

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Barbora Borová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Pankreatické organoidy
Bakalářská práce

2024

Barbora Borová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora Borová**
Osobní číslo: **C21149**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Pankreatické organoidy**
Téma práce anglicky: **Pancreatic Organoids**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Zpracujte literární rešerši na dané téma bakalářské práce.

1. Prostudujte a shrňte současný stav výzkumu pankreatických organoidů. Popište historii a využití buněčných modelů pankreatu pro výzkumné účely s důrazem na nádorové onemocnění pankreatu.
2. Detailně popište postupy používané při přípravě pankreatických organoidů. Zaměřte se na různé zdroje buněk, kultivační podmínky, diferenciaci buněk a použité růstové faktory. Popište izolaci buněk z pankreatických tkání (zdravých, popř. nádorových).
3. Porovnejte výsledky jednotlivých publikovaných prací, a vyberte nejvhodnější protokol pro úspěšné zavedení pankreatických organoidů. Vypracujte přehled analýz a metod pro identifikaci organoidů. A sestavte přehled markerů, které charakterizují zdravé a nádorové organoidy pankreatu.
4. Diskutujte význam organoidů pro výzkum a léčbu onemocnění pankreatu, a jejich perspektivy. Bakalářskou práci přehledně zpracujte, použijte obrázky a schémata. Ke zpracování kompilace využijte elektronických databází, např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *WoS*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lenka Šmíd, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Pankreatické organoidy jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 01. 7. 2024

Barbora Borová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Lence Šmíd, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, za cenné rady, ochotu, věnovaný čas a vstřícnost při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a nejbližším za veškerou podporu během celého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá pankreatickými organoidy, tvorbou a jejich významem v klinické léčbě. V první části práce je popsána stavba a funkce fyziologické slinivky břišní a patologické stavy, které se týkají především karcinogeneze pankreatu. Cílem je jednak objasnit důležitost rozvoje buněčných modelů pankreatu v souvislosti s duktálním adenokarcinomem pankreatu, který se řadí mezi nejzávažnější karcinomy na světě a zároveň zjišťovat využitelnost pankreatických organoidů při léčbě diabetu, který je ve světě velmi rozšířen. V druhé části práce je popsána tvorba jednotlivých buněčných modelů pankreatu využitelných pro modelování duktálního adenokarcinomu pankreatu, ke screeningu léčiv a pro personalizovanou medicínu.

KLÍČOVÁ SLOVA

pankreatické organoidy, organoidy, duktální adenokarcinom pankreatu, rakovina pankreatu, kultivace, slinivka břišní

TITLE

Pancreatic organoids

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with pancreatic organoids, their formation and their importance in clinical treatment. The first part of the thesis describes the structure and function of the physiological pancreas and pathological conditions, which are mainly related to pancreatic carcinogenesis. The aim is to elucidate the importance of the development of pancreatic cell models in the context of pancreatic ductal adenocarcinoma, which is one of the most serious cancers in the world, and also the possible applicability of pancreatic organoids in the treatment of diabetes, which is widespread in the world. The second part of the thesis describes the creation of cell models of the pancreas, which are useful for modelling ductal adenocarcinoma of the pancreas, for drug screening and for personalized medicine.

KEYWORDS

pancreatic organoids, organoids, pancreatic ductal adenocarcinoma, pancreatic cancer, cultivation, pancreas

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
ÚVOD.....	12
1 SLINIVKA BŘIŠNÍ - PANKREAS	14
1.1 Zdravá lidská slinivka břišní.....	14
1.2 Patologické tkáň pankreatu	16
1.3 Onemocnění slinivky břišní	16
1.3.1 Diabetes	16
1.3.2 Využití organoidů v léčbě diabetu	17
1.3.3 Nádorové onemocnění pankreatu	18
1.3.4 Duktální adenokarcinom pankreatu	19
1.3.5 Genové mutace KRAS.....	21
1.4 Buněčné modely v biomedicínském výzkumu	22
1.4.1 2D kultivace	22
1.4.2 3D kultivace	22
1.4.3 Organoidy	23
1.5 Význam pankreatických organoidů	24
1.6 Historie pankreatických organoidů	25
2 BUNĚČNÉ MODEL Y PANKREATICKÝCH ORGANOIDŮ.....	27
2.1 Organoidy odvozené od kmenových buněk.....	28
2.1.1 Příprava a diferenciac e kmenových buněk	29
2.1.2 Kultivace pankreatických progenitorů na organoidy.....	31
2.2 Organoidy ze zdravé tkáně pankreatu.....	32
2.2.1 Odběr a izolace zdravé pankreatické tkáně.....	32
2.2.2 Kultivace organoidů ze zdravé tkáně pankreatu	33
2.3 Fetální pankreatické organoidy	35
2.4 Organoidy rakoviny pankreatu	36
2.4.1 Odběr nádorové tkáně a izolace nádorových organoidů.....	38
2.4.2 Kultivace nádorových organoidů	40
2.5 Metody identifikace organoidů a 3D struktur	43

2.6 Farmakotypizace organoidů.....	45
ZÁVĚR	46
POUŽITÁ LITERATURA	47

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 slinivka břišní	16
Obrázek 2 prekancerózní neoplazie ve slinivce břišní	21
Obrázek 3 tvorba a využití organoidů pankreatu.....	28
Obrázek 4 průběh diferenciacce hPSC na organoidy	34
Obrázek 5 možnosti infekce organoidů	35
Obrázek 6 nádorové pankreatické organoidy	37
Obrázek 7 kultivace organoidů	38
Obrázek 8 vzhled organoidů	43

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2D	dvourozměrný
3D	trojrozměrný
ASC	dospělé kmenové buňky (z angl. adult stem cells)
BME	extrakty bazální membrány (z angl. basement membrane extracts)
BSA	bovinní sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CAF	fibroblasty úzce spojené s nádorem (z angl. cancer-associated fibroblast)
CDKN2A	inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A (z angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)
DE	definitivní endoderm (z angl. definitive endoderm)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor (z angl. epidermal growth factor)
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. epidermal growth factor receptor)
ESC	embryonální kmenové buňky (z angl. embryonic stem cells)
EUS	endoskopický ultrazvuk (z angl. endoscopic ultrasound)
EUS-FNB	endoskopická ultrazvukem naváděná tenkojehlová biopsie
FBS	fetální bovinní sérum (z angl. fetal bovine serum)
FGF10	fibroblastový růstový faktor (z angl. fibroblast growth factor)
GDP	guanosin-5'-difosfát
GTE	endoderm střevní trubice (z angl. gut tube endoderm)
GTP	guanosin-5'-trifosfát

hPSC	lidské pluripotentní kmenové buňky (z angl. human pluripotent stem cells)
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky (z angl. induced pluripotent stem cells)
ITS-X	inzulin-transferin-selenium-ethanolamin
KGF	růstový faktor keratinocytů (z angl. keratinocyte growth factor)
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LSCM	laserová skenovací konfokální mikroskopie (z angl. laser scanning confocal microscopy)
MAPK	mitogen aktivovaná proteinkináza (z angl. mitogen activated protein kinase)
p38MAPK	p38 mitogenem aktivované proteinkinázy (z angl. p38 mitogen-activated protein kinases)
PanIN	pankreatická intraepiteliální neoplazie (z angl. pancreatic Intraepithelial Neoplasia)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PDAC	duktální adenokarcinom pankreatu (z angl. pancreatic ductal adenocarcinoma)
PDO	pankreatické duktální organoidy (z angl. pancreatic ductal organoids)
PE	pankreatický endoderm (z angl. pancreatic endoderm)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PP	pankreatické polypeptidické buňky
PPs	pankreatické progenitory (z angl. pancreatic progenitors)
PSC	pluripotentní kmenové buňky (z angl. pluripotent stem cells)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie (z angl. transmission electron microscopy)
WNT	signální dráha wingless/int-1

ÚVOD

Tvorba buněčných modelů, které slouží k napodobování přesné struktury nacházející se v lidském těle, představuje v současnosti velký potenciál. Organoidy jsou velmi slibným modelem, jelikož jsou schopné rekapitulovat *in vivo* tkáňové struktury *in vitro*, a tím otevírají brány výzkumu v mnoha ohledech, jako je zkoumání genů spojených s rakovinou a jejich odpovědi na danou léčbu. Pankreatické organoidy slouží k objasnění patologických procesů probíhajících ve slinivce břišní, kdy slouží především ke zkoumání nádorových onemocnění pankreatu. Karcinom slinivky břišní se řadí mezi jednu z výzev 21. století týkající se karcinogeneze, jelikož se jedná o velice nepříznivé onemocnění s velmi špatnou prognózou. Mezi nejčastěji vyskytující se typ rakoviny slinivky patří adenokarcinom pankreatu. Tento typ nádoru je v současné době třetí nejčastější příčinou úmrtí spojenou s nádorovým onemocněním. Vzhledem k rychle se zvyšující incidenci tohoto nádoru se očekává, že do roku 2030 se stane druhou nejčastěji se vyskytující rakovinou s velmi nízkou pětiletou mírou přežití. Z tohoto důvodu jsou pankreatické organoidy významným buněčným modelem, který umožňuje výzkum karcinomu pankreatu. Organoidy se shromažďují a snahou je sestavit biobanku nádorů, která bude obsahovat organoidy odvozené od různých stádií karcinomu pankreatu. Toho se dá využít k objevování a validaci léků, ke studování jednotlivých fází nádoru a genetických změn nádoru. Organoidy představují také nástroj pro personalizovanou medicínu.

Organoidy mohou být také slibným nástrojem pro léčbu diabetu. Diabetes je nenádorové onemocnění slinivky břišní, které může nastat v důsledku absolutního nedostatku inzulínu (diabetes 1. typu) nebo v důsledku snížené reakce lidského těla na inzulín a špatné produkce inzulínu (diabetes 2. typu). Podle údaje z roku 2023 každým rokem onemocní diabetem zhruba 60 tisíc lidí a celkový počet diabetických pacientů v České republice v roce 2023 překročil již 1 milion, z nichž pouze 5 % pacientů trpí diabetem 1. typu. Organoidy pankreatických ostrůvků jsou strukturně a buněčně podobné jako lidské ostrůvky. Díky tomu by mohly být využity při transplantaci ostrůvků, čímž by se zvýšil počet pacientů, kterým by transplantace ostrůvku byla poskytnuta. V současnosti je transplantace ostrůvku nabídnuta pouze 0,5 % pacientů, jelikož je spojena s mnoha problémy jako je invazivita zákroku a potřeba 2 dárců pro jednoho pacienta, a proto by využití organoidů pankreatických ostrůvků přispělo k léčbě diabetu.

Tvorba pankreatických organoidů je v současnosti středem zájmu spousty výzkumných kolektivů, které se snaží sestavit ideální protokol pro tvorbu a kultivaci pankreatických organoidů v co největší míře úspěšnosti. Pankreatické organoidy mohou být odvozeny

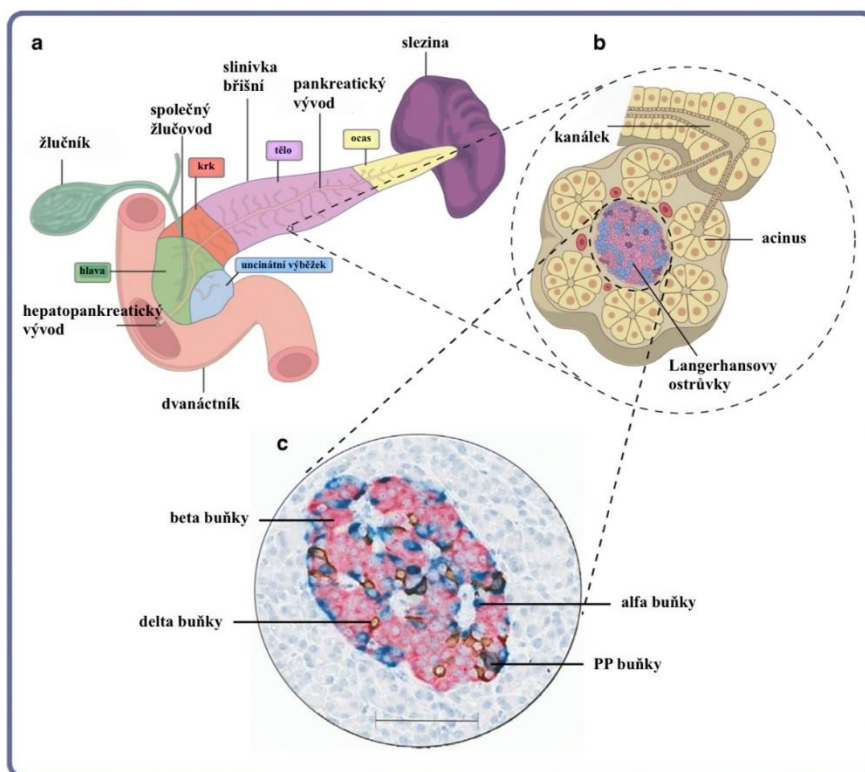
od pluripotentních kmenových buněk, z fetální tkáně, z normální zdravé tkáně a z nádorové tkáně pankreatu. Nejhojněji jsou konstruovány protokoly pro tvorbu nádorových organoidů, pro jejichž tvorbu se využívá odebraná nádorová tkáň od pacienta, která se získává z biopsií nebo resekci pankreatu. Každý typ buněk má svůj způsob zpracování a zahrnuje různé techniky kultivace buněk vedoucích ke vzniku organoidů. Bakalářská práce shrnuje různé protokoly, které vedly k úspěšné tvorbě pankreatických organoidů.

1 SLINIVKA BŘIŠNÍ – PANKREAS

1.1 Zdravá lidská slinivka břišní

Slinivka břišní je kombinovaná endokrinní a exokrinní žláza, která má důležitou funkci při trávení a také se významně podílí na udržování metabolické homeostázy (Balak et al., 2019). Lidská slinivka je samostatný, nezávisle fungující orgán (Dolenšek et al., 2015). Slinivka břišní vzniká v průběhu embryonálního vývoje z progenitorové buňky endodermu. Prvotní progenitorová buňka se rozlišuje na pankreatickou multipotentní progenitorovou buňku, která má schopnost se diferencovat na jakoukoli pankreatickou buňku exokrinní nebo endokrinní části pankreatu, kromě buněk PSC (pluripotentní kmenové buňky). Z multipotentních progenitorových buněk vznikají různé typy buněk: špičkové, kmenové a také endokrinní buňky. Každá z těchto buněk má různé markery buněčných linií. Špičkové buňky se rozlišují na buňky acinární a z kmenových buněk vznikají duktální buňky a endokrinní progenitorové buňky (Lilly et al., 2023). Slinivka břišní zdravého dospělého člověka váží 100 g a je dlouhá zhruba 14 až 25 cm. Tvar normální slinivky je laločnatý a podlouhlý. Slinivka je velice parenchymatický orgán, který se nachází šikmo za zadní a horní břišní stěnou a člení se na pět anatomických částí, kterými jsou hlava, uncinátní výběžek, který je umístěn v předním břišním laloku hlavy, krk, tělo a ocas (Atkinson et al., 2020). Mezi jednotlivými částmi pankreatu nejsou žádné jasně definované hranice. Za pomyslnou hranici mezi hlavou a tělem se dá považovat levý okraj horní mezenterické tepny, kdežto jako hranice mezi tělem a ocasem se dá brát střed těla a ocasu dohromady. Hlava pankreatu je část, která má tvar písmene C a je zarovnaná s horním zakřivením dvanáctníku. Tělo slinivky má plochý a úzký tvar a můžeme jej najít táhnoucí se takřka horizontálně v mediální rovině pod žaludkem (Dolenšek et al., 2015). Lidská slinivka se vyvíjí a roste přibližně do 30. roku života a současně se její hmotnost nebo také objem velice mění během dospělosti (Atkinson et al., 2020). Endokrinní část pankreatu je tvořena pankreatickými neboli Langerhansovy ostrůvky, které vylučují hormony nezbytné pro udržování hladiny glukózy v krvi. Endokrinní část se skládá z pěti různých druhů endokrinních buněk, a to z β buněk, které produkují inzulin (60 %), α buněk produkujících glukagon (30 %), δ produkujících somatostatin (10 %), γ /PP buněk produkujících pankreatický polypeptid a z ϵ buněk produkujících ghrelin (Zhang et al., 2022). Obvykle endokrinní část slinivky břišní zahrnuje jeden až dva miliony Langerhansových ostrůvků. Každý samostatný ostrůvek je tvořen velkým množstvím buněk (desítky až tisíce). Ostrůvky jsou oválného tvaru a jsou rozptýleny po celé slinivce, ale v nejhojnější počtu se nacházejí v ocase pankreatu (McGuckin et al., 2020). Langerhansovy ostrůvky obsahují kromě endokrinních buněk také

stromální buňky, makrofágy, neuronální elementy, endotelové buňky a pericyty. Všechny tyto buňky představují méně než 5 % zastoupených buněk. Ostrůvky jsou funkční miniorgány mající vlastní inervaci a komplexní mezibuněčnou komunikaci. K zajištění správné funkce ostrůvků je nezbytné, aby přijímaly a zpracovávaly signály, jako jsou různé hormony a živiny, které se k nim dostávají z krevního řečiště nebo také z intersticiálního prostoru (Wassmer et al., 2020). Exokrinní část pankreatu je tvořena acinárními buňkami, které ukládají trávicí enzymy, ty jsou následně vylučovány a odváděny do dvanáctníku (Balak et al., 2019). Tvoří se zde enzymy jako je amyláza, lipáza a trypsin. Acinární buňky zastupují zhruba 85 % pankreatické hmoty a jsou hlavními složkami lalůček (Lilly et al., 2023). Acinus, který je základní funkční jednotkou exokrinní části pankreatu, je komplex klínovitých sekrečních buněk, které svým uspořádáním do kulatého "bobulovitého" tvaru vytvářejí centrální dutinu uvnitř. Sekreční buňky vylučují tekutinu složenou z bílkovin, zymogenů, což jsou prekurzory enzymů a také ze samotných enzymů. Tato tekutina následně odtéká z centrální dutiny do vývodu, kterým je interkalární kanálek. Interkalární kanálek tvoří zploštělé, kubické epitelové buňky, které mají velký význam při tvorbě pankreatické šťávy (McGuckin et al., 2020). Endokrinní a exokrinní žlázy slinivky břišní jsou odpovědné za přesun makromolekulárních živin do vstřebatelných fragmentů a za dlouhodobé udržování glykemické rovnováhy. Dalšími buňkami ve slinivce břišní jsou centroacinární buňky a hvězdicové buňky. Centroacinární buňky jsou specializované buňky, které vycházejí z pankreatických vývodů do acinů a jejich význam spočívá v regeneraci pankreatu. Hvězdicové buňky jsou podobné myofibroblastům a nacházejí se v obou částech slinivky. Tyto buňky se podílejí na modelování tkání, další funkcí je vylučování extracelulární matrix a také jsou vhodným zdrojem cytokinů (Lilly et al., 2023). Společně s ostatními orgány se slinivka břišní podílí na uskutečnění běžných fyziologických funkcí a porucha funkce jakéhokoliv orgánu může způsobit nefunkčnost celého řetězce. Onemocnění slinivky břišní kvůli tomuto spojení s dalšími orgány nezpůsobuje pouze lokální účinky, ale doprovází multisystémové poruchy s homeostatickou poruchou, které mohou ohrožovat lidský život (Liu et al., 2023).



