

**37. OTDK
BIOLÓGIA SEKCIÓ**

**MAGZATOKBÓL SZÁRMAZÓ HUMÁN
HASNYÁLMIRIGY DUKTÁLIS ORGANOIDOK
VIZSGÁLATA, MINT LEHETSÉGES
MODELLRENDSZER**

Készítette:

Batka Boglárka

Biológia hallgató, BSc, III. Évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Kutató intézet: Kórélettani intézet

Témavezető:

Dr. Kiss Lóránd

Tudományos főmunkatárs

SZTE Kórélettani Intézet

Társtémavezető:

Dágó Ágnes

PhD hallgató

SZTE Kórélettani Intézet

Belső konzulens: **Sótiné Dr. Bagyánszki Mária**

egyetemi adjunktus

SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

**SZEGED
2024**

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Bevezető	4
A hasnyálmirigy ontogenezise	4
A hasnyálmirigy tájanatómiája	5
A hasnyálmirigy sejtjei	6
A bikarbonát szekréció mechanizmusa a hasnyálmirigy duktális sejtjeiben	8
A hasnyálmirigyet érintő betegségek	11
Akut pankreatitisz	12
Krónikus pankreatitisz	13
Cisztás fibrózis	14
Modellek és vizsgálati lehetőségek a hasnyálmirigyet érintő folyamatok tanulmányozására	14
Célkitűzés	18
Anyagok és módszerek	19
Felhasznált anyagok	19
Alkalmazott oldatok	19
LWRN kondicionált médium készítése	20
Humán minták gyűjtése	21
Magzati organoidok kialakítása	21
Organoidok tenyésztése és passzálása:	22
mRNS izolálás és reverz transzkripció	22
Kvantitatív PCR reakció	23
Humán organoidok fluoreszcens ko-immunfestése	24
Intracelluláris pH mérése humán organoidokon	25
Statisztikai analízis	26
Eredmények	27
Organoid kultúrák növekedése és morfológiája	27
mRNS expressziós vizsgálatok	28
Fehérje expressziós vizsgálatok	29
Ioncsatorna funkcionális vizsgálatok organoidokon	31
Diskusszió	35
Összefoglalás	36
Köszönetnyilvánítás	37
Irodalomjegyzék	38

Rövidítések jegyzéke

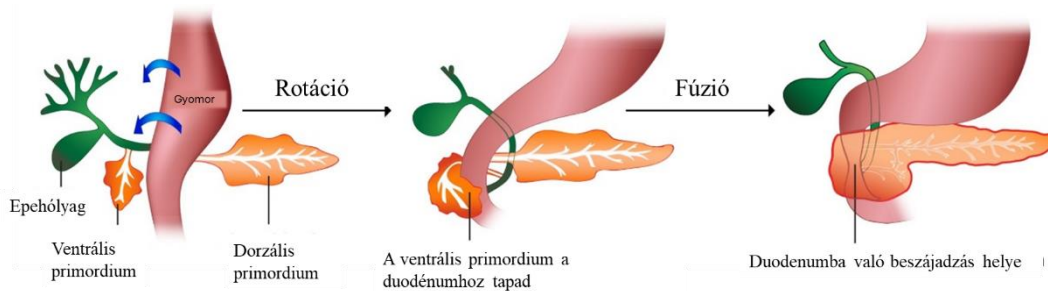
ABC transzporter: ATP-binding cassette transzporter
AP: akut pankreatitisz
BCECF-AM: 2,7-bisz-2-karboxietil-5-(és-6-)karboxifluoreszcein acetoximetil észter
BMP: bone morphogenic protein (csont morfogén fehérje)
BO: blokkoló oldat
BSA: szarvasmarha szérum albumin
cAMP: ciklikus AMP
CF: cisztás fibrózis
CFTR: cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CK-19: citokeratin 19
CP: krónikus pankreatitisz
DM: diabetes mellitus
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF: epidermális növekedési faktor
EIPA: etilizopropil-amilorid
FBS: magzati borjú szérum
FGF: fibroblaszt növekedési faktor
GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GH: gesztációs hét
IL: interleukin
iPSC: indukált pluripotens őssejt kultúra
IRBIT: IP3 receptor-binding protein released with IP3
IP3: inozitol-trifoszfát
NBC: $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporter
NHE: Na^+/H^+ kicserélő
NMDG: N-metil-D-glükamin
OSR1: oxidative stress responsive kinase 1
PAR2: protease activated-receptor 2
PDAC: pankreasz duktális adenokarcinóma
PDZ: post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1)
PKA: protein kináz A
PKC: protein kináz C
PLC: foszfolipáz C
PP: pankreasz polipeptid
ROI: region of interest
SLC26A6: solute carrier 26 A6 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő)
SPAK: SPS sterile 20-related proline alanin rich kinase
TBS: tris puffereelt sóoldat
TGF- β : transzformáló növekedési faktor béta
WNK: with-no-lysine
Wnt: wingless-related integration site

Bevezető

A hasnyálmirigy egy külső és belső elválasztású mirigy. A külső elválasztású exokrin része az emésztőenzimek termelését végzi, míg a belső elválasztású része különböző hormonok szekréciójáért felelős. Számos fontos megbetegedés társulhat a szerv kóros működéséhez, melyek akár halálhoz is vezethetnek. A hasnyálmirigy fiziológiai és pathofiziológiai folyamatai csak részben tisztázottak, ezért a további vizsgálatokat lehetővé tevő modellrendszerek, amik a dolgozat fő fókuszában állnak igen fontosak. A dolgozatban bemutatásra fog kerülni a hasnyálmirigy fejlődése, működése és bizonyos betegségei, illetve egy lehetséges *in vitro* hasnyálmirigy modellrendszer karakterizálása.

A hasnyálmirigy ontogenezise

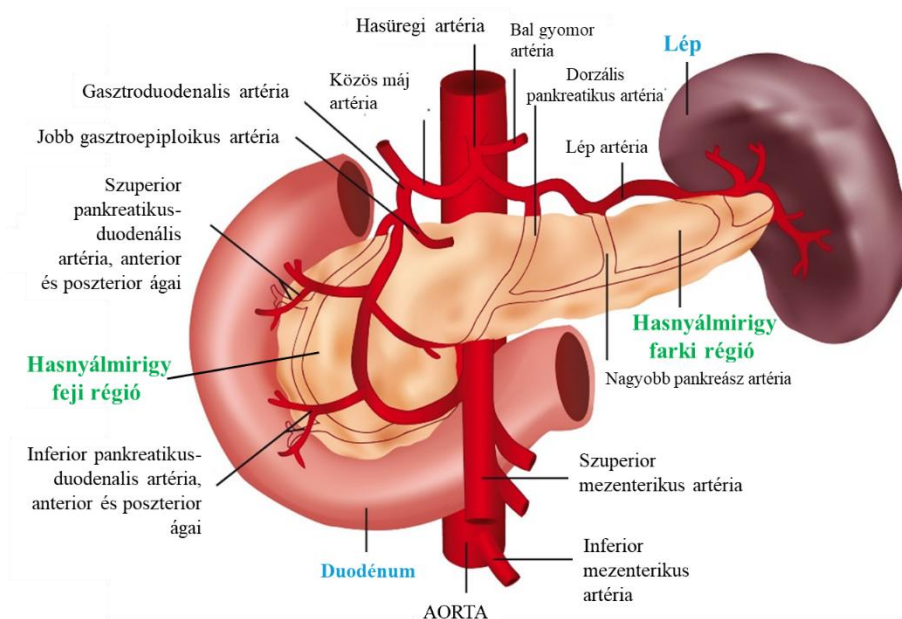
A hasnyálmirigy az ontogenezis során az előbél endodermális epithéliumából keletkezik. A 2-3. gesztációs hét (GH) bekövetkezésekor két primordium keletkezik az előbélből, mint hasnyálmirigy kezdemény. Ezek a primordiumok a ventrális és a dorzális nevet kapták, a retroperitoneumban elfoglalt helyzetükre utalva. A dorzális primordiumból képződik a hasnyálmirigy teste és farka, ez fejlődik ki hamarabb és adja a szerv nagyobbik részét. A ventrális részből a processus uncinatus és a hasnyálmirigy fej alakul ki. A primordiumoknak ekkor még önálló vezetékekből álló rendszere van, nincs összeköttetésük egymással. Az embriogenezis során, a 7. gesztációs hét alatt a gyomor és a bél csavarodása következtében a ventrális primordium a dorzálishoz fúzionál (1. ábra). A fúzió következtében alakul ki továbbiakban a közös epe- és hasnyálmirigy vezeték. A második és harmadik gesztációs hónapokban differenciálódnak a hasnyálmirigy acinus, duktális és endokrin sejtek, majd megjelennek a zimogén granulomok is (McClellan és Weaver, 1993; Henry és mtsai., 2019).



1.ábra A hasnyálmirigy az ontogenezis során. A gyomor és a duodenum rotációja a ventrális primordium elmozdulásához vezet, így az a dorzális primordium mögött és alatt fog elhelyezkedni. A hetedik gesztációs hét alatt megtörténik a két primordium fúziója, amiből a hasnyálmirigy származik. Forrás: Henry és mtsai., 2019

A hasnyálmirigy tájanatómiája

A humán hasnyálmirigy a második legnagyobb mirigyes állományú szerv az emberi szervezetben (An és mtsai., 2023). A szerv hossza 14-18 cm, 2-9 cm széles és 2-3 cm vastag, tömege 50-100 g (Dolenšek és mtsai., 2015). A hasüreg felső részében helyezkedik el a gyomor mögött és a gasztrointesztinális rendszer része. Külső és belső elválasztású mirigyrendszerből épül fel (Longnecker, 2021). Makroszkópiusan 3 részre lehet tagolni: fej, test és fark, amelyeket nem lehet teljesen elhatárolni egymástól.



2. ábra A hasnyálmirigy anatómiája és erei. A humán hasnyálmirigy feji része a duodenum kanyarulatában helyezkedik el, a farki része a lép hilussal van kapcsolatban. Az ábrán látható továbbá a szervhez kapcsolódó főbb véredények. Forrás: Henry és mtsai., 2019

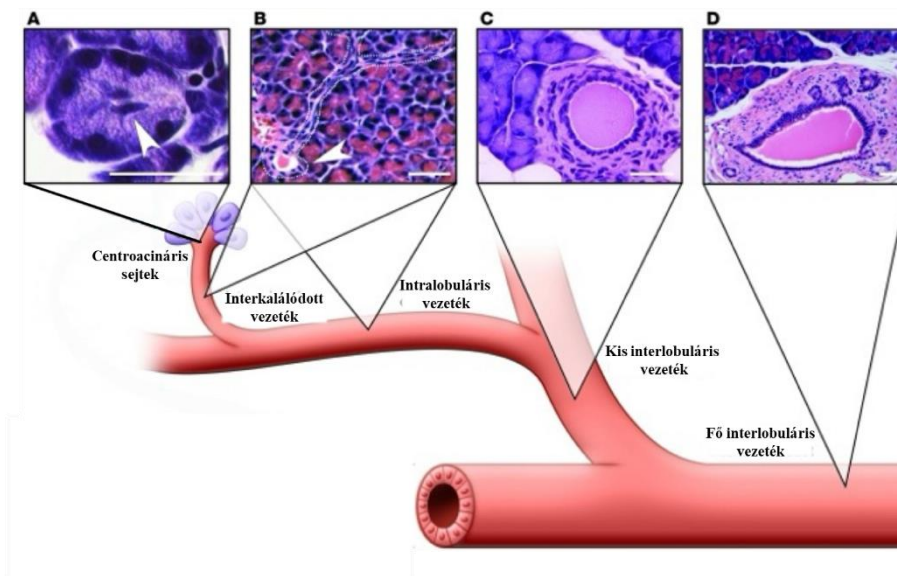
A hasnyálmirigy fej része a duodenum kanyarulatában fekszik. A farki rész a lép hilussal áll kapcsolatban. A hasnyálmirigy teste a gyomor hátulsó disztális részénél fekszik. A szerv gazdag vér- és nyirokérellátottsággal rendelkezik. A hasnyálmirigy hátsó felszíne sokféle érképlettel érintkezik: arteria mesenterica superior, vena mesenterica superior, vena portae, vena cava inferior és aorta. A duodenum kanyarulatában található minor papillába ágazik a hasnyálmirigy mellékvezetéke és ez alatt helyezkedik el a Vater papilla, amelybe a fő hasnyálmirigy vezeték ágazik be. A közös epevezeték a hasnyálmirigyfej mellett halad át, amely egybeágazik a fővezetékkel (2. ábra). A hasnyálmirigy nyirokrendszere gazdagon elágazik az egész szerv területén. Megkülönböztetünk szervközeli/elsődleges nyirokcsomókat és távolabbi/másodlagos nyirokcsomókat. Az elsődlegesek a szerv szélén helyezkednek el, míg a másodlagosak az erek közelében. Gazdagon innervált szerv, mely szimpatikus és paraszimpatikus beidegzést is kap a

nervus vagus afferens rostjai által. Ezek neurotranszmittereket szekretálnak a hasnyálmirigy célsejtjeinek (Dolenšek és mtsai., 2015; Longnecker, 2021).

A hasnyálmirigy sejtjei

A hasnyálmirigy felépítése egy elágazó fához hasonlító rendszer, amely acinusokból és duktális sejtekből áll, továbbá az ezekhez asszociálódott erek, nyirokerek, kötőszövetek és idegek. Az exokrin rész mirigyes lobulosokból épül fel, melynek fő struktúrája az acinus, amely piramis morfológiájú sejtekből áll. Az acinus terminális részénél helyezkednek el a centroacináris sejtek, amik kapcsolatban állnak a terminális duktális epithéliummal. A proximális részen a duktális sejtek morfológiája kuboidális, a disztális részen pedig oszlopszerű, laposabb. A hasnyálmirigy fővezetéke az interlobuláris vezetékbe ágazik, ezután pedig az intralobulárisba, amely az interkaláris vezetékkel folytatódik, amely közvetlen kapcsolatban áll a centroacináris sejtekkel (3. ábra). Ez a rendszer hálózatszerűen ágazik szerte a hasnyálmirigyben. Az exokrin szöveti komponensek több mint 96-99%-ban teszik ki a hasnyálmirigy tömegét, míg az endokrin rész a maradék 1-4%-ban. (Dolenšek és mtsai., 2015).

