielu norāda uz šūnu heterogenitāti primārajās organoīdu pasāžās un tas mainīsies ilgākas kultivēšanas gaitā.



3.3.1. att. **Organoīdu krio-griezumu fenotipiskā iezīmēšana.** Kodoli ir iekrāsoti zilā krāsā, anti viela K19 sarkanā krāsā. Zaļā krāsā ir iekrāsoti aktīna pavedieni.

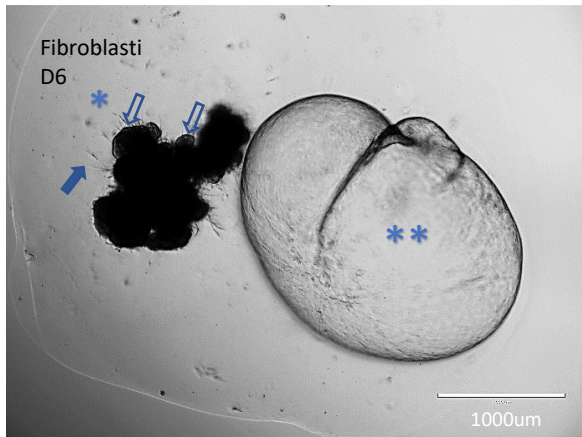
Organoīdu kopkultūru mēģinājums tika veikts, izmantojot SHSY5Y neuroblastomas šūnu līniju un primārās peļu perifēro nervu fibroblastu kultūras. Šūnu izvēli pamatojam ar, to ka turpmāk

plānojam pētīt perifērās nervu sistēmas iesaisti aizkuņģa dziedzera slimību un reģenerācijas aspektos un ir jāatstrādā dažādu nervu sistēmas šūnu/organoīdu kopkultūras izveidošanas paņēmieni. Pēc tripsinizēšanas un gandrīz diennakts inkubācijas piliena veidā, novērojām organoīdu kultūru izveidi gelā. Šoreiz, lai veicinātu adherento šūnu izdzīvošanu barotnēm tika pievienots serums (36). Pēc 24 stundām varēja novērot šūnu apvienošanās organoīdu struktūrās (3.3.2. attēls). Kontroles attēlos ir redzamas normālu organoīdu struktūras. Peļu perifēro fibroblastu kopkultūras attēlos ir manāmas migrējošas šūnas ārpus organoīda. Fibroblasti ir vērojami arī tiešā saskarē ar organoīdiem. Ap dažiem organoīdiem nav novērotas fibroblastu šūnas. SHSY5Y šūnu kopkultūru attēlos, organoīdu struktūrās ir manāmas šūnu kopas, organoīdi izskatās vairāk pildīti, veido sfēras gelā, kā tas ir labi aplūkojams 4. dienas attēlā.

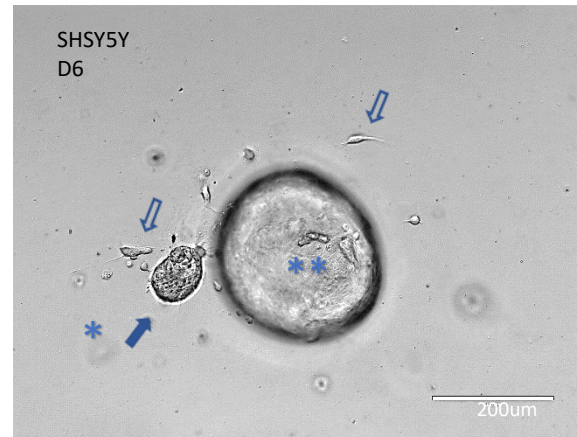


3.3.2. att. **Organoīdu kopkultūru attīstība 24h, 4 dienas un 6 dienas pēc apvienošanas ar peļu perifēro nervu fibroblastu un SHSY5Y šūnām. (A)** 24h pēc organoīdu kopkultūru izveidošanas. **(B)** 4 dienas pēc kopkultūru izveidošanas. **(C)** 6 dienas pēc kopkultūru izveidošanas.