Obrázek 1 slinivka břišní a) anatomické rysy slinivky břišní b) organizace endokrinní a exokrinní soustavy c) lidské pankreatické ostrůvky znázorňující 4 typy endokrinních buněk (Atkinson et al., 2020)

1.2 Patologické tkáň pankreatu

K mnoha morfologickým a patologickým změnám dochází u slinivky břišní vlivem stárnutí. Tyto změny mohou být například atrofie slinivky břišní, tuková degenerace, infiltrace zánětlivými buňkami a exokrinní metaplazií slinivky břišní. Jelikož je endokrinní a exokrinní funkce slinivky velice ovlivněna stárnutím tak mohou tyto změny u člověka usnadňovat vznik onemocnění, které úzce souvisí se stárnutím, jako je diabetes, dyspepsie, duktální adenokarcinom pankreatu nebo také pankreatitida. Stárnutí pankreatu je spojeno s různými faktory jako je genetické poškození, metylace DNA, mitochondriální dysfunkce, stres endoplazmatického retikula nebo zánět (Li et al., 2023).

1.3 Onemocnění slinivky břišní

1.3.1 Diabetes

Diabetes je chronické metabolické onemocnění charakterizované ztrátou dozoru nad hladinou glukózy v krvi. Nejčastějšími typy jsou diabetes 1. typu a diabetes 2. typu. Diabetes 1. typu vzniká v důsledku absolutního nedostatku inzulínu (Bittenglova et al., 2021). K absolutnímu nedostatku inzulínu dochází v důsledku autoimunitní destrukce β buněk slinivky břišní, která je způsobena T buňkami (T – lymfocyty) (Shahjalal et al., 2018). Diabetes 2. typu je způsoben

relativním nedostatkem inzulínu, ke kterému dochází v důsledku zvýšené inzulínové rezistence. Pacienti s prvním typem diabetu jsou v současnosti léčeni především pomocí synteticky vytvořeného inzulínu (Bittenglova et al., 2021). Diabetes 2. typu je spojen hlavně s inzulínovou rezistencí, ke které dochází v případě, kdy periferní tkáň, jako je například tuková, jaterní a svalová tkáň, nejsou schopny vhodně odpovídat na inzulínovou signalizaci a tím je způsobena zvýšená hladina glukózy v krvi. Dojde k přetížení beta buněk, k jejich vyčerpání a vlivem tohoto přestanou fungovat, jak mají a tím dojde k porušení produkce inzulínu, což přispívá k dalšímu zvýšení hladiny glukózy v krvi a nastává hyperglykémii (Lorberbaum et al., 2022). V důsledku exokrinního onemocnění slinivky břišní může diabetes vzniknout také sekundárně a může mít za následek vznik pankreatogenního diabetu (diabetes 3. typu) Rickels a kolektiv poukázali na to, že diabetes bývá běžným následkem velkého množství exokrinních onemocnění slinivky břišní, od monogenetické poruchy exokrinní části pankreatu, ke kterým patří cystická fibróza až po chronickou pankreatitidu a adenokarcinom pankreatu (Marshall, 2020). I přes mnoholeté zkušenosti s léčbou diabetických pacientů pomocí syntetického inzulínu, zůstává diabetes hlavním důvodem mnoha onemocnění jako jsou srdeční onemocnění, slepota, selhání ledvin a amputace dolních končetin. Pacientů, kteří v současnosti dosahují vhodných léčebných cílů potřebných pro snížení rizika diabetických potíží, je pouze méně než 20 % ze všech pacientů potýkajících se s touto nemocí (Dolezalova et al., 2021).

1.3.2 Využití organoidů v léčbě diabetu

Transplantace celé slinivky břišní nebo také transplantace pankreatických ostrůvků poskytuje možný léčebný postup, který by vedl k vyléčení diabetu. Transplantace slinivky je velmi invazivní chirurgický zákrok, který je spojen se značným rizikem komplikací a z tohoto důvodu je transplantace slinivky nebo pankreatických ostrůvků poskytnuta pouze nízkému počtu pacientů s tímto rozšířeným autoimunitním onemocněním (pouze méně než 0,5 % pacientů). Dalším důvodem nízkého počtu transplantací slinivky je nedostatečná výtěžnost, kvůli které je zapotřebí dvou dárců slinivky břišní pro jednoho pacienta (Dolezalova et al., 2021). Díky transplantaci beta buněk či izolovaných pankreatických ostrůvků z kadaverózní slinivky neboli slinivky pocházející z mrtvého těla, byla již malá část pacientů vyléčena. Problémem je ale dostupnost buněčné léčby, která je limitovaná nízkým množstvím kadaverózních pankreatů. Tento problém by mohl být překonán díky beta buňkám odvozených ze samoobnovujících se kmenových buněk (Bittenglova et al., 2021). Organoidy pankreatických ostrůvků založené na kmenových buňkách spolehlivě napodobují vznik a vývoj ostrůvků *in vitro*. Dále tyto organoidy poskytují rozsáhlé množství trojrozměrných funkčních biomimetických ostrůvků,

kteří mají podobnou morfológickou strukturu a podobné buněčné složení jako mají ostrůvky v lidském těle. Organoidy odvozené od ostrůvků přináší slibné vyhlídky při modelování vzniku, vývoje a funkcí ostrůvků. Organoidy také mohou pomoci objasnit mechanismy, které jsou příčinou vzniku cukrovky, podílí se na screeningu léčiv a autologní transplantaci ostrůvků. V současné době je model organoidů pankreatických ostrůvků nedokonalý ve srovnání s ostrůvkem nacházejícími se v lidském těle. Aby model organoidů věrně napodoboval funkce lidských ostrůvků a poskytoval autentické informace o onemocnění cukrovkou je zapotřebí dosáhnout zlepšení heterogenity a funkčnosti těchto organoidů (Zhang et al., 2022). Pro vytvoření funkčních organoidů podobných lidským ostrůvkům, jsou nezbytné endokrinní buňky slinivky břišní, které se využívají jako výchozí buňky. Pro kultivaci ostrůvkových organoidů je možné využít mnoho typů pankreatických endokrinních buněk. Mohou to být pluripotentní buňky izolované z lidských pankreatických ostrůvků, dále endokrinní buňky ostrůvků anebo je možné využít neostrůvkové linie, které se mohou transdiferencovat na buňky obsažené v lidské slinivce břišní jako jsou duktální, acinární a jaterní buňky (Jiang et al., 2022). Organoidy ostrůvků představují slibný lidský model na úrovni celého orgánu, který by bylo možné využít pro zjištění řady patologických mechanismů, které jsou podstatou destrukce ostrůvků slinivky břišní, hodnocení terapeutických léčiv, ale i pro úplné pochopení infekce SARS-CoV-2 a pro následnou léčbu COVID-19 a také pro kontrolu glykémie v souvislosti s COVID-19 (Zhang et al., 2022).

1.3.3 Nádorové onemocnění pankreatu

Rakovina slinivky břišní je onemocnění s rychlým rozvojem a postupem a s velmi špatnou prognózou. Organoidy mohou modelovat vlastnosti nádorových onemocnění slinivky břišní a také je tímto modelem umožněno studovat a zkoumat charakteristiky karcinomu pankreatu, díky čemuž lze účinně řídit klinickou praxi. Organoidy jsou nástrojem ke zlepšování prognózy pacientů s tímto druhem karcinomu (Chen et al., 2021). Pacientů, kteří přežijí s tímto typem nádoru déle než 5 let je velmi malé množství (méně než 5 % pacientů). K důvodům vedoucím k velmi nízkému přežití pacientů s karcinomem slinivky patří pozdní odhalení a diagnóza, rychlý vývoj onemocnění, časná metastáza a špatná odezva na léčbu chemoterapií (Liu et al., 2023). Během posledních dvou desetiletí nastal zásadní pokrok ve výzkumu, díky kterému bylo umožněno pochopení molekulárních a vývojových procesů řídicích vznik tohoto nádoru, který je vysoce zhoubný. I přes všechny nedávné pokroky zůstává rakovina slinivky břišní hlavním důvodem úmrtí spojených s rakovinou ve značném množství průmyslových zemí (Dennaoui et al., 2021). Nádory slinivky břišní jsou velice bohaté na fibrozánětlivé reakce.

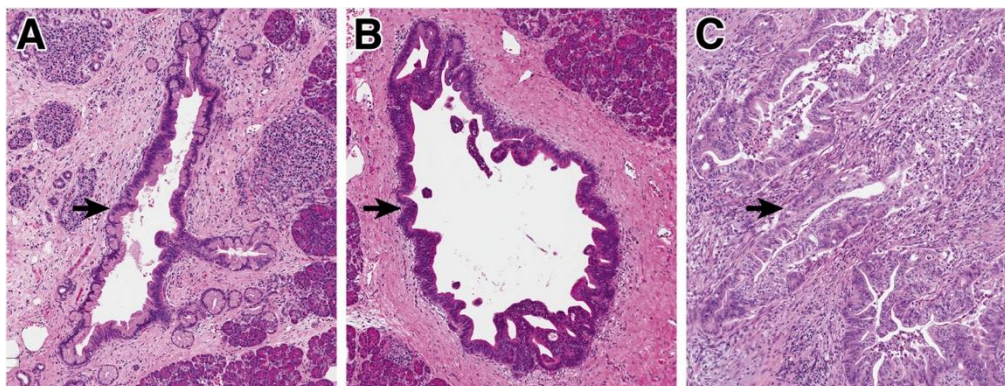
Fibrozánětlivé reakce zabraňují prostupu chemoterapeutik k nádoru. Odpověď na lék a patofyziologii vývoje rakoviny ovlivňuje nádorové mikroprostředí (Haque et al., 2021). Nádorem může být postižena kterákoliv část pankreatu jak hlava, tělo tak ocas pankreatu. V hlavě pankreatu vzniká většina nádorů slinivky (jedná se zhruba o 70 %). Nádory vzniklé v hlavě slinivky se projevují obstrukcí žlučových cest, a to může mít za následek tmavou moč (u 49 % pacientů). Dále mohou být doprovázeny žloutenkou (u 49 % pacientů), únavou (u 51 % pacientů), exokrinní pankreatickou insuficiencí (u 25 % pacientů), úbytkem hmotnosti (u 55 % pacientů) a ztrátou chuti k jídlu (u 48 % pacientů). Pacienti postižení rakovinou v těle či ocase pankreatu nemají nijak zvlášť vyznačující se příznaky. Vyskytují se u nich například bolesti břicha, příznaky související s kachexií nebo také bolesti zad (Park et al., 2021). Podstatnou roli u tohoto typu karcinomu hraje věk, neboť právě ten je rizikovým faktorem. Postižení bývají hlavně starší pacienti, a to ve věku nad 40 let. Rakovina slinivky je u osob ve věku do 40 let vzácná a extrémně vzácná je u pacientů ve věku do 20 let (Matsuda, 2019). Rakovina slinivky břišní se dělí na více typů. Typy karcinomu mohou být: duktální adenokarcinom a speciální typy duktálního karcinomu, maloglandulární karcinom, karcinom acinárních buněk a malobuněčný karcinom. Duktální adenokarcinom pankreatu (PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma) je nejčastěji vyskytujícím se typem karcinomu pankreatu a představuje více než 90 % všech karcinomů pankreatu, které byly zmíněny (Chen et al., 2021).

1.3.4 Duktální adenokarcinom pankreatu

Duktální adenokarcinomy pankreatu vznikají vlivem zhoubné přeměny duktálních epiteliálních buněk. Tyto buňky tvoří kapilární kanálový systém, kterým jsou všechny enzymy a další sekrety odváděny ven ze slinivky břišní (Luo, 2021). Výskyt duktálního adenokarcinomu pankreatu se v porovnání se spoustou dalších nádorových onemocnění hodně zvyšuje. Předpokládá se, že tento typ nádorového onemocnění se stane během následujících let, a to zhruba do roku 2030, druhou nejčastěji frekventovanou příčinou související s rakovinou s pětiletou mírou přežití do 10 % (Pham et al., 2021). Vznik a růst duktálního adenokarcinomu slinivky břišní nastává důsledkem dědičných a somaticky získaných mutací, epigenetické deregulace genů a změn v posttranslační modifikaci proteinů. Změny mají zásadní roli v neoplastické transformaci, lokální invazi a také v metastázách (Dennaoui et al., 2021). Výskyt a progresse duktálního adenokarcinomu pankreatu souvisí se změnami v několika genech (Chen et al., 2021). Mezi nejčastěji vyskytující se prekuzory adenokarcinomu pankreatu patří mikroskopická pankreatická intraepiteliální neoplazie (PanIN), mucinózní cystická neoplazie a také intrapapilární mucinózní neoplazie. PanIN jsou mikroskopické

mucinózně-papilární léze, které mají velikost do 5 mm a vedou k invazivnímu karcinomu. PDAC je spojován s mnoha genovými změnami, jako je například aktivace onkogenů a inaktivace tumor supresorových genů (Moreira et al., 2017). Lidské nádory PDAC jsou charakterizovány řadou mutací v klíčových genech, jako jsou KRAS, TP53, SMAD4 a CDKN2A. Spouštěcí mutací je mutace KRAS (Kirsten rat sarcoma). Tato mutace byla odhalena u více než 90 % adenokarcinomu pankreatu (Pham et al., 2021). Převaha onkogenní mutace v genu KRAS je tedy charakteristickým znakem rakoviny slinivky břišní (Luo, 2021). Podle současných epidemiologických dat a experimentálních nálezů je zřetelné, že součástí neoplastické progresu u duktálního adenokarcinomu pankreatu je také zánět (Dennaoui et al., 2021). Tento typ nádoru bývá ovlivněn hustým stromatem, které obsahuje fibroblasty úzce spojené s nádorem (CAF – cancer-associated fibroblast). Ty mohou přispívat růstovými faktory, cytokiny a imunitními infiltráty. Podstatnou součástí nádoru PDAC jsou stromální buňky a zánět, který velmi souvisí s patogenezí karcinomu pankreatu. Převahu v mikroprostředí tohoto nádoru mají hvězdicové buňky. Tyto buňky mají značnou podobnost s myofibroblasty a za normálních podmínek se podílejí na obnově tkáně. Odlišnou populací stromálních buněk mohou být zánětlivé fibroblasty, které naopak růst nádoru podporují (Tsai et al., 2018). Nebezpečí vzniku rakoviny slinivky břišní zvyšuje dále chronická pankreatitida a různé faktory životního prostředí, které způsobují chronický zánět. Těmito faktory může být například kouření, těžká konzumace alkoholu, strava a obezita (Dennaoui et al., 2021). Z faktorů souvisejících s životním stylem představuje největší riziko, spojené s PDAC nádorem, kouření cigaret. Příznakem PDAC může být také diabetes, a to jak nově vzniklý nebo i již existující, který se stále zhoršuje a je nutné provést vyšetření. Akutní pankreatitida může být také projevem PDAC, ale jedná se o vzácný projev, který se vyskytuje jen u 3 % pacientů s nově diagnostikovaným PDAC (Park et al., 2021). V současnosti se o chirurgickém zákroku hovoří jako o nejpřínosnější terapii u duktálního adenokarcinomu pankreatu. Chirurgický zákrok je umožněn pouze několika málo lidem, u kterých dojde k recidivě onemocnění, neboť je proveditelný pouze u raného stádia tohoto karcinomu (Liu et al., 2023). Technologie organoidů se v posledních pár letech rozvíjí jako zásadní nástroj, který umožňuje dlouhodobou kultivaci tkání, včetně tkáně PDAC (Chen et al., 2023). Pacientům, u kterých nelze provést chirurgický zákrok se podává lék gemcitabin/nab-paclitaxel nebo folfirinox. Tyto léky jsou látky s chemoterapeutickým účinkem a poskytují uspokojivé výsledky v raném stádiu nemoci (Liu et al., 2023). Organoidní model byl vytvořen, aby bylo umožněno lepší porozumění biologických charakteristik a progresu karcinomu slinivky. Tento model se využívá pro experimentální výzkum (Chen et al., 2021). Organoidy slinivky břišní mají rozsáhlé

možnosti uplatnění například při vzniku nádorů nebo při vývoji nádorů v personalizované medicíně. Díky zlepšování technologie organoidů bude docházet k pokrokům u screeningu léčiv a v personalizované medicíně, která souvisí s rakovinou slinivky břišní (Liu et al., 2023).