Az endokrin sejtek az exokrin szövetállományban elszórtan helyezkednek el, ezek úgynevezett Langerhans-szigeteket alkotnak. A szigetek morfológiája cirkuláristól oválisig terjed és jól elkülöníthetőek. Ezek az endokrin sejtek különböző polipeptid hormonokat termelnek. A legnagyobb mennyiségben (50-70%), a béta sejtek fordulnak elő, amelyek inzulint szintetizálnak és szekretálnak. Az alfa sejtek 20-40%-ban fordulnak elő és glukagont szekretálnak. A Langerhans szigetek delta sejtjei szomatosztatint, a pancreas polipeptid sejtek (PP) pancreas polipeptidet szekretálnak és kevesebb, mint 10%-ban találhatóak meg az endokrin állományban. Az epsilon sejtek által szekretált hormon a ghrelin. Ezek a sejtek kevesebb, mint 1%-ban alkotják az állományt (Dolenšek és mtsai., 2015).



3. ábra Az exokrin hasnyálmirigy két fő sejtípusa, az acinus és duktális sejtek. Az ábrán látható a hasnyálmirigy fő duktális vezetékének hálózata és kapcsolatuk egymással. (A) A centroacináris sejtek az (B) interkalálódott vezetékkel vannak összeköttetésben, amely az (C) intralobuláris vezetékbe ágazik, majd a kisebb interlobuláris vezetékbe, ez pedig a (D) fő interlobuláris vezetékhez kapcsolódik. Forrás: Reichert és Rustgi, 2011

Következőekben az exokrin mirigyállomány sejtjeinek tárgyalásáról lesz szó. Az acinus sejtek felelősek a hasnyálmirigy emésztőenzimeinek termeléséért, szekretálásáért és raktározásáért. Az általuk szekretált folyadék NaCl-ban gazdag (Hegyi és Rakonczay, 2015). Az emésztőenzimek zimogén granulomokban proenzimek formájában vannak jelen a sejtekben és a hasnyálmirigyen belül. Ezeket az emésztőenzimeket az enteropeptidáz aktiválja a duodénumban, ezért kulcsfontosságú szerepe van az emésztés folyamatában. Az emésztő enzimek lehetnek proteolitikus, lipolitikus, nukleolitikus és glikolitikus tulajdonságúak. Az inaktív proenzimekhez tartozik például az elasztáz, pepszinogén, dezoxiribonukleáz, ribonukleáz, tripszinogén, kimotripszinogén és a prokarboxipeptidáz. Illetve ezek mellett az amiláz, amely szénhidrátbontó tulajdonsággal rendelkezik, a lipáz, amely zsírsavakat bont, a foszforiláz, amely foszfátsoport hozzáadását katalizálja. A tripszinogén aktivációjával tripszin keletkezik, amely a többi zimogén formában lévő enzim aktivációját is kiváltja (Bonal és mtsai., 2008; Saluja és mtsai., 2019; Pallagi és mtsai., 2015; Hegyi és mtsai., 2011).

A duktális sejtek fő feladata a bikarbonát (HCO_3^-) és folyadék szekréció (Pallagi és mtsai., 2015). Napi 2,5L hasnyálat szekretálnak a duktális sejtek (Hegyi és Rakonczay, 2015). A termelt hasnyál 140mM NaHCO_3^- tartalmaz, ami által a pH alkalikus tartományba kerül (pH 8,0 - 8,5) így, semlegesíti az acinusok által termelt savas összetételű folyadékot és beállítja a megfelelő pH-t az acinussejtek által szekretált enzimeknek. Ezzel megakadályozza ezen enzimek idő előtti aktiválódását, és a hasnyálmirigy önemésztődését (Angyal és mtsai., 2021).

A bikarbonát szekréció mechanizmusa a hasnyálmirigy duktális sejtjeiben

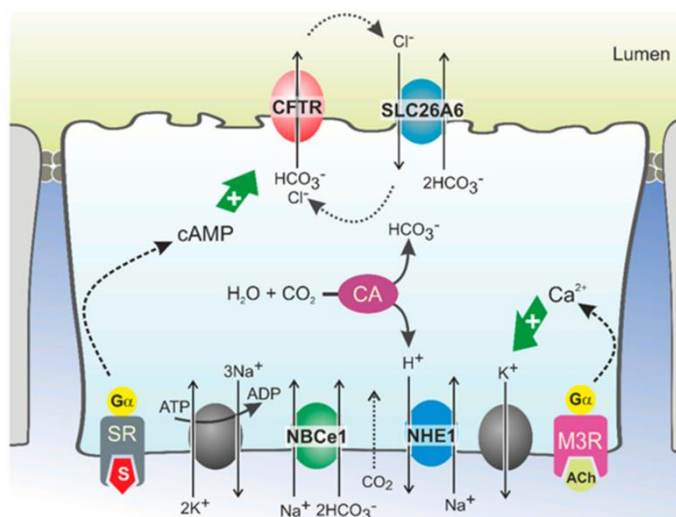
A hasnyálmirigy duktális HCO_3^- szekréciója egy komplex folyamat, 2 részre oszthatjuk. Először is a HCO_3^- felvételére a duktusz sejtbe, amely a bazolaterális membránon elhelyezkedő transzportrendszerekkel valósul meg. Ilyen rendszerekhez tartozik az NBC ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporter) és az NHE (Na^+/H^+ kicserélő). A HCO_3^- bejuthat még passzívan a sejtmembránon keresztül diffundálva is CO_2 formájában. A második része a folyamatnak a HCO_3^- szekréciója az apikális membránon a hasnyálmirigy duktális epithél sejtjein keresztül a lumenbe. Kiemelkedő szerepe van ebben a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátornak (CFTR) és a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélőknek (Pallagi és mtsai., 2015).

A CFTR fehérje a duktuszok apikális membránjában foglal helyet, mint egy cAMP által szabályozott anion csatorna. A CFTR az ABC-transzporter szupercsaládba tartozó fehérje (ATP-binding cassette). ATP hidrolízise által keletkező energiát hasznosítja az iontranszporthoz. Az ABC transzporterek 2 doménből állnak, nukleotid kötő doménekből és transzmembrán kötő doménekből. Ezen kívül tartalmazznak még membránt áthidaló alfa helikális motívumokat és szabályozó doméneket, amelyek a protein kináz A (PKA) és protein kináz C (PKC) által foszforilálódhatnak szignalizációs kaszkádokban. A CFTR megtalálható különböző szervek epithéliumában, például tüdőben, májban, emésztőtraktusban, reproduktív traktusban és a bőrben is. 3-5x nagyobb szelektivitása van a Cl^- ionnal szemben, mint a HCO_3^- ionnal viszont az extracelluláris Cl^- meghatározó paraméter a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ szekrécióban. Amikor a Cl^- fiziológiás koncentrációban jelen van a proximális hasnyálmirigy vezetékek lumenében, akkor a CFTR Cl^- csatornaként funkcionál, viszont, ha lumenális és intracelluláris Cl^- koncentráció alacsony a disztális hasnyálmirigy vezetékeknél, a CFTR HCO_3^- ionokat szekretál az apikális membránon keresztül (Pallagi és mtsai., 2015).

A táplálkozás közben és után jelentős mértékben aktiválódnak mind az acinus mind a duktális sejtek. Ezek, az emésztőenzimeket és a hasnyálat termelik, amelyek több különböző gasztrointesztinális hormonon és kolinerg beidegzésen keresztül mediáltak. HCO_3^- szekréció neuroendokrin bemenete a vago-vagális beidegzésen keresztül valósul meg. A HCO_3^- szekréció fokozódik szekretin, vazóaktív intersticiális peptid, bombesin és acetilkolin hatására, ezek következtében nő az intracelluláris cAMP szint, ezzel párhuzamosan az intracelluláris Ca^{2+} szint is és ez stimulálja a G-proteinhez kapcsolt receptorokat, míg a szekréció csökken szerotonin, substance P, arginin vazopresszin, és ATP hatására (Ishiguro és mtsai., 2012).

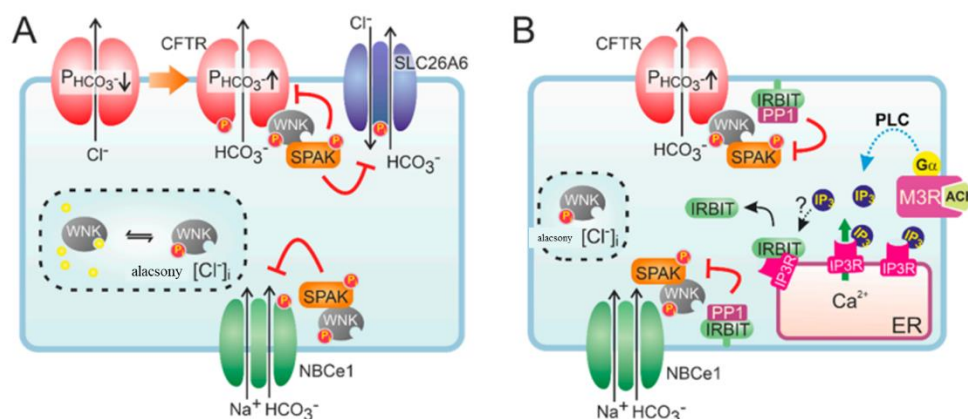
A szekretin étkezés után a duodénum enteroendokrin sejtjeiből, pontosan az S-sejtekből szabadul fel és a véráram útján jut el a bélcsatorna lumenébe, ahol bekötődik a G_s protein alfa

alegységéhez, ami aktiválja az adenilát-cikláz, így emelkedik a cAMP szint. Magas cAMP szint indukálja a PKA-t, ami foszforilálja a CFTR szabályozó doménjét, így az aktiválódik és megtörténik a HCO_3^- szekréció (Pallagi és mtsai., 2015). A duktális epithélium funkciójához számos ioncsatorna és transzporter fehérje hozzájárul. A bazolaterális felszínen funkcionáló, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporter más néven NBC, jelentős szerepet játszik a HCO_3^- intracelluláris bejuttatásában. A transzporterén keresztül közvetlenül 2 HCO_3^- és 1 Na^+ jut be a sejtbe. Ezt a transzportot az elektrokémiai gradiens teszi lehetővé, amit a Na^+/K^+ ATP-áz a Na^+ folyamatos eltávolításával ér el. A HCO_3^- közvetlen transzportján felül, a szénsav-anhidráz a passzív diffúzióval bejutott CO_2 -t átalakítja HCO_3^- -á és H^+ -á. Így indirekt módon is bejut a HCO_3^- a sejtbe. Ebben a reakcióban képződött H^+ -t az NHE löki ki a bazolaterális membránon keresztül, a keletkezett HCO_3^- pedig az apikális membrán felé vándorol és szekretálódik a lumenbe a CFTR vagy a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélők (SLC26A6, SLC26A3) által. Az intracelluláris HCO_3^- kijut a lumenbe a korábban említett transzportrendszeren keresztül és az ott jelen lévő Cl^- ionokra cserélődik ki, amelyet aztán a CFTR újra hasznosít. Amikor az acinus sejtek által szekretált Cl^- -ban gazdag folyadék képződik, a HCO_3^- szekréció az apikális membránon keresztül, az SLC26A6 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő által van mediálva, ennek következtébe HCO_3^- szekréció és Cl^- felvétel történik, így a lumenális Cl^- szint csökken, míg a HCO_3^- nő, ahogy a szekretált folyadék végig halad a duktális hálózaton keresztül (4.ábra) (Angyal és mtsai., 2021; Pallagi és mtsai., 2015; Ishiguro és mtsai., 2012).



4. ábra A HCO_3^- szekréció modellje a hasnyálmirigy duktális sejtjeiben. A felszabadult szekretin (S) és acetilkolin (ACh) sekenti a cAMP termelést és az intracelluláris Ca^{2+} szintet növelik, amely stimulálja a G-protein kapcsolt receptorokat, amely így serkenti a Na^+ függő HCO_3^- transzportot a bazolaterális oldalon. Ebben a folyamatban az NBC és az NHE vesz részt. A szénsav-anhidráz (CA) által katalizált folyamat során is keletkezhet HCO_3^- a sejtben. Az így felhalmozódott HCO_3^- -t az apikális transzportrendszerek (CFTR, SLC26A6) exportálják a lumenbe. Forrás: Angyal és mtsai., 2021

A HCO_3^- szekréciót jelentősen befolyásolja és szabályozza a With-No-Lysine (WNK), az SPS Sterile 20-related proline alanin rich kinase (SPAK) és az oxidative stress responsive kinase 1 (OSR1). A CFTR által szabályozott dinamikus anion transzport befolyásolható, hogy szelektív legyen a HCO_3^- szekrécióra. Ezt a WNK mediálja, amely szabályozza továbbá az OSR1 és a SPAK aktivitását. A WNK kinázok ozmotikus stressz szenzornak tekinthetők és az alacsony intracelluláris Cl^- koncentráció aktiválja őket. Ezeknek a kinázoknak a mutációja magas vérnyomáshoz és szabálytalan NaCl re-abszorpcióhoz vezet. Nyugalmi állapotban a WNK/SPAK útvonal csökkenti az expresszióját és aktivitását a HCO_3^- transzportereknek (például SLC26A6, CFTR, NBC). A CFTR aktivitása által csökken az intracelluláris Cl^- koncentráció, amely a WNK kináz autofoszforylációjához vezet, így aktivált állapotba kerül. Ezután hozzáköt a CFTR-csatornához és fokozza a permeabilitását HCO_3^- -ra. Ugyanakkor a WNK/SPAK útvonal aktivációja gátolja az apikális membránon elhelyezkedő HCO_3^- transzportereket beleértve a CFTR-t is (5/A. ábra). Továbbá meg kell említeni még az IP_3 (inozitol-trifoszfát) Receptor-Binding Protein Released With IP_3 útvonalat (IRBIT) is, amelynek esszenciális szerepe van az HCO_3^- szekréció szabályozásában (5/B. ábra). Az IRBIT antagonistája a WNK/SPAK útvonalnak. Az apikális és bazolaterális membránnál lokalizálódik a PDZ-doménjével. Az IRBIT az IP_3 receptorán keresztül kötődik a foszfolipáz C-hez (PLC), amely fokozza az IP_3 szekréciót. Így hozzájárul a Ca^{2+} és a cAMP felszabaduláshoz, ezáltal szintén serkenti a CFRT aktivitását, HCO_3^- szekréciót és aktiválja az apikális oldalon elhelyezkedő Cl^- és HCO_3^- transzportereket, továbbá közreműködik a bazolaterális felszínen az NBC-vel és az NHE-vel is (Angyal és mtsai., 2021; Pallagi és mtsai., 2015; Ishiguro és mtsai., 2012; Kim és mtsai., 2020).



