

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych

Dyscyplina Nauki Chemiczne

Rozprawa doktorska

Mgr inż. Patrycja Sokołowska

**Opracowanie mikrosystemu przepływowego *Lab-on-a-chip*
do tworzenia i funkcjonalnej analizy modelu wyspy trzustkowej
w warunkach fizjologicznych i cukrzycy typu 2**

Promotor

prof. dr hab. inż. Zbigniew Brzózka

Kopromotor

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń

WARSZAWA 2022

*Pracę dedykuje moim kochanym Rodzicom
oraz Partnerowi Bartoszowi*

Streszczenie

Cukrzyca (łac. *diabetes mellitus*) jest przewlekłą chorobą metaboliczną charakteryzującą się występowaniem stanu podwyższonego stężenia glukozy we krwi (hiperglikemia). Choroba ta jest ściśle związana z dysfunkcją wysp trzustkowych, które są skupiskami komórek dokrewnych odpowiedzialnych m.in. za produkcję i wydzielanie insuliny i glukagonu. To właśnie zaburzenia w sekrecji i działaniu tych hormonów spowodowane przez różne czynniki genetyczne i środowiskowe odpowiadają za rozwój cukrzycy. Pomimo rosnącej liczby badań w obszarze diagnostyki oraz terapii cukrzycy, liczba chorych z roku na rok rośnie, a choroba ta osiągnęła już status epidemii XXI wieku. Głównym celem obecnie stosowanych terapii jest podniesienie komfortu życia pacjenta i niedopuszczenie do wystąpienia przewlekłych powikłań, takich jak np. choroby sercowo-naczyniowe. Z tego względu naukowcy na całym świecie poszukują nowych, bezpiecznych i skutecznych terapii. Niestety, około 90% potencjalnych związków terapeutycznych zostaje wyeliminowanych na etapie badań klinicznych, głównie ze względu na prowadzenie testów na modelach nieodzwierciedlających warunków *in vivo*, takich jak dwuwymiarowe (2D) hodowle komórkowe lub modele zwierzęce.

Wyspy trzustkowe są sferycznymi agregatami zbudowanymi z pięciu typów komórek (α , β , δ , PP, ϵ), które występują w wyspie w ściśle określonym składzie i lokalizacji. Najważniejsze z punktu widzenia badań nad cukrzycą są komórki α - odpowiedzialne za sekrecję glukagonu oraz komórki β - wydzielające insulinę. Każdy z typów komórek spełnia inną funkcję i tylko ich niezaburzone współdziałanie zapewnia utrzymanie prawidłowej gospodarki węglowodanowej organizmu. Z tego powodu, jednym z największych wyzwań inżynierii komórkowej jest odwzorowanie specyficznej morfologii i opracowanie uniwersalnego modelu wyspy trzustkowej w warunkach przepływowych. Wykorzystanie w tym celu systemów mikroprzepływowych typu *Lab-on-a-chip* może być skutecznym narzędziem do opracowania takiego modelu, szybkiego testowania nowych środków terapeutycznych, zrozumienia przyczyn wpływających na rozwój choroby, a także ograniczenia badań prowadzonych z udziałem zwierząt laboratoryjnych.

W ramach pracy doktorskiej opracowano mikrosystem przepływowy do tworzenia, hodowli oraz analizy trójwymiarowego (3D) modelu wyspy trzustkowej. W pierwszym etapie prac przeprowadzono testy wstępne agregacji komórek β (INS-1E) z wykorzystaniem różnych geometrii mikrosystemów przepływowych oraz standardowych, statycznych metod hodowli

trójwymiarowych agregatów komórkowych. Na podstawie przeprowadzonych testów zaprojektowano i wykonano mikrosystem przepływowy zawierający w swojej geometrii mikropułapki złożone z mikropilar, które ograniczają powierzchnie wzrostu wprowadzanych komórek i wspierają ich agregację. Zbadano wpływ parametrów hodowli (gęstość zawiesiny, prędkość jej wprowadzania, wartości naprężeń ścinających, czas podawania roztworów) na proces agregacji komórek oraz poziom ich żywotności i proliferacji. Ponadto, w tym etapie pokazano różnice pomiędzy modelem hodowanym w opracowanym mikrosystemie oraz modelem hodowanym w warunkach statycznych – na wielodołkowych płytkach o U-kształtnym dnie. Zauważono, że zmiana warunków statycznych na przepływowe korzystnie wpływa na proces agregacji, oscylacyjny napływ jonów wapnia (Ca^{2+}) do wnętrza agregatów oraz utrzymanie wysokiego stopnia proliferacji i żywotności komórek przez cały czas trwania hodowli. W dalszej części pracy opracowano model pseudowyspy – sferycznego agregatu komórkowego zbudowanego z komórek α (α -TC1-6) oraz β (INS-1E). Potwierdzono, że obecność mikropułapek w geometrii mikrosystemu korzystnie wpływa na agregację komórek α oraz β we współhodowli. Na tym etapie, dobór odpowiednich parametrów hodowli pozwolił na uzyskanie w pełni funkcjonalnego modelu pseudowyspy, który charakteryzuje się zawartością oraz ułożeniem komórek α i β odzwierciedlającym warunki *in vivo*. Opracowany z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego model wykazywał prawidłowy profil sekrecji insuliny i glukagonu w odpowiedzi na stymulację glukozą. W dalszych etapach prac wykorzystano zaprojektowany system wraz z opracowanym modelem pseudowyspy do badań wpływu potencjalnego środka terapeutycznego – dwóch regioizomerów estru kwasu palmitynowego i kwasu hydroksystearynowego (5-PAHSA oraz 9-PAHSA) na komórki wysp trzustkowych. Udowodniono, że PAHSA działa jako silny aktywator sekrecji insuliny oraz promuje proliferację komórek.

Podsumowując, w ramach pracy doktorskiej opracowano mikrosystem przepływowy do tworzenia, hodowli oraz analizy w pełni funkcjonalnego modelu pseudowyspy, który w przyszłości może zostać wykorzystany jako uniwersalne narzędzie do szybkiego testowania potencjalnych środków terapeutycznych.

Słowa kluczowe: *Hodowle komórkowe 3D, Wyspy trzustkowe, Lab-on-a-chip, Sekrecja insuliny, Sekrecja glukagonu, Cukrzyca, 5-PAHSA, 9-PAHSA.*

Abstract

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease characterized by a high blood sugar level (hyperglycemia). This disease is closely related to the dysfunction of pancreatic islets, which are clusters of endocrine cells responsible for the production and secretion of insulin and glucagon. Disorders of the secretion and function of these hormones caused by various genetic and environmental factors lead to the development of diabetes. Despite the growing number of research in the field of diabetes diagnostics and therapy, the number of patients is increasing every year, and this disease has already reached the status of an epidemic of the 21st century. The main goal of the currently used therapies is to improve the patient's quality of life and prevent the occurrence of chronic complications, such as cardiovascular diseases. For this reason, scientists all over the world are searching for new, safe, and effective therapies. Unfortunately, about 90% of potential therapeutic agents are eliminated in clinical trials, mainly due to testing in models that do not reflect *in vivo* conditions, such as two-dimensional (2D) cell culture or animal models.

Pancreatic islets are spherical aggregates composed of five types of cells (α , β , δ PP, ϵ) that occur in the islet in a strictly defined composition and location. From the diabetes research point of view, the most important are two types of cells: α -cells - responsible for the secretion of glucagon and β -cells - secreting insulin. Each type of cell performs a different function and only their undisturbed interaction ensures the maintenance of the glucose homeostasis. For this reason, one of the greatest challenges of cellular engineering is mapping this specific morphology and developing a universal pancreatic islet model under flow conditions. For this purpose, use of lab-on-a-chip microfluidic systems could be an effective tool to develop such a model, quickly test new therapeutic agents, understand the causes influencing the development of the disease, and limit research conducted on laboratory animals.

The main assumption of the doctoral dissertation was a microfluidic system for the creation, culture, and analysis of a three-dimensional (3D) model of the pancreatic islet. In the first stage of the work, preliminary tests of β -cell (INS-1E) aggregation were carried out using various geometries of microfluidic systems and standard, static methods of culture 3D cell aggregates. Based on the performed tests, a microfluidic system containing in its geometry micro-traps composed of micropillar, which limit the growth surface of the introduced cells and support their aggregation was designed and constructed. The influence of culture parameters (suspension density, speed of its introduction, shear stress values, time of solution application)

on the process of cells aggregation as well as the level of their viability and proliferation was investigated. In addition, the differences between the model in the developed microsystem and in the static conditions - on multi-well plates with a U-shaped bottom were shown. It was noticed that the change from static to flow conditions has a positive effect on the aggregation process, the oscillatory influx of calcium ions (Ca^{2+}) into the aggregates and the maintenance of a high degree of proliferation and cell viability throughout the culture. The next part of the work was focused on the development of a pseudoislet model - a spherical cell aggregate composed of α (α -TC1-6) and β -cells (INS-1E). It was confirmed that the presence of microtraps in the geometry of the microsystem has a positive effect on the α - and β -cells aggregation in co-culture. At this stage, the selection of appropriate culture parameters allowed to obtain a fully functional pseudoislet model, which is characterized by the composition and arrangement of α - and β -cells reflecting *in vivo* conditions. The model developed with the use of a developed microfluidic system showed the correct profile of insulin and glucagon secretion in response to glucose stimulation. In further stages of the work, the designed system and the developed pseudoislet model was used to study the effect of a potential therapeutic agent - two regioisomers of the ester of palmitic acid and hydroxystearic acid (5-PAHSA and 9-PAHSA) on pancreatic islet cells. It has been proven that PAHSA act as a potent activator of insulin secretion and to promote cell proliferation.

In conclusion, as part of the doctoral dissertation, a microfluidic system for the creation, culture, and analysis of a fully functional pseudoislet model was developed. In the future, the developed model could be used as a universal tool for the rapid testing of potential therapeutic agents.

Keywords: *3D cell cultures, Pancreatic islets, Lab-on-a-chip systems, Insulin and glucagon secretion, diabetes mellitus, glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), 5-PAHSA, 9-PAHSA.*

Wykaz używanych skrótów

2D – dwuwymiarowy (ang. *two-dimensional*)

3D - trójwymiarowy (ang. *three-dimensional*)

3R – zasada odnosząca się do polepszenia bytu i humanitarnego traktowania zwierząt doświadczalnych (ang. *Replacement, Reduction, Refinement*)

5-PAHSA - kwas 5-(palmitoiloksy)oktadekanowy (ang. *5-hexadecanoyloxyoctadecanoic acid*)

9-PAHSA - kwas 9-[(1-oksoheksadecyl)oksy]-oktadekanowy (ang. *9-hexadecanoyloxyoctadecanoic acid*)

AMPK - kinaza aktywowana 5'AMP (ang. *5'AMP-activated protein kinase*)

ATP - adenozylo-5'-trifosforan (ang. *adenosine-5'-triphosphate*, ATP)

BSA - albumina surowicy bydlęcej (ang. *bovine serum albumin*)

CAM - cząsteczki adhezji komórkowej (ang. *cell adhesion molecules*)

DAG - 1,2-diacyloglicerol (ang. *diacylglycerol*)

DMEM - podstawowe medium do hodowli komórek (ang. *dulbecco essential medium eagle*)

DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)

DMT – cukrzyca (łac. *diabetes mellitus*)

DMT1- cukrzyca typu 1 (łac. *diabetes mellitus type 1*)

DMT2 - cukrzyca typu 2 (łac. *diabetes mellitus type 2*)

DPBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco (ang. *dulbecco's phosphate buffered saline*)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy, (ang. *deoxyribonucleic acid*)

ECM - macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*)

ECV – skuteczna objętość hodowli (ang. *effective culture volume*)

ER - retikulum endoplazmatyczne (ang. *endoplasmic reticulum*)

FA - kwas tłuszczowy (ang. *fatty acid*)

FAHFA - estry kwasów tłuszczowych i hydroksykwasów tłuszczowych (ang. *fatty acyl esters of hydroxy fatty acids*)

FBS - płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)

FFA - wolne kwasy tłuszczowe (ang. *free fatty acid*)

FFAR1/ GPR40 - receptor wolnych kwasów tłuszczowych sprzężony z białkiem G (ang. *free fatty acid receptor/G-protein coupled receptor*)

GLP-1 - glukagonopodobny peptyd 1 (ang. *glucagon-Like Peptide-1*)

GLUT - transporter glukozy (ang. *glucose transporter*)

GSIS – stymulowane glukozą wydzielanie insuliny (ang. *glucose-stimulated insulin secretion*)

HEPES - Kwas hydroksyetylopiperazynoetanosulfonowy - (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

HFD - myszy karmione dietą wysokotłuszczową (ang. *high-fat diet-fed*)

HG – roztwór o wysokim stężeniu glukozy (ang. *high glucose*)

HSA- kwas hydroksystearynowy (ang. *hydroxy stearic acid*)

HSI - organizacja działająca na rzecz zwierząt (ang. *Humane Society International*)

IDF – Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna (ang. *International Diabetes Federation*)

IP3 - inozytolo-1,4,5-trifosforan (ang. *Inositol trisphosphate*)

iPSC – Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *induced pluripotent stem Cells*)

K_{ATP}- wrażliwe na ATP kanały potasowe (ang. *ATP-sensitive potassium*)

LG - roztwór o niskim stężeniu glukozy (ang. *low glucose*)

NADPH – zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

N-CAM – cząsteczki adhezji neuronów (ang. *neural cell adhesion molecule*)

PA – kwas palmitynowy (ang. *palmitic acid*)

PAHSA - estrek kwasu palmitynowego i hydroksykwasu stearynowego (ang. *palmitic acid esters of hydroxy stearic acids*)

PCL– polikaprolakton (ang. *polycaprolactone*)

PDMS - poli(dimetylosiloksan) (ang. *polydimethylsiloxane*)

PDT - terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*)

PET - poli(tereftalan etylenu) (ang. *polyethylene terephthalate*)

PGA - kwas poliglikolowy (ang. *polyglycolic acid*)

PI – jodek propidyny (ang. *propidium iodide*)

Pip2 - fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PKC - kinaza białkowa C (ang. *protein kinase C*)

PLA - polilaktyd, poli(kwas mlekowy) (ang. *polylactic acid*)

PLC – fosfolipaza C (ang. *phospholipase C*)

PMMA - poli(metakrylan metylu) (ang. *poly(methyl methacrylate)*)

PS – polistyren (ang. *polystyrene*)

RNA - kwasy rybonukleinowe (ang. *ribonucleic acid*)

SAV - stosunek powierzchni hodowlanej do objętości hodowli (ang. *surface-area-to-volume ratio, SAV*)

SGLT2 - Inhibitory kotransportera glukozowo-sodowego 2 (ang. *sodium-glucose cotransporter-2*)

T2D – cukrzyca typu 2 (ang. *type 2 diabetes*)

UV – promieniowanie ultrafioletowe (ang. *ultraviolet light*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

WSS - naprężenia ścinające (ang. *wall shear stress*)

Spis treści

I. CZĘŚĆ LITERATUROWA	17
1. TRZUSTKA.....	17
1.1. WYSPY TRZUSTKOWE	18
1.2. ROLA INSULINY I GLUKAGONU W UTRZYMANIU HOMEOSTAZY WĘGLOWODANOWEJ ORGANIZMU	20
1.2.1. Sekrecja insuliny	20
1.2.2. Sekrecja glukagonu.....	23
1.3. ROLA JONÓW WAPNIA (Ca^{2+}) W SEKRECJI INSULINY	24
2. CUKRZYCA – CHOROBA WYWOŁANA ZABURZENIAMI FUNKCJONOWANIA WYSP TRZUSTKOWYCH	25
2.1. TERAPIE CUKRZYCY TYPU 2	27
2.1.1. Terapie farmakologiczne	28
2.1.2. Estry kwasów tłuszczowych i hydroksykwasów tłuszczowych jako nowe związki w terapii cukrzycy typu 2	29
2.1.3. Terapie chirurgiczne.....	31
2.2. MODELE KOMÓRKOWE WYKORZYSTYWANE W BADANIACH ZABURZEŃ SEKRECJI INSULINY I GLUKAGONU	32
2.2.1. Metody otrzymywania trójwymiarowych (3D) modeli komórkowych wysp trzustkowych.....	33
3. SYSTEMY TYPU <i>LAB-ON-A-CHIP</i>	36
3.1. SYSTEMY <i>LAB-ON-A-CHIP</i> DO BADAŃ BIOLOGICZNYCH	37
3.1.1. Materiały wykorzystywane do konstrukcji mikrosystemów przepływowych....	37
3.1.2. Metody wytwarzania mikrosystemów przepływowych.....	39
3.2. MODELOWANIE TKANEK Z WYKORZYSTANIEM SYSTEMÓW <i>LAB-ON-A-CHIP</i>	41
3.2.1. Parametry pracy mikrosystemów przepływowych	41
3.2.2. Projekt geometrii mikrosystemu do hodowli trójwymiarowych (3D) modeli komórkowych	42
3.2.3. Systemy <i>Lab-on-a-chip</i> w badaniach wysp trzustkowych	45
4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	49
II. CZĘŚĆ BADAWCZA	51

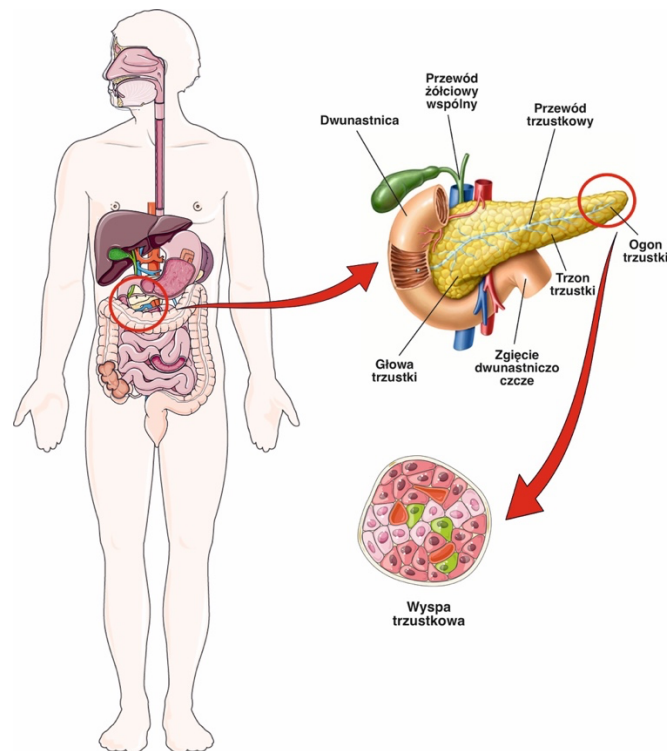
1. CEL PRACY	51
2. MATERIAŁY I METODY BADAŃ.....	53
2.1. APARATURA I DROBNY SPRZĘT LABORATORYJNY	53
2.1.1. Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych	53
2.1.1. Hodowla i analiza modelu komórkowego.....	53
2.2. MATERIAŁY	54
2.2.1. Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych	54
2.2.2. Hodowla i analiza modelu komórkowego.....	54
2.3. ODCZYNNIKI	54
2.3.1. Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych	54
2.3.2. Hodowla i analiza modelu komórkowego.....	55
2.4. METODY BADAŃ	57
2.4.1. Projekt geometrii mikrosystemów przepływowych	57
2.4.2. Wytwarzanie mikrosystemów I i II.....	58
2.4.3. Wytwarzanie mikrosystemu III.....	59
2.4.4. Wytwarzanie mikrosystemu IV.....	60
2.4.5. Przygotowanie mikrosystemów przepływowych do badań	60
2.4.6. Hodowla komórek	61
2.4.7. Hodowla komórek na U-kształtnych płytkach wielodołkowych.....	62
2.4.8. Hodowla komórek w mikrosystemach przepływowych	63
2.4.9. Metody oceny proliferacji, żywotności i aktywności metabolicznej komórek..	64
2.4.10. Procedury oznaczania aktywności agregatów komórkowych.....	68
Pomiar zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia.....	68
3. WYNIKI.....	73
3.1. OPRACOWANIE MIKROSYSTEMU PRZEPŁYWOWEGO DO HODOWLI TRÓJWYMIAROWYCH (3D) STRUKTUR KOMÓRKOWYCH.....	73
3.1.1. Dobór parametrów geometrii mikrosystemu przepływowego (badania z wykorzystaniem mikrosystemów przepływowych I-IV)	73
3.1.2. Geometria mikrosystemu przepływowego IV.....	76
3.1.3. Określenie zgodności odwzorowania mikrostruktur.....	78
3.1.4. Dobór parametrów hodowli komórek w mikrosystemie IV.....	80
3.1.5. Podsumowanie i wnioski.....	86
3.2. OPRACOWANIE TRÓJWYMIAROWEGO MODELU WYSPI TRZUSTKOWEJ	88

3.2.1.	<i>Badania z wykorzystaniem monokultury komórek INS-1E</i>	89
3.2.2.	<i>Badania z wykorzystaniem kokultury komórek.....</i>	103
3.3.	OCENA MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA OPRACOWANEGO SYSTEMU JAKO MODELU DO BADAŃ PRZESIEWOWYCH POTENCJALNYCH ZWIĄZKÓW TERAPEUTYCZNYCH.....	115
3.3.1.	<i>Wpływ izomerów 5-PAHSA i 9-PAHSA na morfologię pseudowysp.....</i>	116
3.3.2.	<i>Ocena wpływu związków 5-PAHSA i 9-PAHSA na lokalizację komórek w pseudowyspie</i>	118
3.3.3.	<i>Wpływ izomerów 5-PAHSA i 9-PAHSA na stymulowane glukozą wydzielanie insuliny i glukagonu.....</i>	119
3.3.4.	<i>Wpływ izomerów 5-PAHSA i 9-PAHSA na wydzielanie glukagonu</i>	121
3.3.5.	<i>Podsumowanie i wnioski.....</i>	122
III.	DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI.....	124
IV.	LITERATURA.....	129

I. Część literaturowa

1. Trzustka

Trzustka jest narządem znajdującym się w jamie brzusznej, za żołądkiem, pomiędzy śledzioną a dwunastnicą i anatomicznie podzielona jest na cztery części: głowę, trzon (złożony z szyi i ciała) oraz ogon. W organizmie jest organem pełniącym dwie główne funkcje: zewnątrzwydzielniczą (egzokrynną) i wewnątrzwydzielniczą (endokrynną). Położenie oraz budowa trzustki zostały przedstawione na rycinie I.1.