Dažas no fibroblastu šūnām bija izveidojušas blīvas šūnu grupas, kur varēja novērot arī nelielu organoīdiem līdzīgu pumpuru izveidošanos (3.3.3. attēls) Dažas no SHSY5Y šūnām bija izvietojušās atsevišķi gelā, kā arī veidojušas šūnu kopas organoīda struktūrā (3.3.4. attēls).



3.3.3. att. Nerva fibroblastu kopkultūras attīstība. *Blīva fibroblastu grupa ar redzamām migrējošām šūnām sānos (pildīta bultiņa) un acīmredzamu epiteliālo kanāliņu šūnu pumpurošanos (tukšas bultiņas). **Organoīds bez acīmredzamas fibroblastu klātbūtnes.



3.3.4. att. SHSY5Y kopkultūras attīstība. *SHSY5Y atsevišķu šūnu (tukšas bultiņas) un sferu (pildīta bultiņa) izvietojšanās gelā. ** Organoīdā redzama SHSY5Y šūnu klātbūtne.

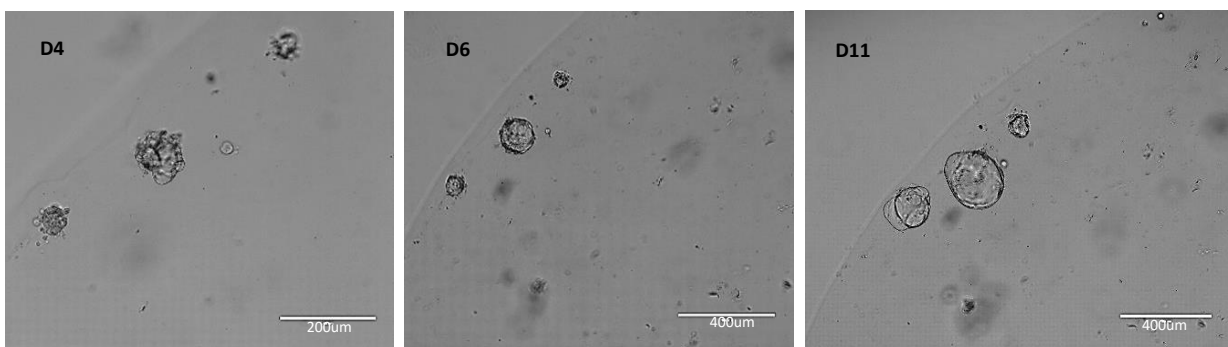
Kopkultūru izveidošana ar šīm šūnām ir iespējama un abi šūnu tipi gelā acīmredzami izdzīvo. Tomēr ir nepieciešama daudz rūpīgāka šādu konstruktū raksturošana, kas ietvertu fenotipisko raksturošanu, šūnu nāves un proliferācijas marķieru analīzi un salīdzināšanu ar atbilstošajām kontrolēm. Varētu izmantot fluorescento konfokālo mikroskopiju, vizualizējošo plūsmas citometriju un gēnu analīzi. Veiksmīga šādu kopkultūru izveidošana varētu ļaut arī identificēt šo šūnu komunikācijā iesaistītos signālceļus.

Šī metode jau tiek pielietota dažādu slimību izpētē, piemēram aizkuņģa dziedzera audzēja, stromas un imūnsistēmas mikrovides organotipisko modeļu veidošanā, vīrusu infekciju modelēšanā (18,29).