5. ábra (A) WNK/SPAK útvonal, (B) IRBIT szerepe és mechanizmusa a HCO_3^- szekrécióban. (A) Az alacsony intracelluláris Cl^- ion koncentráció hatására a WNK autofoszforylációja következik be, de a WNK-hoz kötődhet a SPAK, amely (foszforyláció mediálta folyamat) mérsékli a HCO_3^- transzporterek aktivitását. (B) Az IRBIT-nek antagonista hatása van a WNK-SPAK útvonallal szemben. Serkenti a dukális szekréciós mechanizmust azáltal, hogy serkenti a sejtfelszíni expressziót és aktiválja a Cl^- és HCO_3^- transzportereket. Forrás: Angyal és mtsai, 2021

A hasnyálmirigyet érintő betegségek

A hasnyálmirigy endokrin és exokrin része anatómiailag szorosan kapcsolt, illetve valamely rész zavara kihat a másikra. A hasnyálmirigy exokrin részét érintő és az egyik legnagyobb mortalitással rendelkező gasztrointesztinális megbetegedésekhez tartozik az akut pankreatitisz, (AP), a krónikus pankreatitisz (CP) és a hasnyálmirigy rák. Az akut és a krónikus gyulladása a hasnyálmirigynek bekövetkezhet túlzott mennyiségű alkohol fogyasztás, az emésztőenzimek idő előtti aktiválódása és hipertrigliceridémia miatt. A hipertrigliceridémia egy metabolikus rendellenesség, amely során a szérum vagy plazma trigliceridszintje 1,7mM (Kiss és mtsai., 2023) értéknél magasabb. Epekő által okozott elzáródás a Vater papillánál is lehet kiváltó tényező a gyulladásban (Hegyi és mtsai., 2011; Czako és mtsai., 2009). Az akut gyulladás sorozatosan kiújulhat, illetve tovább fajulhat krónikus gyulladássá is. Ezek a rendellenességek mind a hasnyálmirigy rák kialakulásához vezet. Mindegyik exokrin részt érintő betegség elfogadhatatlanul magas mortalitással jár (Hegyi és mtsai., 2011).

A hasnyálmirigy endokrin részét érintő rendellenesség közül a diabetes mellitus-t (DM), emelném ki. Az exokrin szövet előbbieken említett rendellenességei mind kiválthatják a DM-t. Több állati és humán modell is kimutatta az exokrin hasnyálmirigy csökkent szekréciós képességét mind az inzulin-dependens és nem-inzulin-dependens DM-ban. A DM emellett elkerülhetetlenül okoz kiegyensúlyozatlanságot a sziget sejtek hormon szintjeiben. DM pácienseknél a hasnyálmirigy atrófiája is jellemző (Pallagi és mtsai., 2015).

Akut pankreatitisz

A hasnyálmirigy exokrin állományának kóros gyulladásos megbetegedése az akut pankreatitisz (AP), amely a mai napig kihívást jelentő gasztrointesztinális megbetegedés (Pallagi és mtsai., 2015). Magas mortalitású, komplex kóros állapot, amely mind a dukális és acinus sejteket érinti (Angyal és mtsai., 2021). A betegség súlyosság alapján való csoportosítása magába foglalja az enyhe, közép súlyos és súlyos fokozatokat, melyekből a közép súlyos és súlyos esetek kimenetele rendkívül lesújtó a magas mortalitás miatt. Az AP újra kialakulhat, illetve krónikus pankreatitisz (CP) is kifejlődhet belőle. Jelenleg nincs kifejlesztett terápia az AP betegségre sem a komplikációkra, csakis fájdalomcsillapítás és szupportív kezelés, így a kezelés során a mérséklésen van a hangsúly (Szatmáry és mtsai., 2022). Számos kiváltó oka lehet a betegségnek, például túlzott etanol fogyasztás, dohányzás, epés-megbetegedések és hipertrigliceridémia. A diagnózis felállítása során három tényezőből kettőnek jelen kell lennie: (1) folyamatos, kitartó, súlyos, néha a hátra is kiterjedő hasi fájdalom (2) szérum lipáz/amiláz aktivitása 3x nagyobb a normális értékénél (3) különböző képalkotó eljárások, amelyek alátámasztják a gyulladásos (ödéma és/vagy nekrosis) elváltozásokat (kontrasztanyagok komputertomográfia, mágneses rezonancia képalkotás, ultrahang stb.) (Barreto és mtsai., 2021; Banks és mtsai., 2013).

A legfőbb mechanizmus az AP kialakulása során a patológiásan magas intracelluláris Ca^{2+} koncentráció. A Ca^{2+} , az endoplazmatikus retikulumban raktározódik és a felszabadulási folyamata a citoszolba illetve a mitokondriumba inozitol-trifoszfát, ryanodin receptorokon és Ca^{2+} csatornákon át történik koleszterokinin és acetilkolin serkentett útvonalon keresztül. A Ca^{2+} felszabadulás jelentős mértékben fokozódik a hasnyálmirigy számára toxikus vegyületeket jelenlétében. Ilyen toxikus vegyületek például az epesavak, zsírsavak, és alkohol. A magas intracelluláris Ca^{2+} koncentráció és az aktiválódott emésztőenzimek miatt vagy a kiváltó tényezők miatt (alkohol, hipertrigliceridémia) a mitokondriumok funkciója károsodik, és leáll az ATP termelés. Ennek következménye, hogy számos apikális és bazolaterális transzportfolyamat gátolva lesz, a sejtek károsodnak és elpusztulnak (Barreto és mtsai., 2021; Maléth és mtsai., 2015).

A szekréciós granulomokban tárolt proenzimek korai aktivációja kiterjedt károkat okoz a hasnyálmirigyben. Normál fiziológiás esetben számos mechanizmus védi az acinus sejteket a proenzimek korai aktivációjától, így meggátolva az AP kialakulásához vezető utat. Ilyen például a protease-activated-receptor 2 (PAR2) és a tripszin inhibitor. Azonban a zimogén granulomok és lizoszómák fúziója következtében a tripszinogént, a katepszin B (lizoszómális

hidroláz) hasítja és így túl sok tripszint aktivál, amit a normál folyamatok már nem tudnak gátolni. A katepszin B által keletkezett tripszin hatására megnő a permeabilitása a granulomoknak, ezáltal a katepszin B kiszivárog a citoszolba és acinus károsodáshoz, majd sejthalálhoz fog vezetni. A sejthalálban szerepe van az inflammoszómáknak, endoplazmatikus retikulum stressznek, autofágiának és mitokondriális diszfunkciónak. A nukleáris faktor kappa B aktivációja a túlzott mennyiségű folyamatos Ca^{2+} szint miatt következik be. Az aktiváció következtében gyulladást okozó mediátorok szabadulnak fel, például interleukinek (IL-1, IL-6, tumor nekrosis faktor alfa, IL-17), ennek következtében ez a folyamat szisztémás gyulladást okozhat.

Az acinus sejteken felül a duktális sejteknek is fontos szerepe van az AP kialakulásának és progressziójának mechanizmusában. Az acinusok enzimgazdag szekrétuma savas kémhatású és klorid-ionokban gazdag, amiben a proenzimek könnyen aktiválódnak. Azonban a duktusok által szekretált HCO_3^- -ban gazdag folyadék lúgosítja a hasnyálmirigy duktuszaiban az acinusok szekrétumát. Ez a folyamat korlátozza a duktusok csatornáiban a tripszinogén idő előtti aktivációját. Epekő okozta AP-ben amikor kisebb kövek érintik a Vater papillát és így azt eltömítik, epesavak juthatnak a duktusz csatornába. Az epesavak alacsony koncentrációban duktális HCO_3^- szekréciót indukálnak, amely lehet egyfajta védekező mechanizmus. Ezzel a toxikus epesavak kimosódnak a duktális rendszerből és megvédik az acinus sejteket. Ha nem megfelelő ez a mechanizmus, az acinus sejtekben megemelkedik az intracelluláris Ca^{2+} és a fent említett patológiás folyamatok indulnak el (Saluja és mtsai., 2019; Baretto és mtsai., 2021; Maléth és mtsai., 2015; Hegyi és mtsai., 2011).

Krónikus pankreatitisz

A krónikus pankreatitisz (CP) egy progresszív gyulladásos megbetegedés, amely visszaállíthatatlan károkat okoz a hasnyálmirigyben. Ennek oka lehet például genetikai háttér (CFTR mutációk), többször és rendszeresen kialakuló AP, és túlzott mértékű alkoholfogyasztás. Hisztológiai vizsgálatok által a CP következménye az acinus sejtek elhalása, mononukleáris sejt infiltráció és interlobuláris/intralobuláris/periduktális fibrózis. A következmény az exokrin és endokrin állomány funkció vesztese, ami hasnyálmirigy elégtelenséghez vezet.

A képalkotó eljárások közül kiemelkedő a szekretin érzékenyített mágneses rezonancia kolangiopankreatográfia. Nem invazív eljárás, amely képet ad a hasnyálmirigy, epevezeték és epehólyag alkotta hálózatról. Ez által felbecsülhető a hasnyálmirigy szekréciós volumen,

feltérképezhető az exokrin funkció mértéke, duktális anomáliák észrevétele, a kommunikáció vizsgálata a hasnyálmirigy hálózat között, pszeudociszták, fekélyek és az Oddi-sphincter diszfunkciója (Pallagi és mtsai., 2015).

Cisztás fibrózis

A cisztás fibrózis (CF) vagy más néven muciviscidosis egy potenciálisan halálos, több szervet érintő betegség, amelyet a CFTR gén mutációja okoz. Továbbá az akut pankreatitisz, krónikus pankreatitisz és a hasnyálmirigy adenokarcinómája is a CFTR gén meghibásodásához köthető betegségek. Jelenleg több mint 100000 embert érint világszerte és a paciensek száma 2025-re 50%-kal emelkedni fog (Angyal és mtsai., 2021). Hat féle csoportba sorolhatók be a CFTR gént érintő mutációk. 1.) defektív fehérje termelés, 2.) defektív fehérje érés 3.) defektív csatorna reguláció, 4.) defektív ion csatorna vezetés 5.) csökkent fehérjeszintézis, 6.) csökkent fehérje stabilitás. A leggyakoribb mutáció az 508-as pozícióban lévő fenilalanin delécióna, ami a mutációk 2. csoportjába sorolható. Annak ellenére, hogy a cisztás fibrózissal küzdők várható élettartama nőtt, az átlag halálozási kor 40 év, amiért elsősorban a respiratorikus elégtelenség a felelős. A génmutáció okozta következmények a hasnyálmirigynél széles körűek. A hasnyálmirigy duktális folyadék és elektrolitok CF páciensekben savas kémhatásúak az elégtelen szekréció következtében, ami váladék kicsapódáshoz és emésztőenzimek korai aktiválódáshoz vezet a duktális lumenen belül, ami cisztaképződést és hegesedést (fibrózist) okoz a szöveten belül. Így az acinus és duktális sejtek károsodásának szövődménye hasnyálmirigy elégtelenségéhez vezet. A CF továbbá minden olyan szervet/szervrendszert érint (tüdő, légutak, hasnyálmirigy, mellékhere vezeték), ami epithél sejteket és ezáltal CFTR-csatornát tartalmaz (Angyal és mtsai., 2021; Pallagi és mtsai., 2015).

Modellek és vizsgálati lehetőségek a hasnyálmirigyet érintő folyamatok tanulmányozására

Az állati modellek esszenciálisak a kutatásban, mivel ezekkel a humán szövetek felhasználást tudjuk csökkenteni. Az állati modellek lehetővé tették, hogy új ismeretekkel gyarapítsuk a tudásunkat például a sejtek szignalizációs, proliferációs és differenciálódási útvonalaiban, gyógyszer-, hatóanyag- és rákkutatásban. Ezeknek az állati modelleknek az előnyei közé tartozik a gyors növekedés, az egyszerűbb élettani felépítés ismertsége, nagyszámú utód létrehozása kevés idő alatt, beltenyésztés lehetősége és a költséghatékonyság.

Ezen modellek segítségével *in vivo* kísérleteket tudunk elvégezni, melyeknek célja élő szervezetben különböző folyamatok, betegségek és az ezekre adott sejtes válaszok közötti összefüggések vizsgálata. Az állati modellekből következtetünk az emberben lejátszódó folyamatokra. Azonban rengeteg biológiai folyamat az emberben kisebb-nagyobb mértékben eltérhet az állatokban, és a komplex folyamatok vizsgálata korlátozott általuk. Az állati modellek által elért sikeres eredmények transzlációja emberre a rákkutatásban kevesebb mint 8%. Sajnos ez a transzlációs arány azért olyan alacsony, mert döntő jelentőségű gének térnek el számos esetben rágcsálók és humánok között, ebből kifolyólag az állati modellek bizonyos szintig replikálni tudják a kórfolyamatokat, de nem tudják elég effektíven modellezni a humánokban lejátszódó folyamatokat (Mak és mtsai., 2014; Kim és mtsai., 2020).