Rycina I. 1 Położenie oraz budowa anatomiczna trzustki.

Część zewnątrzwydzielnicza trzustki charakteryzuje się strukturą pęcherzykową i związana jest z wytwarzaniem enzymów i dostarczaniem ich do przewodu pokarmowego. Wytwarzane enzymy są składnikami soku trzustkowego i można zaliczyć je do kilku grup: enzymy proteolityczne, lipolityczne, glikolityczne, nukleolityczne.

Część wewnątrzwydzielnicza (endokrynną) zbudowana jest z wysp trzustkowych, zlokalizowanych głównie w ogonie trzustki, i stanowi około 3% całkowitej masy trzustki.

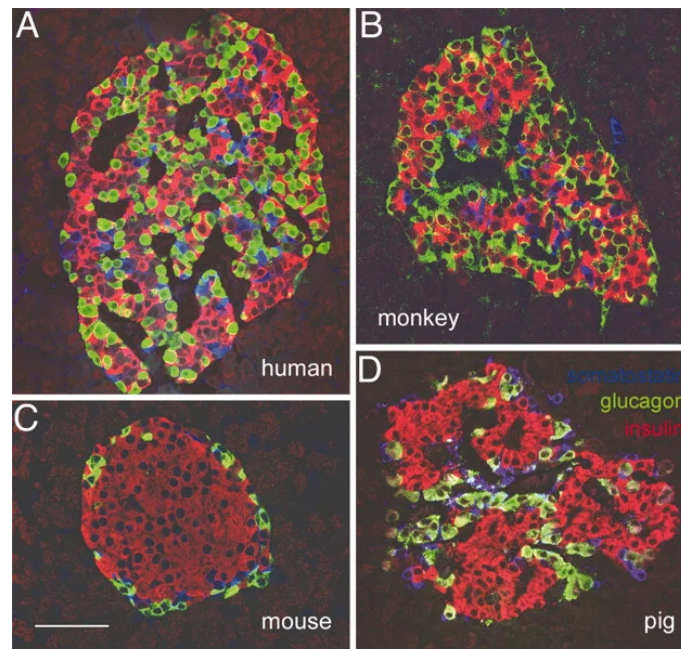
Komórki wysp trzustkowych odpowiedzialne są za produkcję i wydzielanie hormonów, t.j. insulina, proinsulina, amyлина, peptydu C, glukagon, somatostatyna i polipeptyd trzustkowy [1].

1.1. Wyspy trzustkowe

Wyspy trzustkowe zwane również wyspami Langerhansa to rozproszone w miąższu trzustki skupiska komórek dokrewnych, które są odpowiedzialne za utrzymanie prawidłowej gospodarki węglowodanowej organizmu. W trzustce dorosłego człowieka znajduje się około 1 miliona wysepek, co stanowi od 1% do 3% masy całej trzustki. Wyspy trzustkowe mają średnicę 50–200 μm i składają się z czterech głównych typów komórek: komórki α , komórki β , komórki δ i komórki PP. W ostatnich doniesieniach literaturowych opisano kolejny typ komórek występujący w ssaczycach wyspach Langerhansa – komórki ϵ [2].

Skład i architektura wysp trzustkowych jest ściśle określona i różni się w zależności od gatunku. Chociaż organizacja przestrzenna wysp gryzoni i ludzi jest różna, zawartość poszczególnych typów komórek w wyspie jest bardzo zbliżona. Większość (65-80%) komórek budujących wyspę trzustkową to komórki β , które odpowiedzialne są za produkcję insuliny – hormonu obniżającego stężenie glukozy we krwi. Kolejnym typem komórek budujących wyspę są komórki α (15-20%) wydzielające glukagon, który pełni przeciwną funkcję – zwiększa poziom glukozy we krwi. Komórki α oraz β działają względem siebie antagonistycznie i są uważane za dwa najważniejsze typy komórek w badaniach nad patogenezą cukrzycy. Na komórki α oraz β wpływ ma również trzeci rodzaj komórek – komórki δ , znajdujące się w wyspie w 3-10%. Komórki te wytwarzają somatostatynę, która może regulować, a nawet hamować aktywność komórek α i β . Pozostałe typy komórek występujące w wyspie trzustkowej to komórki PP (3-5%) oraz ϵ (<1%). Komórki PP wytwarzają polipeptyd trzustkowy, który może hamować wydzielanie glukagonu przy niskich stężeniach glukozy i może działać jako czynnik regulacji wewnątrzwyspowej [3]. Z kolei komórki ϵ odpowiadają za produkcję greliny, która jest hormonem regulującym łaknienie [4], [5].

Wyspy trzustkowe mają ściśle zdefiniowaną strukturę. W wyspie gryzoni komórki β znajdują się wewnątrz wyspy tworząc rdzeń, natomiast komórki α , δ , ϵ i PP znajdują się na obrzeżach, tworząc coś w rodzaju płaszcza otaczającego komórki β . Z kolei, ludzkie wyspy trzustkowe charakteryzują się bardziej losowym układem komórek, w którym poszczególne typy komórek znajdują się w całej objętości wyspy [2]. Różnice lokalizacji komórek w wyspach pochodzących od różnych gatunków zostały przedstawione na rycinie I.2.



Rycina I. 2 Różnice międzygatunkowe wysp trzustkowych. Skrawki wysp trzustkowych wybarwiono immunofluorescencyjnie. Przekrój przez wyspę trzustkową A) człowieka, B) małpy, C) myszy D) świni. Komórki β (czerwone); komórki α (zielone); komórki δ (niebieskie). [6] Skala: 50 μm .

Pomimo tego, że architektura wysp trzustkowych różni się w zależności od gatunku (rycina I.2.), zmienia się w warunkach otyłości, insulinooporności i cukrzycy zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u ludzi [6]. [7], [8]. Poszczególne wyspy funkcjonują jako jeden narząd, mają ściśle skoordynowane mechanizmy sygnalizacji między wszystkimi typami komórek, co umożliwia szybką reakcję na zmiany stężenia glukozy we krwi, sygnały wewnątrzwyspowe i impulsy nerwowe. Komunikacja pomiędzy komórkami wysp trzustkowych odbywa się poprzez wydzielanie i sygnalizację parakrynną lub poprzez połączenia szczelinowe, a zatem architektura wysp, stosunek i rozkład przestrzenny komórek budujących wyspę są kluczowe z punktu widzenia komunikacji komórka-komórka [9].

Ponadto, na funkcjonalność wysp trzustkowych wpływ ma również skład macierzy zewnątrzkomórkowej (*ang. extracellular matrix, ECM*). ECM jest wytwarzaną przez komórki mieszaniną polisacharydów i białek, która wypełnia przestrzeń między komórkami i zespala ze sobą tkanki. ECM ma wpływ na przekazywanie wielu sygnałów mechanicznych i chemicznych, które odgrywają zasadniczą rolę w kluczowych aspektach takich procesów jak adhezja, proliferacja, różnicowanie, migracja i śmierć komórek. Najważniejszymi białkami z punktu widzenia morfologii wysp trzustkowych i komunikacji pomiędzy nimi są: laminina [10], kolagen [11], fibronektyna [12], kadheryna [13]. Istnieje wiele badań wykazujących, że ECM pełni ważną funkcję dla prawidłowego funkcjonowania wysp *in vivo* i *ex vivo*, ale

interakcje między ECM, a komórkami wysp wciąż nie są w pełni zrozumiałe. Obecne techniki izolacji wysp trzustkowych z organizmu dawcy zaburzą natywną ECM, prowadząc do dysfunkcji, a nawet śmierci komórek [14].

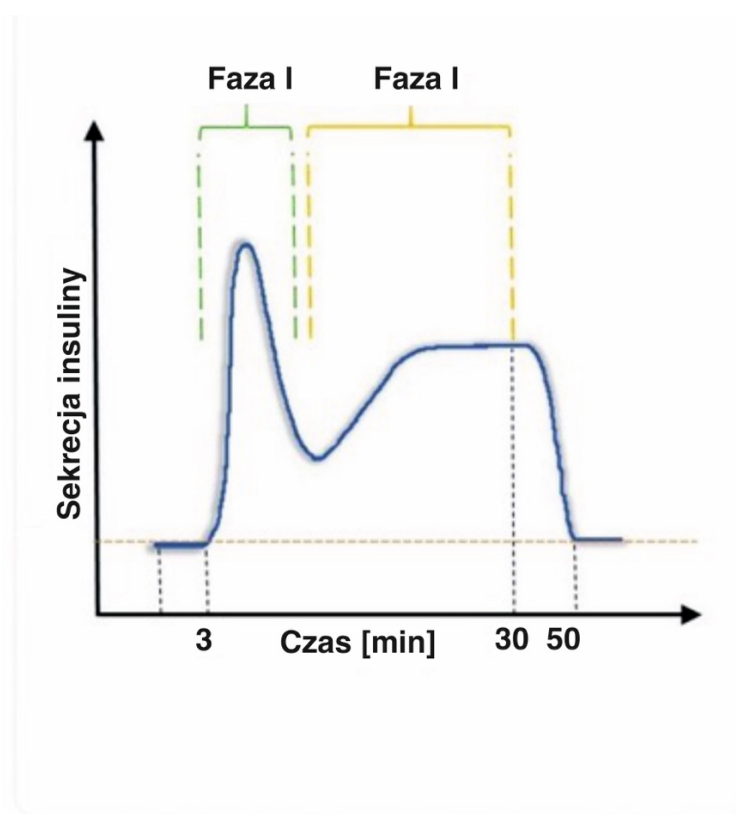
1.2. Rola insuliny i glukagonu w utrzymaniu homeostazy węglowodanowej organizmu

Stężenie glukozy we krwi regulowany jest poprzez kontrolowane uwalnianie dwóch hormonów – insuliny i glukagonu. Podczas gdy wydzielanie glukagonu przez komórki α , prowadzi do wzrostu poziomu glukozy we krwi, wydzielanie insuliny, związane z aktywacją komórek β , prowadzi do obniżenia jej poziomu. Dzięki prawidłowemu funkcjonowaniu obu typów komórek możliwe jest utrzymanie homeostazy organizmu.

1.2.1. Sekrecja insuliny

Proces wydzielania insuliny jest złożony i dynamiczny, a znajomość jego podstaw ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia patologii cukrzycy. Podstawowym czynnikiem wzbudzającym sekrecję insuliny jest podwyższone stężenie glukozy we krwi (hiperglikemia). Sekrecja insuliny, w odpowiedzi na stymulację glukozą (ang. *glucose stimulated insulin secretion*, GSIS) jest procesem wzbudzonym elektrycznie, w którym zmiany potencjału błonowego są sprzężone ze zmianami stężenia glukozy we krwi. W warunkach niskiego stężenia glukozy (stężenie glukozy < 1 mM) potencjał spoczynkowy błon komórek β wynosi około -70 mV [15]. Wzrastające stężenie glukozy powoduje aktywację transporterów glukozy 2 (GLUT 2), które są białkami transportującymi glukozę do wnętrza komórek β gdzie ulega przemianom metabolicznym. Przemiany te obejmują dobrze scharakteryzowany już ciąg zdarzeń: metabolizm glukozy na drodze glikolizy, cyklu Krebsa i fosforylacji oksydacyjnej, generując adenozy-no-5'-trifosforan (ang. *adenosine-5'-triphosphate*, ATP). Wygenerowane ATP zamyka wrażliwe na ATP kanały potasowe (K_{ATP}), zmniejszające spoczynkowy potencjał błony aż do przekroczenia progu -60 mV, inicjując depolaryzację błony. Po depolaryzacji błony, bramkowane napięciem kanały Ca^{2+} otwierają się (osiągając szczytowy napływ przy około -30 mV), a stężenie Ca^{2+} wzrasta. To z kolei wyzwala fuzję pęcherzyków insulinowych z błoną komórkową poprzez hamowanie aktywności białka transportowego - synaptotagminy wrażliwej na Ca^{2+} , a następnie dochodzi do egzocytozy insuliny. Niektóre produkty pochodzące z tych procesów mogą działać jako sygnały wydzielania insuliny, w tym NADPH, malonylo-CoA i glutaminian. Częsteczki te wzmacniają sekrecję insuliny zależną od kanałów K_{ATP} [16].

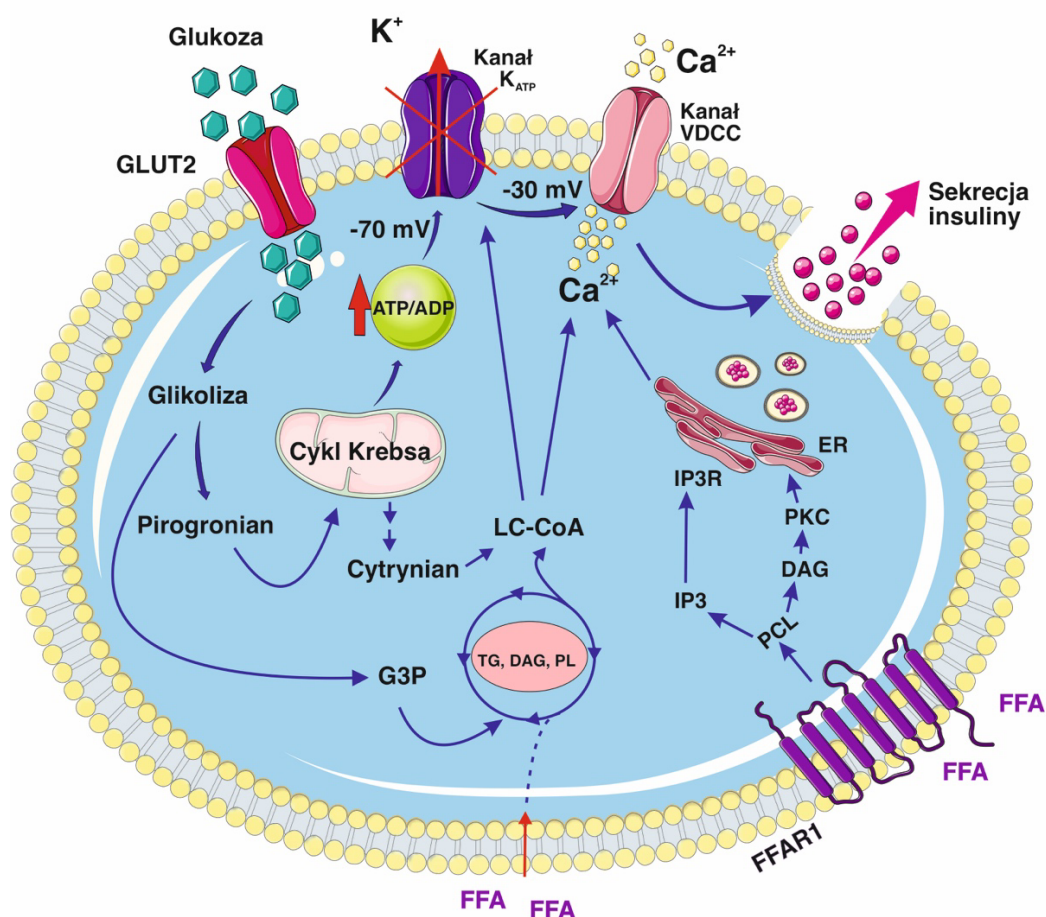
Powszechnie uważa się, że wydzielanie insuliny jest maksymalnie stymulowane przy stężeniach glukozy od 16,7 do 30 mM (300 do 540 mg/dl). Wydzielanie insuliny spowodowane nagłym wzrostem glukozy we krwi przebiega dwufazowo. Początkowo, po około 5 minutach od stymulacji glukozą obserwuje się nagły, wysoki wzrost sekrecji insuliny (faza pierwsza), który stopniowo spada, stabilizuje się lub ponownie rośnie w wolniejszym tempie (faza druga). Na rycinie I.3 przedstawiono dwufazowy charakter wydzielania insuliny. O dwufazowym uwalnianiu insuliny w odpowiedzi na stymulację glukozą po raz pierwszy doniesiono w latach 60-tych [17]. Pomimo kolejnych dziesięcioleci badań, molekularne mechanizmy leżące u podstaw dwufazowej odpowiedzi komórek pozostają niejasne [18]. Wiadomo natomiast, że u pacjentów z cukrzycą lub nieprawidłową tolerancją glukozy dwufazowy charakter wydzielania insuliny jest zaburzony [19]. Wyjaśnienie mechanizmów komórkowych leżących u podstaw dwufazowego wydzielania insuliny jest bardzo ważne z punktu widzenia terapii cukrzycy.



Rycina I. 3 Dwufazowy profil wydzielania insuliny. Rycinę wykonano na podstawie: [20].