3.4. Cilvēka aizkuņģa dziedzera organoīdu izveidošana

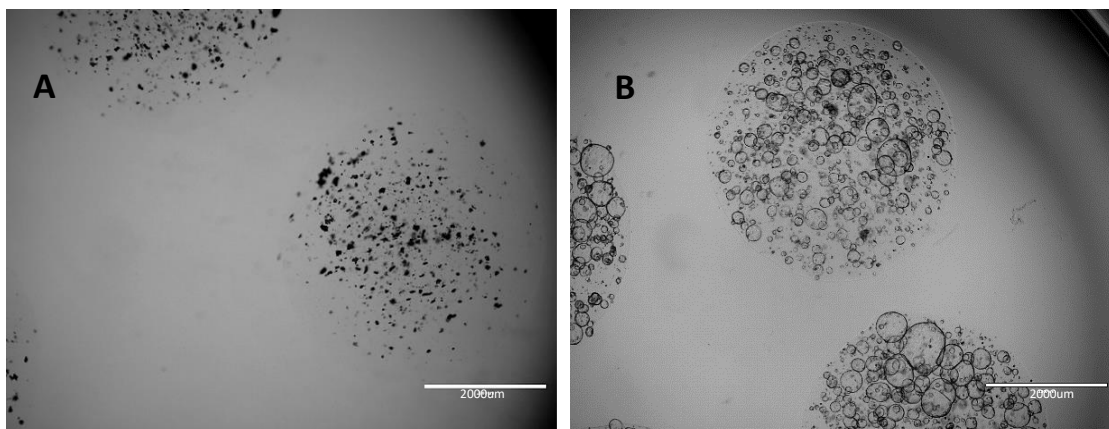
Pirmais cilvēka organoīdu izveidošanas mēģinājums nedeva sekmīgus rezultātus. Kā iespējamais cēlonis, galvenokārt, varēja būt neliels parauga izmērs, kas tika iegūts biopsijas ceļā. Veiksmīgas organoīdu kultūras izveidošanas varbūtība no biopsijas ir ap 30% (38). Pirmais mēģinājums ļāva gūt pieredzi protokola pielietošanā, trūkumu apzināšanā, pilnveidošanā un deva ieskatu vispārīgā organoīdu izveidošanas procesā.

Otrais paraugs sastāvēja no šķietami normālu audu un audzēja audu rezekcijas fragmentiem. Normālu audu gadījumā nelielas organoīdu struktūras bija manāmas jau 4. dienā pēc izsēšanas gelā, 6. dienā atsevišķu organoīdu struktūras bija noformējušās izteiktākā organoīdu struktūrā (3.4.1. attēls), 11. dienā pēc izsēšanas novērojams struktūru palielinājums.



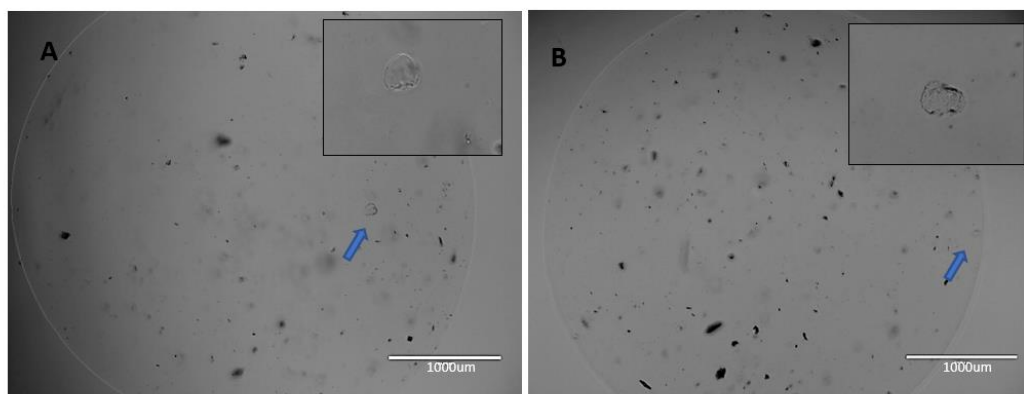
3.4.1. att. Cilvēka aizkuņģa dziedzera normālu audu organoīdu attīstība 4, 6 un 11 dienas pēc izsēšanas gelā