Obrázek 2 prekancerózní neoplazie ve slinivce břišní A) PanIN nízkého stupně postihující pankretické vývody B) PanIN vysokého stupně se zvýšenou patologií v architektuře a cytologii tkáně C) invazivní PDAC způsobující závažné architektonické a cytologické atypie (Wood et al., 2022)

1.3.5 Genové mutace KRAS

Duktální adenokarcinom slinivky břišní, jak již bylo zmíněno, je velice složité onemocnění, které se skládá z bodových mutací, epigenetických změn a z chromozomálních strukturálních obměn. Z genetické stránky je hlavním iniciátorem tohoto závažného onemocnění onkogen KRAS (Kirsten rat sarcoma), který bývá mutačně aktivovaný u více než 90 % PDAC (Luchini et al., 2020). Onkogen KRAS se řadí mezi silné aktivátory dráhy MAPK (mitogen activated protein kinase), která způsobuje iniciaci a progresi rakoviny pankreatu. Malá část duktálních adenokarcinomů slinivky obsahuje mutaci KRAS divokého typu, která ale také může způsobovat deregulaci dráhy MAPK (Pham et al., 2021). KRAS je malá GTPáza, která má schopnost vázat guanosintrifosfát a difosfátové nukleotidy (Cicenas et al., 2017). Protein KRAS je molekulární přepínač, pohybující se mezi aktivní formou, která je vázaná na guanosin-5'-trifosfát (GTP) a mezi neaktivní formou, vázanou na guanosin-5'-difosfát (GDP). Během nádorového bujení zvyšují mutace KRAS hladinu aktivní formy v ustáleném stavu, a to má za následek pohánění protumorigenních drah, kterými jsou například mitogen aktivovaná proteinkináza (MAPK) a fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K) (Gurreri et al., 2023). Dráha MAPK je jednou z nejvýznamnějších v souvislosti s funkcí KRAS. Mutace KRAS kóduje malou GTPázu, jejíž funkcí je působit jako transduktor – efektor a spolupracuje s tyrozinkinázami na povrchu buněk. Po spuštění způsobuje aktivaci různých intracelulárních drah, které jsou zapojené do karcinogeneze. Aktivuje například proliferaci a migraci buněk, obcházení imunitního systému a také blokování apoptózy (Luchini et al., 2020). Mutace, které způsobují konstitutivní aktivaci KRAS mají za následek nekontrolovanou

proliferaci a způsobují rozvoj a také šíření rakoviny. KRAS bývá mutován u mnoha typů nádorů. Předpokládá se, že se vyskytuje u více než 20 % nádorů, ale nejvíce se vyskytuje u karcinomu slinivky břišní, u které se vyskytuje přibližně v 90 % případů. Pomocí studií bylo zjištěno, že mutace KRAS by se dala využít jako významný prognostický biomarker a také jako nástroj predikce léčby (Cicenas et al., 2017).

1.4 Buněčné modely v biomedicínském výzkumu

1.4.1 2D kultivace

2D kultury byly v několika posledních desetiletích preferovaným modelem pro screening léčiv. Byly preferovány díky jejich nízkým nákladům na údržbu, díky snadné manipulaci a také díky vysoké rozšiřitelnosti, která umožňuje vysoce výkonné studie s vysokým obsahem. Jedním z hlavních omezení 2D systému je jejich neschopnost dostatečně napodobit fyziologické prostředí, zejména nedostatek mikroprostředí a mnohobuněčných interakcí přítomných v organoidních modelech. V důsledku toho nemusí 2D modely přesně napodobovat fenotypy komplexních onemocnění, což může omezit jejich prediktivní sílu při screeningových testech léků. (Lee et al., 2023) Mnoho klíčových stránek (jako je buněčná polarita, trojrozměrná samoorganizace, vzájemné působení se stromálními buňkami, dalšími složkami extracelulární matrix a kontakty mezi buňkami) je v dvourozměrném modelu, který využívá immortalizované buněčné kultury nebo také primární buňky, omezeno (Balak et al., 2019). 2D model představuje spoustu omezení a to například, že si buněčné linie v tomto modelu nezachovávají tkáňově specifickou architekturu ani vzájemné polarizované interakce mezi buňkami v duktální populaci buněk a omezení představuje i to, že jim schází schopnost vytvářet vzájemný kontakt stromálních a nádorových buněk (Seppälä, Burkhardt, 2021). Mnoho studií proběhlých během posledních 50 let ukázalo, že buňky kultivované ve 2D nejsou rovnoměrné se stavem *in vivo*. 2D kultury, co se týče strukturální strany, neposkytují podmínky pro organizaci a buněčné vztahy pozorované *in vivo*. Mimo jiné jsou ve 2D struktuře buněčné signální sítě změněny oproti 3D, což má patrně za následek, že výsledky screeningu léků často nenapodobují prostředí *in vivo* (Simian, Bissel, 2017).

1.4.2 3D kultivace

3D model buněčné kultury je takový model, ve kterém je mimo tělo uměle vybudováno prostředí velice podobné živému tělu. Tímto je buňkám poskytnuto vhodné prostředí, ve kterém je umožněn růst buněk ve všech rozměrech, směrech a buňky se mohou spojit s okolním prostředím. Díky tomu, že prostředí v 3D modelech vykazuje určitou podobnost s prostředím

v lidském těle mají také buňky podobné vlastnosti jako buňky a orgány nacházející se v lidském těle. Metody 3D buněčných kultur se dají rozdělit na dva různé typy modelů a to na sféroidní a organoidní modely. Oba modely vznikají shromážděním mnoha buněk, ale liší se tím, že sféroidy jsou jednoduché shluky a organoidy jsou složité shluky. Sféroidy jsou tedy jednoduché shluky široké škály buněk, které nemají schopnost se samy uspořádat či regenerovat a to způsobuje, že mají menší využití než organoidy. Oproti tomu organoidy jsou složité shluky orgánově specifických buněk (Lee et al., 2023). Organoidní kultury se vyvíjejí kupředu, a to velice pomáhá výzkumným pracovníkům provádět translační výzkum na dlouhodobých *in vitro* kulturách, které nemají překážky běžně přítomné jak ve 2D kultuře, tak ve zvířecích modelech (Balak et al., 2019).

1.4.3 Organoidy

Organoidy jsou jednoduché modely *in vitro* jejichž princip je založen na tkáňovém inženýrství. Organoidy napodobují ze spousty hledisek komplexní struktury a funkce odpovídající tkáni *in vivo*. Organoidy mají využití v diagnostice, modelování nemocí, objevování léků a personalizované medicíně. Mohou být odvozeny od mnoha typů buněk jako například z kmenových buněk, progenitorových nebo diferencovaných buněk jak ze zdravých, tak z nemocných tkání což mohou být tkáně postižené nádorem (Zhao et al., 2022). Organoidy jsou charakterizovány jako složité shluky orgánově specifických buněk a lze je kultivovat z mnoha typů buněk, kterými jsou embryonální kmenové buňky, indukované pluripotentní kmenové buňky a dospělé kmenové buňky (Balak et al., 2019). Organoidní model umožňuje analyzovat genové exprese v epiteliálních buňkách bez toho, aniž by došlo ke kontaminaci hematopoetickými, mezenchymálními nebo imunitními buňkami (Moreira et al., 2017). Organoidy umožňují rekapitulovat *in vivo* tkáňové struktury a funkce *in vitro* a také jsou dostupnější pro manipulaci a hloubkové biologické studie, čímž se liší od 2D kultur a zvířecích modelů (Zhao et al., 2022). Organoidy patří mezi 3D buněčné struktury, které mají schopnost se vytvářet samoorganizací buněk a napodobují strukturu a funkčnost orgánu v lidském těle, ze kterého byly buňky pro tvorbu organoidů odvozeny. Podstatnou součástí organoidních kultur je 3D prostředí, které je pro dané buňky nejvhodnější. Organoidy jsou běžně vytvářeny rozkladem (enzymatickým nebo mechanickým) původní tkáně na malé kousky, které jsou po rozkladu vloženy do matrice (Moreira et al., 2017). Kultivace buněk probíhá v extracelulární matrici nebo v kultivačním médiu, které obsahuje růstové faktory. Nejčastěji používanou extracelulární matricí bývá Matrigel (Balak et al., 2019). Podstatou organoidů je tvorba struktury, která se svou strukturou a funkčností co nejvíce blíží tkáni či orgánu, ze kterého

se organoidy vytvářejí. Zachovávají si jak genetické, tak fenotypové vlastnosti. Dříve se organoidy kultivovaly převážně z normálních tkání, ale v dnešní době se čím dál více uplatňuje kultivace organoidů z nádorových tkání (Chen et al., 2023). Pomocí organoidů mohou být ověřovány a popisovány genetické změny, které jsou nezbytné pro progresi rakoviny, k identifikaci a objasnění genů spojených s časnými až pozdními stádii progresu rakoviny, odpovědi na léčbu a jejími výsledky (Moreira et al., 2017). Organoidy lze porovnat s běžnými tradičními modely, jako jsou klasické 2D buněčné kultury a editace genů u myši a lze zjistit, že organoidy přináší řadu výhod oproti těmto modelům. Organoidy odvozené od žijících lidí nebo od myši přináší výhody jako je neškodnost extrakce vzorků, proveditelnost jejich aplikace na člověka a také skutečnost, následné modelování onemocnění není zdraví škodlivé, což umožňuje této technologii výrazně snížit problémy s etickým dodržováním a zvýšit potenciál pro aplikace organoidů (Liu et al., 2023).

1.5 Význam pankreatických organoidů

Organoidy slouží jako nový model pro hodnocení onemocnění, které souvisí se slinivkou břišní. Hlavní onemocnění, pro která jsou organoidy slibným modelem jsou nádorová onemocnění pankreatu, diabetes a cystická fibróza pankreatu (Liu et al., 2023). Organoidy odvozené od duktálního adenokarcinomu pankreatu jsou široce používány ve výzkumu tohoto nádorového onemocnění, a to obzvlášť díky své schopnosti vytvářet, udržovat a rozšiřovat živou biobanku nádorů, které jsou specifické pro pacienta pro pokračující experimenty, technické opakování a také pro validační práce. Pankreatické duktální organoidy (PDO – pancreatic ductal organoids) jsou shromažďovány, udržovány a kryokonzervovány, aby došlo k vytvoření rozsáhlé sbírky obsahující velké množství vzorků nádorů v jedinečné biobance. Shromažďováním organoidů by mělo být docíleno usnadnění následného výzkumu a jednoduššího objevování nebo validace léků. Organoidy duktálního karcinomu lze využít ke studiu genomických znaků, které vedou k evoluci nádoru duktálního adenokarcinomu pankreatu (Seppälä, Burkhart, 2021). K ověřování terapeutických přístupů se obvykle využívají různé buněčné modely, jako jsou například jednovrstevné buněčné linie odvozené od rakoviny. Zajímavým modelem pro léčebné studie jsou organoidy odvozené od pacienta, jelikož mohou být izolovány ze všech stádií probíhajících během rakoviny slinivky břišní. Další výhodou organoidů odvozených od karcinomu pankreatu je, že poskytují čistou neoplastickou populaci buněk, čímž je umožněno zkoumání citlivosti a rezistence na rakovinu pankreatu. V neposlední řadě by mohly být organoidy využity jako základní východisko personalizované medicíny (Tiriác et al., 2019).

Organoidy slinivky břišní by měly mít využití i u jiných onemocnění slinivky břišní, především u některých benigních. Mezi benigními onemocněními slinivky má největší převahu cukrovka 1. typu či cukrovka 2. typu. Možnost, jak propojit buněčnou léčbu v laboratoři s klinickým využitím, může představovat transplantace slinivky břišní nebo transplantace izolovaných pankreatických (Langerhansových) ostrůvků. Výhodou organoidů je, že si zachovávají vzájemné vztahy mezi endokrinními buňkami a dalšími typy buněk nacházejících se ve slinivce, kterými mohou být buňky produkující hormony nebo acinární buňky. Beta buňky odvozené od pluripotentních kmenových buněk totiž tuto vlastnost zachovávat vzájemné vztahy mezi buňkami nemají. V diferenciaci organoidů na inzulínově pozitivně funkční buňky jsou vzájemné vztahy důležité, jelikož pomáhají v rychlosti diferenciaci. Díky některým výzkumům na zvířatech bylo prokázáno, že při použití určitých markerů je možné z vybraných buněk myších ostrůvků zhotovit organoidy, které by obsahovaly všechny buňky nacházející se v pankreatických ostrůvcích. Výzkum organoidů využitelných při zkoumání mechanismů benigních onemocnění není ještě tak rozšířený jako výzkum organoidů karcinomu pankreatu, ale přesto je model organoidů využitelným nástrojem pro zkoumání mechanismů uvnitř buněk, které produkují inzulín (Chen et al., 2023). Studium dalších typů nádorových onemocnění slinivky břišní by mohlo být rozšířeno díky modelům, které by obsahovaly více typů buněk, jako jsou například acinární buňky. Tyto modely s více typy buněk by umožnily zkoumání pankreatoblastomu, karcinomu pocházejícího z acinárních buněk, cystického a mucinózního karcinomu, inzulinomu a dalších endokrinních nádorů (Grapin-Botton, 2016).