Na wydzielanie insuliny z komórek β wysp trzustkowych wpływ mają również inne czynniki takie jak inkretyny, neurohormony, aminokwasy czy lipidy, które aktywują

indukcyjne szlaki sygnałowe. Szczególnie ważne mogą być mechanizmy sygnalizacji lipidowej, w której cząsteczki lipidów, w tym wolne kwasy tłuszczowe (ang. *Free Fatty Acid*, FFA) aktywują szlaki sygnalizacyjne w komórce, które zmieniają egzocytozę pęcherzyków insulinowych. FFA poprzez oddziaływanie z receptorem FFAR1/GPR40 (ang. *Free Fatty Acid Receptor/G-protein coupled receptor*) aktywują fosfolipazę C (ang. *Phospholipase C*, PCL), która z kolei katalizuje hydrolizę fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (ang. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP₂) z wytworzeniem 1,2-diacylglicerolu (ang. *Diacylglycerol*, DAG) i inozytolo-1,4,5-trifosforanu (ang. *Inositol trisphosphate*, IP₃). Poprzez związanie IP₃ do receptora – kanału kationowego IP₃R (ang. *Inositol 1,4,5-triphosphate receptor*) następuje transport jonów wapnia Ca²⁺ z retikulum endoplazmatycznego (ang. *endoplasmic reticulum*, ER) do cytoplazmy. W efekcie następuje fuzja pęcherzyków insulinowych z błoną komórkową i sekrecja insuliny.



Rycina I. 4 Mechanizmy regulujące sekrecję insuliny w komórkach β wysp trzustkowych. Na rycinie przedstawiono stymulowane glukozą wydzielanie insuliny, wpływ wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) oraz produktów pośrednich metabolizmu glukozy i FFA. FFAR1 – receptor wolnych kwasów tłuszczowych, GLUT2 – transporter glukozy 2. G3P – gliceraldehydo-3-fosforan, IPR3 – receptor IP₃, DAG -diaglicerol, PLC –

fosfolipaza, PKC – kinaza białkowa C, ER -retikulum endoplazmatyczne. Rycinę wykonano na podstawie: [21], [22].

Wolne kwasy tłuszczowe są ważne dla prawidłowego funkcjonowania komórek β wysp trzustkowych oraz ich zdolności do kompensowania insulinooporności tkanek obwodowych. FFA odgrywają również ważną rolę w dysfunkcji wysp trzustkowych towarzyszącej cukrzycy typu 2. Niedobór FFA powoduje osłabienie stymulowanej glukozą sekrecji insuliny, natomiast ich chroniczny nadmiar może zmniejszać biosyntezę i wydzielanie insuliny, a także prowadzić do apoptozy komórek β [23], [24].

1.2.2. Sekrecja glukagonu

Glukagon wydzielany z komórek α wysp trzustkowych odgrywa ważną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu [25]. Jak wspomniano wyżej, glukagon ma działanie przeciwstawne do insuliny. Wysokie stężenia glukozy we krwi, stymulujące wydzielanie insuliny z komórek β , hamują wydzielanie glukagonu z komórek α , podczas gdy niskie stężenia glukozy we krwi stanowią jeden z najsilniejszych bodźców wydzielania glukagonu. W związku z tym, prawidłowe stężenie glukozy we krwi zależy, w dużej mierze od niezaburzonej pracy wysp trzustkowych i zrównoważonego wydzielania insuliny i glukagonu z komórek budujących wyspę [26].

Mechanizm komórkowy odpowiedzialny za tę zależną od glukozy regulację wydzielania glukagonu obejmuje wychwyt glukozy przez transporter glukozy 1 (GLUT1) w błonie komórkowej komórek α trzustki, a następnie glikolizę, która ostatecznie generuje ATP w mitochondriach komórek α . Zatem wewnątrzkomórkowy poziom ATP w komórce α odzwierciedla poziom glukozy we krwi. Hipoglikemia (spadek stężenia glukozy we krwi poniżej prawidłowego) i wynikające z niej niskie wewnątrzkomórkowe poziomy ATP w komórce α zamykają wrażliwe na ATP kanały potasowe (kanały K_{ATP}), przez co wypływ jonów potasowych (K^+) jest zmniejszony. Powoduje to depolaryzację błony komórkowej, która z kolei otwiera zależne od napięcia wapniowe kanały jonowe, umożliwiając napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki. Zwiększa to wewnątrzkomórkowy poziom Ca^{2+} , który jest tak jak w przypadku sekrecji insuliny głównym czynnikiem aktywującym egzocytózę glukagonu. Odwrotnie, wzrastające poziomy krążącej glukozy zwiększają jej napływ do komórki α , powodując wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, co otwiera kanały K_{ATP} . Otwarcie

kanałów prowadzi do uzyskania potencjału błonowego, który zamyka zależne od napięcia kanały Ca^{2+} , zapobiegając w ten sposób napływowi Ca^{2+} i wydzielaniu glukagonu [27].

1.3. Rola jonów wapnia (Ca^{2+}) w sekrecji insuliny

Tak jak już wcześniej wspomniano, głównym bodźcem prowadzącym do wydzielania insuliny z komórek β i hamowania wydzielania glukagonu z komórek α wysp trzustkowych jest glukoza. Zmieniające się stężenia glukozy mają wpływ na zmiany stężenia jonów wapnia (Ca^{2+}) m.in. w mitochondriach, retikulum endoplazmatycznym, cytozolu oraz jądrze komórkowym. Komórki β oraz α posiadają liczne kanały biorące udział w kontrolowaniu napływu Ca^{2+} do wnętrza komórki [15]. W prawidłowo funkcjonujących wyspach trzustkowych w momencie podwyższonego stężenia glukozy następuje zwiększony napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki β . Napływ jonów Ca^{2+} powoduje wzrost ich stężenia wewnątrz komórek, co prowadzi do fuzji pęcherzyków magazynujących insulinę z błoną komórkową, a w efekcie do egzocytozy insuliny. Potwierdzono, że do prawidłowego dwufazowego wydzielania insuliny niezbędny jest dwufazowy wzrost cytoplazmatycznego stężenia jonów Ca^{2+} [28]. Pierwsza faza GSIS wymaga szybkiego i wyraźnego podwyższenia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} w komórkach β . Ten gwałtowny wzrost obserwowany jest po około 5 minutach od dostarczenia glukozy. Następnie napływ jonów Ca^{2+} jak i sekrecja insuliny stabilizuje się i trwa do 1-2 godzin po podaniu glukozy. Zmiany stężenia Ca^{2+} , a więc i zmiany wydzielania insuliny mają charakter oscylacyjny. Potwierdzono, że wszelkie zakłócenia napływu jonów wapnia do wnętrza komórek wpływają na nieprawidłowe wydzielanie insuliny i zwiększają ryzyko wystąpienia wielu stanów chorobowych, min. cukrzycy [28], [29].

Analiza wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia stała się więc przedmiotem wielu badań dotyczących metod pośredniego oznaczania zmian w sekrecji insuliny z komórek wysp trzustkowych. Wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia można oznaczać kilkoma metodami głównie opartymi na wykorzystaniu wskaźników fluorescencyjnych lub bioluminescencyjnych. Do najpopularniejszych należą: wskaźniki fluorescencyjne (Fluo-3 AM, Fluo-4 AM, Fura red, Rhod 2, Calcium green-2), wskaźniki bioluminescencyjne (Obelin, Aequorin) [30]. *Kenty i Melton* zaproponowali oznaczanie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w poszczególnych komórkach wysp trzustkowych w odpowiedzi na kilkukrotne stymulacje roztworami zawierającymi glukozę [31]. Test ten oparty był na wskaźniku fluorescencyjnym Fluo-4 AM, który wykorzystano do analizy zmian stężenia

Ca^{2+} w wyizolowanych mysich wyspach trzustkowych. Zauważono oscylacyjne zmiany poziomu jonów wapnia po stymulacji roztworami zawierającymi glukozę, oraz wykazano, że zmiany te były synchroniczne z poziomem wydzielanej insuliny.

Ponadto, wiadomo również, że Ca^{2+} wpływa na proliferację oraz apoptozę komórek. *Rong i Distelhorst* [32] wykazali, że komórki β wykazują trzykrotnie wyższą żywotność w warunkach podwyższonego stężenia glukozy (15 mM lub 25 mM) w porównaniu do stężenia wynoszącego 2 mM lub 5 mM.

Podsumowując, odpowiednie stężenie jonów wapnia jest niezwykle istotne dla utrzymania prawidłowej homeostazy organizmu. Zaburzenia w napływie jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek może skutkować nieprawidłowym funkcjonowaniem wysp trzustkowych. Zbyt niskie wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} może z kolei wywoływać zaburzenia w dwufazowym charakterze wydzielania insuliny [33].

2. Cukrzyca – choroba wywołana zaburzeniami funkcjonowania wysp trzustkowych

Cukrzyca (łac. *diabetes mellitus*) należy do grupy chorób metabolicznych i charakteryzuje się przewlekłym występowaniem podwyższonego stężenia glukozy we krwi. Stan ten może wynikać zarówno z zaburzeń wydzielania insuliny jak i nieprawidłowego działania tego hormonu na komórki i tkanki, co skutkuje zaburzeniami w metabolizmie węglowodanów, białek i lipidów [34]. Nieleczona cukrzyca, a co za tym idzie przewlekłe występowanie stanu hiperglikemii, wiąże się z uszkodzeniem i niewydolnością wielu narządów, czy rozwojem chorób sercowo-naczyniowych [35], [36]. Z roku na rok liczba chorych na cukrzycę wzrasta i obecnie osiągnęła alarmujący poziom epidemii. Według Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej (IDF) 537 milionów dorosłych w wieku 20–79 lat żyje obecnie z cukrzycą. Stanowi to 10,5% światowej populacji w tej grupie wiekowej. Przewiduje się, że całkowita liczba wzrośnie do 643 mln (11,3%) do 2030 roku i do 783 mln (12,2%) do 2045 roku. Niepokojącym jest również fakt, że choruje coraz więcej dzieci – obecnie ponad 1,2 miliona dzieci i młodzieży zmagają się z cukrzycą, a ponad połowa z nich (54%) ma mniej niż 15 lat [37].



Rycina I. 5 Liczba zachorowań na cukrzycę na świecie. Dane z roku 2021. Rycinę wykonano na podstawie: [37].

Czynniki ryzyka wpływające na rozwój cukrzycy nie są jednolite i w dużej mierze zależą od jej rodzaju. Etiologia tego schorzenia wynika ze złożonej zależności między czynnikami ryzyka genetycznymi, środowiskowymi i związanymi ze stylem życia [38]. Obecnie wyróżnić można cztery główne typy cukrzycy:

- **Cukrzyca typu 1** (łac. *diabetes mellitus type 1, DMT1*) – ten typ cukrzycy ma podłoże autoimmunologiczne i jest związany z dysfunkcją komórek β wywołaną poprzez humoralną lub komórkową odpowiedź zapalną. Tempo niszczenia komórek β i rozwoju cukrzycy typu 1 jest zmienne, a autoimmunologiczna destrukcja komórek jest związana głównie z predyspozycjami genetycznymi, ale również z warunkami środowiskowymi [39].
- **Cukrzyca typu 2** (łac. *diabetes mellitus type 2, DMT2*) – stanowi zdecydowaną większość wszystkich przypadków cukrzycy (ok. 80%) i wynika z zaburzeń w produkcji insuliny lub niewrażliwości tkanek na ten hormon (insulinooporność). W przeciwieństwie do cukrzycy typu 1, w rozwoju cukrzycy typu 2 nie dochodzi do

całkowitego zniszczenia komórek β ale utraty ich aktywności funkcjonalnej. W początkowej fazie tej choroby komórki β są pobudzane do wydzielania zwiększonej ilości insuliny, która mimo wszystko nie jest wystarczająca do zaspokojenia zwiększonych (w wyniku insulinooporności) potrzeb organizmu. Cukrzyca typu 2 często pozostaje przez wiele lat niezdiagnozowana ze względu na stopniowy, powolny rozwój i brak typowych objawów [40].

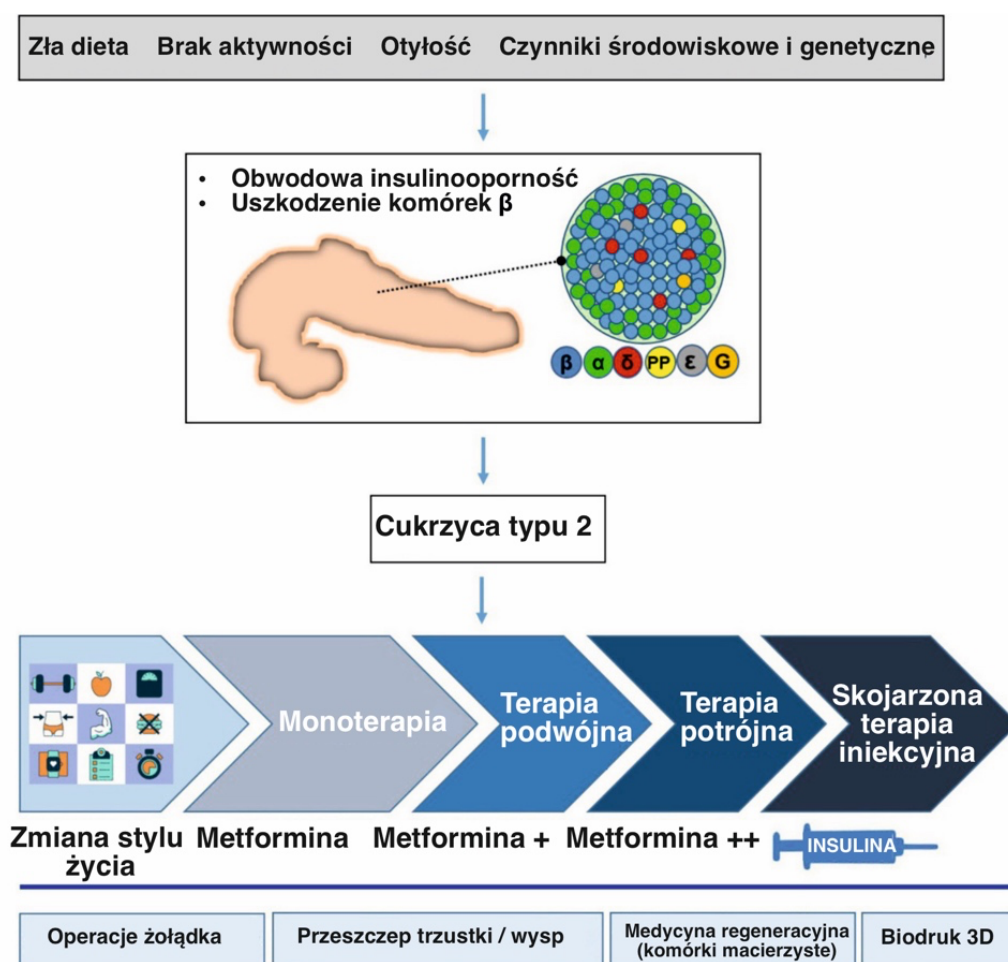
- **Cukrzyca ciążowa** – tym terminem określa się podwyższony poziom glukozy we krwi u kobiet w ciąży, u których wcześniej nie stwierdzono występowania cukrzycy. U kobiet ze stwierdzoną cukrzycą ciążową poziom glukozy we krwi zazwyczaj wraca do normy po porodzie, natomiast podczas ciąży musi być ściśle kontrolowany ponieważ może mieć wpływ zarówno na przebieg ciąży jak i zdrowie dziecka [41].
- **Cukrzyca typu MODY** – jest to bardzo rzadki, stanowiący 1-2% wszystkich przypadków rodzaj cukrzycy. Ta postać choroby spowodowana jest jedną z kilku mutacji pojedynczych genów powodujących defekty w produkcji insuliny i jest dziedziczona autosomalnie. Ze względu na różnice w defektach genów obecnie wyróżnia się co najmniej 13 podtypów MODY, które różnią się pod względem objawów i ciężkości [42].

2.1. Terapie cukrzycy typu 2

Cukrzyca typu 2 jest obecnie jedną z najczęściej występujących chorób cywilizacyjnych, a Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organisation*, WHO) zaklasyfikowała ją jako epidemię XXI wieku [43]. Obecnie, mimo postępu i ciągłego rozwoju metod terapeutycznych, ta choroba nadal pozostaje nieuleczalna, a celem leczenia jest głównie utrzymanie normo-glikemii, niedopuszczenie do wystąpienia przewlekłych powikłań i podniesienie komfortu życia pacjenta. Po rozpoznaniu nieprawidłowego poziomu glukozy we krwi, pierwszą strategią terapeutyczną jest terapia behawioralna, która polega na modyfikacji stylu życia, zmianie nawyków żywieniowych, redukcji masy ciała, wprowadzeniu odpowiedniej aktywności fizycznej oraz systematycznej kontroli poziomu glukozy we krwi. Ten sposób leczenia daje dobre efekty we wczesnych stadiach rozwoju cukrzycy i w dużej mierze zależy od zdolności do regeneracji komórek β [44]. Kiedy zmiany w diecie i aktywności fizycznej zawodzą, do terapii włącza się środki farmakologiczne, które poprawiają uwalnianie i działanie insuliny.

2.1.1. Terapie farmakologiczne

Pierwszym wyborem u większości pacjentów z rozpoznaną cukrzycą typu 2 jest doustna monoterapia metforminą. Lek ten znany jest od 1959 roku i nadal pozostaje numerem jeden w leczeniu cukrzycy. Metformina powoduje obniżenie stężenia glukozy we krwi (zarówno na czczo jak i po posiłku), nie powoduje hipoglikemii i nie przyczynia się do wzrostu masy ciała. Kiedy leczenie metforminą nie przynosi oczekiwanych rezultatów, do terapii włącza się inne leki (terapia skojarzona) takie jak: doustne leki przeciwhiperglikemiczne, agonista receptora GLP-1, pochodne sulfonilomocznika leki inkretynowe, inhibitory SGLT2, pochodne tiazolidynodionu. Jeżeli i te terapie zawodzą, z powodu utraty resztkowej funkcji komórek β , znaczna liczba osób staje przed koniecznością egzogennych wstrzyknięć insuliny [45].



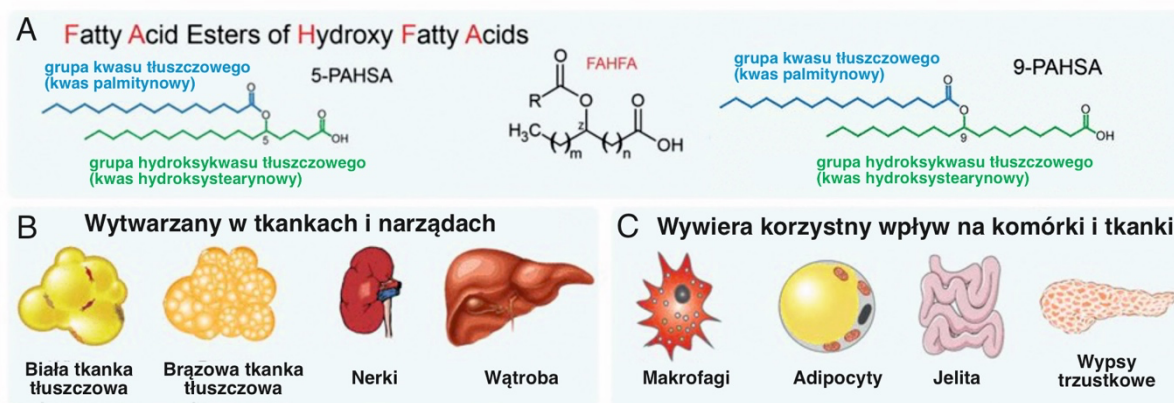
Rycina I. 6 Podejścia terapeutyczne w leczeniu cukrzycy typu 2 obejmujące połączenie środków farmakologicznych, terapii behawioralnej, interwencji chirurgicznych, medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej. Rycinę wykonano na podstawie: [46].