Salīdzinot ar iepriekš iegūtajiem peles aizkuņģa dziedzera organoīdiem, cilvēka organoīdu struktūras attīstās lēni (3.4.2. attēls). Iespējams, tas ir izskaidrojams ar to, ka peļu gadījumā, apstrādājamais paraugs sastāvēja no vesela aizkuņģa dziedzera, tātad no vesela orgāna ar daudziem kanāliņiem. Cilvēka audu materiāla gadījumā, audu paraugs bija neliels, samazinot kanāliņu šūnu klātbūtnes iespējamību. Interesanti, tieši lauciņos, kur vērojams mazāks audu daudzums novērojam organoīdu augšanu. Tas norāda uz audu blīvuma nozīmi izsēšanas laikā. Iespējams, paraugos ir daudz lieko neepitēliālo šūnu, kas iet bojā un traucē kanāliņu šūnu augšanu.



3.4.2. att. Cilvēka un peles modeļa aizkuņģa dziedzera organoīdu augšanas salīdzinājums 4 dienas pēc izsēšanas. (A) Cilvēka normālu audu organoīdi- redzamas nelielas, atsevišķas organoīdu struktūras **(B)** Peles modeļa organoīdi- redzams, ka ir sasniegta pilna konfluence gelā.

Audzēja audu gadījumā tika izveidoti 4 lauciņi, katrā pa četriem 12,5µl pilieniem, kuri sadalīti divās daļās, testējot divu veidu augšanas barotnes- vienu ar EGF un bez Wnt3A kondicionētās barotnes klātbūtnes un otru bez EGF bet ar Wnt3A kondicionēto barotni. Dažādas barotnes tika izmantotas, jo atkarībā no mutāciju klātbūtnes audzēja audos var sagaidīt labāku organoīdu augšanu vienā no šīm barotnēm (38). Barotnē ar EGF faktoru ir novērojamas dažas organoīdiem līdzīgas struktūras, bet, lai tos varētu apstiprināt kā organoīdus ir nepieciešama vēl turpmāka šo struktūru attīstības novērošana. Arī barotnē bez EGF faktora ir novērojama viena organoīdam līdzīga struktūra (3.4.3. attēls) un vairāki gelā izkaisīti audu fragmenti.



3.4.3. att. Cilvēka aizkuņģa dziedzera audzēja rezekcijas audu organoīdi 11. dienā pēc izsēšanas. (A) Organoīdu kultūra, kurai izmantota audzēja 1. barotne (bez EGF, ar Wnt3A kondicionēto barotni). **(B)** Organoīdu kultūra, kurai izmantota audzēja 2. barotne (ar EGF, bez Wnt3A kondicionētās barotnes).

SECINĀJUMI

- 1) Wnt3A un Rspo-1 kondicionētās barotnes ir veiksmīgi izveidotas. Luciferāzes reportiera testa iegūtie rezultāti liecināja, ka pagatavotām barotnēm ir pietiekami augsts Wnt3A un Rspo-1 augšanas faktoru saturs, lai tās varētu tālāk izmantot organoīdu augšanas barotņu pagatavošanā.
- 2) No 5 peļu aizkuņģa dziedzeriem ir veiksmīgi izveidotas 4 organoīdu līnijas, daļa tika sasaldēta, pamazām veidojot organoīdu bibliotēku, tālāku pētījumu veikšanai.
- 3) K19 antivielā dažādi iezīmē peļu organoīdu struktūras- ir redzamas gan vājākas, gan spēcīgākas iezīmes atsevišķās krio-griezumu vietās. Kopkultūru mēģinājums ar peļu nerva fibroblastu kultūru un SHSY5Y šūnu līniju parādīja, ka šūnas spēj gan integrēties organoīdu struktūrās, gan veidot sfēriskus sakopojumus gelā, ārpus organoīda un izdzīvot.
- 4) No cilvēka aizkuņģa dziedzera ir izveidoti normālu audu organoīdi un novēroti atsevišķi organoīdiem līdzīgi veidojumi, audzēja rezekcijas audu paraugos.
- 5) Izveidotos un sasaldētos organoīdu modeļus ir iespējams izmantot tālākā pētniecības attīstībā- pielietojot vēl citas metodes, izpētīt padziļinātāk organoīdu mikrovidi, īpaši audzēju gadījumā.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību savam maģistra darba vadītājam – Dr.Pharm., vadošajam pētniekam Vadimam Parfejevam par doto iespēju izstrādāt maģistra darbu laboratorijā, un gūt savu pirmo pieredzi darbā ar šūnu kultūrām.