1.6 Historie pankreatických organoidů

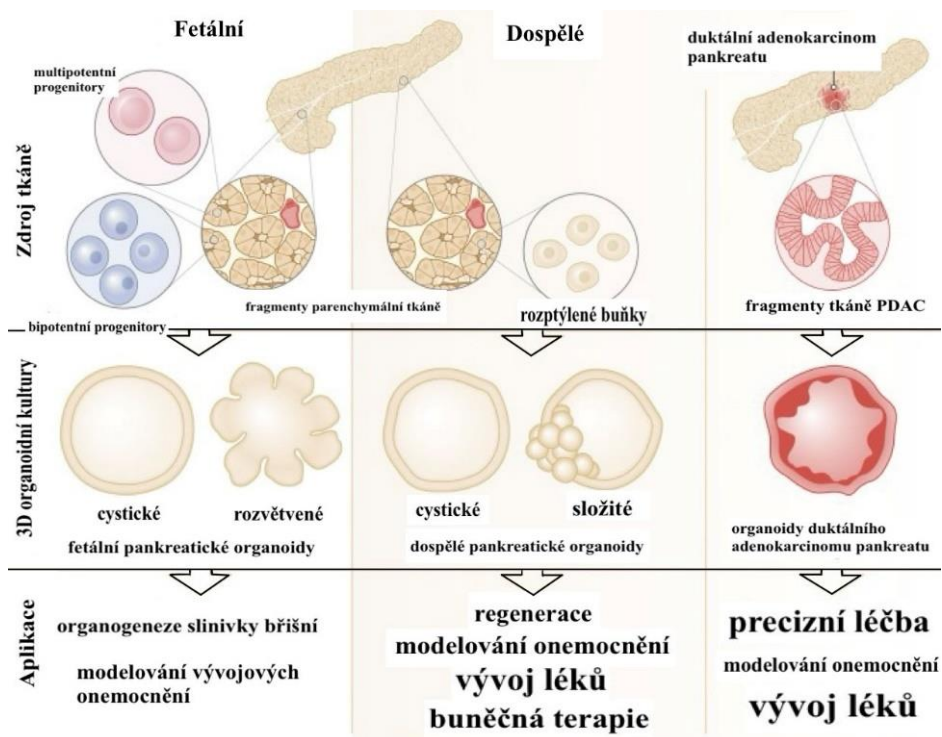
První pankreatické organoidy vytvořili Huch a kolektiv v roce 2013, kdy k vytvoření využili fragmenty vývodů myší slinivky břišní. Fragmenty sloužily k aktivaci signalizace WNT a expresi opakovaní bohatého na leucin obsahující receptor, který je spřažený s G proteinem (LGR5). Tímto se vytvořila struktura připomínající cystu, která měla schopnost se sama znovu replikovat. Tyto cystické struktury neboli organoidy jsou pořád multipotentní a mají schopnost se přeměňovat na typy buněk, které jsou typické pro slinivku, jako jsou acinární buňky a kanálkovité buňky (Liu et al., 2023). V roce 2015 byl popsán vývoj pankreatických organoidů z pluripotentních kmenových buněk. Stavbou připomínaly organoidy stále cystickou strukturu, která je složena jen z jedné polarizované vrstvy tkáňových buněk obklopujících buněčnou dutinu (Huang et al., 2015). V tomto roce byl poprvé popsán výzkum vzniku pankreatických organoidů vytvořených z normální tkáně a z tkáně pankreatických duktálních adenokarcinomů, které byly odebrané od člověka a myši. Tento výzkum byl velice významný, jelikož byl úspěšný

a od této doby, se organoidy rozvíjely víc a víc a jsou považovány za dostupnější model, který má využití při napodobování průběhu vývoje a testování terapeutických možností onemocnění pankreatu (Chen et al., 2023). V roce 2017 Hohwieler a kolektiv oznámili skutečnost, že se lidské pluripotentní kmenové buňky (iPSC) a embryonální kmenové buňky (ESC) diferencují na pankreatické progenitory, a že se kultivují jako epiteliální organoidy. Podmínky 3D kultivace přispěly ke vzniku acinární a duktální linie organoidních buněk. Pomocí globální analýzy genové exprese bylo zjištěno, že blíže ke tkáni dospělého lidského pankreatu a větší podobnost primárním duktálním a acinárním buňkám mají pankreatické organoidy, které byly odvozeny z PSC (Marsee et al., 2021).

2 BUNĚČNÉ MODELY PANKREATICKÝCH ORGANOIDŮ

V dospělé slinivce břišní dominují především 3 hlavní typy buněk: duktální, acinární a endokrinní buňky, kterými jsou pankreatické Langerhansovy ostrůvky. Základem moderní buněčné biologie jsou jednovrstevné buněčné kultury. Kultivace pankreatické tkáně v kultivační misce není snadná nehledě na to, jestli jsou buňky adherovány ke dnu nebo jestli jsou kultivovány jako suspenzní v médiu, jelikož primární buňky v misce postupně ztrácejí původně diferencovaný stav nebo přestávají vyvíjet cytoskelet a rychle ztrácí schopnost dělení (Chen et al., 2023).

Buněčné populace pro organoidní kultury se získávají ze vzorků biopsie zdravé dospělé tkáně, nádorové tkáně nebo fetální tkáně. Nejčastěji využívanou metodou tkáňové disociace je enzymatické štěpení. Složení enzymatického přípravku a účinnost enzymatického štěpení se liší podle typu odebrané tkáně, ze které se buňky izolují a v některých případech může být přidána také DNáza, která zajišťuje odstranění přebytečné DNA uvolněné z nekrotických buněk. Podle typu tkáně, ze které se buňky získávají, může být tkáň dále inkubována s enzymy, jako je kolagenáza, elastáza nebo dispáza, aby se vytvořily jednobuněčné suspenze, které se následně pipetují do Matrigelu. Touto metodou může být ovlivněn buněčný stav získaných buněk, jelikož může vyžadovat delší dobu v enzymatické směsi z důvodu disociace většiny kmenových buněk v tkáni. Disociaci tkáně lze provést také mechanicky. Mechanická disociace je sice oproti enzymatické metodě levnější a také rychlejší za to výtěžek a životaschopnost buněk získaných tímto způsobem může být nekonzistentní. Proto lze tyto dvě metody (enzymatickou a mechanickou) kombinovat a tím je možné dosáhnout lepšího výtěžku buněk (Zhao et al., 2022).



Obrázek 3 tvorba a využití organoidů pankreatu (Balak et al., 2019)

2.1 Organoidy odvozené od kmenových buněk

Dospělé tkáně představují hojnější zdroj tkáňových kmenových buněk, než se dříve předpokládalo, a právě to umožňuje vědcům studovat diferenciaci buněk na zdravých i patologických organoidních modelech z různých typů tkání. Zásadní změnou, která přinesla nové možnosti v oblasti primárních dospělých tkání byl objev dospělých kmenových buněk Lgr5(+). Od objevení těchto buněk byly zavedeny metody kultivace organoidů ze žaludku, jater, slinivky, mozku, plic a mnoha dalších orgánů a tkání. Toto zjištění vedlo k myšlence, že kultivace tkáňových kmenových buněk z dospělé lidské slinivky břišní by mohla být užitečná jak pro studium regenerace slinivky břišní, tak pro studium regenerace pankreatických ostrůvků, které by mohly být potenciálně relevantní pro substituční terapii beta buňkami. Organoidy odvozené z dospělé lidské slinivky břišní se v mnoha ohledech liší od fetálních pankreatických organoidů. Organoidy se navzájem liší hlavně v morfologii a tvorbě endokrinních buněk, což je možné vysvětlit tím, že se v dospělém orgánu nenachází multipotentní progenitor nebo možným nedostatkem optimálního kultivačního média nebo strategií obohacování růstovými faktory (Balak et al., 2019). Zpočátku byly pankreatické organoidy odvozeny pouze z pankreatických duktálních buněk normálních myši a z buněk myši geneticky naprogramovaných k rozvoji premaligních a maligních stádií karcinogeneze pankreatu. Až později došlo díky pokroku ve zkoumání organoidních kultur k tvorbě organoidů z lidské tkáně. Byla vytvořena sbírka normálních a pankreatických intraepiteliálních novotvarů

organoidů, které se mohou nepřetržitě množit a které přežívají kryokonzervaci. Tyto vlastnosti z nich dělají vcelku snadný a tím také užitečný nástroj pro práci v laboratoři (Patman, 2015). U dospělé slinivky břišní dochází k absenci progenitorových buněk nebo pluripotentních kmenových buněk, které se u slinivky plodu nacházejí, což je jedním z hlavních důvodů mnoha nesrovnatelností a rozdílů mezi organoidy vytvořenými z fetální tkáně a z dospělého pankreatu. Studie, která proběhla v roce 2013 poukázala na to, že při částečném podvázání vývodu pankreatu u myši byla zahájena signalizace Wnt a kmenových buněk podobných Lgr5. Buňky obsahující Lgr5 mají schopnost růst a organizovat se do struktur organoidů. Dále bylo touto studií prokázáno, že buňky pocházející také z fragmentů vývodů dospělé slinivky získávají bioúčinnost diferenciacních kanálků a endokrinních buněk (Chen et al., 2023). Organoidy získané z dospělé lidské tkáně slinivky břišní mají schopnost klonální expanze a také tvorby endokrinních buněk. Normální pankreatické organoidy se využívají ke studiu regenerace tkáně slinivky břišní, k modelování různých onemocnění pankreatu a ke screeningu léčiv (Balak et al., 2019).

Pankreatické organoidy mohou být vytvářeny v různých formách, mohou mít mnoho podob a existuje mnoho různých metod jejich konstrukce. Lidské PSC mohou být vytvářeny cílenou diferenciací pomocí aktivinu A a následnou implantací do kultivačního média. ASC zdůrazňují použití specifických dospělých kmenových buněk jako hPSC pro kultivaci ke konstrukci organoidů. Kromě konvenční kultury v Matrigelu lze organoidy kombinovat s technologií genových čipů a dosáhnout tak lepších výsledků výzkumu (Liu et al., 2023).

2.1.1 Příprava a diferenciac kmenových buněk

Organoidy slinivky břišní lze vytvořit z lidských pluripotentních kmenových buněk. Tento typ pankreatických organoidů se vytváří diferenciací pluripotentních kmenových buněk na pankreatické progenitory, ze kterých se poté tvoří pankreatické organoidy. Před samotnou diferenciací je potřeba pluripotentní kmenové buňky připravit. Pokud se využívají zmrazené kmenové buňky, je nejprve potřeba je rozmrazit. Před diferenciací se buňky nasadí na 6-jamkovou destičku, která je potažena vitronektinem, což je rekombinantní lidský protein, který poskytuje ideální povrch pro pluripotentní kmenové buňky, jelikož umožňuje normální růst a udržuje schopnost PSC se diferencovat. K buňkám se přidává médium B8 (Essential 8 Basal Medium, výrobce Gibco), které je doplněné o inhibitor Y-27632, který zvyšuje účinnost klonování buněk. Buňky jsou během 3 až 5 dní připraveny k následnému pasážování, pokud vykazují míru konfluencie neboli splývání zhruba 70 % (Pedraza-Arevalo et al., 2022). Breunig a kolektiv nasadili hPSC do kultivační láhve 1 až 2 dny před samotnou diferenciací. Buňky se

poté nasadí na destičku, ale oproti předchozímu protokolu bylo k buňkám přidáno médium mTeSR1, což je kompletní, bezsérové, definované médium, které je určeno k udržování a expanzi lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Médium bylo obohaceno jako v předchozím protokolu o inhibitor Y-27632. Shluky buněk je potřeba oddělit na jednotlivé buňky, čehož v tomto případě bylo dosaženo přidáním enzymu TryPLE express, nebo enzymu TryPLE Select, které jsou určeny k disociaci buněk (Breunig et al., 2021). Pokud dojde k příliš vysokému podílu diferenciovanych buněk, je potřeba seškrábnout a odstranit příliš velké shluky diferenciovanych buněk. Buňky se přenášejí do zkumavky k oddělení nediferenciovanych a diferenciovanych buněk. Nediferencované buňky klesají ke dnu zkumavky a diferencované buňky se drží při povrchu. Odebírají se pouze diferencované buňky při povrchu, které se nanášejí na novou destičku s vitronektinem. Po 5 až 6 dnech jsou buňky připraveny k diferenciaci na pankreatické progenitory (Pedraza-Arevalo et al., 2022). Breunig a kolektiv uvedli, že výsledná koncentrace buněk musí být v rozmezí $1-1,5 \times 10^6$ buněk/ml. Tímto způsobem jsou tedy PSC buňky připraveny k diferenciaci na PPs (pankreatické progenitory) (Breunig et al., 2021). Poté přichází na řadu samotná diferenciaci na pankreatické progenitory, která obvykle probíhá v několika krocích. Hohwieler a kolektiv využili k diferenciaci diferenciacní médium, které se skládalo z média MCDB131 (MCDB131 obsahuje složky, které se nacházejí v klasických bazálních médiích). Dále toto diferenciacní médium obsahuje glukózu, hydrogenuhličitan sodný, 0,1 % volných mastných kyselin BSA, l-glutamin. Toto médium bylo použito během prvních 6 dní diferenciaci. První den diferenciaci bylo médium navíc obohaceno o Activin A a inhibitor GSK3 β (CHIR99021, výrobce Axon MedChem), který inhibuje glykogensyntázy kinázy 3 a také podporuje diferenciaci buněk produkujících inzulin. Po pár dnech se přidává do média protein KGF (růstový faktor keratinocytů), který podporuje buněčnou proliferaci a diferenciaci. Po 6 dnech se médium vymění za jiné médium, které obsahuje stejné složky jako původní médium, jen je obohaceno o kyselinu askorbovou a ITS-X (inzulin-transferin-selenium-ethanolamin). Od 10. dne se do média k buňkám přidával fibroblastový růstový faktor (FGF10), který také podporuje buněčnou proliferaci a diferenciaci. Tímto způsobem se podařilo kolektivu Hohwieler a spol. diferencovat pluripotentní kmenové buňky na pankreatické progenitory (Hohwieler et al., 2017). V dalším protokolu bylo k diferenciaci použito médium, které obsahovalo stejné složky jako médium v předchozím protokolu. Toto médium bylo použito k diferenciaci mezendodermu na DE (definitivní endoderm) a také u následujícího kroku, kterým je diferenciaci DE na endoderm střevní trubice a trvá přibližně 5 dní. Dalším krokem diferenciaci je diferenciaci GTE (endoderm střevní trubice) na PE (pankreatický endoderm) a poté

následuje poslední krok a tím je diferenciaci PE na pankreatické progenitory. K vytvoření pankreatických progenitorů dochází zhruba po 12 dnech diferenciaci. V těchto dvou krocích se využívá jiné médium než při prvních 2 krocích a to médium, které bylo použito v pozdější fázi diferenciaci již v předešlém protokolu, složení média bylo úplně stejné (MCDB131, BSA bez mastných kyselin, hydrogenuhličitan sodný, glukóza, l-glutamin, kyselina askorbová a ITS-X) (Breunig et al., 2021). Médium je potřeba vždy měnit každý den za čerstvé. Ve všech krocích diferenciaci se k médiu přidávají specifické látky, které podporují a urychlují růst a diferenciaci buněk, ale tyto látky se lišily oproti látkám využitých v protokolu, který sepsali Hohwieler a kolektiv. V tomto protokolu skupina přidávala k buňkám látky podporující diferenciaci jako je např. dorzomorfin, protein FGF2, EGF, inhibitor LDN-193189 a antagonist SANT-1 (Breunig et al., 2021). Pedraza-Arevalo a kolektiv sepsali protokol, ve kterém se diferenciaci na pankreatické progenitory skládala z lehce odlišných fází, a to z diferenciaci na definitivní endotel, poté diferenciaci na primitivní střevní trubici a diferenciaci na zadní předžaludek a poslední fází byla opět tvorba pankreatických progenitorů. Pro každou fázi bylo využito rozdílné diferenciacní médium. V první fázi se médium skládalo z B-27 (doplňek bez séra k podpoře růstu), EGF (růstový faktor, který stimuluje proliferaci buněk), kyseliny retinové a DMEM ((Dulbecco's Modified Eagle Medium). V druhé fázi byla kyselina retinová v médiu nahrazena FGF7, ve třetí fázi bylo médium složeno z B-27, LDN-193189, TBP, Alki II (k indukci pluripotence buněk), FGF7 a DMEM. Ve čtvrté fázi se přidávalo k buňkám médium, které kromě DMEM nemělo s předchozími médii nic společného. Kromě DMEM obsahovalo Glutamax (zlepšuje životaschopnost) a neesenciální aminokyseliny. Doba diferenciaci byla stejná jako u ostatních protokolů (Pedraza-Arevalo et al., 2022). Ve všech třech protokolech probíhala diferenciaci velice podobně a buňky byly úspěšně diferencovány na pankreatické progenitory, které jsou takto připraveny ke kultivaci na pankreatické organoidy (Hohwieler et al., 2017 a Breunig et al., 2021).

2.1.2 Kultivace pankreatických progenitorů na organoidy

Organoidy odvozené od pluripotentních kmenových buněk se kultivují z předem diferencovaných pankreatických progenitorů. Prvním krokem kultivace je inkubace pankreatických progenitorů s TryPLE po dobu 5 minut, aby vznikly shluky 3 až 10 buněk, jelikož TryPLE disociuje buňky (Hohwieler et al., 2017). V dalším protokolu bylo také uvedeno, že je potřeba k buňkám přidat TryPLE Express nebo TryPLE Select, aby došlo k oddělení buněk. Doba oddělení se lišila, jelikož oddělení probíhalo déle a to zhruba 10 až 15 minut. Tento krok je velice důležitý, protože úplné oddělení buněk je důležité pro získání

vysokého počtu buněk (Breunig et al., 2021). Poté se buněčná suspenze smíchá s Matrigelem, který má snížený obsah růstového faktoru a vzniklá suspenze s Matrigelem se nanese na kultivační destičku, na kterou se poté nanese organoidní kultivační médium (obsahuje SANT-1, kyselinu retinovou, LDN-193189 (Sigma), PD0325901 (Calbiochem), doplněné o inhibitor Rock (Y-2632). Po dvou dnech se do média přidá FGF2 a doplní se inhibitor Rock. Od 6. dne kultivace se do média přidával také nikotinamid (Hohwieler et al., 2017). Breunig a kolektiv použili ke kultivaci organoidní médium, které obsahuje základní složky jako je MCDB131, l-glutamin, Na₂CO₃, glukózu, BSA bez mastných kyselin, ITS-X a je navíc obohaceno o kyselinu askorbovou, EGF, FGF10, KGF, MSC2530818, nikotinamid, inhibitor Y-27632, ZnSO₄. Po 7 dnech kultivace se složení organoidního média upraví (Breunig et al., 2021). Kolektiv Pedraza-Arevalo a spol. ke kultivaci použili organoidní médium, které obsahuje DMEM/F-12, hepes (pufr pro buněčné kultury), glutamax, penicilin-streptomycin, B-27, A83-01 (inhibitor receptorů TGF- β využívaný u organoidních kultur), EGF, FGF10, Gastrin, Noggin, R-Spondin, N-acetylserin, nikotinamid (Pedraza-Arevalo et al., 2022). Hohwieler a kolektiv uvedli, že alternativou kultivace organoidů může být rozmnožení pankreatických progenitorů v suspenzi na destičkách s velmi nízkou přilnavostí. Je potřeba zabránit agregaci a to tak, že jsou buňky po hodině a následně po 2 dnech rozmíchány pipetováním nahoru a dolů. Pro suspenzní kultury se využívá jiné médium než pro kultury kultivované s Matrigelem. Využívá se médium z DMEM/F-12, 10 % KOSR (knockout sérum replacement), β -merkapt ethanolu, FGF10, EGF, CHIR99021, fórbolmyristát acetátu (Sigma) (Hohwieler et al., 2017). Během kultivace organoidů z pankreatických progenitorů je možné sledovat malé kulaté organoidy již za 2 dny, které dále rostou během dalších 7 až 10 dní a vytvářejí větší organoidní struktury s charakteristickým kulatým tvarem a lumen. Část kultivovaných buněk je mezenchymálního typu a tyto buňky nevytvářejí organoidy. Těchto buněk nesmí být v kultuře více než 5 %, jelikož by to narušilo růst a diferenciaci organoidů (Pedraza-Arevalo et al., 2022). Organoidy tvořené s Matrigelem se pasážují každých 10 až 14 dní a jsou úspěšně kultivovány až do 5. až 6. pasáže, což odpovídá zhruba 100 dnům. Pankreatické organoidy tvořily struktury podobné cystám (Hohwieler et al., 2017 a Breunig et al., 2021).