Prowadzona terapia konwencjonalna cukrzycy często nie jest w pełni skuteczna, czego efektem są niekontrolowane stany hiperglikemii, prowadzące do powikłań cukrzycy, takich jak choroby sercowo-naczyniowe i niewydolność nerek. Istniejące alternatywne metody leczenia cukrzycy wiążą się z podawaniem organicznych farmaceutyków, ale leki te mają różne skutki uboczne, takie jak nudności, bóle głowy, przyrost masy ciała, uszkodzenia układu oddechowego i wątroby. Dlatego też istnieje rosnąca potrzeba znalezienia efektywnych i bezpiecznych środków terapeutycznych. W ostatnich latach zaobserwowano wzrost zainteresowania substancjami, które mogą wykazywać potencjalne właściwości przeciwcukrzycowe. Do takich substancji zakwalifikowano między innymi kompleksy metali przejściowych – głównie związki rutenu [47], czy flawonoidy [48]. Szczególnie flawonoidy wydają się być obiecującym kandydatem ze względu na swoje przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwcukrzycowe i przeciwalergiczne właściwości. Wykazano, że flawonoidy mogą wpływać na glikemię i cukrzycę typu 2 (T2D) poprzez różne mechanizmy, takie jak promowanie wychwytu glukozy w tkankach, a tym samym poprawianie wrażliwości na insulinę.

2.1.2. Estry kwasów tłuszczowych i hydroksykwasów tłuszczowych jako nowe związki w terapii cukrzycy typu 2

Rosnąca liczba przypadków cukrzycy i powikłań związanych z jej rozwojem jest impulsem do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych i profilaktycznych. W 2014 pojawiły się pierwsze doniesienia na temat grupy związków o potencjalnych właściwościach przeciwcukrzycowych – estrów kwasów tłuszczowych i hydroksykwasów tłuszczowych o nazwie FAHFA (ang. *Fatty Acyl esters of Hydroxy Fatty Acids*) [49]. Początkowo działanie tych związków było sporne, natomiast od 2020 roku pojawia się coraz więcej badań przedstawiających ich potencjalny korzystny wpływ zarówno w leczeniu cukrzycy jak i chorób zapalnych. Te lipidy występują naturalnie w składnikach odżywczych, takich jak owoce, warzywa, jaja i owies, ale również w organizmie w tkance tłuszczowej, nerkach, wątrobie, surowicy, mleku matki oraz smółce. W warunkach fizjologicznych poziomy FAHFA wahają się od 0,5 do 500 nmol/l w surowicy/osoczu i 200 pmol/g w tkance [50]. Obecnie, wyróżnia się kilkadziesiąt rodzin FAHFA, które charakteryzują się różnym składem kwasów tłuszczowych i hydroksykwasów tłuszczowych [51]. Jedną z rodzin FAHFA o potencjalnych właściwościach przeciwcukrzycowych jest PAHSA (ang. *Palmitic Acid esters of Hydroxy Stearic Acids*), która

składa się z kwasu palmitynowego (PA) zestryfikowanego do grupy hydroksylowej kwasu hydroksystearynowego (HSA). [49]. Wykazano, że PAHSA ma pozytywny wpływ na narządy/tkanki, takie jak: tkanka tłuszczowa [52], trzustka [53], jelito [54], wątroba [55], mięśnie [56]. Wpływ PAHSA na trzustkę i jego potencjalne zastosowanie jako środek terapeutyczny w leczeniu cukrzycy wydaje się być szczególnie interesujący. W literaturze można znaleźć badania w których wykazano, że PAHSA korzystnie wpływa na proliferację komórek β trzustki, a także zwiększa wydzielanie insuliny i glukagonopodobnego peptydu 1 (GLP-1), a tym samym może wykazywać działanie przeciwcukrzycowe [53]. Co ciekawe, stwierdzono, że poziomy PAHSA w surowicy i tkance tłuszczowej ludzi opornych na insulinę są obniżone. Podobny efekt zaobserwowano w zwierzęcym modelu cukrzycy typu 2, tj. u myszy karmionych dietą wzbogaconą w tłuszcz (ang. *high fat diet*, HFD). Wykazano, że przewlekłe podawanie regioizomerów 5-PAHSA i 9-PAHSA myszom HFD zwiększa poziom PAHSA od ~1,4 do 3-krotnie, co skutkuje poprawą wrażliwości na insulinę i tolerancji glukozy [56]. Ponadto, istnieją dane wskazujące na to, że podanie roztworów zawierających PAHSA może osłabiać apoptotyczną i martwiczą śmierć komórek β wywołaną przez cytokiny oraz zwiększać żywotność komórek β [57]. Mechanizm działania PAHSA nie jest jeszcze w pełni poznany, ale sugeruje (tak jak w przypadku FFA) aktywację receptora GPR40, który należy do rodziny receptorów wolnych kwasów tłuszczowych sprzężonych z białkami G i jest aktywowany przez nasycone i nienasycone kwasy karboksylowe. Dodatkowo aktywacja receptora GPR40 stymuluje napływ jonów Ca^{2+} oraz zwiększa wydzielanie insuliny i GLP-1 w komórkach β trzustki. Jednak niektóre badania sugerują, że wysoki poziom glukozy we krwi może zmniejszać działanie 5-PAHSA poprzez hamowanie szlaku sygnałowego AMPK (ang. *5'AMP-activated protein kinase*) i promowanie zapalenia, w którym pośredniczy jądrowy czynnik kappa-B (NF- κ B) [58]. Istnieją również badania kwestionujące potencjał przeciwcukrzycowy PAHSA [52]. Dlatego bardzo ważne jest rozstrzygnięcie spornych danych dotyczących roli PAHSA w regulacji funkcji wydzielniczej wysp trzustkowych.



Rycina I. 7 Budowa chemiczna (A), miejsce syntezy (B) i działania (C) 5-PAHSA oraz 9-PAHSA. Rycinę wykonano na podstawie: [59].

2.1.3. Terapie chirurgiczne

Podstawowym celem leczenia cukrzycy typu 2 jest przywrócenie funkcjonalności uszkodzonym komórkom β wysp trzustkowych oraz zwiększenie wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę. W sytuacji, gdy terapie farmakologiczne zawodzą alternatywą mogą być interwencje chirurgiczne. Do tej pory z sukcesem klinicznym przeprowadzono jednoczesny przeszczep trzustki oraz nerki [60], [61] lub transplantację wysp ksenogenicznych do żyły wrotnej [62]. Jednak brak dawców oraz problemy z utratą funkcjonalności wysp (związane głównie z utratą integralności ECM) stanowią duże ograniczenie tego typu zabiegów. Podczas izolacji wysepek nisza wewnątrzwydzielnicza trzustki oraz wewnętrzne unaczynienie i unerwienie są zaburzone, a przeszczepione wyspy albo powoli się wszczepiają, albo z czasem tracą swoje funkcje wydzielnicze z powodu niedokrwienia i stanu zapalnego. Z tego powodu opracowuje się alternatywne metody, w tym przeszczep wysp trzustkowych pochodzących od innego dawcy tego samego gatunku (allotransplantacja) do błony podśluzowej żołądka [63]. Badane są również inne podejścia, oparte na wykorzystaniu komórek macierzystych, endogennej regeneracji komórek β i technologii biodruku (3D) [64]. Zwiększenie masy komórek β wymaga replikacji pozostałości komórek β trzustki, generowania dojrzałych subpopulacji komórek β oraz mobilizacji komórek progenitorowych w trzustce lub innych aktywnych metabolicznie narządach, takich jak jelita i wątroba [45]. Terapie oparte na komórkach macierzystych zakładają wytwarzanie reagujących na glukozę komórek β -podobnych z mezenchymalnych komórek macierzystych, ludzkich embrionalnych komórek macierzystych i indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych pochodzących od pacjenta [45]. Ze względu na złożoność choroby, w celu przywrócenia normoglikemii

i skutecznego leczenia cukrzycy typu 2 należy stosować wieloaspektowe podejścia terapeutyczne.

2.2. Modele komórkowe wykorzystywane w badaniach zaburzeń sekrecji insuliny i glukagonu

W ostatnich latach zaobserwować można dynamiczny rozwój badań w obszarze testowania potencjalnych środków terapeutycznych mogących wpływać na proliferację, żywotność oraz funkcje sekrecyjne komórek trzustki. Wprowadzenie leku na rynek to długi (~15 lat) i kosztowny proces, a najważniejszym etapem dla każdej firmy farmaceutycznej jest przejście przez rygorystyczny etap badań przedklinicznych, w którym gromadzone są dane o skuteczności i bezpieczeństwie leku. Głównym celem tego etapu jest określenie bezpiecznej dawki dla pacjenta i ocena potencjalnej toksyczności produktu. Zazwyczaj badania przedkliniczne prowadzone są na dwuwymiarowych (2D) kulturach komórkowych hodowanych tradycyjnymi metodami (*in vitro*) lub na modelach zwierzęcych (*in vivo*). Wskaźnik niepowodzeń w opracowywaniu leków wynosi około 90%, co wynika głównie z faktu wykorzystywania nieodpowiednich modeli do badań. Dwuwymiarowe hodowle komórkowe (2D) to konwencjonalne podejście znane od XX wieku i najszerzej stosowane przez większość zespołów badawczych. W takim modelu linie komórek adherentnych hoduje się jako monowarstwę na płaskiej powierzchni szklanej lub polimerowej [65]. Ponieważ hodowle 2D są dobrze poznane i przetestowane, a także generują stosunkowo niewielkie koszty stanowią podstawę prawie wszystkich obecnych rutynowych testów. Podejście to ma jednak wiele ograniczeń, głównie dlatego, że hodowle 2D nie reprezentują prawdziwego środowiska komórkowego – w organizmie komórki nie są strukturą jednowarstwową, ale złożonym, wielokomórkowym modelem otoczonym macierzą zewnątrzkomórkową. Głównym ograniczeniem podejścia 2D jest to, że nie odzwierciedla ono w pełni interakcji komórka-komórka i komórka-środowisko zewnątrzkomórkowe. Ponadto istnieje wiele różnic pomiędzy komórkami w organizmie a hodowlą komórek w monowarstwie mogących wpływać na ich funkcję i różnie reagować .in.. na środki terapeutyczne. W przypadku badań z wykorzystaniem komórek trzustki wykazano istotne różnice min. w stopniu proliferacji, żywotności, komunikacji komórkowej i wydzielaniu insuliny między monowarstwą ludzkich komórek β , a skupiskami tych komórek hodowanych w postaci trójwymiarowych agregatów [66]. Dlatego też w badaniach przedklinicznych nowych środków terapeutycznych często wykorzystywane są modele zwierzęce. Natomiast również w tym przypadku istnieje wiele ograniczeń

wynikających np. z rozbieżności filogenetycznej pomiędzy zwierzętami laboratoryjnymi a ludźmi, co skutkuje niedokładnymi przewidywaniami odpowiedzi na konkretne środki terapeutyczne. Ponadto, istnieje wiele aspektów etycznych i prawnych związanych z wykorzystywaniem zwierząt laboratoryjnych. Według Humane Society International (HSI) [67] zwierzęta wykorzystywane w badaniach są często poddawane niehumanitarnym metodom eksperymentalnym, które obejmują indukcję ran oraz guzów. Ponadto wysokie koszty oraz czas ograniczają wykorzystanie modeli zwierzęcych jako narzędzi do badań farmaceutycznych.

2.2.1. Metody otrzymywania trójwymiarowych (3D) modeli komórkowych wysp trzustkowych

Zgodnie z zasadą 3R (ang. *Replacement, Reduction and Refinement*), obecnie dąży się do zastąpienia wykorzystania zwierząt laboratoryjnych innymi, zbliżonymi do tych występujących w warunkach *in vivo* modelami badawczymi. Te ograniczenia zapoczątkowały nową erę badań nad trójwymiarowymi modelami wysp trzustkowych, które mogłyby zostać wykorzystane do symulacji choroby, lepszego zrozumienia jej przyczyn i testowania nowych terapii. Jednym z najpopularniejszych podejść do zastąpienia modelu zwierzęcego jest trójwymiarowa hodowla komórkowa, która, jak wykazano, zmniejsza lukę między kulturami komórkowymi, a tkankami fizjologicznymi [68]. Modele komórkowe 3D uzyskuje się metodami niewymagającymi dodatkowych rusztowań – ze względu na naturalne właściwości komórek, takie jak zdolność do samoagregacji, lub metodami opartymi na różnego rodzaju rusztowaniach (rusztowania biologiczne, rusztowania polimerowe, metody enkapsulacji) [46].

2.2.1.1. Metody oparte na naturalnych właściwościach komórek do agregacji

Do najczęściej wykorzystywanych metod tworzenia trójwymiarowych struktur komórkowych zalicza się metody samoorganizacji, metodę wiszącej kropli, wykorzystanie bioreaktorów obrotowych i metodę biodruku 3D. Jednak najbardziej popularnymi podejściami do tworzenia modeli do badań wysp trzustkowych są samoorganizacja komórek i metoda wiszącej kropli [69], [70]. Metody wykorzystujące zdolność komórek do samoorganizacji opierają się na ograniczeniu adhezji komórek do powierzchni naczynia hodowlanego (poprzez zastosowanie podłoży niskoadhezyjnych), kiedy interakcje międzykomórkowe przeważają nad interakcjami komórka-komórka z powierzchnią. Agregacja komórek początkowo zachodzi

poprzez interakcje między integrynami a białkami macierzy komórkowej. Z biegiem czasu powstałe agregaty komórkowe uzyskują bardziej sferyczny kształt i ostatecznie charakteryzują się obecnością białek ECM i połączeń międzykomórkowych [71]. Agregację komórek wysp trzustkowych osiąga się głównie poprzez prowadzenie hodowli w butelkach hodowlanych poddawanych ciągłemu mieszaniu, w wielodołkowych płytkach o U-kształtnym dnie lub płytkach pokrytych substancją zapobiegającą adhezji komórek.

Do tej pory z wykorzystaniem metody samoorganizacji komórek z powodzeniem hodowano trójwymiarowe struktury komórek β trzustki. Jednak głównymi ograniczeniami tej metody jest brak kontroli nad wielkością otrzymywanych struktur oraz losowa agregacja komórek. Otrzymane agregaty o większych średnicach ($>400\ \mu\text{m}$) mogą charakteryzować się obniżoną żywotnością i obecnością rdzenia nekrotycznego, wynikającą z utrudnionej dyfuzji składników odżywczych do wnętrza wielokomórkowych struktur agregatu [72]. Drugą często stosowaną techniką jest technika wiszącej kropli. W tej metodzie sferyczne agregaty otrzymuje się poprzez nanoszenie kropli zawiesiny komórkowej na wnętrze pokrywki płytki hodowlanej, którą następnie odwraca się. Po odwróceniu płytki, krople utrzymywane są dzięki napięciu powierzchniowemu, a grawitacja powoduje organizację komórek na dnie kropli [70]. Dzięki wykorzystaniu metody wiszącej kropli możliwe jest uzyskanie dużej liczby jednorodnych agregatów w stosunkowo krótkim czasie. Na przykład *Jo i współl.* [73] uzyskali sferyczne hybrydowe agregaty komórek β trzustki (linie komórkowe RIN-m i RIN-5F) o średnicach około $590\text{--}1200\ \mu\text{m}$. Takie struktury charakteryzowały się morfologią i poziomem wydzielania insuliny, glukagonu i somatostatyny, podobnym do natywnych wysp trzustkowych. Agregaty komórkowe uzyskane metodą wiszącej kropli, po wszczepieniu do przestrzeni podskórnej myszy z wywołaną eksperymentalnie cukrzycą wykazywały wysoką żywotność oraz w sposób prawidłowy wydzielały insulinę, co wskazuje na ich terapeutyczny potencjał [74]. Metoda wiszącej kropli, jest jednym z najczęściej stosowanych podejść uzyskiwania 3D struktur komórkowych. Wadami tej metody jest konieczność zmniejszenia objętości kropli w przypadku prowadzenia wysokoprzepustowych testów i trudności w wymianie pożywki podczas prowadzenia hodowli.

2.2.1.2. Metody oparte na rusztowaniach

Innym sposobem otrzymywania trójwymiarowych struktur komórkowych jest zastosowanie rusztowań wykonanych z biomateriałów lub rusztowań pochodzenia naturalnego (biologicznych) wspierających hodowlę i agregację komórek wysp trzustkowych. Ze względu na wiele atrakcyjnych cech biomateriałów, takich jak biokompatybilność, wytrzymałość mechaniczna, niska immunogenność, elastyczność podobna do tkanki i kontrolowane uwalnianie, rusztowania z biomateriałów znalazły szerokie zastosowanie w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej. Podejście to wykorzystuje macierze oparte m.in. na kwasie poliglikolowym (PGA), polikwasie mlekowym (PLA), polistyrenie, polikaprolaktonie (PCL), poli-L-lizynie, poli(dimetylosiloksanie) (PDMS) [75]. Do tej pory wykazano, że zastosowanie rusztowań wykonanych z PGA w hodowli wyizolowanych szczurzych wysp trzustkowych pozwalało na zwiększenie żywotności komórek, wyższej sekrecji insuliny oraz zachowanie prawidłowej morfologii wysp [76]. Również PCL był z powodzeniem stosowany jako rusztowanie do podskórnego przeszczepu wysp trzustkowych i również wspomagał wydzielanie insuliny [77]. Poza wszystkimi zaletami tej metody, główną wadą jest niejednorodny rozkład komórek.

Rusztowania biologiczne pełnią funkcje naśladujące naturalną tkankę. Naturalne rusztowania biologiczne obejmują decelularyzowane narządy lub białka, które powszechnie występują w macierzy pozakomórkowej, takie jak kolagen, fibronektyna i żelatyna [78]. Produkcja rusztowań pozbawionych komórek składa się z kilku etapów. Właściwa tkanka jest najpierw izolowana i poddawana lizie. Procedura ta usuwa komórki o potencjale immunogennym, które mogą wpływać na powodzenie przeszczepu. Na rusztowanie wysiewa się następnie komórki biorecy (np. komórki macierzyste), które różnicują się w określone narządy [79]. Głównym ograniczeniem wykorzystania rusztowań biologicznych są aspekty etyczne dotyczące pozyskiwania narządów do decelularyzacji, ale jednym z rozwiązań tej kwestii może być zastosowanie rusztowań składających się z naturalnych polimerów, takich jak: alginian, kwas hialuronowy, agaroza, żelatyna, kolagen, chitozan, dekstran [80].

2.2.1.3. Enkapsulacja

Jednym z głównych problemów metodologicznych wyżej opisanych podejść, opartych na porowatych rusztowaniach, jest niejednorodny rozkład komórek. Kwestię tą można częściowo rozwiązać, zamykając materiał biologiczny w matrycy hydrożelowej (enkapsulacja),

która jest otoczona półprzepuszczalną membraną ułatwiającą dostarczanie tlenu, składników odżywczych i leków oraz zapewniającą usuwanie metabolitów [81]. Metoda enkapsulacji pozwala na immobilizację komórek lub całych wysp trzustkowych w materiale biopolimerowym. W badaniach wysp trzustkowych najczęściej stosuje się alginian, agarozę, chitozan lub syntetyczne hydrożele [82], [83].

Oprócz głównych zastosowań, takich jak kontrolowane uwalnianie leków, enkapsulacja jest obiecującym rozwiązaniem w przeszczepie ksenogenicznym wysp trzustkowych u osób chorych na cukrzycę [84], głównie ze względu na brak konieczności stosowania po przeszczepie leków immunosupresyjnych. Metoda enkapsulacji znajduje szerokie zastosowanie jako metoda tworzenia trójwymiarowych struktur. Pozwala na zapewnienie jednorodnego rozkładu komórek i precyzyjnej kontroli nad rozmiarem uzyskanej struktury. Z drugiej strony zmniejsza ilość substancji dostarczanych do komórek zamkniętych w kapsułce, co może być zarówno wada jak i zaletą. Jednak nawet złożone trójwymiarowe hodowle komórkowe w warunkach statycznych nie są w stanie naśladować cech istotnych dla funkcji narządów występujących w organizmach żywych, np. połączenia tkankowe, transport/gradient składników odżywczych i tlenu do wnętrza struktury oraz mechaniczny wpływ mikrośrodowiska. Aby przezwyciężyć te ograniczenia w ostatnich latach powstają nowe rozwiązania oparte na połączeniu hodowli komórkowych i mikrosystemów przepływowych typu *Lab-on-a-chip*.