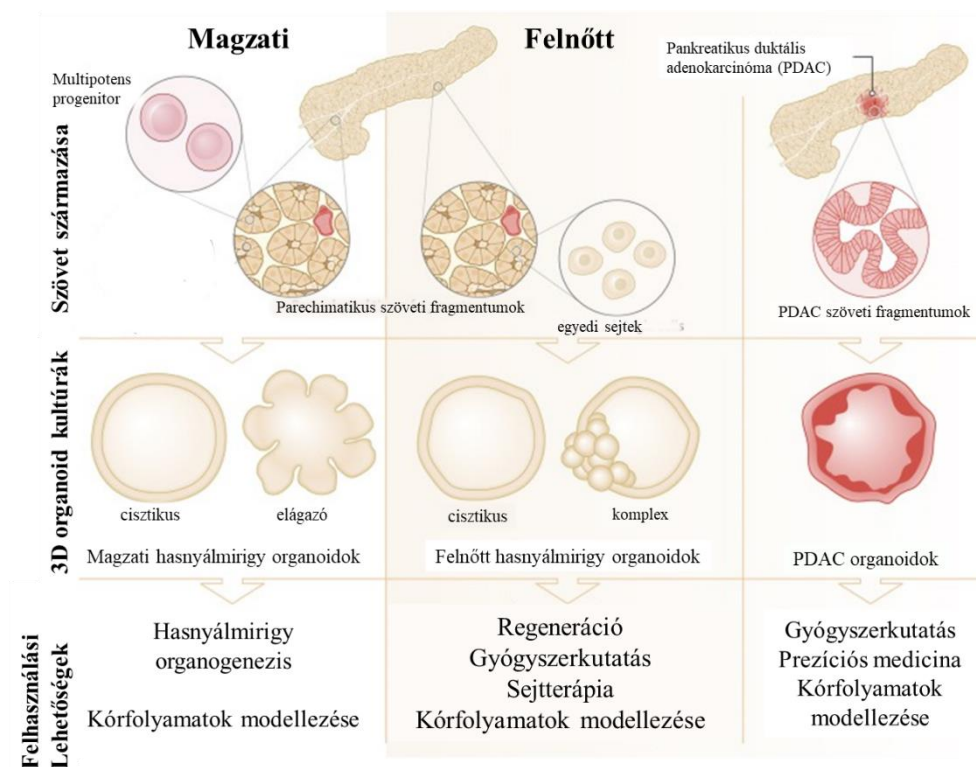
Az állati modellek egy szükséges alapot jelentenek a kezdeti kutatásokban, de a humán modellek alkalmazása a legcélravezetőbb. Azonban az emberi modellek használata során a legfőbb nehézség a humán sejtekhez és szövetekhez való korlátozott hozzáférés. Ezekhez az intraoperatív szövettani minták, biopsziák és elhunytakból származó minták által tudunk hozzáférni. Az utóbbi lehetőségnél jelentős károsodás érheti a szövetet, különös tekintettel a hasnyálmirigy esetén, mivel az emésztőenzimek viszonylag gyorsan felemésztik a szervet. A munkánk fókuszában a hasnyálmirigy duktuszok állnak, mely vizsgálatára számos lehetőség van mind állati, mind pedig humán szövetek által (Kim és mtsai., 2020). A továbbiakban a duktális vizsgálatokra alkalmas *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* lehetőség lesznek bemutatva.

In vitro modellekhez tartoznak a 2D sejtkultúrák, amelyek lehetnek primer sejtek vagy immortalizált sejtvonalak. Ezek a közül a szélesebb körben alkalmazott duktális sejtvonalak a humán adenokarcinóma eredetű Capan-1 és Capan-2 sejtek. Több tanulmány is bizonyította a Capan-1 sejtek esetén, hogy funkcióban viszonylag jól tudják modellezni a primer duktális bikarbonát szekréciót (Szűcs és mtsai., 2006; Wang és Novak, 2013). Az *ex vivo* modellekhez tartozik a mikrodisszekcióval izolált duktális struktúra. Ishiguo és mtsai. (2012) ilyen módon izolált hasnyálmirigy duktuszokon végzett mikroperfúziós vizsgálatokat. Azóta ez az *ex vivo* modell széles körben alkalmazott metodika lett a hasnyálmirigy duktusz vizsgálatok területén. Főleg ennek a modellnek a segítségével és a szegedi hasnyálmirigy kutatócsoport úttörő munkájának köszönhetően a duktuszok szerepéről az akut pankreatitiszben számos részletre fény derült (Venglovecz és mtsai., 2008; Hegyi és mtsai., 2011; Pallagi és mtsai., 2014; Fűr és mtsai., 2021).

Az *in vitro* modellek forradalmi eljárása a 3D organoid kultúrák kifejlesztése volt a 2010-es évek környékén. Az organoid sejtek polarizáltabbak a 2D sejt kultúráknál, a sejtfunkciók és transzportfolyamatok ezáltal jobban hasonlítanak az *in vivo* funkciókhoz. Az organoidok

pluripotens őssejtekből vagy felnőtt őssejtekből származó sejtek, melyek a körülöttük levő extracelluláris mátrix segítségével 3D-ban tudnak növekedni, és ebben a 3D környezetben sokkal optimálisabb körülmények között növekednek a sejtek. Ezek kiváló *in vitro* modellek lehetnek élettani folyamatok tanulmányozására. Továbbá végezhető rajtuk számos kísérlet, amely humán kórfolyamatokhoz, rák-, gyógyszer- és hatóanyagkutatáshoz köthető. A hasnyálmirigy organoid kultúrákat állati vagy humán őssejtekből lehet tenyészteni. A sejtek fenntartásához, az organoid genezishez, és a proliferációhoz elengedhetetlenek a különböző növekedési faktorok jelenléte, mint például a Wnt aktivátor (wingless-related integration site) (Wnt3a, R-spondin), tirozin kináz receptor ligandok (EGF-epidermal growth factor, FGF10-fibroblast growth factor), és BMP (bone morphogenic protein) inhibitorok (noggin), TGF- β (transforming growth factor beta) inhibitor (Balak és mtsai., 2019; Kim és mtsai., 2020). Az organoidok felhasználási köre sokrétű. Az alap kutatási folyamatok mellett bizonyos betegségek modellezésére és a precíziós medicinában is jelentős szerepe lehet. Biobankok létrehozása során, paciensekből vett mintákból organoidokat lehet létrehozni és tárolni későbbi genetikai, farmakológiai, és molekuláris kísérletek felhasználásához (Kim és mtsai., 2020). Molnár és mtsai. (2020) kimutatta PCR és morfológiai analízissel, intracelluláris pH mérései vizsgálatokkal, hogy egérből tenyésztett organoid kultúra és mikrodisszekcióval izolált *ex vivo* duktuszok közötti transzport aktivitás, fehérje termelés és szekréció rendkívül hasonló, így kiváló modell lehet a hasnyálmirigy folyamatainak tanulmányozására (Molnár és mtsai., 2020).

Egy másik lehetőség organoidok előállítására az indukált pluripotens őssejt (iPSC) technológia, amely során normálisan differenciálódott sejteket programoznak át őssejtté. Ezt transzkripciós faktorok kényszerített kifejeződésével érik el. Így az újraprogramozott sejtől az organoid fejlődhet ki.



6. ábra Hasnyálmirigy organoid kialakítása és felhasználási lehetőségei. Lehetőség van különböző szöveti forrásból 3D organoidok kialakítására, megfelelő médiumok használatával. Az ábra mutatja az organoidok morfológiai sokféleséget a szövet forrásától függően. Páciensek szöveti biopsziáiból PDAC organoidok kialakítása lehetséges. Forrás: Balak és mtsai., 2019

Célkitűzés

A hasnyálmirigy duktusz funkciók vizsgálatára elsősorban állatmodellnek állnak rendelkezésre, de azok működése bizonyos mértékben eltér a humán duktusz sejtek működésétől. Ezért rendkívül fontos, hogy a kutatások során egyre több humán szöveten végezzük a méréseket. Azonban a humán hasnyálmirigy mintákhoz való hozzáférés rendkívül korlátozott.

A munka során a fő célunk egy új humán hasnyálmirigy duktális modellrendszer létrehozása volt, valamint ennek a karakterizálása. *In vitro* 3D organoid kultúrákat szerettünk volna kialakítani humán magzatokból nyert hasnyálmirigy szövetekből. Majd ezen organoidok duktális markereinek expressziós szintjeit és a duktuszokra jellemző funkciókat terveztük megfigyelni különböző metodikák alkalmazásával.

Anyagok és módszerek

Felhasznált anyagok

A kísérletek során felhasznált vegyszereket elsősorban a Merck Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be, ellenkező esetben jelöltük az anyagok gyártóját.

Alkalmazott oldatok

Az organoidok izolálásához és fenntartásához használt oldatok a következők voltak:

- **Splitting médium:** Advanced DMEM-F12-ben (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) oldjuk fel a többi anyagot, 10 mM HEPES (1 M, ThermoFisher Scientific), 2 mM GlutaMaxTM Supplement (ThermoFisher Scientific), 125 µg/mL Primocin (invivoGen, San Diego, CA, Egyesült Államok)
- **Digestion médium:** 95,49% splitting médium, 2,5% FBS (ThermoFisher Scientific), 1250 unit/mL Collagenase IV. (Worthington, Columbus, OH, Egyesült Államok), 1 mg/mL Dispase (Merck), 2 mg/mL Soybean Trypsin Inhibitor (ThermoFisher Scientific), 1x Antibiotic-Antimycotic (100X, ThermoFisher Scientific), 1x Kanamycin Sulfate (100X, ThermoFisher Scientific), 2 µg/mL Voriconazole (Tocris, Bristol, Egyesült Királyság)
- **Wash médium:** 95,4% Splitting médium, 2,5% FBS, 1x Antibiotic-Antimycotic, 1x Kanamycin Sulfate, 1 µg/mL Voriconazole
- **Feeding médium:** 45,6% Splitting médium, 50% L-WRN kondicionált médium, 500 nM A-38-01 (Tocris), 50 ng/mL EGF (ThermoFisher Scientific), 100 ng/mL FGF (ThermoFisher Scientific), 10 nM Gastrin I. (Tocris), 1,25 mM N-acetilcisztein (Merck), 10 mM Nikotinamid (Merck), 1x B-27 Supplement (ThermoFisher Scientific), 350 µg/mL Prostaglandin E2 (Tocris), 10,5 µM Y-27632 ROCK inhibitor (Tocris), 1x Antibiotic-Antimycotic, 1x Kanamycin Sulfate, 1 µg/mL Voriconazole.

Az immunfestés során a következő oldatok voltak alkalmazva: TBS puffer (desztillált vízben feloldottunk 0,049 M Trizma base-t, 0,15 M NaCl-t, és 0,0046 M KCl-t, majd a pH-t beállítottuk 7,3-7,5 közé); BO (blokkoló oldat: 50 mg/mL BSA TBS pufferben); BO + TX (Blokkoló oldat és Triton X-100: 50 mg/mL BSA és 1 mg/mL Triton X-100 TBS pufferben);

Paraformaldehid (PFA, 20 mg/mL PFA TBS pufferben oldva); 1 mg/mL Triton X-100 TBS pufferben.

Az intracelluláris pH (ipH) méréshez felhasznált oldatok tartalma az 1. táblázatban van összefoglalva. Ezeken felül az ammónium pulzus technika során a $\text{NH}_4\text{Cl}^- \text{HCO}_3^-$ és HCO_3^- oldatok 5 μM forskolint (Tocris) tartalmazhatott. A Na elvonásos technika során a Na^+ mentes HCO_3^- és a HCO_3^- oldatok 10 μM EIPA (Merck) (Na^+/H^+ kicserélő gátlószere) és/vagy 10 μM S0859 ($\text{Na}^+ \text{HCO}_3^-$ gátlószere) tartalmazhattak.

	Standard HEPES oldat	HCO_3^- oldat	$\text{NH}_4\text{Cl}-$ HCO_3^- oldat	Na^+ mentes HCO_3^- oldat	Na^+ mentes $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$ oldat
NaCl	140	115	95		
KCl	5	5	5	5	5
HEPES acid	10				
CaCl_2	1	1	1	1	1
MgCl_2	1	1	1	1	1
Glükóz	10	10	10	10	10
NaHCO_3		25	25		
NH_4Cl			20		20
NMDG				115	95
Kolin HCO_3^-				25	25
Atropin				0,01	0,01
pH	7,5	-	-	8,3	8,3

1. táblázat. Az intracelluláris pH mérés során felhasznált oldatok összetétele. Az egyes anyagok koncentrációi mM-ban vannak megadva. Rövidítés: NMDG: N-metil-D-glükamin

LWRN kondicionált médium készítése

Az L-WRN sejtvonal az ATCC-től (Manasas, VA, Egyesült Államok) származik. A sejtek Wnt-3A, R-spondin 3 és noggin fehérjét termelnek. A termelésre alkalmas sejtek, vagyis a termeléshez szükséges vektort azok a klónok tartalmazzák, amelyek rezisztensek a G-418 és hygromicin B antibiotikumok kezelésekre. A Wnt-3A, R-spondin, és a noggin olyan szignalizációs útvonalakat aktiválnak majd más primer sejtekben, amik segítségével kialakulhatnak a 3D organoid struktúrák.

Az L-WRN sejtek tenyésztése DMEM (ATCC) médiumban történik, mely ki van egészítve a következőkkel: 10% FBS (ThermoFisher Scientific), 0,5 mg/mL G-418 (ThermoFisher Scientific), 0,5 mg/mL hygromicin B (ThermoFisher Scientific). A konfluencia elérése után az L-WRN sejteket DMEM, 10% FBS, 1x Antibiotic-Antimycotic (ThermoFisher Scientific), és

1x Kanamycin Sulfate (ThermoFisher Scientific) tartalmú médiumban tenyésztjük tovább. Ezt követően öt naponta médiumot cserélünk rajtuk öt alkalommal és a médiumokat szűrést (0,2 μ m szűrő) követően fagyaszttjuk, majd az organoidok növesztéséhez használjuk.

Humán minták gyűjtése

A vizsgálatokhoz a hasnyálmirigyek humán abortált magzatokból származtak. Orvosi indikáció után valósult meg a magzatok abortálása az SZTE-SZAOK Nőgyógyászati Klinikán a szigorú etikai szabályokat követve. Ezután a magzatok az SZTE SZAOK Pathológiai Intézetébe lettek elvive és ott patológus távolította el a hasnyálmirigyet, amelyeket a további kísérletekre használtunk fel. A vizsgálatokhoz rendelkezünk etikai engedéllyel, melynek száma: SZTE-SZAOK 3415.