2.2 Organoidy ze zdravé tkáně pankreatu

2.2.1 Odběr a izolace zdravé pankreatické tkáně

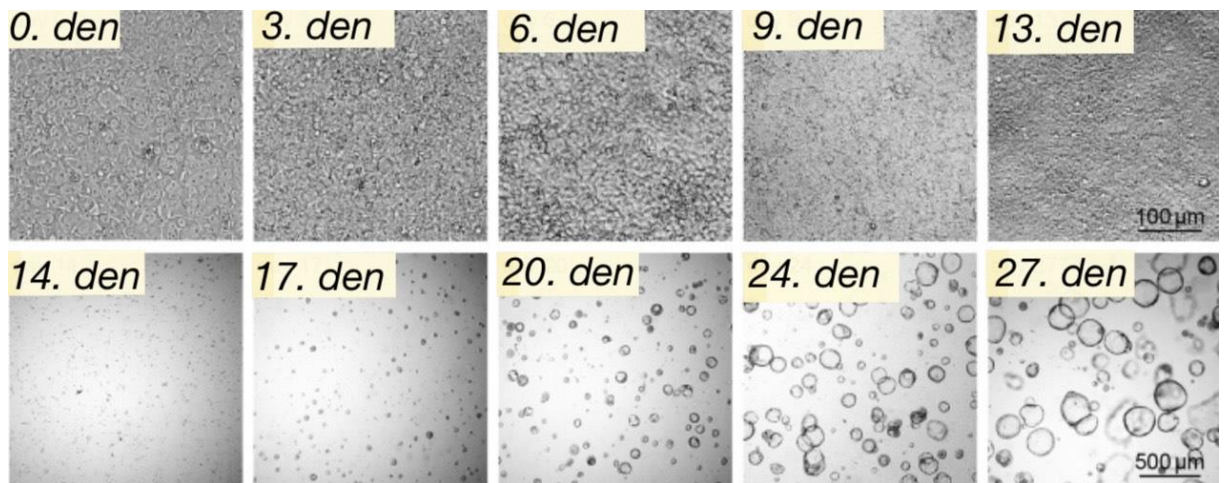
Organoidy lze kromě diferenciaci z pluripotentních kmenových buněk vytvářet také ze zdravé tkáně dospělé lidské slinivky břišní. Zdravá tkáň se odebírá stejně jako nádorová tkáň. Tkáň

ke kultivaci se získává buď z resekce slinivky břišní nebo z různých biopsií (Driehuis et al., 2020). Další možností získání tkáně pro tvorbu organoidů je tkáň slinivky břišní, která byla získána od zemřelých dárců, kteří své orgány poskytli k transplantaci. Kromě tohoto způsobu lze tkáň slinivky břišní získat z orgánů, které byly odebrány za záměrem transplantace, ale následně byly odmítnuty a byly poskytnuty k výzkumnému účelu (Georgakopoulos et al., 2020). Pro tvorbu lze využít také tkáň pankreatu, která je ochuzená o lidské pankreatické ostrůvky, která nemůže být využita ke klinické transplantaci (Loomans et al., 2018). Organoidy lze vytvořit také expanzí dospělé pankreatické tkáně (Jiang et al., 2022). Odebraná tkáň se ihned po odběru dává do odběrového média, kterým je médium Ad-DF+++, které se skládá z Advanced DMEM/F12 média, Glutamaxu, HEPES a navíc obsahuje Primocin, který chrání buňky před bakteriemi. Do odběrového média se přidává také inhibitor Rock, který zabraňuje buněčné smrti a podporuje růst organoidů. Po odběru tkáně je potřeba odstranit všechnu tkáň, která není pankreatický epitel jako je například tuk, střevní epitel nebo také sval. Tento krok je potřebný, jelikož k následné kultivaci se využívá pouze epiteliální tkáň pankreatu. Odebraná tkáň se obdobně jako nádorová tkáň rozřeže na ještě menší kousky a takto připravená tkáň se tráví v digesčním pufru. K digesci se využívá digesční pufr, který je určen pro normální nenádorovou tkáň a tento pufr je složen z HBSS, kolagenázy II, inhibitoru Rock, inhibitoru trypsinu a glycerolu. Digesce normální tkáně probíhá oproti digesci nádorové tkáně pouze 2 hodiny (Driehuis et al., 2020). Georgakopoulos a kolektiv tkáň nejprve disociovali pomocí disociátu gentleMACS (výrobce Miltenyi Biotec) a poté byla tkáň stejně jako v předchozím protokolu štěpena v roztoku, který se tentokrát skládal z DMEM, kolagenázy I a dispázy II a DNázy po dobu 1 až 2 hodin. Po ukončení digesce byly kanálky izolovány a byly takto připraveny ke kultivaci na organoidy (Georgakopoulos et al., 2020).

2.2.2 Kultivace organoidů ze zdravé tkáně pankreatu

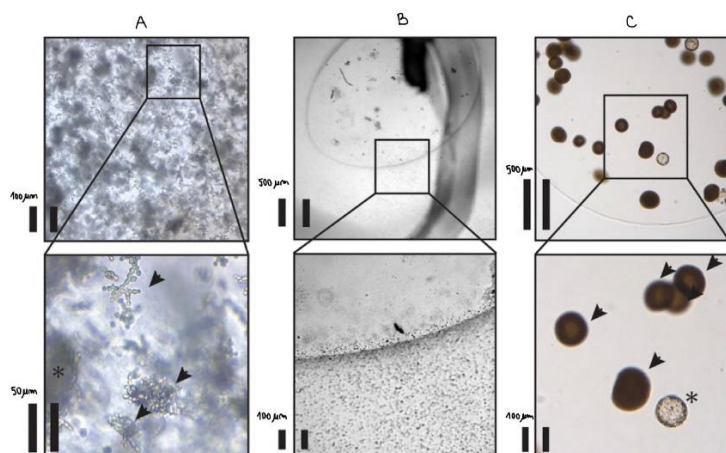
Ke kultivaci organoidů z normální zdravé tkáně slinivky břišní se využívá kompletní kultivační médium, které obsahuje potřebné růstové faktory. Růstové faktory se v médiu používají k tomu, aby se podpořil a zvýšil růst organoidů pankreatu. Médium používané ke kultivaci zdravé tkáně se nazývá normální pankreatické médium (Driehuis et al., 2020). Georgakopoulos a kolektiv kultivovali pankreatické kanálky. Buněčná suspenze kanálek se smíchá s redukováným růstovým faktorem BME 2 – RGF (extrakt bazální membrány se sníženým růstovým faktorem) a nasadí se na kultivační destičku, na které se organoidy kultivují s optimalizovaným expanzním médiem (obsahuje základní médium doplněné o N2 (Gibco), B27 (Gibco), N-acetylcystein, RSP01 kondicionované médium, které neobsahuje sérum, Gastrin I, EGF,

Noggin, FGF10, Nikotinamid, FSK, A8301, PGE2). Během prvních 7 dnů kultivace se do média přidával navíc inhibitor Y27632 (inhibitor Rho kinázy, který podporuje růst organoidů) (Georgakopoulos et al., 2020). Driehuis a kolektiv ke kultivaci využili smíchání s Matrigelem/BME. Směs se nanasla opět na kultivační destičku a destička se otočila do zavěšené polohy. Tento krok je důležitý k tomu, aby buňky neklesly ke dnu a nedošlo tak k nechtěnému vytvoření 2D kultury místo 3D kultury. Buňky se kultivují v organoidním kultivačním médiu, které jako ve všech ostatních protokolech obsahuje inhibitor Rock, který růst organoidů podporuje. Kultivační médium použito v tomto protokolu obsahuje základní pankreatické médium, Wnt3a, rekombinantní R-spondin 3, Primocin, EGF, FGF10, PGE2 a A8301 (Driehuis et al., 2020). Kolektiv Loomansová a spol. využili ke kultivaci médium, které bylo na bázi epidermálního růstového faktoru a obsahovalo Noggin a R-spondin (Loomans et al., 2018). Během prvních 24 hodin je potřeba sledovat, zda se v kultuře netvoří plísně či bakterie. Organoidy se začínají viditelně tvořit během prvních 2 až 4 dnů kultivace (Driehuis et al., 2020). Vznikající organoidy svým tvarem připomínají hlávkku kvěťáku a později vytvářejí větší cystické struktury (Loomans et al., 2018). Cystický vzhled je typický pro normální organoidy a liší se tím od organoidů nádorových (Driehuis et al., 2020). Pasážování organoidů lze úspěšně provést už po 14 dnech kultivace a pasážují se po dobu zhruba 10 pasáží (Georgakopoulos et al., 2020 a Loomans et al., 2018).



Obrázek 4 průběh diferenciaci hPSC na organoidy,

den 0 až den 13 – diferenciaci hPSC na pankreatické progenitory, den 14 až den 27 – tvorba pankreatických organoidů podobných pankreatickým vývodům (Breunig et al., 2021)



Obrázek 5 možnosti infekce organoidů A) plísňová (kvasinková) infekce v organoidech B) bakteriální infekce v kultivačním organoidním médiu C) bakteriální infekce v Matrigelu (Driehuis et al., 2020)

2.3 Fetální pankreatické organoidy

Organoidy, které jsou odvozené z lidské fetální tkáně slinivky břišní se dají využít ke zkoumání vývoje slinivky a ke sledování oprav ve slinivce. Z fragmentů fetální pankreatické parenchymové tkáně lze vytvořit více rozvětvené fetální organoidy a z rozptýlených jednotlivých buněk z fragmentů fetální tkáně mohou vzniknout cystické organoidy s multipotentními progenitory, které také vytvářejí větvené organoidy. Dále fetální organoidy umožňují studovat vývojové podněty a morfogenezi slinivky břišní (Balak et al., 2019). Ukázalo se, že buňky exprimující transkripční faktor 9(SOX9) SRY-box, které se nacházejí uvnitř pankreatu myšního plodu, mají schopnost regenerovat jak endokrinní, tak acinární buňky, ale u dospělé slinivky břišní nedochází k regeneraci jak endokrinních tak ani acinárních buněk SOX9. V roce 2013 proběhla studie, která uvedla, že byly vyvinuty 3 kultivační systémy pro izolaci progenitorových buněk z plodu myši slinivky břišní. Další možností k získání progenitorových buněk slinivky břišní, které se mohou vyvinout v organoidy, jsou linie PSC. Studie potvrdila, že přidáním EGF a nikotinamidové signální indukční látky ve 4 stádiích kultivace lze z PSC vytvořit pankreatický endoderm (Chen et al., 2023). Vzhledem k omezené dostupnosti lidské fetální tkáně a také k tomu, že je neetické používat lidskou fetální tkáň byla k vytváření fetálních organoidů využita fetální tkáň hlodavců, hlavně myši (Balak et al., 2019). Další možností, jak získat fetální tkáň k tvorbě organoidů je využití tkáně pankreatu z plánovaných potratů, ale aby bylo možné tuto tkáň použít musí být poskytnut písemný rodičovský souhlas. Tento způsob odběru a využití fetální tkáně z plánovaných potratů byl schválen etickou komisí. Lidská fetální tkáň se získává z plodů, které mají gestační stáří 9 týdnů, 20 týdnů a 22 týdnů. Fetální tkáň pankreatu, která je určena k vytvoření organoidů

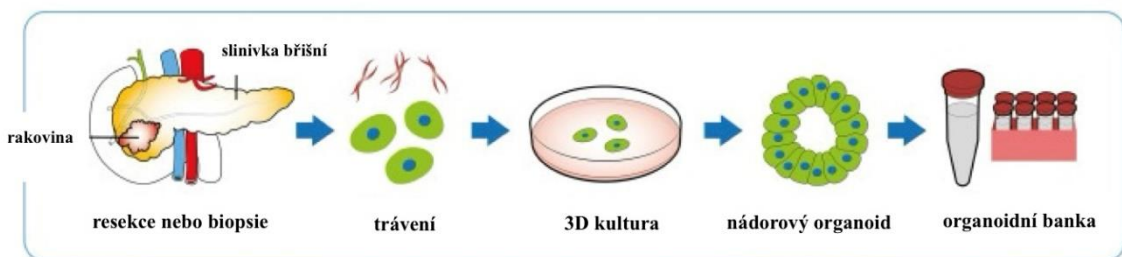
se zpracovává buď okamžitě po odběru nebo je možné ji kryokonzervovat při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v médiu, které je určeno k mražení (skládá se z 50 % FCS a 50 % DMSO). Pokud je pro přípravu využita kryokonzervovaná fetální tkáň je potřeba ji nejprve přenést do média Advanced DMEM/F12 o teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nechá se inkubovat 10 minut v inkubátoru. Po uplynutí času se tkáň přenesse znovu do čerstvého média a inkubace se opakuje ještě dvakrát. Rozmrazené vzorky se rozdělí skalpelem na jednotlivé malé shluky tkáně. Takto připravené tkáň se nanese na Matrigel a organoidy jsou kultivovány za podobných podmínek jako dospělé organoidy pankreatu. Čerstvá fetální tkáň se kultivuje za stejných podmínek a pomocí stejných kroků jako tkáň rozmražená (Loomans et al., 2018).