3. Systemy typu *Lab-on-a-chip*

Miniaturyzacja oraz techniki wytwarzania systemów *Lab-on-a-chip* to obecnie jeden z najdynamiczniej rozwijających się kierunków badań. Takie mikrosystemy przepływowe to miniaturowe, zintegrowane urządzenia, dzięki którym możliwe jest prowadzenie zarówno reakcji chemicznych/biochemicznych oraz wysokoprzepustowych analiz produktów tych reakcji. Najważniejszymi zaletami systemów *Lab-on-a-chip* jest ograniczenie zużycia odczynników i zminimalizowane ilości produkowanych odpadów, redukcja kosztów i czasu potrzebnego do przeprowadzenia badań, minimalizacja rozcieńczenia, możliwość analizy małej objętości (10–100 μ l) próbki, możliwość pełnej automatyzacji, zapewnienie powtarzalności oraz prowadzenie analiz w czasie rzeczywistym. Ze względu na wiele zalet systemów *Lab-on-a-chip* zostały one szeroko zastosowane jako przyszpitalne urządzenia *point-of-care* otwierając tym samym nowe perspektywy w szybszej diagnostyce [85]. Ponadto, ze względu na

możliwość wykorzystania biokompatybilnych materiałów, zaprojektowania struktur odpowiednich dla hodowli komórek oraz zapewnienia warunków przepływowych systemy *Lab-on-a-chip* są coraz szerzej wykorzystywane do opracowania modeli organów i tkanek do badań biologicznych.

3.1. Systemy *Lab-on-a-chip* do badań biologicznych

3.1.1. Materiały wykorzystywane do konstrukcji mikrosystemów przepływowych

Rodzaj materiału wykorzystanego do konstrukcji systemu *Lab-on-a-chip* w dużej mierze zależy od rodzaju prowadzonych badań. W celu prowadzenia badań biologicznych z wykorzystaniem kultur komórkowych należy wybrać materiał charakteryzujący się przede wszystkim biokompatybilnością, nietoksycznością i zapewnieniem efektywnej wymiany gazowej. Ponadto, taki materiał powinien być stabilny w szerokim zakresie temperatur, co jest istotne przy prowadzeniu procesów sterylizacji przed rozpoczęciem hodowli komórkowej w takim systemie [86].

Najczęściej wykorzystywane materiały do produkcji systemów *Lab-on-a-chip* oraz ich wady i zalety zostały przedstawione w tabeli I.1.

Tabela I.1. Materiały najczęściej wykorzystywane do konstrukcji systemów *Lab-on-a-chip*

Material	Zalety	Wady	Ref.
Poli(dimetylosiloksan) (PDMS)	• przepuszczalny dla gazów • biokompatybilny • transparenty • elastyczny (wysoki moduł sprężystości 360–870 kPa) • łatwy w obróbce (możliwość odtworzenia skomplikowanych struktur) • hydrofobowy (istotne z punktu widzenia hodowli 3D)	• nieodporny na rozpuszczalniki organiczne	[87] [88] [89]

Szkło	• transparentny • hydrofilowy (istotne z punktu widzenia hodowli 2D)	• czasochłonne metody przetwarzania (skomplikowane struktury są trudne do odtworzenia) • nieprzepuszczalny dla gazów • hydrofilowy (ograniczenie dla hodowli 3D)	[90] [91] [92]
Poli(metakrylan metylu) (PMMA)	• transparentny • sztywniejszy niż elastomery, • niska autofluorescencja • biokompatybilny	• hydrofilowy (ograniczenie dla hodowli 3D) • słabo przepuszczalny dla gazów	[93] [94]
Polistyren (PS)	• sztywniejszy niż elastomery, • łatwy w obróbce	• słaba odporność chemiczna, zwłaszcza na substancje organiczne. • podatny na degradację UV	[95] [96]
Papier	• matryca celulozowa papieru pozwala uzyskać porowatą strukturę do wzrostu komórek w formie 3D struktur. • niski koszt • biokompatybilny • łatwo modyfikowalny	• niska rozdzielczość wzoru • nieodporny na wysokie temperatury	[97]

W przypadku prowadzenia hodowli komórkowej z wykorzystaniem mikrosystemów przepływowych należy również pamiętać o transparentności co najmniej jednego z materiałów konstrukcyjnych, tak aby umożliwić obserwację i analizę prowadzonej hodowli. Najczęściej

wykorzystywanymi materiałami są materiały polimerowe oraz szkło. Polimery używane do konstrukcji mikrosystemów przepływowych to głównie: poliwęglan (PC), polistyren (PS), poli(dimetylosiloksan) (PDMS), poli(metakrylan metylu) (PMMA), poli(tereftalan etylenu) (PET). Poza wszystkimi zaletami materiałów polimerowych, ze względu na słabą odporność chemiczną, niską przepuszczalność dla gazów, czy wysoką sztywność polimery takie jak: PC, PS, PET czy PMMA są głównie stosowane do konstrukcji systemów w połączeniu z innymi biokompatybilnymi materiałami. Podobnie szkło, które charakteryzuje się hydrofilową powierzchnią odpowiednią dla hodowli komórek adherentnych rosnących w monowarstwie - również wykorzystywane jest w połączeniu z innymi materiałami (najczęściej z PDMS). Spośród wymienionych w tabeli I.1 materiałów do konstrukcji systemów wykorzystywanych do badań z udziałem materiału biologicznego największą popularnością cieszy się poli(dimetylosiloksan) (PDMS). PDMS należy do grupy polimerów krzemooorganicznych, a jego popularność związana jest z wysoką biokompatybilnością i transparentnością, która umożliwia prowadzenie i ciągłą obserwację stanu hodowli. Ponadto, PDMS zapewnia efektywną wymianę gazową i jest materiałem hydrofobowym, wspierającym hodowlę komórek nieadherentnych w formie trójwymiarowych struktur, co jest niezwykle istotne w przypadku projektowania systemów do modelowania tkanek. W literaturze przedstawiono wiele systemów skonstruowanych z PDMS, wykorzystywanych głównie do hodowli 3D modeli komórkowych [98], [99].

3.1.2. Metody wytwarzania mikrosystemów przepływowych

Rodzaj metody wykorzystanej do produkcji mikrosystemów przepływowych zależy głównie od materiału użytego do ich konstrukcji. Metody te można podzielić na metody replikacyjne i metody bezpośredniej obróbki.

Do najczęściej stosowanych **metod replikacyjnych** zalicza się:

- odciskanie,
- formowanie wtryskowe,
- odlew.

Metody replikacyjne polegają na kształtowaniu ciekłego lub plastycznego metariału polimerowego z wykorzystaniem różnego rodzaju form (pieczętek) stanowiących matryce z wypukłym wzorem odzwierciedlającym zaprojektowaną geometrię mikrosystemu. Pieczętki przygotowywane są różnymi technikami, m.in. z wykorzystaniem metody fotolitografii czy

mikrofrezowania. Etap wykonania pieczętki jest etapem najbardziej czasochłonnym, należy pamiętać, że każda niedokładność w wykonaniu pieczętki zostanie odwzorowana we wszystkich mikrostrukturach wykonanych z jej wykorzystaniem.

Po wykonaniu pieczętki zawierającej wzór geometrii mikrosystemu właściwy układ otrzymuje się jedną z wymienionych metod replikacyjnych (odciskanie, metoda wtryskowa i odlew). **Odciskanie** jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod kształtowania polimerów termoplastycznych, takich jak np. PMMA. W tej metodzie, pieczętkę oraz polimer umieszcza się w komorze próżniowej prasy hydraulicznej i podgrzewa powyżej temperatury zeszklenia polimeru. Następnie wzór zawarty na pieczętce jest odciskany w polimerze i następuje chłodzenie polimeru poniżej temperatury zeszklenia. Zaletą tej metody jest czas trwania całego procesu, który nie przekracza 10 min. Kolejną metodą obróbki materiałów polimerowych jest **formowanie wtryskowe**. W metodzie tej polimerowy materiał w postaci granulek zostaje umieszczony w ogrzewanym cylindrze, gdzie ulega uplastycznieniu. Następnie, polimer zostaje wtryskiwany pod wysokim ciśnieniem do formy i po etapie chłodzenia otrzymuje się gotową strukturę. Tak w przypadku odciskania, zaletą metody wtrysku jest szybkość procesu, który trwa zaledwie kilka sekund. **Metoda odlewu** jest technologią najczęściej wykorzystywaną w laboratoriach badawczych do obróbki materiału polimerowego jakim jest PDMS. W metodzie odlewu na gotową pieczętkę wylewa się przygotowaną mieszaninę (prepolimeru i czynnika sieciującego) nieusieciowanego polimeru, a następnie w temperaturze 60-120°C prowadzi się sieciowanie przez 30-180 minut. Po przeprowadzeniu procesu sieciowania warstwę PDMS z odwzorowanymi mikrostrukturami oddziela się od pieczętki i uszczelnia kanały przy pomocy drugiej warstwy PDMS, szkła lub innego polimeru [100].

Drugim typem metod wytwarzania mikrosystemów przepływowych są metody **bezpośredniej obróbki**, do których zalicza się:

- mikroobróbka laserowa,
- stereolitografia,
- mikrofrezowanie.

Mikroobróbka laserowa jest technologią trawienia kształtów w podłożu polimerowym z wykorzystaniem generowanego przez laser promieniowania ultrafioletowego lub podczerwonego. Pożądany kształt powstaje podczas przesuwu wiązki lasera lub obrabianego

materiału. Wadą tej metody jest wysoki koszt sprzętu, a także duża chropowatości obrabianej powierzchni. Kolejną metodą jest metoda **stereolitografii**, w której zaprojektowane struktury są odtwarzane w światłoczułych polimerach poprzez ich stopniowe utwardzanie promieniowaniem UV generowanym przez laser. Wykorzystując metodę stereolitografii możliwe jest wytworzenie kanałów o wymiarach powyżej 250-500 μm .

Technika **mikrofrezowania** opiera się na tworzeniu trójwymiarowych struktur w polimerach za pomocą obracającego się frezu z wykorzystaniem obrabiarek sterowanych numerycznie. Metoda ta charakteryzuje się dużą dokładnością i możliwością odwzorowania skomplikowanych struktur. Metody bezpośredniej obróbki są również często wykorzystywane do tworzenia pieczętek do produkcji mikrosystemów przepływowych.

3.2 Modelowanie tkanek z wykorzystaniem systemów *Lab-on-a-chip*

W ostatnich latach obiecujące stało się wykorzystanie systemów *Lab-on-a-chip* do hodowli i analizy modeli komórkowych w odpowiednich warunkach przepływowych. Poza wymienionymi w rozdziale 3 (*Systemy typu Lab-on-a-chip*) zaletami systemów *Lab-on-a-chip*, z punktu widzenia badań biologicznych bardzo istotna jest możliwość odwzorowania warunków przepływowych oraz prowadzenie hodowli komórek i analizy w jednym urządzeniu, w czasie rzeczywistym. Do tej pory mikrosystemy przepływowe były z powodzeniem wykorzystywane do tworzenia takich modeli komórkowych jak *Lung-on-a-chip* [101], *Kidney-on-a-chip* [102], *Heart-on-a-chip* [103], [104] i *Liver-on-a-chip* [105].

3.2.1. Parametry pracy mikrosystemów przepływowych

Przy projektowaniu systemów do hodowli modeli tkankowych należy zwrócić uwagę na optymalizację pracy systemu i dobór parametrów hodowli takich jak odpowiednie warunki przepływu (natężenie przepływu, częstotliwość zmiany pożywki, czas dostarczania składników odżywczych, kierunek przepływu). Dobór odpowiednich warunków panujących w mikrosystemie wpływa na istotne parametry hodowli takie jak: naprężenia ścinające (ang. *wall shear stress*, WSS), skuteczną objętość hodowli (ang. *effective culture volume*, ECV) oraz stosunek powierzchni hodowlanej do objętości hodowli (ang. *surface-area-to-volume ratio*, SAV). Naprężenia ścinające wywołane przez przepływ pożywki i innych reagentów mogą istotnie wpływać na morfologię, żywotność i proliferację hodowanych w systemie komórek. Dobrze dobrane parametry naprężeń ścinających mogą odwzorować przepływ płynów

występujący w organizmie. Z drugiej strony zbyt wysokie wartości mogą powodować uszkodzenie komórek (zmiany przepuszczalności a nawet fragmentację błony komórkowej) i tym samym obniżenie ich żywotności [106]. Dlatego na etapie projektowania systemu do hodowli komórek bardzo istotna jest optymalizacja warunków przepływowych. Kolejnym ważnym parametrem jest stosunek powierzchni hodowlanej do objętości hodowli, który jest wielkością pola powierzchni na jednostkę objętości obiektu lub zbioru obiektów. Stosunek powierzchni do objętości oblicza się, dzieląc pole powierzchni naczynia hodowlanego przez jego objętość. Im niższy stosunek, tym wolniejszy transport cząsteczek w komórce i z otaczającym środowiskiem. Potwierdzono, że w mikrosystemach przepływowych uzyskiwane wartości SAV są zbliżone do tych panujących w organizmie. Zapewnienie odpowiedniego stosunku powierzchni do objętości hodowli pozwala na efektywniejsze dostarczanie tlenu oraz substancji odżywczych do wnętrza struktur komórkowych. Kolejnym parametrem wpływającym na hodowlę komórkową w systemach typu *Lab-on-a-chip* jest skuteczna objętość hodowli, która jest parametrem charakteryzującym mikrośrodowisko komórkowe i zdolność komórek do jego kontroli podczas hodowli. W prawidłowo zaprojektowanych mikrosystemach przepływowych uzyskuje się niskie wartości ECV i wysokie wartości współczynnika SAV, które są zbliżone do tych panujących w warunkach *in vivo* [107]. Z tego względu, w celu zapewnienia efektywnego transportu składników odżywczych, przy prowadzeniu hodowli komórkowych z wykorzystaniem mikrosystemów przepływowych, dobór odpowiednich parametrów hodowli oraz zoptymalizowanie warunków przepływu są kluczowym etapem.

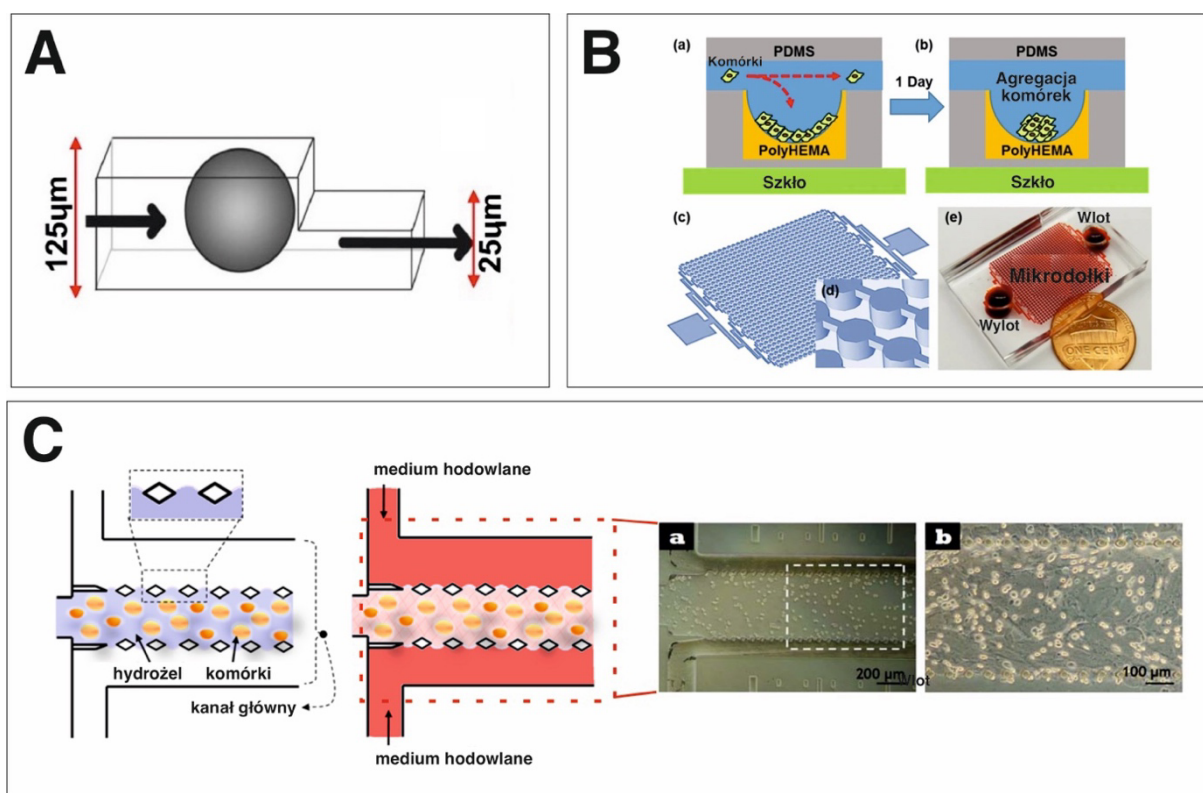
3.2.2. Projekt geometrii mikrosystemu do hodowli trójwymiarowych (3D) modeli komórkowych

Opracowując system do hodowli 3D modeli komórkowych bardzo ważnym aspektem jest zaprojektowanie odpowiedniej geometrii mikrostruktur. Najczęściej stosowane rozwiązania opierają się na wykorzystaniu mikrodołków, rzędów mikropilar lub mikrokanałów o odpowiednich wysokościach. Przykłady tych rozwiązań zostały przedstawione na rysunku I.6. Zmiany wysokości mikrokanałów pozwalają na unieruchomienie trójwymiarowych modeli hodowanych w systemie i zapewnienie odpowiedniej dyfuzji składników odżywczych do wnętrza wielokomórkowych struktur. Takie rozwiązanie zostało przedstawione przez *Sankar i współ.*, którzy wykorzystali mikrosystem przepływowy o zmiennej wysokości głównego kanału służącego do hodowli wyizolowanych mysich wysp trzustkowych [108]. Zmniejszając

wysokość kanału z początkowej wysokości wynoszącej 125 μm (w której wyspy poruszały się swobodnie) do 25 μm , naukowcy stworzyli barierę umożliwiającą przepływ roztworu w mikroukładzie z jednoczesną blokadą ruchu wyizolowanych wysp trzustkowych (rycina I.6 A). Takie rozwiązanie może być z powodzeniem wykorzystane do hodowli wyizolowanych wysp, natomiast może nie zapewniać odpowiedniego procesu tworzenia trójwymiarowych struktur z pojedynczych komórek wysp trzustkowych. Kolejnym rozwiązaniem, które jest najczęściej wykorzystywane do otrzymywania i hodowli sferoidów (najczęściej nowotworowych) jest zaprojektowanie mikrodołków w geometrii systemu. Takie rozwiązanie służy do wychwycenia pojedynczych komórek, które opadają na dno dołka i tworzą sferyczne struktury [109]. Takie rozwiązanie wykorzystano do opracowania wysokoprzepustowej platformy do tworzenia i analizy sferoidów nowotworowych (rycina I.6 B). Dzięki temu otrzymano 1024 jednorodnych (zmienność wielkości $<10\%$) sferoidów złożonych z komórek nowotworu piersi, które były z powodzeniem hodowane przez kolejne dwa tygodnie [110]. Dzięki opracowaniu tego modelu wykazano pozytywny wpływ terapii fotodynamicznej (ang. *photodynamic therapy*, PDT) na komórki nowotworowe. Takie rozwiązanie zostało również z powodzeniem zastosowane do hodowli ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych (hPSC), które różnicowano w funkcjonalne agregaty komórek endokrynnych wykazujących zbliżone funkcje do wysp trzustkowych [111]. Opracowany system składał się z warstwy PDMS wyposażonej w 382 dołki (o średnicy 720 μm i wysokości 600 μm), umieszczonej pomiędzy dwiema uszczelniającymi warstwami poliwęglanu (PC). Górna warstwa PC wyposażona została we wlot, który połączono z pompą perystaltyczną, za pomocą, której wprowadzano komórki do systemu. Komórki lokalizowały się w dołkach w warstwie PDMS i w zależności od gęstości wprowadzanej zawiesiny w każdym z dołków uzyskano agregaty komórkowe o średnicach 224–338 μm . Uzyskane z wykorzystaniem opisanego systemu agregaty komórkowe z powodzeniem hodowano przez ponad miesiąc. Opisane urządzenie może być wykorzystane do produkcji wielu, jednorodnych agregatów komórkowych i ich długoterminowej hodowli, co może znacznie wspomóc badania z zakresu medycyny regeneracyjnej.