Magzati organoidok kialakítása

A magzati hasnyálmirigyből egy 8-15 milliméteres darabot kivágunk és egy Petri-csészébe tesszük úgy, hogy ellepje a Splitting médium, majd steril szikével apró darabokra (1-2 mm) aprítjuk és beletesszük egy Erlenmeyer-lombikba, amelyben sterilre szűrt 10 mL Digestion médium van. A lombikot rázó vízfürdőbe helyezzük (37°C, 165 rpm) 5 percre. Fénymikroszkóppal rendszeresen ellenőrizzük (5 percenként) a szövet emésztettségi állapotát (200-200 μ L sejt szuszpenziót Petri csészében vizsgálva). Kb. 5-10 perc emésztés elég a magzati szövetnek. Az emésztés végén 15 mL-es centrifuga csőbe összegyűjtjük az emésztett szuszpenziót és 10 percig (4°C, 90 rcf) centrifugáljuk. Centrifugálás után a felülúszót leszívjuk, majd Wash médiummal háromszor mossuk, szuszpendáljuk és 10 percig centrifugáljuk (4°C, 90 rcf). A mosási lépések után leszívjuk a felülúszót, de annyi Wash médiumot hagyunk a sejteken, amiben fel tudjuk szuszpendálni őket. Kísérleti tervnek megfelelő mennyiségű (130-250 μ L) 4°C-os Matrigel-be (Corning, Corning, NY, Egyesült Államok) hideg vágott pipetta hegygel (4°C) belemérjük a sejt szuszpenziót, majd az előmelegített 24-well plate-be 9 μ L térfogatú dome-okat (Matrigel alkotta kupolákat) teszünk ki. A Matrigel olyan extracelluláris mátrix mely 4°C-on folyékony, de 37°C-on már bekocsonyásodik (szilárdul), és ezért szükséges, hogy a folyékony állag fenntartása során hideg eszközökkel (pl. pipettahegy) dolgozzunk. A dome-okban lévő sejtek mennyiségét sztereó mikroszkóp alatt tudjuk ellenőrizni. Ezután 37°C-ra helyezzük a sejteket tartalmazó organoidokat 10 percig (ezalatt a

Matrigel megdermed), majd 1 mL Feeding médiumot adunk a sejteket tartalmazó lemez lyukaiba.

Organoidok tenyésztése és passzálása:

Az orgnaoid kultúrákat 24 lyukú lemezekben tenyésztettük a Matrigel segítségével létrehozott dome-okban. Minden második napon Feeding médiumot cserélünk rajtuk. A passzálás során a dome-okat Feeding médiummal együtt összegyűjtjük szűrős pipettahegy segítségével egy 15 mL-es Falcon csőbe (ha sok a dóm és egybe nem fér, akkor két lépésben gyűjtjük össze). Az összegyűjtött dome-okat lecentrifugáljuk (90 rcf, 10 perc, 4°C), majd leszívjuk a felülúszót. A sejtek disszociálására az üledékre TripleExpress-t (ThermoFisher Scientific) és Dulbecco foszfát puffer oldatot (ThermoFisher Scientific) mérünk, néhányszor le-föl szuszpendáljuk, és a mintát rázóinkubátorba helyezzük (165 rpm, 15-20 perc, 37°C). A rázás és disszociációs lépés folyamán egy homogén oldatot kell kapjunk, amely alatt egyedi sejtekre kell szétessenek az organoidok. Ezt követően centrifugáljuk a mintát (90 rcf, 10 perc, 4°C), majd eltávolítjuk a felülúszót. Wash médiummal kétszer mossuk a pelletet és mosások között szuszpendáljuk és centrifugáljuk a mintákat (90 rcf, 10 perc, 4°C). A második mosás után eltávolítjuk a Wash médium nagy részét, csak annyit hagyunk a mintán, amennyi szükséges a szuszpendáláshoz a Matrigelbe való kirakás előtt. Innen a lépések megegyeznek az organoid izolálásnál végénél leírt lépésekkel.

mRNS izolálás és reverz transzkripció

Egy körülbelül 3x3 mm-es magzati hasnyálmirigy darabot jégen hűtött 1 ml TRIzol-reagensbe tettünk, majd azonnal homogenizáltuk IKA Ultra Turrax-szal (típus:TP18/10). Ezt követően folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk és a későbbi felhasználásig -80°C-on tároltuk (legfeljebb 1-6 napig). A szövet teljes RNS tisztítását három lépésben hajtottuk végre. Először 200 µL kloroform hozzáadásával 15 percig erőteljesen ráztattuk a mintákat, majd 8 percig állni hagytuk, és 12000 g-vel 15 percig 4°C-on centrifugáltuk. Ezután három elkülönülő fázist kapunk. Az alsó rózsaszínű TRIzol-os fázist benne a fehérjékkel, középen a DNS-t tartalmazó fehér fázis, a felső átlátszó fázis pedig a további vizsgálatokhoz szükséges RNS-t tartalmazta. A felső fázist egy üres eppendorf csőbe pipettáztuk át. Ehhez 500 µL izopropanolt adtunk és vortexeltük. 8 percig szobahőn inkubálás után centrifugáltuk 12000 g-vel 10 percig 4°C-on. Ekkor az izopropanol hatására kicsapódott RNS megjelent az eppendorf falán. A

felülúszót eltávolítottuk és 1 mL 75%-os alkoholt adtunk hozzá és vortexeltük. Ezután ismét centrifugáltuk 7500g-vel 5 percig 4°C-on. Az RNS az etanol hatására is kicsapódva maradt az eppendorf falán. A felülúszót leszívtuk és nyitott kupak mellett hagytuk, hogy a maradék alkohol elpárologjon (1-2 perc) ügyelve arra, hogy az RNS ne száradjon ki. Végül az RNS-t 70 µL RNáz mentes vízben felfuszpendáltuk és a mintákat -80°C-on tároltuk a felhasználásig.

Az RNS koncentráció méréséhez a ThermoFisher Scientific NanoDrop készüléket használtuk. A készülék bizonyos szennyeződések is (DNS, fehérje, TRIzol) is képes becsülni az abszorbancia mérések alapján. Az izolált RNS-eket akkor tekintettük tisztának, ha a NanoDrop készülék a következő abszorbancia hányados értékeket mérte: A260/A280: 1,9-2,1 és A260/A230: 1,8-2,5. Az RNS integritást agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk.

Ezt követően reverz transzkripciót végeztünk, vagyis a teljes izolált RNS mennyiséget cDNS-é írtuk át. A reverz transzkripcióhoz összeállított reakcióelegy térfogata 20 µL, mely 2 µg RNS-t tartalmazott. A reverz transzkripció PCR protokollja a következő volt: 10 percig 25°C, majd 2 órán át 37°C, 5 percig 85°C, végül 4°C. Az így kapott cDNS-t a további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

Kvantitatív PCR reakció

A 2. táblázat összefoglalja azokat a primereket, amiket a génexpresszió meghatározásához alkalmaztunk. A primereket mind az IDT Inc (USA) OligoAnalyzer programjának a segítségével megvizsgáltuk. Gradiens PCR-t futtattunk a primerek megfelelő kapcsolódási (annealing) hőmérsékletének meghatározásához. A reakcióelegy térfogata 10 µL volt, mely komponensei a következők voltak: 4 µL gyári master mix, 2,78 µL nukleáz mentes víz és 0,8 µL 20x-osára hígított reverz és forward primer, 1,67 µL cDNS minta (yellow buffer-t tartalmaz). A kvantitatív real-time PCR protokollja lépésenként a következőkben megadott ideig és hőmérsékleten lett megfuttatva: 2 percig 50°C-on, 10 percig 95°C-on, majd 40 amplifikációs ciklus következett három ismétlődő lépésben: 95°C-on 15 másodpercig, 57 C-on vagy 63,6°C-on 30 másodpercig (gén függően változtatva a gradiens PCR alapján), 30 másodpercig 72°C-on. A Melt Curve (leolvasási görbe) 70°C és 95°C között 5 másodpercig, 0,5°C -os lépésekben történt.

Gén	5'-3' Primer párok	Termék (bp)	Anneling T (°C)
SLC26A6	F: TTATCGGAGGCATCTTCCAG	501	57
	R: CAGCATTGGCAAAGTACACG		57
SLC26A3	F: AGACAAACTTCCAGTGCCCAT	73	63,6
	R: ACAGCCGTAGGATACACCTGC		63,6
NBC	F: GGTGTGCAGTTCATGGATCGTC	336	57
	B: GTCAGTGTCCAGACTTCCCTTC		57
CK19	F: ACCAAGTTTGAGACGGAACAG	181	63,6
	R: CCCTCAGCGTACTGATTTCT		63,6
GAPDH	F: AGCCTCAAGATCATCAGCAATGCC	105	57
	R: TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT		57

2. táblázat. A relatív génexpresszióhoz felhasznált oligonukleotid primer párok.

Humán organoidok fluoreszcens ko-immunfestése

Az organoidokat tartalmazó Matrigel dome-okat óvatosan kivettük a lemezekből és kriomátrixba helyeztük, majd -80°C-on fagyasztottuk. Az organoidokból kriosztáttal -20°C-on 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk és tárgylemezekre helyeztük a metszeteket. Ezeket 2%-os PFA-ben 20 percig fixáltuk, majd 3x mostuk TBS puffer oldattal. A tárgylemezen levő metszeteket hidrofób tollal (PAP Pen, ThermoFisher Scientific) körbe rajzoljuk, majd 3x5 percig tartó mosás követett TBS pufferrel tárgylemez festőedényben. Ezt követően Triton X-100–TBS oldattal permeabilizáltuk a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten, majd 1x5 percig TBS pufferrel mostuk. BO-TX oldattal 60 percig blokkoltuk a felületet, majd az elsődleges antitestet oldatokat ráraktuk a mintákra: SLC26A6 (1:200 hígítás BO-TX oldatban; nyúl poliklonális IgG; Abcam [Cambridge, Egyesült Királyság]); SLC4A4 (1:100 hígítás BO-TX oldatban; nyúl poliklonális IgG; Abcam). Egy egész éjszakát inkubáltuk az elsődleges antitestekkel a metszeteket 4°C-on.

A második napon 4x5 percig mossuk a mintákat TBS pufferrel. Ezután a fluoreszcensen jelölt anti-nyúl másodlagos antitestet (Alexa 488, 1:500 hígítás BO oldatban) raktuk rá a mintákra és 60 percig inkubáltuk. Inkubáció után 4x5 perces mosás következik TBS pufferrel, majd a CK-19-et (1:100 hígítás BO-TX oldatban; nyúl poliklonális IgG; Abcam) raktuk rá a metszetekre és azzal inkubáltuk egy teljes éjszakát a mintákat.

A harmadik napon 1x mossuk a metszeteket fürdetőkádban, majd feloldjuk a sejtmagfestéket (H33342, 2µg/mL) TBS-ben és ezzel inkubáljuk a mintákat 1-2 órán keresztül. Inkubáció után 3x mossuk a mintákat TBS-sel, majd mountolás következett Fluoromounttal, és lefedtük fedőlemezzel a metszeteket.

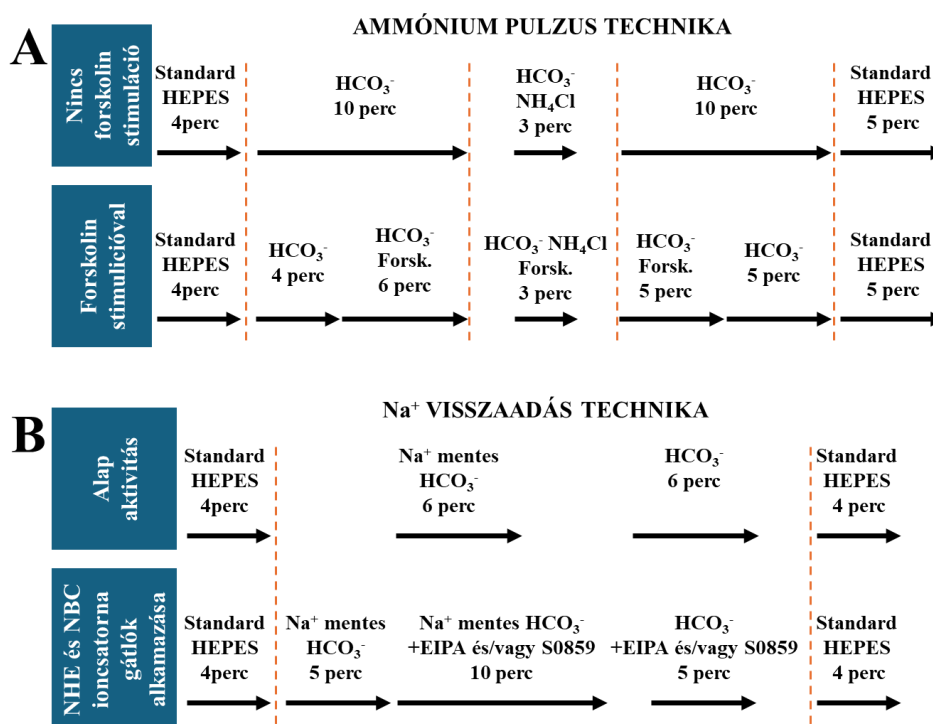
Intracelluláris pH mérése humán organoidokon

A funkcionális vizsgálatok az általunk létrehozott *in vitro* humán 3D organoid modelleken történtek. Kivettünk egy dome-ot a 24-lyukú lemezből és átraktuk petri csészébe, amelyben Feeding médium van. Óvatosan ebben párszor le-föl szuszpendáljuk a dome-ot, hogy szétessen és elérhetőek legyenek az egyedi organoidok. Majd pipetta segítségével kitapasztunk 1-4 organoidot egy korábban poly-L-lizinnel bevont kör fedőlemezre. Az organoid(ok) tartalmazó fedőlemezt egy tartókamrába helyeztük. Ezután az organoidokra 2 μ M BCECF-AM (ThermoFisher Scientific) (pH érzékeny fluoreszcens festék) tartalmú oldatot rakunk, és 20 percig 37°C-on CO₂ inkubátorban tartjuk a mintákat, amíg sejtek feltöltődnek a BCECF-AM festékkel. Ennek segítségével tudjuk majd valós időben vizsgálni az ipH-t, és ennek következtében pedig az organoidokban lévő ioncsatornák működésére tudunk következtetni. A funkcionális méréseket a Zeiss Axio Observer 7 mikroszkópon végeztük. A hozzá tartozó ZEN szoftverrel pedig az organoid körvonalán területeket jelöltünk ki (ROI-region of interest), amelyen belül a fluoreszcencia intenzitásokat monitoroztuk. A mérések során az organoidokat különböző oldatokkal perfundáltuk, 4-6 mL/perc sebességgel. Két féle mérési technikát alkalmaztunk, az egyik az ammónium pulzus, míg a másik a Na⁺ visszaadás technika. Az ezek során használt oldatok összefoglalója a 7. ábrán látható.

