

## ZAKLJUČNO POROČILO

o rezultatih internega raziskovalnega projekta UKC Maribor  
za obdobje od 10. 2. 2016 do 26. 9. 2022

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta:	IRP-2015/02-04	
Naslov projekta:	FIZIOLOGIJA ACINARNIH CELIC TREBUŠNE SLINAVKE; POMEN KALCIJEVIH SIGNALNIH POTI V FIZIOLOŠKIH IN PATOFIZIOLOŠKIH POGOJIH	
Vodja projekta:	prim. prof. dr. Stojan POTRČ, dr. med.	
Trajanje projekta (leta, od-do):	6 let 7 mesecev	10. 2. 2016 – 26. 9. 2022
Velikost projekta	<input checked="" type="checkbox"/> mali (10.000,00 EUR)	<input type="checkbox"/> veliki (50.000,00 EUR)

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

#### 1. Poročilo o realizaciji predloženega programa raziskovalnega projekta - opis raziskave (izhodišča, predstavitev problema, metode dela), ugotovljeni rezultati in uporaba (*največ do 3 strani*)

I. IZHODIŠČE
<p>Nezadostno oziroma neustrezno delovanje trebušne slinavke lahko ima za posledico razvoj sladkorne bolezni ali vnetja (pankreatitisa), ki se deli v akutno in kronično (1). Izkazalo se je, da pri razvoju vnetja trebušne slinavke igra ključno vlogo preobremenitev celice z znotrajcelično koncentracijo kalcijevih ionov <math>[Ca^{2+}]_i</math>, ki povzroči znotrajcelično aktivacijo encimov, vakuolizacijo in nekrozo trebušne slinavke (3, 4). Samo sproščanje <math>[Ca^{2+}]_i</math> in aktivacija acinarnih celic je odvisna od holinergične in hormonske stimulacije, se pravi od izločanja acetilholina (ACh) in holecistokinina (CCK) (5). Fiziološki vzorec sproščanja <math>[Ca^{2+}]_i</math> nastopa v različnih oblikah - od kratkotrajnih in šibko koreliranih apikalnih koničastih oscilacij <math>[Ca^{2+}]_i</math>, do periodičnega globalnega valovanja (6, 7).</p>
II. PREDSTAVITEV PROBLEMA
<p>Praktično skoraj vse znanje o signalnih poteh <math>Ca^{2+}</math> sloni na raziskavah opravljenih na izoliranih celicah glodavcev (miši in podgane) (8, 9). Pri metodah izolacije pride do strukturnih in funkcionalnih sprememb zaradi encimske razgradnje (10). Prav tako ti modeli ne ponazarjajo fiziološkega stanja, saj celice niso v interakciji z matriksom in z drugimi sosednjimi celicami (11, 12). Iz raziskav na Langerhansovih otočjih je bilo razvidno, da je metoda tkivne rezine primerna za preučevanje fizioloških procesov <i>in situ</i>. Prednosti omenjene metode so: 1) kratek čas priprave; 2) odsotnost encimov, potrebnih pri pripravi izoliranih celic, 3) ohranjena morfologija, 4) ohranjen membranski potenciali in 5) ohranjena funkcija eksocitoze acinarnih celic znotraj intaktnih acinusov (13, 14). Te prednosti pridejo v poštev tudi pri preučevanju eksokrine funkcije trebušne slinavke (15).</p>

### III. METODE DELA

Priprava svežih tkivnih rezin 10 do 20 tednov starih NMRI in C57BL/6J miši obeh spolov je sledila po že opisanem protokolu (16, 17). Po pridobitvi tkivnih rezin (7 primerkov; 6 samic, 1 samec) je sledila priprava za nadaljnje poizkuse. Opravili smo test preživetja celic (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit), poskus izločanja amilaze, transmissijsko elektronsko mikroskopijo, imunofluorescenčno barvanje (protitelesa proti amilzi, protitelesi Mist1/bHLH15 in 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 2,5 µg/ml)), barvanje s fluorescentnim Ca<sup>2+</sup> indikatorjem (Oregon Green 488 Bapta 1 (OGB-1) ali Calbryte 520 AM) in konfokalno mikroskopijo s snemanjem sprememb [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Za zajetje oddane efluorescence je bil uporabljen hibridni detektor Leica HyD. Fluorescenco smo opazovali z ločljivostjo 256 x 256 pikslov s frekvenco 5 Hz oziroma 512 x 512 pikslov s frekvenco 10 Hz za zaznavo širjenja signala [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> od apikalnega do bazalnega dela celice. Premer zaslonke smo nastavili na 150 µm z debelino optične rezine 4 µm, kar je omogočilo zadostno zaznavo in snemanje signala posamezne celice (premer acinarnih celic podgane znaša med 10-24 µm). V raziskavi smo opazovali signal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> po stimulaciji acinarnih celic s protokolom naraščajočih koncentracij ACh in ceruleina (agonista dekapeptidnega receptorja za holecistokinin). Ob stimulaciji z ACh smo uporabili nizki protokol koncentracij 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM ter visok protokol 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM. Ob stimulaciji s cereluinom pa smo uporabili koncentracije 10 pM, 100 pM in 1000 pM. Sam signal je bil glede na njegove kinetične lastnosti analiziran s pomočjo programa Leica Application Suite Advanced Fluorescence in naprej obdelan s programskimi skriptami MATLAB (The MathWorks, Inc., Massachusetts, ZDA) ter Anacondo2 različica 2.4.1.0 (18-21). Iz omejene analize smo lahko sklepali o spremembi frekvence, trajanja oscilacij, relativnega aktivnega časa (aktivnost celice v določenem časovnem intervalu) in koeficienta variabilnosti intervala med oscilacijami. Določili smo tudi sinhronost delovanja acinarnih celic med acinusi in znotraj acinusa s pomočjo koaktivnosti, kjer vrednost 0 predstavljala nesinhronost in 1 sinhronost med binariziranimi signali.