Kolejnym rozwiązaniem wykorzystywanym w geometrii systemów *Lab-on-a-chip* do hodowli komórek jest zaprojektowanie mikropilar. Mikropilary są rzędami kolumn o zróżnicowanym kształcie, które tworzą barierę ograniczającą powierzchnię wzrostu komórek jednocześnie tworząc przestrzeń do swobodnego przepływu płynów (rycina I.6.C). Zastosowanie mikropilar w geometrii jest często wykorzystywane w mikrosystemach do

hodowli dwuwymiarowej [104], gdzie zapewniają oddzielenie adherentnej warstwy komórek od bezpośredniego przepływu pożywki hodowlanej, a tym samym minimalizują niekorzystny wpływ naprężeń ścinających. W celu prowadzenia hodowli trójwymiarowych w systemach opartych na zastosowaniu rzędów mikropilar często do zawiesziny komórkowej dodaje się hydrożel, który po usieciowaniu tworzy rusztowanie do hodowli przestrzennej. Takie rozwiązanie zostało wykorzystane przez *Kim i współ.*, którzy zaprojektowali urządzenie do hodowli komórek wątroby (HepG2) [112]. Geometria systemu składała się z mikrokanалу głównego oddzielonego rzędem mikropilar od kanałów bocznych. Wysokość mikrokanalów oraz wysokość i szerokość mikropilar wynosiła $50\ \mu\text{m}$, a przerwy między mikropilarami $20\ \mu\text{m}$. Takie rozwiązanie pozwoliło na hodowlę trójwymiarowego modelu złożonego z komórek wątroby z wykorzystaniem rusztowania z Matrigel.



Rycina I. 8 Rozwiązania geometryczne stosowane do hodowli trójwymiarowych modeli komórkowych. A) Rozwiązanie geometria polegające na zastosowaniu zmiennej wysokości mikrokanalu głównego służącego do hodowli wyizolowanych mysich wysp trzustkowych [108]. B) Wysokoprzepustowa platforma do tworzenia i analizy sferoidów nowotworowych. Geometria oparta na zastosowaniu mikrodołków sprzyjających grawitacyjnemu opadaniu komórek i ich agregacji [110]. C) Urządzenie mikroprzepływowe z mikropilarami w kształcie rombu. Schematyczny rycina geometrii mikrosystemu oraz zdjęcie morfologii komórek HepG2 tworzących trójwymiarowe struktury w macierzy Matrigel po 2 dniach hodowli [112].

W tym rozdziale zaprezentowano przykłady mikrostruktur najczęściej stosowane w mikrosystemach przepływowych do hodowli trójwymiarowych modeli komórkowych. Projekt geometrii mikrostruktur w dużej mierze zależy od rodzaju prowadzonej hodowli i charakteru wykonywanych badań. Badania sekrecji insuliny i glukagonu z wykorzystaniem komórek wysp trzustkowych prowadzone są zarówno w systemach do hodowli dwuwymiarowych jak i trójwymiarowych, natomiast w ostatnich latach dąży się do opracowania trójwymiarowego, sferycznego modelu wyspy trzustkowej.

3.2.3. Systemy *Lab-on-a-chip* w badaniach wysp trzustkowych

Systemy *Lab-on-a-chip* to narzędzia, które mogą znacznie przyspieszyć i ułatwić badania biologiczne w dziedzinie chorób trzustki [113]. Głównym celem wykorzystania takich systemów jest zrozumienie patologii cukrzycy i odkrycie nowych, skutecznych terapii. W tym celu niezbędne jest opracowanie 3D modelu wyspy trzustkowej (pseudowyspy), który będzie charakteryzował się odwzorowaniem określonego składu i lokalizacji komórek w warunkach *in vivo*. Badania w zakresie pozyskiwania modeli wysp trzustkowych w systemach *Lab-on-a-chip* są ograniczone, głównie ze względu na brak dostępnych linii komórek wysp trzustkowych. Z tego powodu większość dotychczasowych badań opiera się analizie funkcji wyizolowanych szczurzych wysp trzustkowych, a opracowane systemy są wykorzystywane głównie w celu segregacji wysp czy badania sekrecji insuliny, glukagonu i somatostatyny [73]. Natomiast wykazano, że wyspy trzustkowe po izolacji tracą swoją funkcję i mogą nie być odpowiednie do długoterminowej hodowli. Coraz częściej więc w celu opracowania modelu wyspy trzustkowej w mikrosystemie przepływowym, wykorzystuje się komórki macierzyste, które następnie poddawane są procesom różnicowania.

Opisane w literaturze mikrosystemy przepływowe do badań prowadzonych z wykorzystaniem wysp trzustkowych opierają się na połączeniu dwóch elementów: mechanizmu pułapkowania zdolnego do unieruchomienia jednej lub wielu wysp oraz narzędzia analitycznego lub metody monitorowania stanu prowadzonej hodowli. Jako mechanizm pułapkowania wykorzystać można wszystkie rozwiązania geometryczne sprzyjające hodowli trójwymiarowych struktur, natomiast w celu analizy stanu hodowli wykorzystuje się głównie metody oparte na zjawisku fluorescencji, analizy mikroskopowe, immunoenzymatyczne testy czy monitorowanie wewnątrzkomórkowych oscylacji Ca^{2+} . Inne potencjalne narzędzia wykorzystywane do analizy sekrecji insuliny to metody patch clamp,

amperometria/woltamperometria, spektroskopia impedancyjna, tranzystory polowe i rezonans plazmonów powierzchniowych [20].

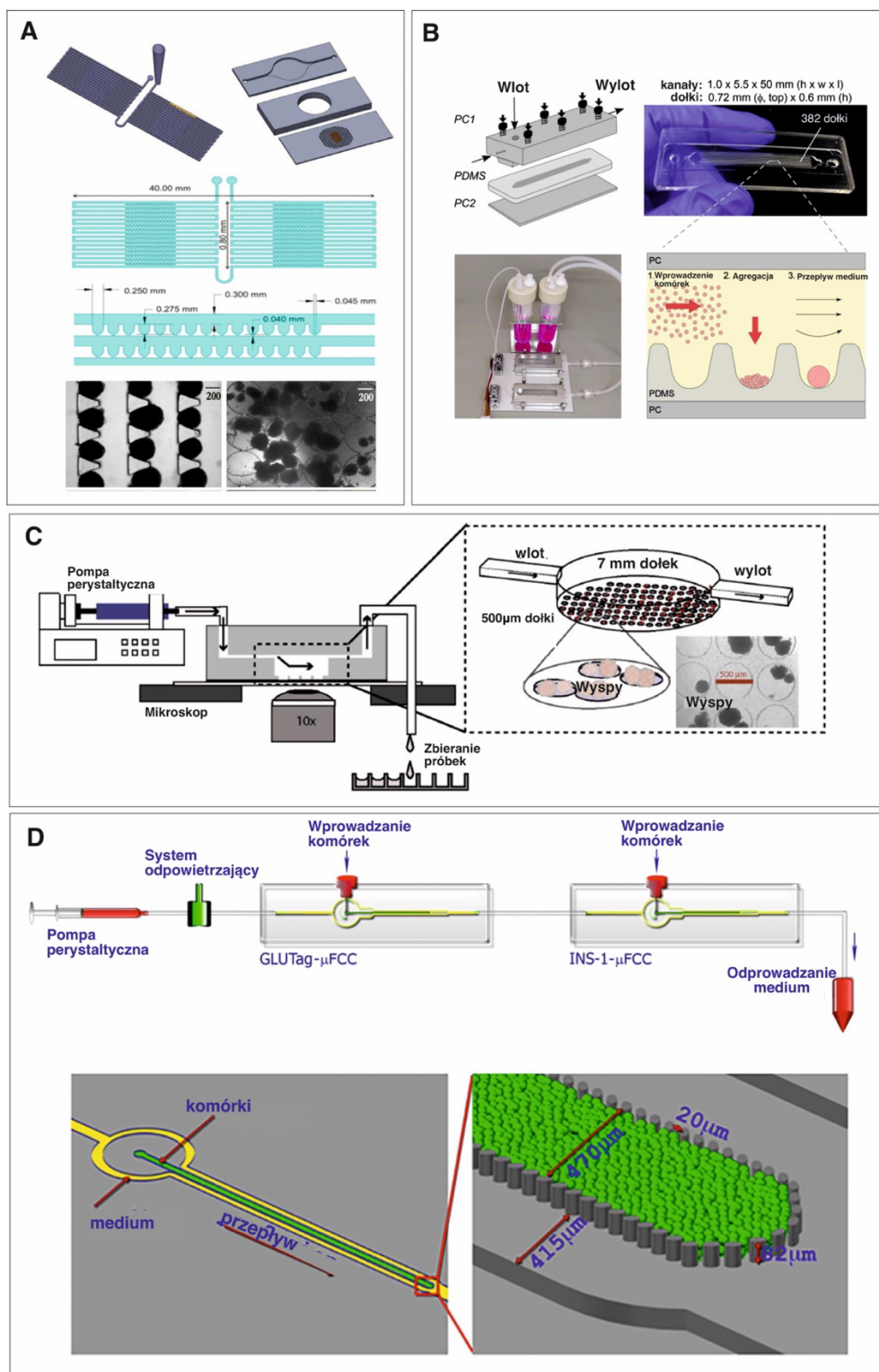
Tak jak wcześniej wspomniano wyspy trzustkowe mogą być hodowane po izolacji z organizmu dawcy natomiast w pewnym momencie hodowli w warunkach statycznych zaczynają tracić swoją strukturę, gęstość i morfologię z powodu ograniczonej dyfuzji składników odżywczych do wnętrza wyspy. Z tego powodu mikrosystemy przepływowe w badaniach wysp trzustkowych są głównie opracowywane w celu segregacji wyizolowanych wysp na podstawie ich funkcjonalności i oceny przydatności w celach transplantacyjnych. Jednym z takich urządzeń jest zaprojektowany przez *Nourmohammadzadeh i współ.*, [114] mikrosystem przepływowy wyposażony w rzędy mikrodołków, które spełniały funkcje pułapek. Układ przedstawiono na rycinie I.9.A. Górna warstwa systemu posiadała wlot ($20\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 500\text{ }\mu\text{m}$) służący do wprowadzania wysp. Środkowa warstwa, która spełnia funkcję komory hodowlanej miała średnicę 7 mm i głębokość 3 mm. Dolna warstwa składa się z szeregu okrągłych dołków (o średnicy $500\text{ }\mu\text{m}$ i głębokości $150\text{ }\mu\text{m}$) służących do unieruchomienia wysp. W takim systemie hodowano 100 wcześniej wyizolowanych szczurzych lub ludzkich wysp trzustkowych. Dzięki zastosowaniu odpowiednich warunków przepływowych przeprowadzono wysokoprzepustową analizę żywotności na poziomie pojedynczej wyspy. Przedstawione badania pokazują możliwość opracowania wysokoprzepustowych platform do segregacji wysp trzustkowych w celach transplantacyjnych.

Kolejnym mikrosystemem przepływowym do analizy wyizolowanych wysp trzustkowych jest skonstruowany z 3 warstw PDMS system zaproponowany przez *Mohammed i współ.* [113]. W swojej geometrii układ ten zawiera warstwę górną z prostokątnym mikrokanalem, warstwę środkową z okrągłym mikrokanalem i warstwę dolną zawierającą kanał z mikrodołkami. Wymiary kanału to $19\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 500\text{ }\mu\text{m}$. Układ przedstawiono na rysunku I.9.C. W takim systemie charakteryzacja unieruchomionych w dołkach wysp trzustkowych odbywa się na zasadzie obrazowania fluorescencyjnego potencjału błony mitochondrialnej i wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia (Ca^{2+}), a także oznaczenia ilościowego wydzielanej insuliny z wykorzystaniem immunoenzymatycznego testu (ELISA). Zaproponowano, że tak zaprojektowane urządzenie pozwala na szybką ocenę jakości tkanki bezpośrednio po izolacji z trzustki dawcy.

Innym podejściem w badaniach w obszarze cukrzycy typu 2 jest opracowanie funkcjonalnych modeli, które mogą zastąpić uszkodzoną tkankę lub posłużyć jako modele

badawcze potencjalnych środków terapeutycznych. Z powodu ograniczonej dostępności ludzkich linii komórek trzustki oraz wyizolowanych ludzkich wysp, takie badania są najczęściej prowadzone z wykorzystaniem komórek macierzystych lub zwierzęcych linii komórek wysp trzustkowych. *Hirano i współl.* [111] opracowali system składający się z jednorazowej, otwartej warstwy PDMS wyposażonej w 382 dołki, która znajdowała się pomiędzy dwoma uszczelniającymi warstwami poliwęglanu (PC). W takim systemie prowadzono hodowlę ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), które uważane są za obiecujące źródło komórek dla medycyny regeneracyjnej ze względu na ich nieokreślony potencjał proliferacyjny i zdolność do różnicowania do funkcjonalnych komórek somatycznych. W każdym z dołków opracowanego mikrosystemu uzyskano jeden agregat komórkowy, który w zależności od gęstości wprowadzanej zawiesiny osiągał średnice w zakresie 224–338 μm . Po 30 dniowym procesie różnicowania w opisanym systemie uzyskano zróżnicowane komórki wykazujące właściwości endokrynne podobne do wysp trzustkowych. Opracowany mikrosystem przepływowy został przedstawiony na rycinie I.9.B.

Z kolei, *Nguyen i współl.* [115] zaproponowali „układ hormonalny na chipie”, który mógłby zostać wykorzystany do obserwowania dynamicznych zmian sekrecji GLP-1 i insuliny z komórek trzustki oraz jelita. Geometria mikrosystemu została przedstawiona na rysunku I.9.D. W konstrukcji mikrosystemu wykorzystano eliptyczne mikropillary (30 μm x 50 μm), które dzielą kanał mikroprzepływowy na kanał główny (o szerokości 470 μm) do hodowli komórek i dwa kanały boczne (każdy o szerokości 415 μm) służące do dostarczania składników odżywczych do hodowli. W odróżnieniu do większości badań prowadzonych na wyizolowanych wyspach, w tak zaprojektowanym systemie prowadzono trójwymiarową hodowlę szczurzych komórek beta trzustki (INS-1E) lub mysich komórek L jelita (GLUTag). W celu zbadania komunikacji pomiędzy komórkami trzustki i jelita i ich wzajemnego wpływu na sekrecję hormonów połączono ze sobą dwa identyczne mikrosystemy przepływowe z których jeden wykorzystano do hodowli komórek INS-1E a drugi do hodowli komórek GLUTag (rycina I.9 D). Przy wykorzystaniu prostych metod obserwacji oraz testu ELISA zbadano sekrecję insuliny i GLP-1 po stymulacji różnymi stężeniami glukozy oraz potwierdzono, że warunki przepływowe wpływają na zwiększenie sekrecji insuliny.



Rycina I. 9 A) Schemat geometrii oraz warstw systemu do pułapkowania wyizolowanych wysp ludzkich oraz mikroskopowe zdjęcia wysp po umieszczeniu w układzie [114]. B) Mikrosystem do pułapkowania i hodowli ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych składający się z rzędów 382 dołków [111]. C) Schemat urządzenia do hodowli i analizy wyizolowanych wysp trzustkowych. Schemat przedstawia przekrój urządzenia oraz stanowiska eksperymentalnego (lewa strona) oraz widok komory wyposażonej w mikrodołki [113]. D) Schemat „układu hormonalnego na chipie”. Wymiary układu mikroprzepływowego. Rzędy mikropilar dzielą

kanał mikroprzepływowy na kanał główny do hodowli komórek oraz dwa kanały boczne do przepływu pożywki hodowlanej [115].

Tak jak przedstawiono powyżej, w większości systemów opisanych w literaturze prowadzona jest hodowla wyizolowanych wysp trzustkowych lub agregatów komórek macierzystych poddanych różnicowaniu. Opracowanie systemów *Lab-on-a-chip*, do hodowli i analizy modeli wysp trzustkowych, które odwzorowują morfologie i skład komórkowy wysp, są w pełni funkcjonalne, unaczynione i otoczone ECM, usprawniłoby badania cukrzycy i przyczyniłoby się do odkrycia terapii przeciwcukrzycowych [82].

4. Podsumowanie i wnioski

Według Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej do 2045 roku liczba osób dorosłych dotkniętych cukrzycą osiągnie 700 milionów. Cukrzyca typu 2, która stanowi 80% wszystkich chorych zdiagnozowanych z cukrzycą, doprowadziła do eskalacji globalnego kryzysu w opiece zdrowotnej i osiągnęła już rozmiary pandemii. Obecne metody leczenia, głównie oparte na środkach farmakologicznych niwelują objawy cukrzycy i poprawiają jakość życia pacjenta, ale do tej pory nie opracowano jeszcze strategii leczenia mogących odwrócić dysfunkcję komórek wysp trzustkowych. Może to wynikać z faktu niewystarczającej wiedzy na temat rozwoju i przyczyn tej choroby oraz trudności w prowadzeniu eksperymentów na ograniczonej puli ludzkich komórek β trzustki.

Z tego względu istnieje potrzeba opracowania nowych multidyscyplinarnych strategii leczenia ukierunkowanych na konkretne etapy patogenezy cukrzycy. W warunkach *in vivo* wyspa trzustkowa jest złożoną, ściśle określoną strukturą zbudowaną z kilku typów komórek, które znajdują się w wyspie w specyficznym stosunku i lokalizacji. Architektura i integralność wysp zmieniają się w warunkach otyłości, insulinooporności i cukrzycy, dlatego też bardzo istotne jest opracowanie modeli badawczych odwzorowujących unikalną strukturę wyspy trzustkowej. W literaturze przedstawionych zostało szereg doniesień mówiących o tym, że otrzymywane tradycyjnymi metodami 2D lub 3D modele komórkowe w warunkach statycznych, mogą nie odzwierciedlać w pełni złożoności tkanki i wykazywać odmienne odpowiedzi na proponowane terapie. Z tego powodu istnieje potrzeba opracowania uniwersalnego trójwymiarowego modelu wyspy trzustkowej.

Rozwiązaniem może być wykorzystanie systemów *Lab-on-a-chip*, które mogą ułatwić zrozumienie czynników wpływających na rozwój choroby i przyspieszyć badania biologiczne

w dziedzinie chorób trzustki. W literaturze opisano kilka przykładów. Liczba doniesień literaturowych dotyczących mikrosystemów przepływowych do hodowli komórek wysp trzustkowych stale rośnie. Natomiast nadal największym wyzwaniem jest opracowanie modelu komórkowego odwzorowującego morfologię wysp trzustkowych (np. unaczyniony model, który składa się ze wszystkich typów komórek budujących wyspę trzustkową). Opracowanie modelu wyspy trzustkowej w połączeniu z odpowiednią metodą analityczną przyczynić się do opracowania w pełni funkcjonalnej platformy do badań nad cukrzycą.