2.4 Organoidy rakoviny pankreatu

Organoidy rakoviny pankreatu jsou nádorové modely lidského duktálního adenokarcinomu pankreatu (PDAC), které jsou vytvořené ze vzorků tkání odebraných při chirurgických zákrocích a jsou využívány pro personalizované léčebné strategie u jednotlivých pacientů. Chirurgický zákrok lze provést pouze u malého počtu pacientů postižených tímto karcinomem, a proto se u pacientů, u kterých chirurgický zákrok možný není, posuzuje možnost vytvoření lidských organoidů duktálního adenokarcinomu pomocí EUS tenkojehlové biopsie. Vytvoření organoidů karcinomu pankreatu je pomocí metody EUS-FNB poměrně úspěšné a rychlé (Tiriac et al., 2018). PDAC organoidy mohou být stanoveny z chirurgických resekcí vzorků a vzorků z biopsie tenkou jehlou ve vysokých rychlostech, a to umožňuje stanovení PDAC organoidů jak z resekovaných vzorků nádorů, tak z metastatického onemocnění (Pham et al., 2021). Pankreatické organoidy mohou být generovány z resekovaných nádorů a biopsií, přežívají kryokonzervaci a vykazují duktálně specifické a chorobné specifické charakteristiky. Ortotopicky transplantované neoplastické organoidy rekapituluji celé spektrum vývoje nádoru tvorbou časných novotvarů, které progredují do lokálně invazivních a metastatických karcinomů (Boj et al., 2015). Úspěšnost tvorby organoidů je důležitá pro vývoj medicíny u pacientů s tímto typem karcinomu. Organoidy rakoviny pankreatu jsou nádorové modely lidských PDA, které je možné generovat z tkáně odebrané při chirurgickém zákroku nebo je možné je vytvářet také z menšího množství materiálu získaného při biopsii. Organoidy vytvořené z nádorové tkáně karcinomu pankreatu se využívají k testování potenciální terapie a k léčbě rakoviny (Tiriac et al., 2018). Různé studie prokázaly, že organoidy duktálního adenokarcinomu pankreatu mohou být stanoveny s úspěšností 65–75 %. Důležitou vlastností je, že si organoidy PDAC zachovávají heterogenitu nádoru i po četných pasážích a zachovávají si mutační složitost, která je běžně pozorována u lidských nádorů PDAC v těle (Pham et al.,

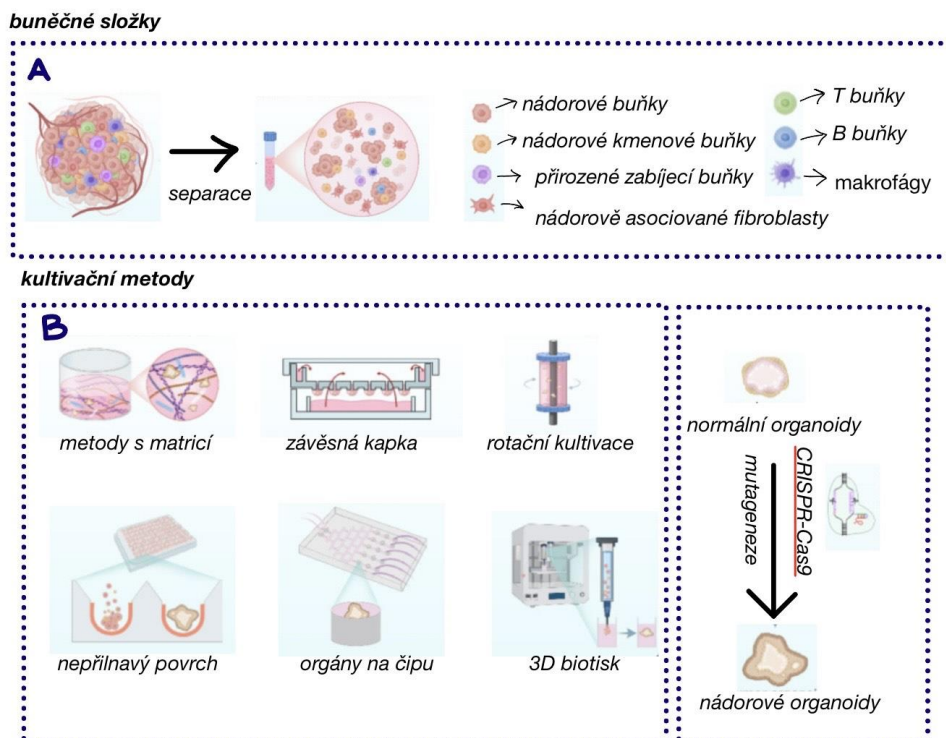
2021). Organoidy karcinomů či dalších onemocnění se stále vyvíjejí kupředu, dochází k pokroku orgánové regenerace technologie tvorby u pankreatických kultur a vykazují velký potenciál do budoucna (Chen et al., 2023). Organoidy PDAC jsou nejvyspělejším oborem pankreatických organoidů, protože preklinický výzkum a klinické objevy synchronně postupují kupředu (Liu et al., 2023). Nádorové organoidy jsou tedy nejčastějším záměrem většiny vědeckých skupin zabývajících se tvorbou organoidů. Organoidy duktálního adenokarcinomu pankreatu lze využít k tvorbě patientských organoidních linií PDAC, které lze využít k modelování onemocnění, vývoji léčiv a možnostem léčby zaměřené na člověka (Balak et al., 2019). V současné době patří mezi hlavní oblasti výzkumu související s organoidy rakoviny pankreatu vytvoření organoidního modelu PDAC, konstrukce modelů z normálních buněk pomocí technologie CRISPR-Cas9 a založení organoidní banky pro precizní medicínu rakoviny pankreatu (Liu et al., 2023).

nádorové organoidy odvozené od pacienta



Obrázek 6 nádorové pankreatické organoidy (Bengtsson et al., 2021)

Nádorové organoidy jsou běžně vytvářeny hlavně ze dvou primárních zdrojů, a to z indukovaných pluripotentních kmenových buněk a z čerstvě resekované nádorové tkáně. Většina buněčných materiálů se získává separací původních nádorových tkání do směsi buněčných klastrů obsahujících nádorové kmenové buňky. Buněčné shluky se resuspendují v médiu doplněném o konkrétní růstové faktory. Buňky poté vyrostou do nádorových organoidů pomocí různých metod jako je metoda založená na matrici, visící kapka, rotační systém, nízkoadhezivní platforma, orgán na čipu, 3D biotisk nebo genetické inženýrství (Lv J et al., 2024).



Obrázek 7 kultivace organoidů A) buněčné složky, které je možné využít k tvorbě organoidů B) metody použitelné k tvorbě nádorových organoidů (Lv et al., 2024)

2.4.1 Odběr nádorové tkáně a izolace nádorových organoidů

Lidská nádorová tkáň PDAC se získává od pacientů, kteří podstupují chirurgickou resekci karcinomu pankreatu (Kokkinos et al., 2021). Pacientovi, který podstoupí chirurgický zákrok, se odebere vzorek nádoru mimo nekrotické části dané nádorové tkáně. Odebírá se přibližně 0,5 cm³ nádorové tkáně (Gong et al., 2023). Často je odebírána také přilehlá část tkáně okolo nádoru. Tkáň, která je odebrána na chirurgickém sále je zkontrolována patologem zabývajícím se patologiemi u slinivky břišní. Patolog ověří diagnózu a identifikuje nádorovou tkáň a tkáň odebranou z okolí primárního nádoru (Beato et al., 2021). Tkáň odebraná z rakoviny slinivky břišní je očištěna od přípojného tuku, krevních skvrn a spálené tkáně, aby ke kultivaci zůstala čistě nádorová tkáň. Velikost odebrané tkáně, která je potřebná k digesci je zhruba 1 cm x 0,5 cm x 1 cm (Song et al., 2023). Dalším způsobem získání vzorků může být pankreatoduodenektomie. Tkáň by měla být odebrána co nejdříve a zároveň by během odběru nemělo dojít k tepelnému poranění, které by mohlo být způsobené ultrazvukovým skalpelem po odstranění nádorové tkáně (Song et al., 2023). V dalším protokolu bylo uvedeno, že vzorky je možné získat také pomocí tenkojehlové biopsie naváděné EUS z masového poškození pankreatu. Tato metoda je založena na využití jádrové jehly a poskytuje vyšší množství tkáně, která má zachovanou architekturu. Využívá se jehla o velikosti 22 a je používána technika pomalého tahu, kdy se vpich jehlou provádí skrz celý nádor, aby se získal co nejlepší vzorek.

Vzorky odebrané touto metodou se umísťují do bazálních organoidních médií a jsou takto transportovány do laboratoře (Tiriac et al., 2018). Choi a spol. uvedli ve svém protokolu, že lze organoidy vytvářet také z maligního ascitu nebo pleurálního výpotku, který je odebrán během torakocentézy nebo paracentézy. U tohoto způsobu odběru tkáně se odebírá zhruba 50 až 100 ml vzorků tekutiny do sterilní nádoby. Poté se tekutina odstředí při 1500 rpm po dobu 10 minut, promyje se a tím se nádorové buňky koncentrují (Choi et al., 2023). Během odběru tkáně je nejlepší, když se podaří získat části tkáně z různých oblastí nádoru. Tím se zvyšuje naděje, že vytvořená organoidní kultura bude reprezentovat heterogenitu nádoru *in vivo* (Driehuis et al., 2020). Celý proces odběru tkáně trvá přibližně půl hodiny až hodinu (Gong et al., 2023). Nádorová tkáň musí být ihned umístěna do ledového PBS obsahujícího 1 x roztok antibiotika/ antimykotika a je přepravena na ledu. V jednom protokolu se uvádí, že vzorek musí být během 15 minut transportován na ledu do laboratoře, kde je nádorová tkáň rozřezána na 3 stejně velké části a každý z kousků je umístěn na samostatnou Petriho misku, na které je nádorová tkáň rozřezána na 1-2 mm explantáty (Kokkinos et al., 2021). Seppälä a spol. v protokolu také uvedli, že je nutné nádorovu tkáň mechanicky rozřezat skalpelem na menší kousky a že tkáň musí být enzymaticky disociována v disociačním médiu, které obsahuje kultivační médium a kolagenázu XI (Seppälä et al., 2022). Obecně je ve všech protokolech uvedeno, že je potřeba vzorek tkáně transportovat do laboratoře co nejdříve po odběru a že vzorek bývá rozřezán na menší části. Protokoly se lišily v tom, že podle Gong a spol. byl proveden po odběru tkáně navíc oplach odebrané tkáně fyziologickým roztokem pufovaným fosfátem (Gong et al., 2023). Podle protokolu, který sepsali Driehuis a spol. se odebraná tkáň přenáší do odběrového média (Ad-DF+++), které obsahuje Primocin o koncentraci 50 ng/ml (Driehuis et al., 2020).

Po transportu tkáně do laboratoře přichází na řadu disociace odebrané tkáně. U nádorové tkáně je možné digesce provádět po dobu maximálně 24 hodin, která by neměla být překročena. Během prvních 4 hodin digesce by se měl proces sledovat v 30minutových intervalech. Průběh disociace tkáně je pozorován v mikroskopu ve světlém poli. Disociace je usnadněna pomocí pipetování, kdy během 30minutových intervalů, ve kterých je trávená tkáň pozorována, je také promíchána pipetováním nahoru a dolů. Konec digesce je indikován tvorbou buněčných shluků, které se skládají z 5 až 10 buněk. Enzymy se inaktivují přidáním 1 ml FBS přímo do digesční směsi (Driehuis et al., 2020). Podle původního protokolu, který v roce 2015 sepsal Boj et al. byla při přípravě pankreatických organoidů nádorová tkáň rozemleta a štěpena kolagenázou II v kompletním lidském médiu při 37 °C po dobu maximálně 16 hodin. Tkáň byla dále štěpena

pomocí TrypLE, který disociuje buňky, po dobu 15 minut při 37 °C, dále byla zalita do GRF Matrigelu se sníženým růstovým faktorem a kultivována v lidském kompletním médiu (Boj et al., 2015). Kolektiv Tiriac a spol. u vzorků, které byly odebrané pomocí biopsie tenkou jehlou, mechanicky disociovali tkáň v disociačním médiu, které obsahovalo 5mg/ml kolagenázy XI, která byla použita také v jiných protokolech, ale navíc digesční médium obohatili o 10 µg/ml DNAzy I a o 10,5 µM Y-27632 (selektivní inhibitor proteinkinázy) v kompletním lidském médiu (Tiriac et al., 2018). Beato a kolektiv ke štěpení tkáně využili médium, které se skládalo z promývacích médií obohacených kolagenázou IV z *Clostridium histolyticum* (5mg/ml) a Dispázou (1mg/ml). Zkumavka s tkání a digesčním médiem se inkubovala 30 až 45 minut v třepačce při teplotě 37 °C s mícháním při 500 rpm. (Beato et al., 2021). Kolektiv Vaes a spol. štěpili tkáň kolagenázou II v AdvDF+++ (Advanced Dulbecco 's Modified Eagle Medium/Ham's F-12), které bylo doplněné o 50% Wnt3a kondicionované médium. Rovněž bylo doplněné o 10 µM inhibitor Rho kinázy (Y-27632), který byl použit také v protokolu sepsaném kolektivem Tiriac a spol. z roku 2018. Tkáň byla stejně jako v předešlém protokolu disociována na třepačce při 37 °C a byla disociována po dobu 1 až 2 hodin. Takto disociovaná tkáň byla dále štěpena při stejné teplotě pomocí enzymu tryPLE, který byl znovu doplněn o 10 µM inhibitor Rho kinázy. Štěpení tkáně pomocí enzymu tryPLE bylo zastaveno přidáním studeného AdvDF+++ (Advanced Dulbecco 's Modified Eagle Medium/Ham's F-12) a poté následovala centrifugace po dobu 5 minut při 350 rpm při teplotě 4 °C. Po dokončení digesce se peleta resuspendovala v chladné matrici BME (Geltrex LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, výrobce Gibco) (Vaes et al., 2020). V dalším protokolu byla pankreatická tkáň disociována pouze půl hodiny až hodinu. Doba disociace tkáně závisí na tvrdosti odebrané tkáně, jelikož houževnatější nádorové tkáně je potřeba trávit delší dobu. Velmi podstatným faktorem je zaručit životaschopnost nádorových buněk a snažit se tkáň rozštěpit na jednotlivé buňky, proto se proces digesce sleduje pod mikroskopem. Měkčí tkáně se disociují kratší dobu, aby byla plně zajištěna životaschopnost nádorových buněk (Gong et al., 2023). Biologický materiál, který byl během odběru odebrán od pacienta je možné skladovat v odběrovém médiu maximálně po dobu 48 hodin při teplotě 4 °C. Je zde ale riziko, že čím déle bude tkáň skladována před samotným zpracováním, tím nižší bude potom účinnost růstu organoidů (Driehuis et al., 2020).

2.4.2 Kultivace nádorových organoidů

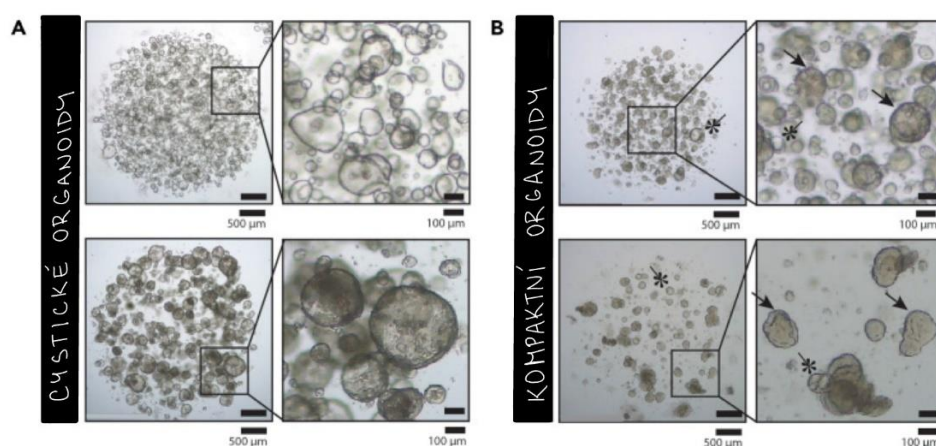
Kultivace pankreatických organoidů závisí na tom, zda se kultivují organoidy ze zdravé tkáně nebo zda se jedná o nádorovou tkáň, jelikož k růstu nádorových organoidů se využívá médium,

kteře neobsahuje specifické růstové faktory, které jsou přítomné v klasickém médiu (Driehuis et al., 2020). Gong a kolektiv před samotnou kultivací suspenzi odstředili při 300 g po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a vysrážené buňky byly odebrány a resuspendovány ve vhodném množství matrixového gelu. Tkáň byla kultivována v 6-jamkové destičce, do které bylo pipetováno 50 μ l suspenze nádorové tkáňe a na ni bylo napipetováno organoidní médium. Ke kultivaci bylo použito médium složené z Advanced DMEM/F12, Primocinu (100 μ g/ml), HEPES, GlutaMAX-I, A83-01 (500 nM), Y-27632 (10 μ M, k podpoře růstu organoidů), N-acetylcystein (1.56 mM), nikotinamid (10 mM), FGF10 (fibroblastový růstový faktor, 10 ng/mL), B27supplement, epidermálního růstového faktoru (50 ng/ml), Gastrinu I (0,01 μ M), upravené médium Wnt3A (50 ng/ml), R-spondin-1 kondicionované médium (R-spondin zvyšuje diferenciaci buněk, 250 ng/mL) a Noggin kondicionované médium (100 ng/mL). Nádorové buňky se kultivovaly ve zvlhčeném inkubátoru v přítomnosti 5% CO₂ při 37 °C (Gong et al., 2023). V dalším protokolu byla ke kultivaci použita směs médií 1:1, která se skládá z promývacího média bez FBS a kondicionovaného média suplementovaného Wnt3A/R-Spondin/Noggin, L-WRN (ATCC). Část složek v tomto médiu bylo shodných s předchozím protokolem (B27, nikotinamid, N-acetyl-L-cystein, Primocin, mNoggin, Gastrin. Toto médium kolektiv obohatil o lidský fibroblastový růstový faktor FGF10 (100 ng/ml), lidský epidermální růstový faktor EGF, o inhibitor A 83-01 (500 nM), o prostaglandin E2 (1 μ M) a o inhibitor Y-27632. Růst a množení organoidních kultur se sledovalo po dobu 14 dnů a během celé této doby kultivace bylo potřeba každé 2 dny přidat nová růstová média (Beato et al., 2021). Vaes a kolektiv ke kultivaci využili místo Matrigelu Geltrex, ze kterého byla vytvořena buněčná suspenze, která byla nanášena na 24jamkovou kultivační destičku a nechala se zatuhnout po dobu 30 minut při 37 °C. Po ztuhnutí bylo na Geltrex nanášeno organoidní médium a kultivace dále probíhala stejně jako u ostatních protokolů (Vaes et al., 2020). Také organoidy z maligního ascitu a pleurálního výpotku byly kultivovány za stejných podmínek ale ve 24-jamkové destičce s Matrigelem s růstovými faktory. Médium bylo navíc obohaceno o pár složek například o heregulin beta-1 (aktivuje MAPK), inzulin, R-spondin-1 (zvyšuje diferenciaci buněk), beta-estradiol, hydrokortizon, FGF-7, FGF-10 a EGF (Choi et al., 2023). V jednom z protokolů bylo popsáno, že je možné nádorové organoidy kultivovat současně ve více typech nádorových organoidních médií. Například pro výběr mutací KRAS byly z média odstraněny mutanty EGF, FGF2 a IGF1 kvůli tomu, že mutace KRAS významně aktivují signalizaci EGF. Pro mutace SMAD4 je z média odstraněn Noggin, A83-01 a Wnt3a z důvodu, že potlačují signalizaci TGF- β /BMP nebo také signalizaci p38MAPK. U mutací TP53 je do média možné přidat Nutlin 3, protože mutace TP53 získává rezistenci na inhibitor