### IV. REZULTATI

Preživetje in morfološko celovitost acinarnih celic znotraj tkivnih rezin po eksperimentalnih manipulacijah smo preverili s konfokalno mikroskopijo, s slikanjem s kontrastom Dodt, s testom preživetja celic, s TEM in z imunofluorescenčnim barvanjem. Opažali smo veliko variabilnost oscilacij [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> med acinusi, medtem ko so bila sama nihanja [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dokaj sinhrona znotraj acinusa. Uspešno smo testirali odziv acinarnih celic na različne koncentracije sekretagogov, pri čemer smo opazovali povprečno frekvenco, trajanje, relativni aktivni čas oscilacij in variabilnost intervala med oscilacijami [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Prav tako smo preko metode funkcionalnih mrež preučili sinhronost oscilacij med celicami. Ugotovili smo, da v primeru stimulacije z ACh pride do porasta povprečne frekvence, trajanja, relativnega aktivnega časa oscilacij in koaktivnosti v odvisnost od uporabljene koncentracije, pri čemer postajajo oscilacije bolj regularne. V primeru ceruleina smo dokazali koncentracijsko odvisnost v trajanju in relativnem aktivnem času, medtem ko frekvenca, koaktivnost in regularnost oscilacij z zvišanjem koncentracije nista statistično značilno narasli.

### V. LITERATURA

1. Roberts SE, Morrison-Rees S, John A, Williams JG, Brown TH, Samuel DG. The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol IAP AI*. 2017 Jan 19.
2. Tenner S, Baillie J, DeWitt J, Vege SS, American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2013 Sep;108(9):1400-1415; 1416.

3. Ward JB, Petersen OH, Jenkins SA, Sutton R. Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis? *Lancet Lond Engl.* 1995 Oct 14;346(8981):1016–9.
4. Voronina S, Longbottom R, Sutton R, Petersen OH, Tepikin A. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology. *J Physiol.* 2002 Apr 1;540(Pt 1):49–55.
5. Petersen OH. Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J Physiol.* 1992 Mar;448:1–51.
6. Thorn P, Lawrie AM, Smith PM, Gallacher DV, Petersen OH. Local and global cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. *Cell.* 1993 Aug 27;74(4):661–8.
7. Tepikin AV, Petersen OH. Mechanisms of cellular calcium oscillations in secretory cells. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Oct 27;1137(2):197–207.
8. Wan MH, Huang W, Latawiec D, Jiang K, Booth DM, Elliott V, et al. Review of experimental animal models of biliary acute pancreatitis and recent advances in basic research. *HPB.* 2012 Feb;14(2):73–81.
9. Hue Su K, Cuthbertson C, Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB.* 2006;8(4):264–86.
10. Irving-Rodgers HF, Choong FJ, Hummitzsch K, Parish CR, Rodgers RJ, Simeonovic CJ. Pancreatic islet basement membrane loss and remodeling after mouse islet isolation and transplantation: impact for allograft rejection. *Cell Transplant.* 2014 Jan;23(1):59–72.
11. Apte MV, Wilson JS. The importance of keeping in touch: regulation of cell-cell contact in the exocrine pancreas. *Gut.* 2005 Oct;54(10):1358–9.
12. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Shimosegawa T. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2009 Nov;7(11 Suppl):S48-54.
13. Stožer A, Dolenšek J, Skelin Klemen M, Slak Rupnik M (2013) Cell physiology in tissue slices. Studying beta cells in the islets of Langerhans. *Acta medico-biotechnica* 6: 20-32.
14. Marciniak A, Cohrs CM, Tsata V, Chouinard JA, Selck C, Stertmann J, et al. Using pancreas tissue slices for in situ studies of islet of Langerhans and acinar cell biology. *Nat Protoc.* 2014 Dec;9(12):2809–22.
15. Marciniak A, Selck C, Friedrich B, Speier S. Mouse pancreas tissue slice culture facilitates long-term studies of exocrine and endocrine cell physiology in situ. *PLoS One.* 2013;8(11):e78706.
16. Speier S, Rupnik M. A novel approach to in situ characterization of pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflüg Arch.* 2003 May 28;446(5):553–8.
17. Stožer A, Dolenšek J, Rupnik MS. Glucose-Stimulated Calcium Dynamics in Islets of Langerhans in Acute Mouse Pancreas Tissue Slices. *PLoS ONE.* 2013 Jan 24;8(1):e54638.
18. Huang Z, Wang H, Sun N, Wang J, Zhao M, Shen J, et al. Congo red modulates ACh-induced Ca(2+) oscillations in single pancreatic acinar cells of mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2014 Dec;35(12):1514–20.
19. Gerasimenko JV, Sherwood M, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV. NAADP, cADPR and IP3 all release Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci.* 2006 Jan 15;119(Pt 2):226–38.
20. Liang HY, Song ZM, Cui ZJ. Lasting inhibition of receptor-mediated calcium oscillations in