II. Część badawcza

1. Cel pracy

Cukrzyca związana z nieprawidłowościami w funkcjonowaniu komórek wysp trzustkowych jest obecnie jedną z najczęściej występujących chorób przewlekłych. Jej przyczyny nie są do końca poznane, a zasadniczą rolę w rozwoju odgrywają czynniki genetyczne oraz środowiskowe. Cukrzyca jest chorobą nieuleczalną. Aktualnie dostępne terapie mają na celu złagodzenie objawów, niedopuszczenie do wystąpienia powikłań i podniesienie komfortu życia pacjenta.

Z tego względu, istnieje rosnąca potrzeba opracowania modelu komórkowego wysp trzustkowych, który posłuży jako uniwersalny model do badań czynników patogennych i potencjalnych środków terapeutycznych. Najnowsze doniesienia wskazują, że modele opracowywane w warunkach statycznych nie odzwierciedlają w pełni strukturę wysp trzustkowych, a co za tym idzie, często wykazują odmienne (w stosunku do badań *in vivo*) odpowiedzi na stosowane środki terapeutyczne. Dlatego, konieczne jest opracowanie w pełni funkcjonalnego modelu wyspy trzustkowej, który będzie mógł być wykorzystany zarówno w badaniach podstawowych, nakierowanych na zrozumienie mechanizmów biorących udział w rozwoju cukrzycy, jak i do testowania nowych środków terapeutycznych.

Sformułowano hipotezę badawczą, według której zastosowanie odpowiedniej geometrii mikrostruktur, gęstości i stosunku liczby komórek trzustki danego typu, a także warunków przepływowych umożliwi opracowanie sferycznych agregatów o rozmiarze i składzie komórkowym odwzorowującym wyspy trzustkowe znajdujące się w organizmie.

Stąd, głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie trójwymiarowego modelu wyspy trzustkowej złożonego z komórek α i β wysp trzustkowych z wykorzystaniem układu przepływowego typu *Lab-on-a-Chip*.

Szczegółowe cele badawcze prac obejmowały:

1. Odwzorowanie morfologii wyspy trzustkowej z wykorzystaniem standardowych technik hodowli komórkowych.

2. Zaprojektowanie mikrosystemu przepływowego do tworzenia, hodowli oraz analizy pseudowysp (sferycznych agregatów złożonych z komórek α oraz β wysp trzustkowych) z wykorzystaniem pomiarów fluorescencyjnych.
3. Odwzorowanie morfologii wyspy trzustkowej z wykorzystaniem interdyscyplinarnego podejścia opartego na połączeniu mikrotechnologii i wiedzy z zakresu biologii komórki.
4. Określenie użyteczności opracowanego modelu do badań przesiewowych potencjalnych środków terapeutycznych.

2. Materiały i metody badań

2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny

2.1.1 Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych

- Bezolejowy kompresor model JWA-10 (Magnum);
- Eksykator z pompą próżniową (Kartell);
- Generator plazmy tlenowej (diener ATTO);
- Mikrofrezarka CNC Miromilling Machine (Minitech Machinery Co.);
- Lampa UV (Blak-Ray, model B 100 AP);
- Pompa perystaltyczna (Ismatec, model ISM596D);
- Suszarka laboratoryjna (Binder);
- Waga techniczna (Radwag);
- Wiertarka (Dremel Multi, model: 395);
- Skalpel, ostrze chirurgiczne ze stali węglowej (Ribbel);
- Strzykawki 5 ml (B. Braun);
- Probówki typu Eppendorf (Wuxi NEST Biotechnology);
- Laserowy mikroskop konfokalny, LEXT (Olympus).

2.1.1. Hodowla i analiza modelu komórkowego

- Inkubator HERA-Cell 150 (Thermo Scientific);
- Komora laminarna Lamil (Karstulan Metalli OY);
- Wirówka, Universal 32 Tabletop Centrifuge (Hettich);
- Odwrócony mikroskop świetlny (Olympus CKX53)
- Laserowy mikroskop konfokalny (Olympus CLSM);
- Odwrócony mikroskop fluorescencyjny (Olympus IX71);
- Czytnik płytek wielodołkowych (Tecan Infinite 200 Pro);
- Wyrząsarka orbitalna (IKA® MS 3 digital shaker)
- Probówki typu Falcon 15 ml (Genoplast Biochemicals);
- Probówki typu Falcon 50 ml (Wuxi NEST Biotechnology);
- Pipety automatyczne (Gilson);

- Pipety elektroniczne (Mettler-Toledo, Rainin, model: E4XLS);
- Pipety serologiczne (Wuxi NEST Biotechnology);
- Pipety Pasteura (Wuxi NEST Biotechnology);
- Końcówki do pipet (Gilson);
- Probówki typu ependorf (Nest);
- Płytki do liczenia komórek Fast-Read® 102 (Biosigma).

2.2. Materiały

2.2.1. Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych

- Szkiełka nakrywkowe 1,5H, 24x60 mm, $170 \pm 5\mu\text{m}$ (Carlroth);
- Płytki z poli(metakrylanu metylu), PMMA (PMMA Evonik GS);
- Igły (BD Microlance 3);
- Wężyki LMT-55 o średnicy kanału wewnętrznego 0,19 mm i grubości ścianki 0,91 (Tygon);
- Wężyki LMT-55 bez zaczepów o średnicy kanału wewnętrznego 0,19 mm i grubości ścianki 0,91 mm (Tygon);
- Film kapilarny Pro/Cap 200 (Chromaline).

2.2.2. Hodowla i analiza modelu komórkowego

- Butelki do hodowli komórkowej (Falcon);
- Płytki 96-dołkowa U-kształtne (Greiner Bio-One, CELLSTAR®);

2.3. Odczynniki

2.3.1. Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych

- Pre-polimer poli(dimetylosiloksan) – PDMS Sylgard 184 (Dow Corning);
- Odczynnik sieciujący Sylgard 184 (Dow Corning);
- Alkohol etylowy (0,5% v/v, POCh, Poland);
- Azot (MULTAX S.C.);
- Sól sodowa fluoresceiny (Sigma Aldrich).

2.3.2. Hodowla i analiza modelu komórkowego

Linie komórkowe

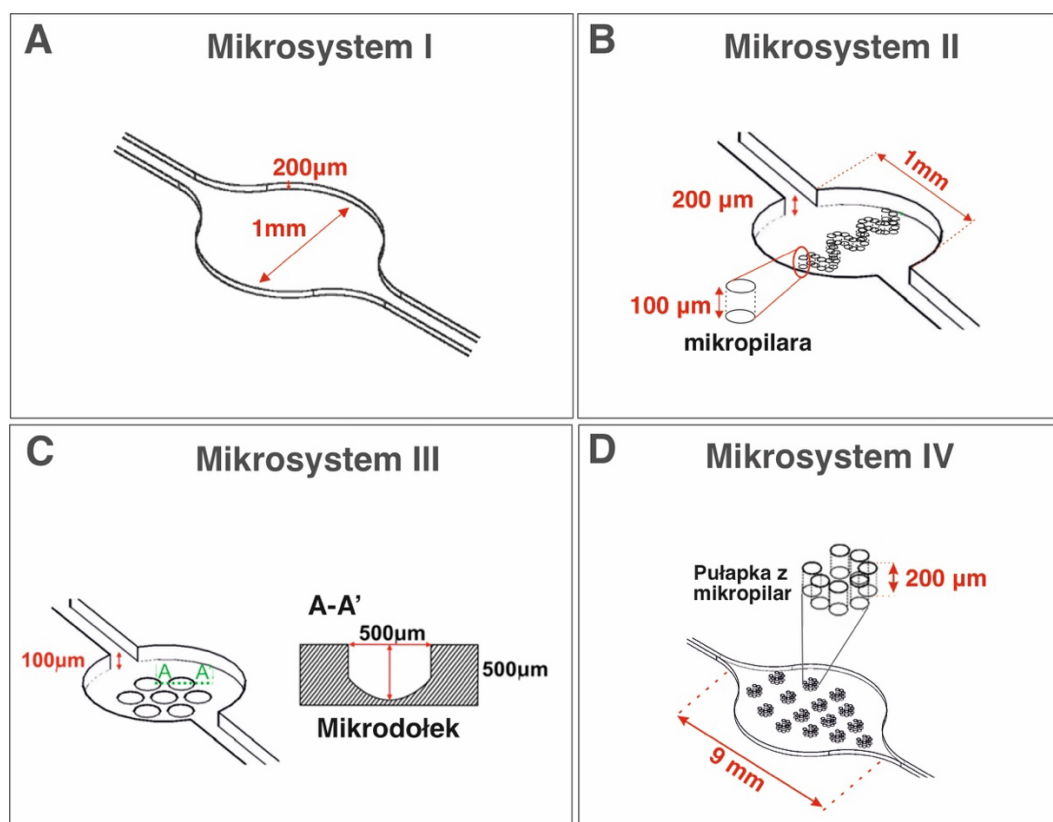
- α -TC1-6 (alpha TC1 clone 6) - mysia linia komórek alfa wysp trzustkowych (*American Type Culture Collection*, ATCC catalog no. CRL-2934);
- INS-1E – szczurza linia komórek β wysp trzustkowych (uzyskane dzięki uprzejmości Dr. Pierre Maechler (Uniwersytet Genewski, Genewa, Szwajcaria).
- Podstawowe medium do hodowli komórek RPMI-1640 (Sigma Aldrich);
- Podstawowe medium do hodowli komórek DMEM z niską zawartością glukozy, ang. *Dulbecco Essential Medium Eagle, low glucose, pyruvate* (Gibco);
- Buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco, ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, DPBS – (Biowest);
- Trypsyna (Gibco);
- 2-merkaptoetanol (Thermo Fisher);
- Kwas hydroksyetylopiperazynoetanosulfonowy HEPES (Gibco);
- L-glutamina (Thermo Fisher);
- Pirogronian sodu (Thermo Fisher);
- Aminokwasy - MEM ang. *Non-essential Amino - Acid Solution* (Gibco);
- Płodowa surowica bydlęca, ang. *Fetal Bovine Serum*, FBS (Gibco);
- Penicillina/Streptomycyna (Sigma-Aldrich);
- Dimetylosulfotlenek (DMSO) (Sigma);
- Pluronic (Sigma-Aldrich);
- Albumina surowicy bydlęcej, ang. *Bovine Serum Albumin* BSA (Thermo Fisher);
- Jodek propidyny (PI) (Sigma-Aldrich);
- Acetometoksy pochodna kalceiny (kalceina-AM) (Sigma-Aldrich);
- Alamar Blue (Bio-Rad);
- Dioctan 5-chlorometylofluoresceiny - CellTracker™ Green CMFDA Dye (Thermo Fisher);
- D-(+)-Glukoza (Sigma);
- Bufor Krebsa-Ringera (składający się z 135 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 5 mM NaHCO₃, 0,5 mM MgCl₂x6H₂O, 1,5 mM CaCl₂x2H₂O, 10 mM HEPES, 0,1% BSA, 0,5 mM NaH₂PO₄xH₂O, przygotowany z odczynników firmy CHEMPUR);

- Paraformaldehyd (Thermo Fisher);
- Triton X-100 (Thermo Fisher);
- Mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko insulinie (Cell Signaling Technology);
- Królicze monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko glukagonowi (Abcam);
- Przeciwciało anty-królicze IgG sprzężone z Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher);
- Przeciwciało anty-mysie IgG sprzężone z Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher);
- Hoechst 33258 (Sigma Aldrich);
- kwas 5-(palmitoiloksy)oktadekanowy - 5-PAHSA (Cayman Chemical);
- kwas 9-[(1-oksoheksadecyl)oksy]-oktadekanowy - 9-PAHSA (Cayman Chemical);
- Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific).

2.4. Metody badań

2.4.1. Projekt geometrii mikrosystemów przepływowych

W badaniach wykorzystano cztery mikrosystemy przepływowe o różnych geometriach. Trzy z nich zostały wcześniej opracowane w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Czwarty mikrosystem został zaprojektowany w ramach niniejszej pracy, na podstawie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem systemów I, II oraz III. Na rycinie II.1 przedstawiono geometrię wykorzystywanych mikrosystemów przepływowych.



Rycina II. 1 Geometria komory hodowlanej wykorzystywanych w badaniach mikrosystemów przepływowych. A) Mikrosystem I zawierający w swojej geometrii jedną owalną komorę hodowlaną. B) Mikrosystem II wyposażony w jedną owalną komorę hodowlaną zawierającą rząd sinusoidalnie ułożonych mikropilar. C) Mikrosystem III zawierający w swojej geometrii owalną komorę hodowlaną wyposażoną w 7 U-kształtnych dołków. D) Jedna z dwóch identycznych komór hodowlanych mikrosystemu IV. Komora wyposażona w 15 mikropułapek.

Geometrie wszystkich wykorzystanych w badaniach mikrosystemów przepływowych zaprojektowane zostały przy użyciu oprogramowania do projektowania 3D CAD SolidWorks, Dassault Systems. Następnie, na podstawie projektu wykonano płytki z odwzorowanymi geometriami mikrostruktur (nazywanymi w dalszej części pracy pieczętkami).

2.4.2. Wytwarzanie mikrosystemów I i II

Pieczątkę z odwzorowaną geometrią mikrosystemu I oraz II wykonano przy użyciu metody fotolitografii. W pierwszym etapie projekt geometrii wydrukowano na transparentnej folii otrzymując w ten sposób negatywową maskę (z przezroczystym wzorem geometrii). Maskę nałożono na warstwę filmu kapilarnego o grubości 200 μm przyklejonego do szklanej płytki. Całość naświetlano przez 90 sekund światłem ultrafioletowym (UV). Pod wpływem promieniowania UV film kapilarny w miejscach z przezroczystym wzorem geometrii został utwardzony. Pozostałe, nienaświetlone części filmu kapilarnego odmyto strumieniem bieżącej wody i osuszono sprężonym powietrzem.

W dalszych etapach prac, w celu odwzorowania geometrii znajdującej się na wytworzonej pieczętce zastosowano metodę odlewu. Na oczyszczonej i osuszonej powierzchni pieczętki wylano przygotowaną w stosunku 9:1 (stosunek 9:1 pozwala na uzyskanie hydrofobowej powierzchni) i odgazowaną mieszaninę pre-polimeru PDMS oraz czynnika sieciującego. W celu usieciowania polimeru całość umieszczono w suszarce (1,5 h, 75 °C). Po tym czasie oddzielono usieciowany PDMS od pieczętki, który zamrożono w ciekłym azocie i wywiercono otwory wlotowe i wylotowe o średnicach 1,9 mm. Przy użyciu detergentu oraz wody destylowanej umyto warstwę PDMS z odwzorowaną geometrią i osuszono sprężonym powietrzem. Jako warstwę uszczelniającą kanałów, wykorzystano przygotowaną w ten sam sposób warstwę PDMS (płaska powierzchnia, bez wzoru mikrostruktur) lub szkiełko nakrywkowe o grubości $170 \pm 5 \mu\text{m}$ (do badań z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego). W ostatnim etapie, obie warstwy PDMS połączono z wykorzystaniem plazmy tlenowej (moc 80% maksymalnej mocy generatora (200 W), czas ekspozycji warstw PDMS na plazmę wynosił 30 jednostek czasu określonych przez producenta [116]), a następnie w wywierconych otworach umieszczono wężyki wlotowe oraz wylotowe LMT-55.

2.4.3. Wytwarzanie mikrosystemu III

Pieczętkę zawierającą geometrię mikrosystemu III wykonano za pomocą metody mikrofrezowania w płytce z PMMA o wymiarach 100 mm x 100 mm i grubości 2 mm. W pierwszym etapie zaprojektowany wzór przetłumaczono na język maszynowy za pomocą modułu SolidCAM. Następnie, frezowanie mikrokanalów przeprowadzono w czterech cyklach, pomiędzy którymi następowała zmiana frezu. W pierwszym cyklu wykonano mikrokanały o kwadratowym przekroju poprzecznym i wymiarach 100 μm x 100 μm przy pomocy frezu czołowo-walcowego o średnicy 100 μm . W celu zapewnienia jak najlepszej jakości frezowanych mikrostruktur posuw narzędzia w płaszczyźnie XY ustawiono na 80 mm/min natomiast prędkość obrotową frezu ustawiono na 12000 obr/min. W kolejnym cyklu wyfrezowano dwanaście okrągłych mikrokomór płaskodennych o średnicy 2,7 mm i głębokości 100 μm . Cykl ten zrealizowano przy pomocy frezu o średnicy 500 μm i z zaprogramowanym posuwem w płaszczyźnie XY o wartości 500 mm/min i prędkości obrotowej narzędzia 12000 obr/min. W każdej spośród tych dwunastu mikrokomór wykonano po siedem zgłębień o kulistym dnie o średnicy 500 μm i maksymalnej głębokości 500 μm , stanowiących mikrodołki hodowlane. Zgłębienia te wykonano przy pomocy frezu kulistego o średnicy 500 μm . W ostatnim cyklu przycięto formę do wymiaru 65 mm x 20 mm przy pomocy frezu o średnicy 1 mm.

W celu odwzorowania geometrii mikrosystemu III wykorzystano metodę podwójnego odlewu. W tej metodzie wykorzystywane są dwie formy: pierwotna i wtórna. Forma pierwotna to wytworzona na drodze mikrofrezowania pieczętkę zawierająca sieć mikrokanalów. Natomiast forma wtórna jest warstwą polimeru z odwzorowaną geometrią i stanowi negatyw zaprojektowanego wzoru geometrii. W celu uzyskania formy wtórnej na pieczętkę wylano przygotowaną w stosunku 9:1, odgazowaną mieszaninę pre-polimeru PDMS oraz czynnika sieciującego. Polimer sieciowano 1,5 h w 75°C. Następnie, oddzielono usieciowany PDMS od pieczętki otrzymując w ten sposób formę wtórną z wypukłymi mikrostrukturami. Formę wtórną poddano starzeniu cieplnemu w 100 °C przez 48 h. Po tym czasie, na formę wtórną ponownie wylano przygotowaną w stosunku 9:1 i odgazowaną mieszaninę pre-polimeru PDMS oraz czynnika sieciującego. Po 1,5 h sieciowania polimeru w 75 °C oddzielono formę wtórną od usieciowanej warstwy PDMS z odwzorowaną geometrią mikrosystemu. Warstwę PDMS zamrożono w ciekłym azocie i wywiercono otwory wlotowe i wylotowe o średnicach 1,9 mm. Przy użyciu detergentu oraz wody destylowanej oczyszczono warstwę PDMS i osuszono sprężonym powietrzem. Jako warstwę uszczelniającą wykorzystywano przygotowaną w ten

sam sposób płaską warstwę PDMS. Obie warstwy połączono z wykorzystaniem plazmy tlenowej (moc 80% maksymalnej mocy generatora (200 W), czas ekspozycji warstw PDMS na plazmę wynosił 30 jednostek czasu określonych przez producenta [116]). Następnie w wywierconych wcześniej otworach umieszczono wężyki LMT-55.