Az ammónium pulzus technika során intracelluláris alkalizációt váltunk ki 3 percig. Ebből a hasnyálmirigy duktusz sejtek elsősorban apikális oldalon levő CFTR és SLC26A6 ioncsatornák aktiválásával próbál regenerálódni úgy, hogy HCO₃⁻ pumpálnak ki. Ezután hirtelen elvonjuk az ammóniumot, és a sejt belseje savas lesz és az intracelluláris acidózisból szintén megpróbálnak a sejtek regenerálódni, más ioncsatornák fokozott működtetésével. A vizsgálatokat forskolin (5 μ M koncentráció) stimulációval és a nélkül is elvégeztük. A forskolin egy CFTR agonista, így ennek az ioncsatornának a funkciójára tudunk majd következtetni a mérések alapján. A mérés során alkalmazott pontos oldatokat az 7.A ábra részletesen tartalmazza. A HCO₃⁻-tartalmú oldatok mérés során karbogén gázzal (95% O₂ + 5% CO₂) voltak buborékoltatva, ami alapján az oldatok pH-ja a megfelelő szintre áll be.

A bazolaterális nátrium-függő HCO₃⁻ felvételt Na⁺ visszaadás technikával monitoroztuk az organoidokon. A mérés során alkalmazott pontos oldatokat a 7.B ábra részletesen tartalmazza. Na⁺ mentes HCO₃⁻ oldattal acidózist idéztünk elő, majd visszaadtuk a Na⁺ -t az oldathoz, így ebből a sejtek már tudtak regenerálódni (7.B, Alap aktivitás). A kísérlet egy másik elrendezésében szelektíven blokkoltuk az NBC-t vagy az NHE-t, vagy mindkét bazolaterális

transzportert (7.B, NHE és NBC ioncsatorna gátlók alkalmazása). Az inhibitorok hozzáadásával következtethetünk az NBC és NHE működésére.



7. ábra. Az ipH mérések lefolyásának összefoglaló ábrája. (A) Az ammónium pulzus technika során alkalmazott oldatok és időtartamok. (B) A Na elvonás során alkalmazott oldatok és időtartamok.

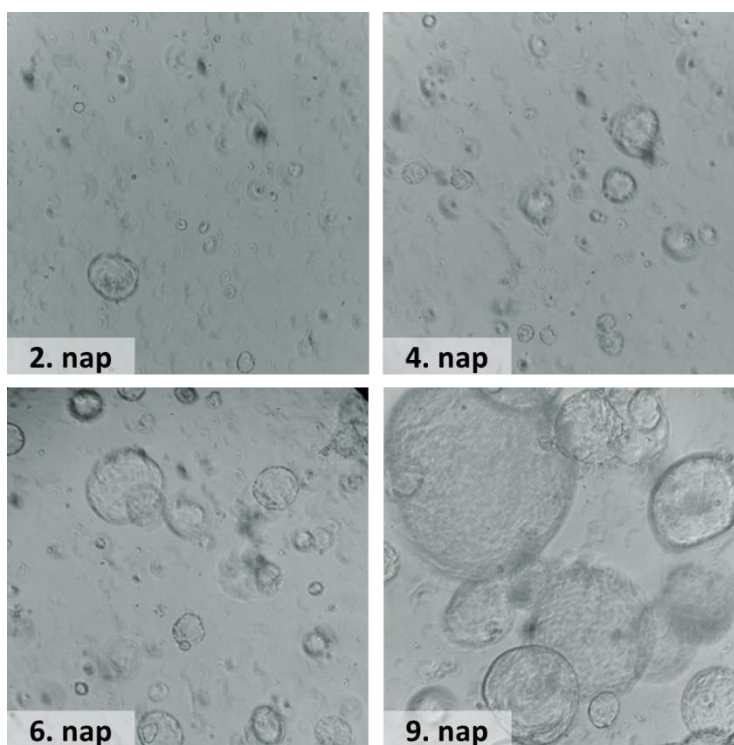
Statisztikai analízis

Az oszlopdiagrammokon az adatok átlagát $\pm$ szórását ábrázoltuk. A két oszlopot tartalmazó grafikonokon az adatokat Student féle t-próbával hasonlítottuk össze, míg a több átlagot tartalmazó mérések esetén egyutas-ANOVA-val kerestünk szignifikáns különbségeket. Az ANOVA mérések után Bonferroni post hoc teszttel tovább elemeztünk a mintákat (JASP Team, <https://jasp-stats.org/>, Version 0.18.3). A $P < 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

Eredmények

Organoid kultúrák növekedése és morfológiája

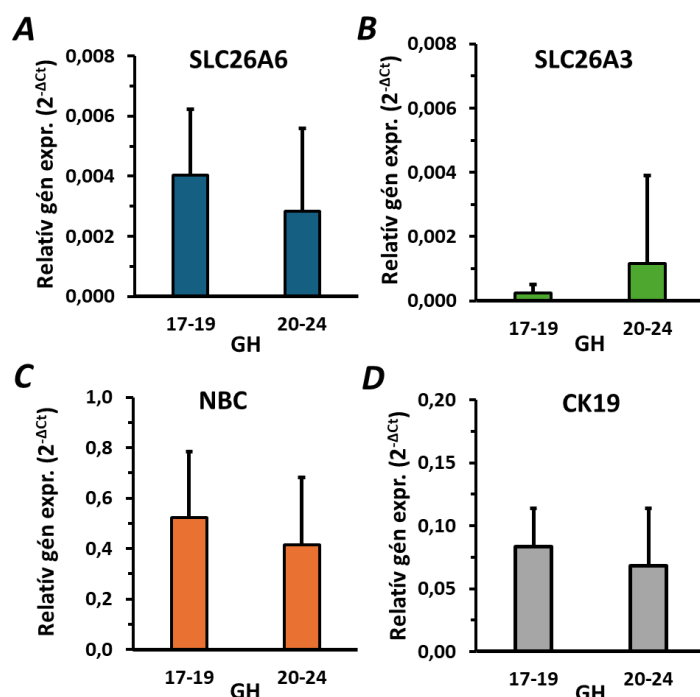
Az organoid kultúrák tenyésztésének körülményei és folyamata a korábban leírt módszerek részben olvasható. Az organoidokat kb. 6-7 passzálásig tartottuk fenn és folytak rajtuk a mérések, valamint a passzálások során az összegyűjtött sejtmennyiség egy részét le is fagyasztottuk. A kultúrák 5-9 nap alatt érték el azt a növekedési szintet, ami után már szükség volt a passzálásra. A 8. ábrán látható az organoid kultúrák növekedésének bizonyos fázisai a negyedik passzálást követő 2-4-6-9 napokon. Az organoidok megfelelő fejlődése és mérete elengedhetetlen a rajtuk elvégezhető kísérletek szempontjából.



8. ábra. Organoid kultúrák növekedése és fejlődése a negyedik passzálást követő 2-4-6-9 napokon.

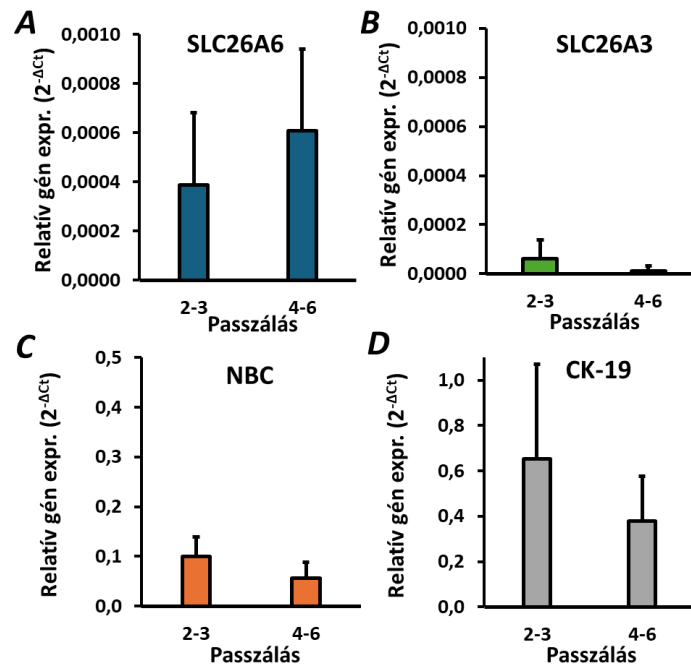
mRNS expressziós vizsgálatok

A kvantitatív PCR segítségével relatív génexpressziós szinteket határoztunk meg humán magzati szöveteken (9. ábra) és humán magzati organoidokon (10. ábra). Összehasonlítottuk az mRNS expressziós szinteket a 17-19 GH és 20-24 GH között a szövetek esetén, valamint az organoidokban a különböző passzálások során vizsgáltuk és összehasonlítottuk szintén az mRNS expressziókat. A magzati hasnyálmirigy szövetekben az SLC26A6, SLC26A3, NBC és CK-19 (duktális marker) génexpressziós szintjei nem mutattak szignifikáns eltérést a 17-19 GH és 20-24 GH között (9. ábra).



9. ábra. Az (A) SLC26A6, (B) SLC26A3, (C) NBC és (D) CK19 mRNS-ek expressziós szintjei humán magzati hasnyálmirigy szövetekben. A GAPDH háztartási génhez voltak hasonlítva a gének expresszió értékei. Az értékek átlag ± szórás vannak ábrázolva. A szignifikáns különbségek vizsgálatára Student féle t-próba lett végezve.

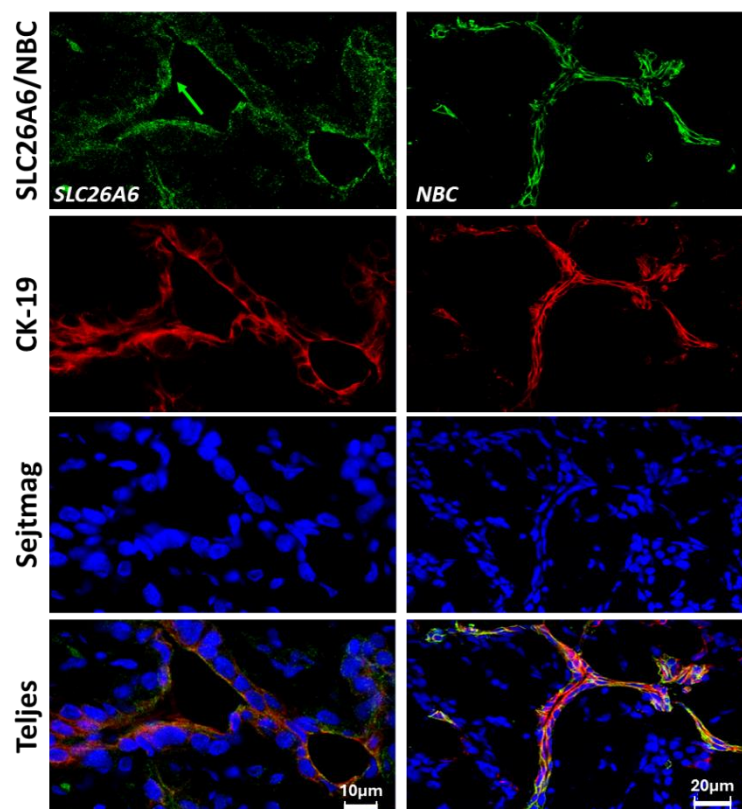
Az organoid minták passzálási számai (2-3 és 4-6) között sem volt jelentős relatív génexpressziós különbség és stabil duktusz marker mRNS-expressziót mutattak (10. ábra). A szövet és az organoid mintákban az SLC26A6 mutatott jelentősebb expressziót az SLC26A3-hoz képest. Az NBC és a CK-19 esetében mértük a legnagyobb génkifejeződéseket.



10. ábra. Az (A) *SLC26A6*, (B) *SLC26A3*, (C) *NBC* és (D) *CK19* mRNS-ek expressziós szintjei humán magzati organoid mintákban. A *GAPDH* háztartási génhez voltak hasonlítva a gének expresszió értékei. Az értékek átlag ± szórás vannak ábrázolva. A szignifikáns különbségek vizsgálatára Student félé t-próba lett végezve.

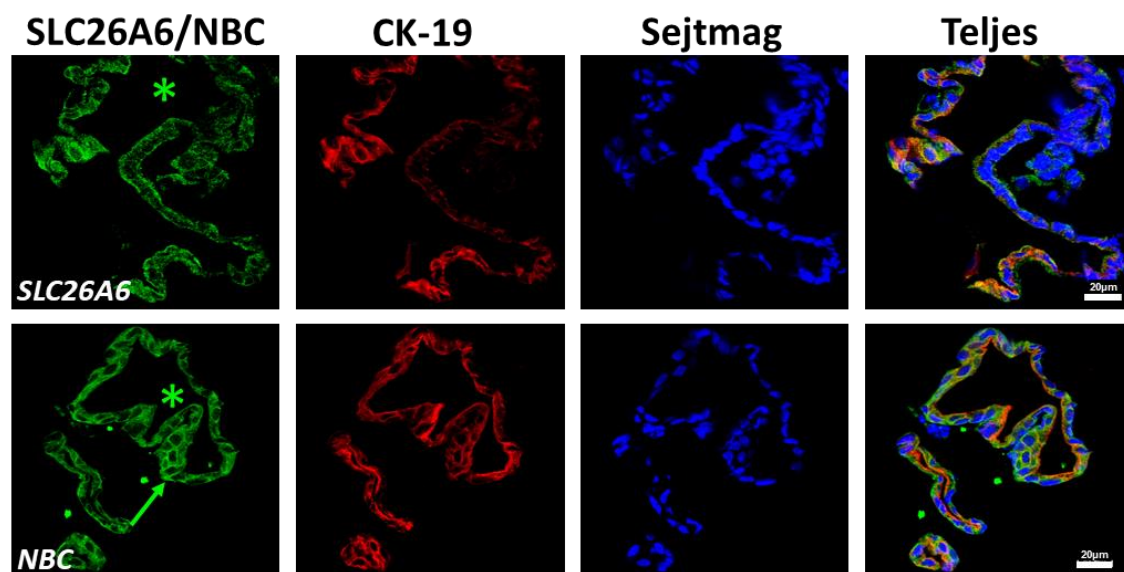
Fehérje expressziós vizsgálatok

Az mRNS vizsgálatokon túl immunfluoreszcens festésekkel is kimutattuk az *SLC26A6*, *NBC* és *CK-19* expresszáldását a magzati szövetben (11. ábra) és az organoid mintákban (12. ábra) is.