MDM2 Nutrin-3 (Ikezawa et al., 2022). V současnosti je kultivace nádorových organoidů závislá na Matrigelu (Lv et al., 2024). Matrigel byl použit ke kultivaci organoidů ve všech zmíněných protokolech. Kolektiv Driehuis a spol. popsal také přípravu samotného nádorového média, které využívali ke kultivaci. Organoidy jsou většinou viditelné po 2 až 4 dnech po nasazení. Nádorové organoidy se jeví jako cystické nebo denzní struktury. V tomto protokolu byla shodná doba s jedním z předchozích protokolů, během které musí být přidávána organoidní média, aby se zajistil potřebný přísun růstových faktorů, což je každé 2 až 3 dny (Driehuis et al., 2020). Kultury bylo potřeba v závislosti na rychlosti růstu rozdělit, pokud tvořily velké shluky nebo pokud nadměrně splývaly (Tsai et al., 2018). Organoidy byly ve všech zmíněných protokolech úspěšně stanoveny za 14 až 21 dní. Úspěšnost tvorby organoidů nádoru pankreatu je potvrzena standardní morfologií organoidů a také pozitivní genotypizací známých mutací PDCA (Tiriac et al., 2018). Organoidy jsou taktéž považovány za úspěšně kultivované, pokud je možné je udržet po dobu pěti nebo více pasáží (Choi et al., 2023). Organoidy jsou pasážovány zhruba každých 7 dní disociací pomocí TrypLE po dobu 10 minut při 37 °C (Schuth et al., 2022). Organoidy byly vždy pasážovány, což umožňovalo tvorbu nových organoidů (Vaes et al., 2020). Při tvorbě organoidů může být kultura ovlivňována farmakologickou inhibicí nebo mohou být odstraněny či přidány určité růstové faktory, aby bylo docíleno výběru buněk s danými genetickými změnami, které jsou specifické pro nádor. Umožňuje to zabránit nadměrnému růstu nechtěných či kontaminujících buněk ve vzorcích nádoru. Přítomnost kontaminujících buněk v kultuře organoidů je velice známý problém, se kterým se bojuje při tvorbě organoidů odvozených od nádorové tkáně (Driehuis et al., 2019). Organoidní linie jsou také testovány na kontaminaci mykoplazmaty. K potvrzení původu nádorových buněk u dané vytvořené organoidní linie se ověřují profily genomických změn odpovídajících PDAC pomocí celogenomového sekvenování (Schuth et al., 2022). V dalším protokolu také uvedli, že úspěšnou tvorbu prokázali pozitivní genotypizací známých mutací u PDAC a sledováním standardní morfologie organoidů.

Velká část adenokarcinomů slinivky břišní obsahuje mutaci KRAS, což vede k signalizaci dráhy EGFR nezávislé na ligandu a z tohoto důvodů může být tento ligand odebrán z kultivačního média pro nádorovou tkáň. Wnt ligant může být také odebrán, jelikož adenokarcinom pankreatu je nezávislý na Wnt. Protože není předem jasné, jaké genetické změny jsou přítomny v konkrétním nádoru, který je kultivován, je doporučeno kultivovat 2 vzorky nádorů, kdy každý ze vzorků je kultivován s médiem s odlišnými růstovými faktory. Jeden vzorek se kultivuje v médiu s růstovými faktory FGF10 a A83-01 a druhý vzorek se

kultivuje v médiu s růstovými faktory EGF a FGF10. Tímto způsobem kultivace se zvyšuje šance, že se podaří vytvořit nádorovou organoidní kulturu, protože obě nádorová média vyvíjejí na nanesené primární buňky různý selekční tlak (Driehuis et al., 2020). Po úspěšném vytvoření pankreatických organoidů mohou být organoidy barveny hematoxylinem a eozinem nebo také histochemickým barvením nebo jsou charakterizovány farmakotypizací. Vytvořené pankreatické organoidy se shromažďují a poté se kryokonzervují, aby se udržovaly co nejdéle, a tím se vytváří sbírka široké řady různých typů nádorů v živých biobankách. Shromažďuje se co nejvíce organoidů s různým spektrem podtypů tohoto onemocnění a s různou heterogenitou. Tímto širokým výběrem nádorových organoidů je usnadněn následný výzkum a objevování či také validace léků (Seppälä, Burkhart, 2021).



Obrázek 8 vzhled organoidů A) horní 2 snímky - organoidy cystické struktury podobné zdravé tkáni, spodní 2 snímky - cystická struktura vyskytující se v nádorech B) snímky organoidů nádorů pankreatu s hustou morfolofií (Driehuis et al., 2020)

2.5 Metody identifikace organoidů a 3D struktur

Vzniklé organoidy lze identifikovat pomocí různých metod sloužících k posouzení klíčových aspektů u vzniklých organoidů, jako je buněčné složení, struktura a morfologie, molekulární signatura a heterogenita organoidů. Mezi základní metody identifikace organoidů patří barvení hematoxylinem a eozinem, průtoková cytometrie, polymerázová řetězová reakce, zobrazovací metody ve 2D jako je imunofluorescence nebo imunohistochemická analýza a zobrazovací metody ve 3D. Zobrazovací metody jsou nejvíce využívány k posuzování organoidů. 3D metody oproti 2D metodám představují lepší způsob pro analýzu struktury organoidů, jelikož 3D metody umožňují získávat informace nejen o morfologické struktuře, ale také o buněčném složení, o interakcích mezi buňkami, informace o funkci organoidů a také umožňují sledovat vývoj organoidů v reálném čase. (Maharjan et al., 2024). První možností, jak identifikovat organoidy je pozorování morfogeneze organoidů. Nejčastějším morfologickým znakem, který se u organoidů vyskytuje je přítomnosti lumen (jeden nebo více),

který se typicky vyskytuje u tkání *in vivo*. Další strukturou, která charakterizuje organoidy jsou různé pupeny, výčnělky či větve, které jsou typické například pro organoidy odvozené od pankreatické tkáně. Posledním morfologickým znakem, který lze u organoidů pozorovat je rozvrstvení neboli vznik více vrstev (Lee et al., 2022). Jednou z konkrétních možností, jak zkoumat morfologické vlastnosti organoidů je imunohistochemická analýza. Pomocí této metody se zkoumá morfologie vzniklých organoidů, které se porovnávají se vzorkem nádoru, ze kterého byly organoidy vytvořeny (Vaes et al., 2020). Pro imunohistochemickou analýzu se provádí standardní barvení hematoxylinem a eosinem a poté jsou pořízeny snímky obarvených preparátů, které se analyzují pod mikroskopem (Watanabe et al., 2022). Kolektiv Vaes a spol., pomocí histochemické analýzy zjistili, že struktura organoidů je velice podobná struktuře původního nádoru. Pomocí histochemie je možné také pozorovat typické jaderné rysy malignity jako je zvětšení jádra, mnohočetná jádérka, mitóza a apoptóza, které dokazují podobu s nádorovou tkání (Vaes et al., 2020). 3D zobrazování organoidů je velmi důležité pro pochopení složité struktury organoidů. Přínosy 3D zobrazování organoidů, kterými jsou vizualizace vnitřních struktur a buněčné organizace, poskytují zásadní informace, kterých je využito u vývojové biologie, modelování nemocí, regenerativní medicíny, tkáňového inženýrství a také u screeningu léčiv (Maharjan et al., 2024). Jednou z metod 3D zobrazování organoidů může být technologie tkáňového projasnění, která umožňuje zobrazit vnitřní strukturu organoidů i přes jejich neprůhlednost a silnou autofluorescenci. Princip této techniky je založen na zprůhlednění biologické tkáně a tím je umožněno vizualizovat vnitřní strukturu bez toho, aniž by bylo potřeba provádět řezy tkáně. Po zviditelnění přicházejí na řadu zobrazovací techniky jako je konfokální mikroskopie, světelná mikroskopie a dvoufotonová mikroskopie (Ko et al., 2024). Dvoufotonová mikroskopie je zobrazovací technika, kterou lze také využít pro zobrazení vzniklých organoidů. Tato metoda funguje na principu fluorescenčního a pulzního laseru a má sníženou fototoxicitu, tudíž nepoškozuje zobrazované tkáně a umožňuje zobrazení s vysokou rozlišovací schopností (Xue et al., 2021). Další využitelnou metodou je konfokální mikroskopie, která je klíčovou při zobrazování organoidů, jelikož odhaluje složitou 3D architekturu organoidů. Zajímavým typem konfokální mikroskopie je laserová skenovací konfokální mikroskopie (LSCM), jelikož kromě vizualizace umožňuje také jemnou analýzu obrazu subcelulárních organoidů. Využívá proteinové značení o různých vlnových délkách a díky tomu lze popsat také aktivitu organoidů, vývojové pokroky, díky přesnému výčtu buněk, jader a různých biomarkerů. Kromě toho všeho dokáže konfokální laserová mikroskopie určit rozmanitost fenotypů v nádorových organoidech, které jsou odvozené od pacienta (Ko et al., 2024). Významnou technikou je také elektronová mikroskopie,

kteřá se dělí na transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) a na skenovací elektronovou mikroskopii. Tyto dvě elektronové mikroskopie se od sebe liší v tom, co jsou schopny zobrazit. Transmisní elektronová mikroskopie je založena na principu průchodu svazku elektronů vzorkem, což vede k zobrazení vnitřních struktur s vysokým rozlišením a tím poskytuje informace o buněčných složkách a jemných strukturálních detailech organoidů. Skenovací elektronová mikroskopie funguje na principu skenování povrchu vzorku pomocí svazku elektronů a tím umožňuje sledovat povrchové rysy a textury, což je velmi důležité pro studium morfologie povrchu organoidů (Maharjan et al., 2024).

2.6 Farmakotypizace organoidů

Pankreatické organoidy získané z chirurgických vzorků a biopsií lze použít pro vysokokapacitní testování léčiv neboli k farmakotypizaci (Seppälä, Burkhart, 2021). Stanovené pankreatické organoidy, které jsou již několikrát pasážovány, lze využít ke screeningu léčiv. Organoidy byly rozděleny na jednotlivé buňky a byly vloženy do suspenze Matrigel/ kompletní médium. Byla testována léčiva gemcitabin, paklitaxel, SN-38 (aktivní metabolit irinotekanu) a oxaliplatin. Aby byl screening rychlý, byly vybrány takové vzorky, které vykazovaly rychlý růst, vysokou buněčnost a minimální obsah stromálních buněk, fibrózní či nekrotické tkáně. Pankreatické organoidy měly krátký čas na vytvoření a tento rychlý screening zabraňoval dlouhodobému vytvoření organoidů. Po 5 dnech byla u screeningu léčiv stanovena životaschopnost buněk pomocí CellTiter-Glo (Demyan et al., 2022). Kolektiv Grossman a spol. také provedli farmakotypizaci organoidů. Buňky byly naředěny v Matrigelu na hustotu 25 000 buněk na 1 ml a poté bylo do každé jamky na 96-jamkové destičce nanášeno 10 μ l suspenze na konečnou hustotu 2500 buněk v každé jamce. Matrigel se nechal 30 minut ztuhnout, po uplynutí této doby bylo do každé jamky přidáno 100 μ l organoidního růstového média. Buňky se nechaly růst 4 dny a poté bylo původní médium nahrazeno čerstvým médiem a do každé jamky byly přidány léky. Po přidání léků k organoidům se nechaly organoidy růst další 4 dny v přítomnosti léků a poté byl měřen buněčný růst (Grossman et al., 2022).

ZÁVĚR

Organoidní struktury mají za cíl přesně rekapitulovat lidskou tkáň, díky čemuž mají své místo v diagnostice, modelování onemocnění spojených s tkání, od kterých jsou odvozeny, při objevování léků a v neposlední řadě také v personalizované medicíně. Existuje mnoho různých protokolů, které nezávisle na sobě sepsaly různé výzkumné skupiny. V protokolech pro stanovení organoidů se využívá jiný typ buněk na základě toho, jaký typ organoidů je cílem vytvoření daným kolektivem. Lze využít pluripotentní kmenové buňky, fetální tkáň, normální zdravou tkáň nebo nádorovou tkáň. Na základě toho je zvolen kultivační postup tak, aby došlo k úspěšné tvorbě organoidů. Nejvyužívanějším modelem pankreatických organoidů jsou organoidy vytvořené z nádorové tkáně, jelikož jsou velmi důležitým nástrojem pro sledování průběhu onemocnění, genetických změn a genetických mutací, které vznikají při nádorovém onemocnění ve slinivce břišní. Duktální adenokarcinom pankreatu je charakterizován řadou mutací, ale mutace KRAS se vyskytuje u více než 90 % duktálního adenokarcinomu pankreatu, což z ní dělá charakteristický znak rakoviny slinivky břišní. Organoidy lze využít také pro hodnocení vlivu jednotlivých léčiv na karcinom pankreatu. Organoidní modely se stále posouvají kupředu, nejdříve byly pouze myší modely tkání, v dnešní době jsou k dispozici lidské modely, které jsou oproti původním vyvinutější a lépe rekapitulují procesy probíhající v lidské tkáni. Příprava organoidů je náročná a často neúspěšná a může dlouho trvat, než se podaří odhalit správný postup, který vede k úspěchu, ale i přesto jsou velmi využívaným modelem.

POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Atkinson MA, Campbell-Thompson M, Kusmartseva I, Kaestner KH. Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia*. 2020; 63(10):1966-1973. doi: 10.1007/s00125-020-05203-7.
- 2) Balak JRA, Juksar J, Carlotti F, Lo Nigro A, de Koning EJP. Organoids from the Human Fetal and Adult Pancreas. *Curr Diab Rep*. 2019;19(12):160. doi: 10.1007/s11892-019-1261-z.
- 3) Beato F, Reverón D, Dezsai KB, Ortiz A, Johnson JO, Chen DT, Ali K, Yoder SJ, Jeong D, Malafa M, Hodul P, Jiang K, Centeno BA, Abdalah MA, Balasi JA, Tassielli AF, Sarcar B, Teer JK, DeNicola GM, Permeth JB, Fleming JB. Establishing a living biobank of patient-derived organoids of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Lab Invest*. 2021;101(2):204-217. doi: 10.1038/s41374-020-00494-1.
- 4) Bengtsson A, Andersson R, Rahm J, Ganganna K, Andersson B, Ansari D. Organoid technology for personalized pancreatic cancer therapy. *Cell Oncol (Dordr)*. 2021;44(2):251-260. doi: 10.1007/s13402-021-00585-1.
- 5) Bittenglova K, Habart D, Saudek F, Koblas T. The Potential of Pancreatic Organoids for Diabetes Research and Therapy. *Islets*. 2021;13(5-6):85-105. doi: 10.1080/19382014.2021.1941555.
- 6) Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio II, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvisse M, Tiriác H, Spector MS, Gracanin A, Oni T, Yu KH, van Boxtel R, Huch M, Rivera KD, Wilson JP, Feigin ME, Öhlund D, Handly-Santana A, Ardito-Abraham CM, Ludwig M, Elyada E, Alagesan B, Biffi G, Yordanov GN, Delcuze B, Creighton B, Wright K, Park Y, Morsink FH, Molenaar IQ, Borel Rinkes IH, Cuppen E, Hao Y, Jin Y, Nijman IJ, Iacobuzio-Donahue C, Leach SD, Pappin DJ, Hammell M, Klimstra DS, Basturk O, Hruban RH, Offerhaus GJ, Vries RG, Clevers H, Tuveson DA. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*. 2015;160(1-2):324-38. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.021.
- 7) Breunig M, Merkle J, Melzer MK, Heller S, Seufferlein T, Meier M, Hohwieler M, Kleger A. Differentiation of human pluripotent stem cells into pancreatic duct-like organoids. *STAR Protoc*. 2021;2(4):100913. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100913.
- 8) Cicenás J, Kvederaviciute K, Meskinyte I, Meskinyte-Kausiliene E, Skeberdyte A, Cicenás J. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(5):42. doi: 10.3390/cancers9050042.
- 9) Demyan L, Habowski AN, Plenker D, King DA, Standring OJ, Tsang C, St Surin L, Rishi A, Crawford JM, Boyd J, Pasha SA, Patel H, Galluzzo Z, Metz C, Gregersen PK,