pancreatic acini by neutrophil respiratory burst--a novel mechanism for secretory blockade in acute pancreatitis? Biochem Biophys Res Commun. 2013 Aug 2;437(3):361-7.

21. Skelin M, Rupnik M. cAMP increases the sensitivity of exocytosis to Ca<sup>2+</sup> primarily through protein kinase A in mouse pancreatic beta cells. Cell Calcium. 2011 Feb;49(2):89-99.

## 2. Ocena stopnje realizacije in zastavljenih raziskovalnih ciljev (obkrožite)



DA

NE

Če je odgovor NE, napišite kratko utemeljitev

**3. Pridobitev za UKC Maribor - doktorska disertacija, članek, prispevek na znanstveni konferenci/simpoziju ali kongresu, patent, uvedba novih dejavnosti, smernic in metod ali izboljšanje že obstoječih itd. (največ do 1 stran)**

Doktorska disertacija, magistrska naloga, raziskovalna naloga, specialistična naloga: 13.9.22 je bila oddana doktorska disertacija z naslovom <b>FIZIOLOGIJA ACINARNIH CELIC TREBUŠNE SLINAVKE; POMEN KALCIJEVIH SIGNALNIH POTI V FIZIOLOŠKIH IN PATOFIZIOLOŠKIH POGOJIH</b> . Naloga še čaka odobritev/oceno Komisije za predhodno oceno doktorske disertacije.
Objavljeni članki: MAROLT, Urška, PARADIŽ, Eva, POHOREC, Viljem, LIPOVŠEK DELAKORDA, Saška, VENGLOVECZ, Viktória, GÁL, Eleonóra, ÉBERT, Attila, MENYHÁRT, István, POTRČ, Stojan, GOSAK, Marko, DOLEŃSEK, Jurij, STOŽER, Andraž. Calcium imaging in intact mouse acinar cells in acute pancreas tissue slices. <i>PLoS one</i> . 2022, vol. 17, iss. 6, str. 1-26, ilustr. ISSN 1932-6203. <a href="https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0268644">https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0268644</a> , DOI: <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268644">10.1371/journal.pone.0268644</a> . [COBISS.SI- ID <a href="https://www.cobiss.si/id/112261635">112261635</a> ]
Nove metode, smernice, dejavnosti:
Prispevki (konference, srečanja, kongresi, simpoziji):

**4. Sumaričen prikaz ciljev projekta (obvezno izpolnite!)**

	Doktorat, magisterij, raziskovalna ali specialistična naloga	Objavljeni članki	Nove metode, smernice, dejavnosti	Prenos znanja (konference, srečanja, kongresi, simpoziji)
(DA/NE)	NE (V POSTOPKU)	DA		
Število	1	1		

Datum: 18.10.2022	Podpis vodje projekta:  prof. dr. Stojan POTRČ, dr. med specialist splošne kirurgije
----------------------	---

**Izpolni Oddelek za znanstveno-raziskovalno delo**

**REALIZACIJA PROJEKTA**

- CILJI IZPOLNjeni V CELOTI  
 CILJI DELNO IZPOLNjeni  
 CILJI NISO IZPOLNjeni

Porabljena sredstva (v EUR):

6.973,00

Predvidena sredstva: 7.000 EUR

Pregledal in ocenil predstojnik OZRD:

Podpis: 

Datum: 16.11.2022