Paldies par atvēlēto laiku, vienmēr laipno attieksmi, zināšanām un sniegtajiem padomiem laboratorijas metožu apgūšanā un maģistra darba izstrādē.

Paldies Līgai Kunradei par atvēlēto laiku, luciferāzes reportiera testa veikšanas apmācīšanā.

Paldies arī Saulcerītei par sapratni, atbalstu, motivāciju un padomiem darba izstrādes procesā.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI

1. Longnecker DS. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl Base*. 2017;2.
2. Pelosi E, Castelli G, Testa U. Pancreatic cancer: molecular characterization, clonal evolution and cancer stem cells. *Biomedicines*. 2017;5(4):65.
3. Bakhti M, Böttcher A, Lickert H. Modelling the endocrine pancreas in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(3):155–71.
4. Muraro MJ, Dharmadhikari G, Grün D, Groen N, Dielen T, Jansen E, et al. A Single-Cell Transcriptome Atlas of the Human Pancreas. *Cell Syst*. 2016 Oct;3(4):385-394.e3.
5. Talathi SS, Zimmerman R, Young M. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas. *StatPearls*. StatPearls Publishing: 2021. 653.lpp. [atsauce-29.04.2021]. Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532912/>
6. Mühlemann M. Intestinal stem cells and the Na⁺-D-Glucose Transporter SGLT1: potential targets regarding future therapeutic strategies for diabetes. Universität Würzburg; 2018.
7. Paschou SA, Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocr Connect*. 2018;7(1):R38–46.
8. Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab*. 2017;6(9):943–57.
9. Leppäniemi A, Tolonen M, Tarasconi A, Segovia-Lohse H, Gamberini E, Kirkpatrick AW, et al. 2019 WSES guidelines for the management of severe acute pancreatitis. *World J Emerg Surg*. 2019;14(1):1–20.
10. Forsmark CE. Diagnosis and management of exocrine pancreatic insufficiency. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2018;16(3):306–15.
11. Wei T, Sui H, Su Y, Cheng W, Liu Y, He Z, et al. Research advances in molecular mechanisms underlying the pathogenesis of cystic fibrosis: From technical improvement to

- clinical applications. *Mol Med Rep.* 2020;22(6):4992–5002.
12. Kuzel AR, Lodhi MU, Rahim M. Pancreatic divisum: an unusual cause of chronic pancreatitis in a young patient. *Cureus.* 2017;9(11).
 13. Haeberle L, Esposito I. Pathology of pancreatic cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2019;4.
 14. Saluja AK, Dudeja V. Relevance of Animal Models of Pancreatic Cancer and Pancreatitis to Human Disease. *Gastroenterology.* 2013 May;144(6):1194–8.
 15. Feldmann G, Rauenzahn S, Maitra A. In vitro models of pancreatic cancer for translational oncology research. *Expert Opin Drug Discov.* 2009 Apr 3;4(4):429–43.
 16. Saloman JL, Albers KM, Cruz-Monserrate Z, et al. Animal Models: Challenges and Opportunities to Determine Optimal Experimental Models of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Pancreas.* 2019;48(6):759-779.
 17. Yee N, Pack M. Zebrafish as a model for pancreatic cancer research. *Methods Mol Med.* 2005 Feb 1;103:273–98.
 18. Drost J, Clevers H. Translational applications of adult stem cell-derived organoids. *Development.* 2017;144(6):968–75.
 19. Corrò C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol Physiol.* 2020;319(1):C151–65.
 20. Kim J, Koo B-K, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(10):571–84.
 21. 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. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116(52):26580–90.
 22. Zhao B, Ni C, Gao R, Wang Y, Yang L, Wei J, et al. Recapitulation of SARS-CoV-2 infection and cholangiocyte damage with human liver ductal organoids. *Protein Cell.* 2020;11(10):771–5.
 23. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(7):407–18.