11. ábra. Humán magzati szövet immunfluoreszcens festése. (zöld: SLC26A6/NBC; piros: CK-19; kék: sejtmag) Az ábrán a nyíl az SLC26A6 festődésére mutat az apikális membránonon.

A humán hasnyálmirigy szöveti mintákban az SLC26A6 főleg a ductusok apikális membránjában expresszáldott, ami a ductális lumen felé néz (11. Ábra). Ezzel szemben az NBC festődését elsősorban a bazolaterális membránban figyeltük meg. Ezek a fehérje lokalizációk a ductusokban megegyeznek a korábbi tanulmányok által bizonyított lokalizációkkal. A CK-19 ductális marker festődése kolokalizált az SLC26A6 és az NBC ioncsatornákkal.



12. ábra. Humán magzati organoidok immunfluoreszcens festése. (zöld: SLC26A6/NBC; piros: CK-19; kék: sejtmag) Az ábrán látható * jel a lumen helyzetére utal, a nyíl pedig az NBC festődésére a bazolaterális membránon.

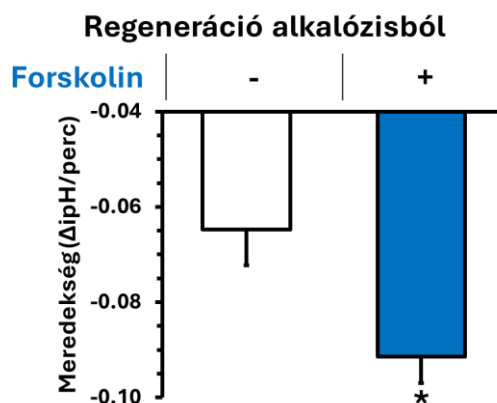
A magzati organoid kultúrákban szintén kimutattuk az SLC26A6 és NBC fehérjék kifejeződését (12. ábra). Azonban az SLC26A6 esetén diffúz festődést láttunk, míg az NBC esetén itt is főleg bazolaterális lokalizációban voltak a fehérjék a sejtekben. Az mRNA expresszióhoz hasonlóan az SLC26A6 fehérje expressziója nagyon alacsony volt, míg az NBC és CK-19 expressziók elég jól detektálhatók voltak fehérje szinten is.

Ioncsatorna funkcionális vizsgálatok organoidokon

A kísérletek során humán hasnyálmirigy duktális organoidokon végeztünk ipH mérést és külön vizsgáltuk az apikális és a bazolaterális ioncsatornák működését celluláris alkalózis és acidózis során. A mérések során agonista vagy antagonistá vegyületeket alkalmaztunk, amelyek célzottan az adott ioncsatorna működését serkentik vagy gátolják. A forskolin (CFTR agonista) stimulálja az adenilát cikláz, amely ezáltal cAMP-t fog termelni. A cAMP pedig a CFTR-csatornát nyitja, így aktiválódik. Az EIPA, amely egy nem szelektív gátlószer az NHE-t, az S0859 pedig egy szelektív gátlószer az NBC-nek.

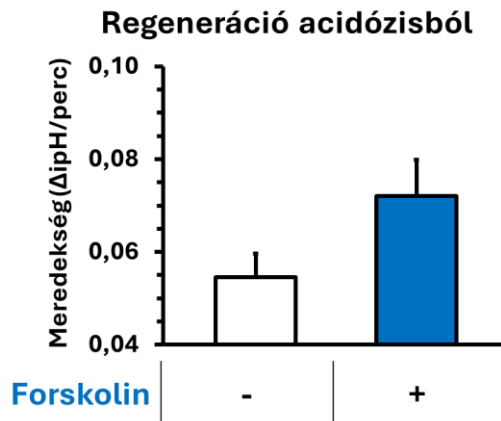
Ammónium pulzus technikával váltottuk ki az alkalózist intracellulárisan a hasnyálmirigy duktális organoidokban (13. ábra). A sejtben akkumulálódó ammónium (NH_4^+) hatására az ipH jelentősen megnövekszik. Az ipH változást BCECF-AM, sejtmembránra permeábilis fluoreszcens festéssel követtük nyomon. Alkalózisból történő regenerációban elsősorban az apikális oldalon elhelyezkedő transzporterek vesznek részt. Normál esetben a magas ipH

hatására a sejt úgy próbál regenerálódni, hogy az apikális felszínen lévő $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő (pl. az SLC26A6) HCO_3^- -t exportál a sejtől a lumenbe. A regenerációhoz hozzájárul még a CFTR-csatorna aktivációja is, amely Cl^- -t vagy HCO_3^- -t fog exportálni, így csökkentve az ipH-t. A méréseink során az organoidok alap regenerációja $-0,065 \pm 0,048 \Delta\text{ipH}/\text{min}$ volt (13. ábra). A forskolin kezelés hatására ez statisztikailag szignifikánsan csökkent $-0,091 \pm 0,045 \Delta\text{ipH}/\text{min}$ -re, ami egyértelmű indikátora a funkcionális és fokozott CFTR transzporter működésnek.



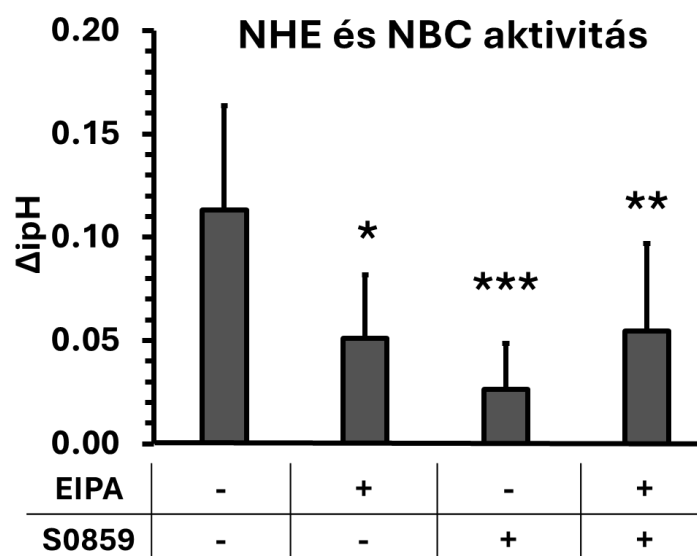
13. ábra Alkalózisból történő regeneráció organoidokban. Ammónium pulzus technikával váltottuk ki az alkalózist intracellulárisan a hasnyálmirigy duktális organoidokban. Az ábra az ammónium pulzus alatt bekövetkező ipH változást szemlélteti. Az organoidok egy részét előkezeltük forskolinnal, a másik része viszont nem kapott forskolint. Az adatok átlag $\pm$ SD, a párhuzamos mérések száma $n=6-6$ (organoidok). A statisztikai vizsgálathoz Student-féle t-próbát alkalmaztunk és a szignifikáns különbségeket a következő módon jelöltük: * $p \leq 0.05$

Alkalózis után az NH_4^+ eltávolításának hatására acidotikus állapot alakul ki a sejtben (14. ábra). Az acidózisból való regenerációban elsősorban a bazolaterális oldalon elhelyezkedő transzportrendszerek vesznek részt (pl. NHE, NBC). Alacsony ipH során az NBC és az NHE-csatornák fognak aktiválódni, és az NBC HCO_3^- felvételével, az NHE pedig H^+ leadásával igyekszik emelni az ipH-t. Forskolinnal történő stimuláció hatására, szignifikáns változás nem történt, amiből következik, hogy a CFTR transzporter nem vesz részt ebben a folyamatban.



14. ábra Acidózisból történő regeneráció organoidokban. Alkalózis után az NH_4^+ eltávolításának hatására acidotikus állapot alakult ki intracellulárisan. Az ábrán az ebből történő regeneráció mértéke látható. Az adatok $\text{átlag} \pm \text{SD}$ vannak ábrázolva, a párhuzamos mérések száma $n=6-6$ (organoidok). A statisztikai vizsgálathoz Student-féle t -próbát alkalmaztunk, de nem volt különbség a csoportok között.

Az NHE és NBC csatornák vizsgálatánál a kísérlet célja a bazolaterális Na^+ -függő HCO_3^- felvétel vizsgálata nátrium visszaadás technikával (15. ábra). Na^+ mentes HCO_3^+ oldattal acidózist idéztünk elő, majd Na^+ visszaadásával a sejtek regenerálódhattak a bazolaterális transzporterek működése által. Normál esetben az NHE transzporter által a sejt H^+ -t exportál és az NBC által HCO_3^- -t vesz fel, így helyreállítva az ipH-t. Ha EIPA-val gátoljuk az NHE-t a sejtől nem tud H^+ távozni, viszont HCO_3^- transzportot lehetővé teszi az NBC aktivitása. Ha S0859-cel gátoljuk az NBC-t csakis az NHE H^+ exportja kompenzálhatja a folyamatot. Mindkét transzporter gátlásával nem történik regeneráció az acidózisból. Az 15. ábrán látható, hogy az EIPA vagy az S0859 kezelése hatására az alap regenerációhoz ($0,1131 \pm 0,0505$) képest szignifikánsan csökkentek a duktális organoidok acidózisból való regenerációs képességeik. Továbbá az EIPA és S0859 együttes alkalmazása is szignifikánsan csökkentette a vizsgált organoidok regenerációját az acidózisból.



15. ábra Az NHE és NBC aktivitás az organoidokban. NHE és NBC csatornáknál a bazolaterális Na^+ -függő HCO_3^- felvételt vizsgáltuk nátrium visszaadás technikával. A vizsgálat során az organoidokat vagy nem kezeltük gátlószerekkel vagy pedig $10\ \mu\text{M}$ EIPA (NHE gátló) és/vagy $10\ \mu\text{M}$ S0859 (NBC gátló) anyagokkal kezeltük. Az adatok átlag $\pm$ SD vannak ábrázolva, a párhuzamos mérések száma $n=13-30$ (organoidok). A statisztikai vizsgálathoz ANOVA, majd azt követően Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk. Mindegyik csoportot a gátló szert nem kapott kontroll csoporthoz viszonyítottunk, és a szignifikáns különbségeket a következő módon jelöltük: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

Diszkusszió

Az exokrin hasnyálmirigyet érintő magas mortalitású betegségek (AP, CP és a hasnyálmirigyrák) és a fiziológiás szekréciós folyamatok kutatása egy komplex folyamat, amely során a humán modellrendszerek használata a legcélravezetőbb. A 3D *in vitro* organoidok ígéretes modellek a különböző differenciálódási, fiziológiai és pathofiziológiai folyamatok tanulmányozására. Kísérleteink során kvantitatív PCR által a magzati szövet és magzati organoidok relatív génexpresszióját mutattuk ki és hasonlítottuk össze, illetve fluoreszcens ko-immunfestéssel mutattuk ki az expresszáldott fehérjét. Továbbá izolált humán magzati hasnyálmirigy duktális szövetből organoidokat tenyésztettünk, majd ezeken funkcionális ipH méréseket végeztünk ammónium pulzus technikával és nátrium visszaadás technikával, így vizsgálva az apikális (CFTR, SLC26A6) és bazolaterális (NBC, NHE) transzportrendszereket.

Az mRNS és fehérje expressziós vizsgálatok során kimutattuk, hogy a vizsgált organoidok expresszálják a CK-19 duktális markert és több duktuszokra jellemző ioncsatornát, az SLC26A6, SLC26A3 és NBC-t. Ezek közül az SLC26A3 mutatta a legalacsonyabb mRNS expressziót, és fehérje szinten nem is tudtuk a szövetben megfesteni. Az SLC26A6 és NBC ioncsatornák mind mRNS, mind pedig fehérje szinten kimutathatóak voltak. Az immunfluoreszcens festés során kimutattuk, hogy az SLC26A6 az apikális membránban, az NBC pedig a bazolaterális membránban expresszáldott. A CK-19 duktális marker kolokalizáltan festődött az SLC26A6 és NBC ioncsatornákkal. Ezek a fehérje elhelyezkedések a sejten belül megegyeznek a korábbi irodalmi adatokkal. Egy másik tanulmányban Molnár és mtsai. (2020) egérből származó organoidokat hoztak hasonló módszerrel létre, mint a mi módszerünk. Az egér organoidok tulajdonságait hasonlították össze izolált primer hasnyálmirigy duktusz sejtekkel és a génexpressziós és immunfluoreszcens vizsgálatoknál kimutatták ők is, hogy az SLC26A6 és NBC expresszáldott az organoidokban és a primer duktális sejtekben is. Boj és mtsai. (2015) létrehozott olyan organoid modelleket, amelyek normális és neoplasztikus rágsáló és humán hasnyálmirigy szövetekből származtak és szintén duktusz tulajdonságokat mutattak. Ezek a modellek a hasnyálmirigyrák (például PDAC) tanulmányozására elengedhetetlennek minősülnek és bizonyították, hogy ezen modellek megfelelőek a duktális pathofiziológiai folyamatok tanulmányozására. Továbbá lehetőséget adnak a személyre szabott diagnosztikára és kezelésre a rákos páciensek esetében. Hohwieler és mtsai. (2016) által létrehozott humán pluripotens őssejtekből származó organoid kultúrát,

(amelyek reprezentálták a humán hasnyálmirigy globális génexpresszióját) orthotop transzplantációval immunhiányos egérbe helyeztek és ezek az organoidok normális duktális és acinus hasnyálmirigy szöveté fejlődtek, így bizonyítva azt, hogy ez megfelelő modell hasnyálmirigyet érintő folyamatok tanulmányozására.