- Fox S, Valente C, Abadali S, Matadial-Ragoo S, DePeralta DK, Deutsch GB, Herman JM, Talamini MA, Tuveson DA, Weiss MJ. Pancreatic Cancer Patient-derived Organoids Can Predict Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Surg.* 2022;276(3):450-462. doi: 10.1097/SLA.0000000000005558.
- 10) Dennaoui R, Shrestha H, Wagner KU. Models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2021;40(3):803-818. doi: 10.1007/s10555-021-09989-9.
- 11) 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.
- 12) Dolezalova N, Gruszczuk A, Barkan K, Gamble JA, Galvin S, Moreth T, O'Holleran K, Mahbubani KT, Higgins JA, Gribble FM, Reimann F, Surmacki J, Andrews S, Casey JJ, Pampaloni F, Murphy MP, Ladds G, Slater NKH, Saeb-Parsy K. Accelerating cryoprotectant diffusion kinetics improves cryopreservation of pancreatic islets. *Sci Rep.* 2021;11(1):10418. doi: 10.1038/s41598-021-89853-6.
- 13) 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. doi: 10.1016/j.xpro.2020.100192.
- 14) Driehuis E, van Hoeck A, Moore K, Kolders S, Francies HE, Gulersonmez MC, Stigter ECA, Burgering B, Geurts V, Gracanin A, Bounova G, Morsink FH, Vries R, Boj S, van Es J, Offerhaus GJA, Kranenburg O, Garnett MJ, Wessels L, Cuppen E, Brosens LAA, Clevers H. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(52):26580-26590. doi: 10.1073/pnas.1911273116.
- 15) Georgakopoulos N, Prior N, Angres B, Mastrogianni G, Cagan A, Harrison D, Hindley CJ, Arnes-Benito R, Liao SS, Curd A, Ivory N, Simons BD, Martincorena I, Wurst H, Saeb-Parsy K, Huch M. Long-term expansion, genomic stability and in vivo safety of adult human pancreas organoids. *BMC Dev Biol.* 2020;20(1):4. doi: 10.1186/s12861-020-0209-5.
- 16) Gong M, Meng H, Tan D, Li P, Qin J, An Q, Shi C, An J. Establishment of organoid models for pancreatic ductal adenocarcinoma and screening of individualized therapy strategy. *Animal Model Exp Med.* 2023;6(5):409-418. doi: 10.1002/ame2.12352.
- 17) Grapin-Botton A. Three-dimensional pancreas organogenesis models. *Diabetes Obes Metab.* 2016;18 Suppl 1(Suppl 1):33-40. doi: 10.1111/dom.12720.
- 18) Grossman JE, Muthuswamy L, Huang L, Akshinthala D, Perea S, Gonzalez RS, Tsai LL, Cohen J, Bockorny B, Bullock AJ, Schlechter B, Peters MLB, Conahan C, Narasimhan S, Lim C, Davis RB, Besaw R, Sawhney MS, Pleskow D, Berzin TM,

- Smith M, Kent TS, Callery M, Muthuswamy SK, Hidalgo M. Organoid Sensitivity Correlates with Therapeutic Response in Patients with Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 2022;28(4):708-718. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4116.
- 19) Gurreri E, Genovese G, Perelli L, Agostini A, Piro G, Carbone C, Tortora G. KRAS-Dependency in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Mechanisms of Escaping in Resistance to KRAS Inhibitors and Perspectives of Therapy. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11):9313. doi: 10.3390/ijms24119313.
- 20) Haque MR, Rempert TH, Al-Hilal TA, Wang C, Bhushan A, Bishehsari F. Organ-Chip Models: Opportunities for Precision Medicine in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(17):4487. doi: 10.3390/cancers13174487.
- 21) Hohwieler M, Illing A, Hermann PC, Mayer T, Stockmann M, Perkhofer L, Eiseler T, Antony JS, Müller M, Renz S, Kuo CC, Lin Q, Sandler 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;66(3):473-486. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312423.
- 22) Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, Nostro C, Wang R, Muthuswamy LB, Crawford HC, Arrowsmith C, Kalloger SE, Renouf DJ, Connor AA, Cleary S, Schaeffer DF, Roehrl M, Tsao MS, Gallinger S, Keller G, Muthuswamy SK. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell – and patient-derived tumor organoids. *Nat Med.* 2015; 21(11):1364-71. doi: 10.1038/NM.3973.
- 23) Chen H, Zhuo Q, Ye Z, Xu X, Ji S. Organoid model: A new hope for pancreatic cancer treatment? *Biochimica et Biophysica Acta – Reviewa on Cancer.* 2021 ;1875(1):188466. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188466.
- 24) Chen S, Wang M, Liu L, Wang G, Wang L, Zhong C, Gao C, Wu W, Li L. Ultrasound-guided fine-needle aspiration/biopsy-based pancreatic organoids establishment: an alternative model for basic and preclinical research. *Gastroenterol Rep (Oxf).* 2023;11: goad019. doi: 10.1093/gastro/goad019.
- 25) Choi W, Kim YH, Woo SM, Yu Y, Lee MR, Lee WJ, Chun JW, Sim SH, Chae H, Shim H, Lee KS, Kong SY. Establishment of Patient-Derived Organoids Using Ascitic or Pleural Fluid from Cancer Patients. *Cancer Res Treat.* 2023;55(4):1077-1086. doi: 10.4143/crt.2022.1630.
- 26) Ikezawa K, Ekawa T, Hasegawa S, Kai Y, Takada R, Yamai T, Fukutake N, Ogawa H, Akazawa T, Mizote Y, Tatsumi K, Nagata S, Asukai K, Takahashi H, Ohkawa K, Tahara H. Establishment of organoids using residual samples from saline flushes during

endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in patients with pancreatic cancer. *Endosc Int Open*. 2022;10(1): E82-E87. doi: 10.1055/a-1713-3404.

- 27) Jiang L, Shen Y, Liu Y, Zhang L, Jiang W. Making human pancreatic islet organoids: Progresses on the cell origins, biomaterials and three-dimensional technologies. *Theranostics*. 2022;12(4):1537-1556. doi: 10.7150/thno.66670.
- 28) Ko J, Hyung S, Cheong S, Chung Y, Li Jeon N. Revealing the clinical potential of high-resolution organoids. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2024; 207:115202. doi: 10.1016/j.addr.2024.115202.
- 29) Kokkinos J, Sharbeen G, Haghighi KS, Ignacio RMC, Kopecky C, Gonzales-Aloy E, Youkhana J, Timpson P, Pereira BA, Ritchie S, Pandzic E, Boyer C, Davis TP, Butler LM, Goldstein D, McCarroll JA, Phillips PA. Ex vivo culture of intact human patient derived pancreatic tumour tissue. *Sci Rep*. 2021;11(1):1944. doi: 10.1038/s41598-021-81299-0.
- 30) Lee BH, Seijo-Barandiaran I, Grapin-Botton A. Epithelial morphogenesis in organoids. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2022; 72:30-37. doi: 10.1016/j.gde.2021.10.001.
- 31) Lee SY, Koo IS, Hwang HJ, Lee DW. In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discov*. 2023;28(4):119-137. doi: 10.1016/j.slasd.2023.03.006.
- 32) Li K, Bian J, Xiao Y, Wang D, Han L, He C, Gong L, Wang M. Changes in Pancreatic Senescence Mediate Pancreatic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):3513. doi: 10.3390/ijms24043513.
- 33) Lilly AC, Astsaturov I, Golemis EA. Intrapancreatic fat, pancreatitis, and pancreatic cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2023;80(8):206. doi: 10.1007/s00018-023-04855-z.
- 34) Liu Y, Li N, Zhu Y. Pancreatic Organoids: A Frontier Method for Investigating Pancreatic-Related Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):4027. doi: 10.3390/ijms24044027.
- 35) Loomans CJM, Williams Giuliani N, Balak J, Ringnalda F, van Gurp L, Huch M, Boj SF, Sato T, Kester L, de Sousa Lopes SMC, Roost MS, Bonner-Weir S, Engelse MA, Rabelink TJ, Heimberg H, Vries RGJ, van Oudenaarden A, Carlotti F, Clevers H, de Koning EJP. Expansion of Adult Human Pancreatic Tissue Yields Organoids Harboring Progenitor Cells with Endocrine Differentiation Potential. *Stem Cell Reports*. 2018;10(3):712-724. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.02.005.
- 36) Lorberbaum DS, Sarbaugh D, Sussel L. Leveraging the strengths of mice, human stem cells, and organoids to model pancreas development and diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13:1042611. doi: 10.3389/fendo.2022.1042611.

- 37) Luchini C, Paolino G, Mattiolo P, Piredda ML, Cavaliere A, Gaule M, Melisi D, Salvia R, Malleo G, Shin JI, Cargnin S, Terrazzino S, Lawlor RT, Milella M, Scarpa A. KRAS wild-type pancreatic ductal adenocarcinoma: molecular pathology and therapeutic opportunities. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):227. doi: 10.1186/s13046-020-01732-6.
- 38) Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer. *Semin Oncol.* 2021;48(1):10-18. doi: 10.1053/j.seminoncol.2021.02.003.
- 39) Lv J, Du X, Wang M, Su J, Wei Y, Xu C. Construction of tumor organoids and their application to cancer research and therapy. *Theranostics.* 2024; 14(3):1101-1125. doi: 10.7150/THNO.91362.
- 40) Maharjan S, Ma C, Singh B, Kang H, Orive G, Yao J, Shrike Zhang Y. Advanced 3D imaging and organoid bioprinting for biomedical research and therapeutic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2024; 208:115237. doi: 10.1016/j.addr.2024.115237.
- 41) Marsee A, Roos FJM, Verstegen MMA; HPB Organoid Consortium; Gehart H, de Koning E, Lemaigre F, Forbes SJ, Peng WC, Huch M, Takebe T, Vallier L, Clevers H, van der Laan LJW, Spee B. Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids. *Cell Stem Cell.* 2021 ;28(5):816-832. doi: 10.1016/j.stem.2021.04.005.
- 42) Marshall SM. The pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia.* 2020 ;63(10):1962-1965. doi: 10.1007/s00125-020-05235-z.
- 43) Matsuda Y. Age-related morphological changes in the pancreas and their association with pancreatic carcinogenesis. *Pathol Int.* 2019;69(8):450-462. doi: 10.1111/pin.12837.
- 44) McGuckin E, Cade JE, Hanison J. The pancreas. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine.* 2020, **21**(11), 604-610. doi: 10.1016/j.mpaic.2020.08.005.
- 45) Moreira L, Bakir B, Chatterji P, Dantes Z, Reichert M, Rustgi AK. Pancreas 3D Organoids: Current and Future Aspects as a Research Platform for Personalized Medicine in Pancreatic Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology.* 2017 ;5(3):289-298. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.12.004.
- 46) Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA.* 2021;326(9):851-862. doi: 10.1001/jama.2021.13027.
- 47) Patman G. From normal to metastases—a whole gamut of pancreatic organoids. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* 2015;12;61. doi:10.1038/nrgastro.2015.1.

- 48) Pedraza-Arevalo S, Cujba AM, Alvarez-Fallas ME, Sancho R. Differentiation of beta-like cells from human induced pluripotent stem cell-derived pancreatic progenitor organoids. *STAR Protoc.* 2022;3(3):101656. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101656.
- 49) Pham NA, Radulovich N, Ibrahimov E, Martins-Filho SN, Li Q, Pintilie M, Weiss J, Raghavan V, Cabanero M, Denroche RE, Wilson JM, Metran-Nascente C, Borgida A, Hutchinson S, Dodd A, Begora M, Chadwick D, Serra S, Knox JJ, Gallinger S, Hedley DW, Muthuswamy L, Tsao MS. Patient-derived tumor xenograft and organoid models established from resected pancreatic, duodenal and biliary cancers. *Sci Rep.* 2021;11(1):10619. doi: 10.1038/s41598-021-90049-1.
- 50) Pham TND, Shields MA, Spaulding C, Principe DR, Li B, Underwood PW, Trevino JG, Bentrem DJ, Munshi HG. Preclinical Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Utility in Immunotherapy Studies. *Cancers (Basel).* 2021;13(3):440. doi: 10.3390/cancers13030440.
- 51) Seppälä TT, Burkhart RA. Can Pancreatic Organoids Help in the Treatment of Pancreatic Cancer? *Adv Surg.* 2021; 55:215-229. doi: 10.1016/j.yasu.2021.05.015.
- 52) Seppälä TT, Zimmerman JW, Suri R, Zlomke H, Ivey GD, Szabolcs A, Shubert CR, Cameron JL, Burns WR, Lafaro KJ, He J, Wolfgang CL, Zou YS, Zheng L, Tuveson DA, Eshleman JR, Ryan DP, Kimmelman AC, Hong TS, Ting DT, Jaffee EM, Burkhart RA. Precision Medicine in Pancreatic Cancer: Patient-Derived Organoid Pharmacotyping Is a Predictive Biomarker of Clinical Treatment Response. *Clin Cancer Res.* 2022; 28(15):3296-3307. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-4165.
- 53) Shahjalal HM, Abdal Dayem A, Lim KM, Jeon TI, Cho SG. Generation of pancreatic β cells for treatment of diabetes: advances and challenges. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):355. doi: 10.1186/s13287-018-1099-3.
- 54) Schuth S, Le Blanc S, Krieger TG, Jabs J, Schenk M, Giese NA, Büchler MW, Eils R, Conrad C, Strobel O. Patient-specific modeling of stroma-mediated chemoresistance of pancreatic cancer using a three-dimensional organoid-fibroblast co-culture system. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022;41(1):312. doi: 10.1186/s13046-022-02519-7.
- 55) Simian M, Bissell MJ. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol.* 2017;216(1):31-40. doi: 10.1083/jcb.201610056.
- 56) Song J, Zhang J, Ji Y, Tang J, Sheng J, Liang T, Bai X. Protocol for isolating single cells from human pancreatic cancer tissues and analyzing major immune cell populations using flow cytometry. *STAR Protocols.* 2023 ;4(4):102679. doi: 10.1016/j.xpro.2023.102679.
- 57) Tiriác H, Bucobo JC, Tzimas D, Grewel S, Lacombe JF, Rowehl LM, Nagula S, Wu M, Kim J, Sasson A, Vignesh S, Martello L, Munoz-Sagastibelza M, Somma J, Tuveson

- DA, Li E, Buscaglia JM. Successful creation of pancreatic cancer organoids by means of EUS-guided fine-needle biopsy sampling for personalized cancer treatment. *Gastrointest Endosc.* 2018;87(6):1474-1480. doi: 10.1016/j.gie.2017.12.032.
- 58) Tiriac H, Plenker D, Baker LA, Tuveson DA. Organoid models for translational pancreatic cancer research. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2019; 54:7-11. doi: 10.1016/j.gde.2019.02.003.
- 59) Tsai S, McOlash L, Palen K, Johnson B, Duris C, Yang Q, Dwinell MB, Hunt B, Evans DB, Gershan J, James MA. Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models. *BMC Cancer.* 2018;18(1):335. doi: 10.1186/s12885-018-4238-4.
- 60) Vaes RDW, van Dijk DPJ, Welbers TTJ, Blok MJ, Aberle MR, Heij L, Boj SF, Olde Damink SWM, Rensen SS. Generation and initial characterization of novel tumour organoid models to study human pancreatic cancer-induced cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020;11(6):1509-1524. doi: 10.1002/jcsm.12627.
- 61) Wassmer CH, Lebreton F, Bellofatto K, Bosco D, Berney T, Berishvili E. Generation of insulin-secreting organoids: a step toward engineering and transplanting the bioartificial pancreas. *Transpl Int.* 2020;33(12):1577-1588. doi: 10.1111/tri.13721.
- 62) Watanabe S, Yogo A, Otsubo T, Umehara H, Oishi J, Kodo T, Masui T, Takaishi S, Seno H, Uemoto S, Hatano E. Establishment of patient-derived organoids and a characterization-based drug discovery platform for treatment of pancreatic cancer. *BMC Cancer.* 2022;22(1):489. doi: 10.1186/s12885-022-09619-9.
- 63) Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis and Treatment. *Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology.* 2022; 163(2); 386-402. doi: 10.1053/j.gastro.2022.03.056.
- 64) Xue Y, Browne AW, Tang WC, Delgado J, McLelland BT, Nistor G, Chen JT, Chew K, Lee N, Keirstead HS, Seiler MJ. Retinal Organoids Long-Term Functional Characterization Using Two-Photon Fluorescence Lifetime and Hyperspectral Microscopy. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15:796903. doi: 10.3389/fncel.2021.796903.
- 65) Zhang X, Ma Z, Song E, Xu T. Islet organoid as a promising model for diabetes. *Protein Cell.* 2022;13(4):239-257. doi: 10.1007/s13238-021-00831-0.
- 66) Zhao Z, Chen X, Dowbaj AM, Sljukic A, Bratlie K, Lin L, Fong ELS, Balachander GM, Chen Z, Soragni A, Huch M, Zeng YA, Wang Q, Yu H. Organoids. *Nat Rev Methods Primers.* 2022; 2:94. doi: 10.1038/s43586-022-00174-y.