24. Nakamura T, Sato T. Advancing intestinal organoid technology toward regenerative medicine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;5(1):51–60.
25. Huch M, Bonfanti P, Boj SF, Sato T, Loomans CJM, Van De Wetering M, et al. Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J*. 2013;32(20):2708–21.
26. 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 Dev Biol*. 2020;20(1):1–20.
27. Loomans CJM, Giuliani NW, Balak J, Ringnalda F, van Gorp L, Huch M, et al. Expansion of adult human pancreatic tissue yields organoids harboring progenitor cells with endocrine differentiation potential. *Stem Cell Reports*. 2018;10(3):712–24.
28. 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. *Nat Protoc*. 2016;11(9):1724.
29. Tsai S, McOlash L, Palen K, Johnson B, Duris C, Yang Q, et al. Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models. *BMC Cancer*. 2018 Dec 27;18(1):335.
30. Sarantis P, Koustas E, Papadimitropoulou A, Papavassiliou AG, Karamouzis M V. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. *World J Gastrointest Oncol*. 2020;12(2):173.
31. McKenna LR, Edil BH. Update on pancreatic neuroendocrine tumors. *Gland Surg*. 2014;3(4):258.
32. Bekkali NLH, Oppong KW. Pancreatic ductal adenocarcinoma epidemiology and risk assessment: Could we prevent? Possibility for an early diagnosis. *Endosc ultrasound*. 2017;6(Suppl 3):S58.
33. Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A. Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(11):S44–7.
34. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling

pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* (80-). 2008;321(5897):1801–6.

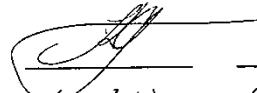
35. Repasky GA, Cox AD, Hanker AB, Mitin N, Der CJ. Role of R-Ras in cell growth. In: *Handbook of Cell Signaling*. Elsevier; 2010. p. 1753–62.
36. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, et al. Human pancreatic tumor organoids reveal loss of stem cell niche factor dependence during disease progression. *Cell Stem Cell*. 2018;22(3):454–67.
37. Zhao C. Wnt Reporter Activity Assay. *BIO-PROTOCOL*. 2014;4(14):e1183.
38. Driehuis E, Gracanin A, Vries RGJ, Clevers H, Boj SF. Establishment of Pancreatic Organoids from Normal Tissue and Tumors. *STAR Protoc*. 2020;1(3):100192.
39. De Lau W, Barker N, Low TY, Koo B-K, Li VSW, Teunissen H, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*. 2011;476(7360):293–7.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

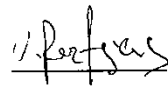
Maģistra darbs "Cilvēka aizkuņģa dziedzera organoīdu 3D modeļa izveide" izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

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

Autors/e: Karīna Goluba
(vārds, uzvārds)


(paraksts) 17.06.2021
(datums)

Rekomendēju/~~nerkomendēju~~ darbu aizstāvēšanai
Vadītājs: Vadošais pētnieks, Vadims Parfejevs, Dr.Pharm.
(amats, vārds, uzvārds, grāds)


(paraksts) 17.15.2021
(datums)

Recenzents/e: _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2021., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: docente Kristīne Saleniece, Dr.pharm. _____
(paraksts)