A funkcionális vizsgálataink során kimutattuk, hogy az organoidok forskolin hatására fokozzák az alkalózisból való regenerációt, ami bizonyítja a működőképes CFTR-csatornák jelenlétét. Ezen felül szintén funkcionális mérésekkel is igazoltuk az NBC és az NHE-csatornák jelenlétét különböző specifikus gátlószerek alkalmazásával. Molnár és mtsai. (2020) egérből izolált primer hasnyálmirigy duktális sejteken és hasnyálmirigy duktális organoidokon végzett összehasonlító vizsgálatokat. A funkcionális ipH mérésekkel szintén bizonyították a CFTR, NBC és NHE-csatornák jelenlétét. Jelentős apikális HCO_3^- szekréció és a bazolaterális Na^+ függő HCO_3^- felvétel mérték ki. Az apikális transzporterek vizsgálatánál (elsősorban CFTR), valamint a bazolaterális ioncsatornák (pl. NBC és NHE) is hasonló mértékben működtek a primer izolált duktusz sejtekben és a létrehozott hasnyálmirigy egér organoidokban.

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy az izolált magzati hasnyálmirigyből kialakított organoidok releváns modellrendszerek a fiziológiai és pathofiziológiai folyamatok tanulmányozására és ígéretes eredményeket érhetünk el használatukkal.

Összefoglalás

Az exokrin hasnyálmirigy elsősorban acinusokból és duktuszokból épül fel. A duktális rendszer mind fiziológiai, mind pathofiziológiai funkciója csak részben ismert, és vizsgálatára általában állati szöveteket használunk. Azonban az állati minták nagy hátránya, hogy funkcióban kisebb-nagyobb mértékben különbözhetnek az emberi szövetektől. A humán hasnyálmirigyhez való hozzáférés azonban nagymértékben korlátozott. Célunk izolált magzati hasnyálmirigyből duktális organoid kultúrák létrehozása és jellemzése, mely egy új modellrendszer lehetne a jövőben a duktuszok vizsgálatára.

Abortált humán magzatok (14-23 gesztációs hetű [GH]) hasnyálmirigyei lettek a vizsgálatokhoz felhasználva (etikai engedély: SZTE-ÁOK-3415). A szövetből 3D organoid kultúrákat hoztunk létre, amiken a mérések történtek. Kvantitatív PCR segítségével relatív génexpressziós szinteket határoztuk meg, a fehérjeexpressziót pedig immunfestéssel néztük (ioncsatornák: SLC26A6, SLC26A3, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporter [NBC]; duktális marker:

citokeratin-19 [CK-19]). A funkcionális mérésekhez az intracelluláris pH-t követtük, mellyel az iontranszporterek (CFTR, Na⁺/H⁺ -cserélő [NHE], NBC) működését igazoltuk. Ezek során CFTR agonistát (forskolin) vagy különböző ioncsatorna inhibitorokat (EIPA, S0859) alkalmaztunk.

Az SLC26A6, SLC26A3, NBC és a CK-19 relatív génexpressziós szintje nem különbözött jelentősen a 17-19GH és 20-23GH szövetek között. Az organoid kultúrák szintén stabil duktusz marker mRNS-expressziót mutattak. A szövet és organoid mintákban is az SLC26A3 expressziója volt a legkisebb, majd az SLC26A6 jelentősebb expressziót mutatott, és az NBC esetén mértük a legnagyobb gén kifejeződést az ioncsatornák közül. Az immunfluoreszcens festések alapján az SLC26A6 főleg az apikális membránban, míg az NBC a bazolaterális membránban helyezkedik el. Organoidokon a funkcionális mérések során az intracelluláris alkalózisból történő regeneráció a forskolin stimuláció hatására szignifikánsan nagyobb volt az alap regenerációhoz képest, ami a CFTR-csatorna fokozott aktivitására utal. Az EIPA és S0859 gátlószerekkel végzett mérések alapján az NHE és NBC ioncsatornák működését is kimutattuk.

A munka során sikeresen létrehoztunk olyan 3D organoidokat humán magzati hasnyálmirigyből, melyek a duktuszok markereit mRNS és fehérje szinten is expresszálják, valamint funkcionálisan is aktív, duktuszokra jellemző ioncsatornákkal rendelkeznek. Eredményeink ígéretes alapot nyújtanak a humán magzati hasnyálmirigy szövetek felhasználásához a duktális bikarbonát szekréció vizsgálatokban.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kiss Lórándnak és társtémavezetőmnek Dágó Ágnesnek, akik szakértelmükkel, segítőkészségükkel, a konzultációkon nyújtott tanácsaikkal és magyarázataikkal hatalmas segítséget nyújtottak nekem a munkám során. Köszönet illeti Prof. Dr. Rakonczay Zoltánt, aki lehetővé tette a Szegedi Tudományegyetem Kórélettani Intézet laboratóriumában végzett munkámat. Köszönöm Orján Erik Márknak, Mihalekné Fűr Gabriellának, Takácsné Mihalik Boglárkának és Márkus Máténak a technikai segítséget. Köszönöm belső konzulensemnek, Sótiné Dr. Bagyánszki Máriának a támogatását. Végül de nem utolsósorban hálával tartozom szüleimnek, akik türelemmel, szeretettel és megértéssel támogattak a munkám során.

Irodalomjegyzék

- An J, Jiang T, Qi L, Xie K. Acinar cells and the development of pancreatic fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2023 Jun-Aug;71-72:40-53. doi: 10.1016/j.cytogfr.2023.05.003.
- Angyal D, Bijvelds MJC, Bruno MJ, Peppelenbosch MP, de Jonge HR. Bicarbonate Transport in Cystic Fibrosis and Pancreatitis. *Cells.* 2021 Dec 24;11(1):54. doi: 10.3390/cells11010054.
- Balak JRA, Juksar J, Carlotti F, Lo Nigro A, de Koning EJP. Organoids from the Human Fetal and Adult Pancreas. *Curr Diab Rep.* 2019 Dec 11;19(12):160. doi: 10.1007/s11892-019-1261-z.
- Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, Tsiotos GG, Vege SS; Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut.* 2013 Jan;62(1):102-11. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302779.
- Barreto SG, Habtezion A, Gukovskaya A, Lugea A, Jeon C, Yadav D, Hegyi P, Venglovecz V, Sutton R, Pandol SJ. Critical thresholds: key to unlocking the door to the prevention and specific treatments for acute pancreatitis. *Gut.* 2021 Jan;70(1):194-203. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322163.
- Barreto SG, Habtezion A, Gukovskaya A, Lugea A, Jeon C, Yadav D, Hegyi P, Venglovecz V, Sutton R, Pandol SJ. Critical thresholds: key to unlocking the door to the prevention and specific treatments for acute pancreatitis. *Gut.* 2021 Jan;70(1):194-203. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322163.
- Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio II, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvise M, Tiriach H, Spector MS, Gracianin A, Oni T, Yu KH, van Boxtel R, Huch M, Rivera KD, Wilson JP, Feigin ME, Öhlund D, Handly-Santana A, Ardito-Abraham CM, Ludwig M, Elyada E, Alagesan B, Biffi G, Yordanov GN, Delcuze B, Creighton B, Wright K, Park Y, Morsink FH, Molenaar IQ, Borel Rinkes IH, Cuppen E, Hao Y, Jin Y, Nijman IJ, Iacobuzio-Donahue C, Leach SD, Pappin DJ, Hammell M, Klimstra DS, Basturk O, Hruban RH, Offerhaus GJ, Vries RG, Clevers H, Tuveson DA. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell.* 2015 Jan 15;160(1-2):324-38. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.021.
- Boj SF, Vonk AM, Statia M, Su J, Vries RR, Beekman JM, Clevers H. Forskolin-induced Swelling in Intestinal Organoids: An In Vitro Assay for Assessing Drug Response in Cystic Fibrosis Patients. *J Vis Exp.* 2017 Feb 11;(120):55159. doi: 10.3791/55159.
- Bonal C., Herrera P. L. (2008). Genes controlling pancreas ontogeny. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 823-835. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072444cb>
- Czakó L, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Wittmann T, Otsuki M. Interactions between the endocrine and exocrine pancreas and their clinical relevance. *Pancreatol.* 2009;9(4):351-9. doi: 10.1159/000181169.
- Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets.* 2015;7(1):e1024405. doi: 10.1080/19382014.2015.1024405.
- Für G, Bálint ER, Orján EM, Balla Z, Kormányos ES, Czira B, Szűcs A, Kovács DP, Pallagi P, Maléth J, Venglovecz V, Hegyi P, Kiss L, Rakonczay Z Jr. Mislocalization of CFTR expression in acute pancreatitis and the beneficial effect of VX-661 + VX-770 treatment on disease severity. *J Physiol.* 2021 Nov;599(22):4955-4971. doi: 10.1113/JP281765.
- Hegyi P, Pandol S, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr. The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut.* 2011 Apr;60(4):544-52. doi: 10.1136/gut.2010.218461.
- Henry BM, Skinningsrud B, Saganiak K, Pękala PA, Walocha JA, Tomaszewski KA. Development of the human pancreas and its vasculature - An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. *Ann Anat.* 2019 Jan;221:115-124. doi: 10.1016/j.aanat.2018.09.008.
- Hohwieler M, Illing A, Hermann PC, Mayer T, Stockmann M, Perkhofer L, Eiseler T, Antony JS, Müller M, Renz S, Kuo CC, Lin Q, Sendler M, Breunig M, Kleiderman SM, Lechel A, Zenker M, Leichsenring M, Rosendahl J, Zenke M, Sainz B Jr, Mayerle J, Costa IG, Seufferlein T, Kormann M, Wagner M, Liebau S, Kleger A. Human pluripotent stem cell-derived acinar/ductal organoids generate human pancreas upon orthotopic transplantation and allow disease modelling. *Gut.* 2017 Mar;66(3):473-486. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312423.
- Ishiguro H, Yamamoto A, Nakakuki M, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, Kondo S, Mochimaru Y. Physiology and pathophysiology of bicarbonate secretion by pancreatic duct epithelium. *Nagoya J Med Sci.* 2012 Feb;74(1-2):1-18.
- Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Oct;21(10):571-584. doi: 10.1038/s41580-020-0259-3.

- Kim Y, Jun I, Shin DH, Yoon JG, Piao H, Jung J, Park HW, Cheng MH, Bahar I, Whitcomb DC, Lee MG. Regulation of CFTR Bicarbonate Channel Activity by WNK1: Implications for Pancreatitis and CFTR-Related Disorders. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;9(1):79-103. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.09.003. Epub 2019 Sep 24.
- Kiss L, Fűr G, Pisipati S, Rajalingamgari P, Ewald N, Singh V, Rakonczay Z Jr. Mechanisms linking hypertriglyceridemia to acute pancreatitis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2023 Mar;237(3):e13916. doi: 10.1111/apha.13916.
- Longnecker, Daniel S. 2021. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2021.01
- Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res*. 2014 Jan 15;6(2):114-8.
- Maléth J, Balázs A, Pallagi P, Balla Z, Kui B, Katona M, Judák L, Németh I, Kemény LV, Rakonczay Z Jr, Venglovecz V, Földesi I, Pető Z, Somorácz Á, Borka K, Perdomo D, Lukacs GL, Gray MA, Monterisi S, Zaccolo M, Sendler M, Mayerle J, Kühn JP, Lerch MM, Sahin-Tóth M, Hegyi P. Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis. *Gastroenterology*. 2015 Feb;148(2):427-39.e16. doi: 10.1053/j.gastro.2014.11.002.
- McClellan P, Weaver LT. Ontogeny of human pancreatic exocrine function. *Arch Dis Child*. 1993 Jan;68(1 Spec No):62-5. doi: 10.1136/adc.68.1_spec_no.62.
- Molnár R, Madácsy T, Varga Á, Németh M, Katona X, Görög M, Molnár B, Fanczal J, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Pallagi P, Maléth J. Mouse pancreatic ductal organoid culture as a relevant model to study exocrine pancreatic ion secretion. *Lab Invest*. 2020 Jan;100(1):84-97. doi: 10.1038/s41374-019-0300-3.
- Pallagi P, Balla Z, Singh AK, Dósa S, Iványi B, Kukor Z, Tóth A, Riederer B, Liu Y, Engelhardt R, Jármay K, Szabó A, Janovszky A, Perides G, Venglovecz V, Maléth J, Wittmann T, Takács T, Gray MA, Gácsér A, Hegyi P, Seidler U, Rakonczay Z Jr. The role of pancreatic ductal secretion in protection against acute pancreatitis in mice*. *Crit Care Med*. 2014 Mar;42(3):e177-88. doi: 10.1097/CCM.0000000000000101.
- Pallagi P, Hegyi P, Rakonczay Z Jr. The Physiology and Pathophysiology of Pancreatic Ductal Secretion: The Background for Clinicians. *Pancreas*. 2015 Nov;44(8):1211-33. doi: 10.1097/MPA.0000000000000421.
- Reichert M, Rustgi AK. Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J Clin Invest*. 2011 Dec;121(12):4572-8. doi: 10.1172/JCI57131. Epub 2011 Dec 1.
- Saluja A, Dudeja V, Dawra R, Sah RP. Early Intra-Acinar Events in Pathogenesis of Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2019 May;156(7):1979-1993. doi: 10.1053/j.gastro.2019.01.268.
- Szatmary P, Grammatikopoulos T, Cai W, Huang W, Mukherjee R, Halloran C, Beyer G, Sutton R. Acute Pancreatitis: Diagnosis and Treatment. *Drugs*. 2022 Aug;82(12):1251-1276. doi: 10.1007/s40265-022-01766-4. Epub 2022 Sep 8.
- Szucs A, Demeter I, Burghardt B, Ovári G, Case RM, Steward MC, Varga G. Vectorial bicarbonate transport by Capan-1 cells: a model for human pancreatic ductal secretion. *Cell Physiol Biochem*. 2006;18(4-5):253-64. doi: 10.1159/000097672.
- Venglovecz V, Rakonczay Z Jr, Ozsvári B, Takács T, Lonovics J, Varró A, Gray MA, Argent BE, Hegyi P. Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. *Gut*. 2008 Aug;57(8):1102-12. doi: 10.1136/gut.2007.134361.
- Wang J, Novak I. Ion transport in human pancreatic duct epithelium, Capan-1 cells, is regulated by secretin, VIP, acetylcholine, and purinergic receptors. *Pancreas*. 2013 Apr;42(3):452-60. doi: 10.1097/MPA.0b013e318264c302.