2.4.4. Wytwarzanie mikrosystemu IV

Pieczątkę zawierającą geometrię mikrosystemu IV (tak jak w przypadku mikrosystemu III) wykonano z użyciem metody mikrofrezowania. Zaprojektowany i przetłumaczony wzór odwzorowano w płytce z poli(metakrylanu metylu) (PMMA) (1 mm x 1 mm x 2 mm) przy użyciu metody frezowania. Frezowanie wykonano w kilku etapach, przy użyciu mikrofrezarki CNC firmy Minitex Machinery Corp. Mini-Mill model/3. Do frezowania pieczętek wykorzystano frezy trzpieniowe Kyocera Series 1610 o średnicach 500 μm , 150 μm i 1 mm. W pierwszym etapie, z powierzchni PMMA za pomocą frezu o średnicy 500 μm obracającego się z prędkością 12000 obr./min usunięto górną warstwę PMMA grubości 100 μm . Frezowanie prowadzono z prędkością posuwu 500 mm/min i prędkością wglębną 250 mm/min. Frezowanie odbywało się w dwóch etapach, każdorazowo zagłębiając narzędzie w 50 μm . Ten etap miał na celu wyrównanie nierówności obrabianej powierzchni. W kolejnym etapie, za pomocą frezu o średnicy 500 μm obracającego się z prędkością 12000 obr./min wyfrezowano odpowiednie mikrokanały z komorami. Frezowanie prowadzono z posuwem 300 mm/min i szybkością penetracji 150 mm/min. Frezowanie odbywało się w czterech krokach, każdorazowo zagłębiając się na 50 μm . Następnie, frezem o średnicy 150 μm z szybkością penetracji 100 mm/min i z krokiem 15 μm w wykonanych komorach wyfrezowano mikropilary. W końcowym etapie pieczętki ze wzorem zostały wycięte frezem 1mm do wymiarów 62 x 26 mm. Następnie, w celu replikacji znajdującego się na pieczętce wzoru mikrosystemu IV wykorzystano metodę odlewu (opisaną w punkcie 2.4.2 *Wytwarzanie mikrosystemów I i II*).

2.4.5. Przygotowanie mikrosystemów przepływowych do badań

Wszystkie roztwory wykorzystywane w badaniach doprowadzono do komór hodowlanych mikrosystemów przepływowych przy użyciu pomp perystaltycznych. Przed rozpoczęciem hodowli komórkowej mikroukłady poddano procesowi sterylizacji. W tym celu, mikroukłady poddano działaniu promieniowania ultrafioletowego (lampa UV) przez 30 min, a następnie do komór hodowlanych przy pomocy wężyków wlotowych wprowadzono roztwór 70% (v/v)

etanolu (3 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min). Po procesie sterylizacji, do komór hodowlanych wprowadzano świeże medium hodowlane (medium do hodowli komórek INS-1E (monokultura) lub medium do hodowli komórek INS-1E oraz medium do hodowli komórek α -TC1-6 zmieszane w stosunku objętościowym 1:1 (kokultura)) i umieszczono na minimum 2 h w inkubatorze (37 °C, 5% CO₂).

2.4.6. Hodowla komórek

We wszystkich badaniach z udziałem materiału biologicznego wykorzystano dwie komercyjnie dostępne linie komórkowe:

- α -TC1-6 (alpha TC1 clone 6) - mysia linia komórek alfa wysp trzustkowych
- INS-1E - szczurza linia komórek β wysp trzustkowych

Do hodowli poszczególnych linii komórkowych wykorzystano media hodowlane o następującym składzie:

- **Medium hodowlane komórek INS-1E:**

RPMI-1640 wzbogacone o: 5% (v/v) termicznie inaktywowany FBS (w temperaturze 56 °C przez 30 min), 1 mM pirogronian sodu, 2 mM, L-glutaminę, 10 mM HEPES, 50 μ M 2 merkaptoetanol oraz antybiotyki: 100 μ g/ml streptomycynę i 100 IU/ml penicylinę.

- **Medium hodowlane do komórek α -TC1-6:**

DMEM z niską zawartością glukozy, wzbogacone o 10% (v/v) termicznie inaktywowany FBS, 15 mM HEPES; 0,1 mM endogenne aminokwasy, glukozę (2 mg/ml); 0,02% BSA, 100 μ g/ml streptomycynę i 100 IU/ml penicylinę.

Wykorzystywane w badaniach linie komórkowe hodowano w standardowych butelkach do hodowli komórek adherentnych (25 cm²). Świeże medium hodowlane wymieniano każdego dnia hodowli. W momencie osiągnięcia przez komórki 80-90% konfluencji, przeprowadzano pasaż komórek według następującej procedury. Z butelki hodowlanej usuwano medium hodowlane i delikatnie przemywano komórki 1 ml DBPS. Następnie, w celu odklejenia komórek od powierzchni butelki hodowlanej do butelki dodawano 1,5 ml trypsyny (0,25 %)

i inkubowano przez 3-5 min. (37°C, 5% CO₂). Po odklejeniu komórek, w celu neutralizacji trypsyny do butelki dodawano 1,5 ml świeżego medium hodowlanego, przemywano kilkakrotnie i całość zawiesiny komórkowej przeniesiono do probówki typu falkon. Zawiesinę wirowano przez 5 min z prędkością obrotową 1200 RPM. Następnie, z nad osadu komórkowego zlewano supernatant, dodawano 1 ml świeżego medium i 0,2 – 0,3 ml zawiesiny przenoszono do nowych butelek hodowlanych.

2.4.7. Hodowla komórek na U-kształtnych płytkach wielodołkowych

W celu przeprowadzenia hodowli agregatów komórkowych w warunkach statycznych (bez przepływu) prowadzono hodowlę z wykorzystaniem wielodołkowych płytek o U-kształtnym dnie. Wykorzystanie takich płytek miało na celu ułatwienie agregacji komórek poprzez ich grawitacyjne opadanie na dno dołka. W tym etapie badań prowadzono hodowlę dwóch modeli badawczych: monokultury złożonej z komórek INS-1E oraz kokultury złożonej z komórek INS-1E oraz α -TC1-6 zmieszanych w odpowiednim stosunku gęstości (1:2, 1:3, 1:4). Dodatkowo, w celu określenia jak najlepszych warunków agregacji oraz hodowli komórek badania prowadzono w dwóch wariantach:

- Po 24 h modyfikacji powierzchni płytki U-kształtnej roztworem Pluronic.
- Bez modyfikacji powierzchni płytki U-kształtnej.

W celu przygotowania zawiesiny komórkowej do badań prowadzonych z wykorzystaniem płytek wielodołkowych przeprowadzono etap pasażu komórek. Po etapie wirowania z nad osadu zlano supernatant, a do otrzymanego peletu dodano 1 ml medium hodowlanego. Gęstość zawiesiny komórkowej określano przy pomocy płytki do liczenia komórek Fast-Read® 102. Następnie, przy użyciu medium hodowlanego zawiesinę komórkową rozcieńczano w celu uzyskania pożądanej gęstości komórek, która wynosiła odpowiednio: $8,8 \times 10^5$ komórek/ml, 1×10^5 komórek/ml, 2×10^4 komórek/ml.

Monokultura – komórki β (INS-1E)

W przypadku prowadzenia eksperymentów z wykorzystaniem U-kształtnych płytek 96-dołkowych przygotowano zawiesinę komórkową według wcześniej opisanej procedury (2.2.1. *Przygotowanie zawiesiny komórkowej do badań*). Następnie, do każdego z dołków dodano 100 μ l zawiesiny o odpowiedniej gęstości komórek ($8,8 \times 10^5$ komórek/ml, 1×10^5 komórek/ml, 2×10^4 komórek/ml) i inkubowano przez noc w celu uzyskania agregacji (37°C, 5% CO₂). W przypadku testów prowadzonych na 96-dołkowych płytkach U-kształtnych

modyfikowanych roztworem Pluronic, 24 h przed rozpoczęciem hodowli komórkowej powierzchnie dołków pokrywano 100 μ l 1% roztworem Pluronic. Roztwór Pluronic o stężeniu 1% przygotowano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości Pluronic (w formie proszku) w wodzie dejonizowanej. Po 24 h zebrano roztwór Pluronic z dołków i przepłukano je dwukrotnie roztworem buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (DPBS). Następnie, do każdego z dołków dodano 100 μ l zawiesiny komórkowej o odpowiedniej gęstości ($8,8 \times 10^5$ komórek/ml, 1×10^5 komórek/ml, 2×10^4 komórek/ml) i inkubowano przez kolejne 24 h w celu uzyskania agregacji komórek (37°C , 5% CO_2). Świeże medium hodowlane dostarczano każdego dnia hodowli

Kokultura – komórki β (INS-1E) oraz α (α -TC1-6)

W celu odzwierciedlenia składu i lokalizacji komórek w pseudowyspie prowadzono wspólną hodowlę komórek α oraz β . W pierwszym etapie, tak jak w przypadku monokultury płytki o U-kształtnym dnie poddano 24 h modyfikacji 1% roztworem Pluronic. Następnie, przygotowano (zgodnie z punktem 2.2.1. *Przygotowanie zawiesiny komórkowej do badań*) zawiesiny komórek INS-1E oraz α -TC1-6 o gęstości 1×10^5 komórek/ml, które zmieszano zawiesinę ze sobą w trzech różnych stosunkach gęstości: 1:2, 1:3, 1:4. Tak przygotowaną zawiesinę komórek dodano (po 100 μ l) do dołków płytki o U-kształtnym dnie i inkubowano przez 24 h w celu uzyskania agregacji komórek (37°C , 5% CO_2). Świeże medium hodowlane (mieszanina medium hodowlanego do komórek INS-1E oraz α -TC1-6 w stosunku objętościowym 1:1) dostarczano każdego dnia prowadzonej hodowli.

2.4.8. Hodowla komórek w mikrosystemach przepływowych

2.4.8.1. Mikrosystemy przepływowe I-III

W celu zaprojektowania geometrii systemu do hodowli modelu pseudowyspy prowadzono pracę wstępną z wykorzystaniem monokultury komórek INS-1E oraz trzech różnych mikrosystemów przepływowych opisanych w punkcie 2.2.1 (*Projekt geometrii mikrosystemów przepływowych*). W pierwszym etapie przygotowano (zgodnie z punktem 2.2.1. *Przygotowanie zawiesiny komórkowej do badań*) zawiesinę komórkową o gęstości 2×10^6 komórek/ml, którą następnie wprowadzono do przygotowanego (zgodnie z punktem 2.2.4. *Przygotowanie mikrosystemu przepływowego do badań*) mikrosystemu przepływowego (5 min, prędkość przepływu: 15 μ l/min). W czasie całego procesu wprowadzania komórek

obserwowano komory hodowlane przy użyciu odwróconego mikroskopu świetlnego. W celu uzyskania agregacji komórek mikroukład z wprowadzonymi komórkami inkubowano przez 24 h w 37°C, 5% CO₂.

2.4.8.2. Mikrosystem przepływowy IV

W mikrosystemie IV prowadzono hodowlę zarówno monokultury komórek INS-1E jak i kokultury komórek INS-1E oraz α -TC1-6. W przypadku monokultury etap wprowadzania zawiesiny komórkowej wykonano tak jak opisano powyżej (w punkcie 2.2.7.1. *Mikrosystemy I-III*). Procedurę wprowadzania komórek wykonywano do momentu wypełnienia wszystkich mikropułapek komórkami. Po wypełnieniu mikropułapek zatrzymywano przepływ, a następnie przepłukano mikrosystem medium hodowlanym (5 min, prędkość przepływu: 15 μ l/min), w celu wypłukania z systemu komórek nie znajdujących się w pułapkach. Mikroukład z wprowadzonymi komórkami inkubowano przez 24 h w 37°C, 5% CO₂ (w celu uzyskania agregacji).

W przypadku prowadzenia badań z wykorzystaniem kokultury, przygotowano (zgodnie z punktem 2.2.1 *Przygotowanie zawiesiny komórkowej do badań*) zawiesinę komórek INS-1E oraz α -TC1-6 o gęstości 2×10^6 komórek/ml zmieszanych w stosunku gęstości 1:2. Wprowadzanie komórek wykonano dokładnie tak jak opisano powyżej.

2.4.9. Metody oceny proliferacji, żywotności i aktywności metabolicznej komórek

Oznaczanie zmian średnicy agregatów – analiza agregacji

Obserwacje morfologii otrzymanych agregatów komórek wysp trzustkowych prowadzono przez cały czas trwania hodowli z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu świetlnego (Olympus CKX53). W celu określenia prawidłowego procesu agregacji pomiary średnicy agregatów, pola powierzchni oraz sferyczności prowadzono przy pomocy programu cellSens Dimension (Olympus) na podstawie zdjęć uzyskanych w kolejnych 5 dniach trwania hodowli.

Test proliferacji AlamarBlue

AlamarBlue to odczynnik stosowany do oznaczania proliferacji komórek. Zawiera on nietoksyczny, nie wykazujący fluorescencji wskaźnik oksydacyjno-redukcyjny (REDOX) - resazuryne, który w odpowiedzi na redukcję metabolizmu komórkowego przekształcony

zostaje do rezorufiny, która jest wskaźnikiem silnie fluorescencyjnym. Intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do aktywności metabolicznej komórek.

- *Wielodołkowe płytki U-kształtne*

W celu oceny proliferacji komórek wykonano test z wykorzystaniem odczynnika AlamarBlue. Roztwór AlamarBlue o stężeniu 10% obj. przygotowano w medium hodowlanym do komórek INS-1E (w przypadku badań prowadzonych z wykorzystaniem monokultury komórek β) lub mieszaninie medium hodowlanego do komórek INS-1E oraz α -TC1-6 w stosunku 1:1 obj. (w przypadku prowadzenia eksperymentów z wykorzystaniem kokultury komórek). Następnie, delikatnie usuwano medium hodowlane z dołków płytki wielodołkowej i do każdego z dołków dodano po 100 μ l roztworu AlamarBlue. Płytkę z roztworem inkubowano przez 50 min w inkubatorze (37°C, 5% CO₂). Intensywność fluorescencji mierzono z wykorzystaniem czytnika płytek wielodołkowych przy długości fali wzbudzenia 552 nm i długości fali emisji 583 nm. Po wykonaniu pomiaru, z dołków płytki usuwano roztwór AlamarBlue i dodano po 100 μ l świeżego medium hodowlanego. Test prowadzono przez 5 dni trwania hodowli, dokonując pomiarów co 24 h.

- *Mikrosystem IV*

Roztwór AlamarBlue o stężeniu 10% obj. przygotowano tak jak w przypadku badań z wykorzystaniem wielodołkowych płytek U-kształtnych. Następnie, roztwór wprowadzono do mikrosystemu przepływowego (3 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min) i inkubowano przez 50 min (37°C, 5% CO₂). Ze względu na ułożenie komór w geometrii systemu zgodnie z dołkami hodowanymi na standardowej płytce wielodołkowej, pomiary prowadzono bezpośrednio w systemie z wykorzystaniem czytnika płytek wielodołkowych. Uchwyt dla mikrosystemu stanowiło wieczko płytki 96-cio dołkowej. Po wykonaniu pomiaru do mikrosystemu wprowadzono świeże medium hodowlane (3 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min) i inkubowano przez kolejne 24 h (37°C, 5% CO₂).

Barwienie różnicowe

W celu określenia liczby komórek żywych i martwych w uzyskanych agregatach komórkowych wykonano barwienie różnicowe z wykorzystaniem kalceiny-AM i jodku propidyny. Barwienie wykonano pierwszego dnia hodowli (po 24 h od wysiania komórek na

dołek/wprowadzenia komórek do mikrosystemu) oraz ostatniego dnia (po 96 h od wysiania komórek na dołek/wprowadzenia komórek do mikrosystemu).

Acetoksymetylowy ester kalceiny to przenikający przez błonę komórkową związek lipofilowy wykorzystywany do oznaczania komórek żywych. Związek ten jest hydrolizowany wewnątrz komórki, wskutek czego powstaje nieprzepuszczalna dla błon komórkowych kalceina, która po wzbudzeniu emituje zielone światło fluorescencji. Intensywność fluorescencji kalceiny mierzono przy długości fali wzbudzenia 490 nm i długość fali emisji 515 nm. Drugi z wykorzystanych barwników - jodek propidyny to czerwony, nieprzenikający przez nienaruszoną błonę komórkową barwnik fluorescencyjny. Barwnik ten wykazuje zdolność do penetracji wyłącznie martwych lub uszkodzonych komórek, gdzie wiąże się z DNA i RNA poprzez interkalację między zasadami. Intensywność fluorescencji jodku propidyny mierzono przy długości fali wzbudzenia 535 nm i długość fali emisji 617 nm.

- *Płytki U-kształtne*

Roztwór kalceiny-AM (CAM) o stężeniu końcowym 4 μ M i jodku propidyny (PI) o stężeniu końcowym 40 μ M przygotowywano odpowiednio w pożywce hodowlanej INS-1E (dla monokultury) lub mieszaninie pożywki hodowlanej INS-1E oraz α -TC1-6 w stosunku objętościowym 1:1 (dla kokultury). Następnie, z dołków hodowlanych usuwano medium hodowlane i dodawano po 100 μ l roztworu mieszaniny kalceiny-AM i jodku propidyny. Płytki inkubowano w inkubatorze (37°C, 5% CO₂) przez 20 min. Po tym czasie, w celu analizy wybarwione agregaty komórkowe przenoszono z płytki wielodołkowej na szkiełko nakrywkowe (o grubości 170 $\pm$ 5 μ m). Obserwacje prowadzono z wykorzystaniem skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego Fluoview FV10i. Dzięki skanowaniu wybarwionych agregatów w 3 wymiarach (X,Y,Z) zwizualizowano przekrój poprzeczny hodowli. Ocenę żywotności komórek dokonano wykonując analizę profilu intensywności fluorescencji przy użyciu oprogramowania cellSens Dimension (Olympus).

- *Mikrosystemy przepływowe I-IV*

Roztwór CAM i PI przygotowano zgodnie z procedurą opisaną powyżej (*Płytki U-kształtne*). Roztwór wprowadzono do mikrosystemów przepływowych (3 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min) i inkubowano w 37°C z 5% CO₂ przez 20 min. Obserwacje prowadzono tak jak w przypadku badań prowadzonych z wykorzystaniem płytek U-kształtnych z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Fluoview FV10i. W przypadku badań prowadzonych z wykorzystaniem mikrosystemów przepływowych I, II oraz III barwienie

różnicowe wykonywano po 24 h od wprowadzenia komórek do systemów. Natomiast w przypadku mikrosystemu IV, barwienie różnicowe wykonywano po 24 h oraz 96 h od wprowadzenia komórek do systemu.

Test przepływu komórek i ich pułapkowania w mikrosystemie przepływowym IV

W celu przeprowadzenia wizualizacji przepływu komórek i ich zatrzymywania w pułapkach zaprojektowanych w geometrii mikrosystemu IV wykorzystano barwnik CellTracker™ Green CMFDA (dioctan 5-chlorometylofluoresceiny). CellTracker™ Green CMFDA jest fluorescencyjnym barwnikiem wykorzystywanym w celu monitorowania przemieszczania się i lokalizacji komórek. Wykazuje on zdolność do swobodnego przenikania przez błony komórkowe żywych komórek. Barwnik ten jest stabilny, nietoksyczny i fluorescencyjny w fizjologicznym pH.

Przed przystąpieniem do testów przygotowano roztwór wyjściowy CellTracker™ Green CMFDA Dye o stężeniu 10 mM, rozpuszczając zawartość fiolki (50 µg) w dimetylosulfotlenku (DMSO). Z tak otrzymanego roztworu wyjściowego przygotowano (w medium hodowlanym bez czerwieni fenolowej oraz bez FBS) roztwór o stężeniu 10 µM. W celu wybarwienia komórek, z naczynia hodowlanego usunięto pożywkę hodowlaną i dodano 2 ml roztworu CellTracker™ Green CMFDA Dye o stężeniu 10 µM i inkubowano przez 30 min w 37°C, 5% CO₂. Po tym czasie, przygotowano zawiesinę komórkową o gęstości 2 x 10⁶ komórek/ml według wcześniej opisanej procedury (2.2.1. *Przygotowanie zawiesiny komórkowej do badań*). W celu określenia rozkładu przepływu i pułapkowania komórek zawiesinę komórkową wprowadzono do mikroukładu przepływowego przy 5 różnych prędkościach przepływu (10 µl/min, 15 µl/min, 20 µl/min, 25 µl/min, 30 µl/min). Przez cały czas wprowadzania zawiesiny komórkowej prowadzono obserwację z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego zintegrowanego z kamerą CCD (Olympus IX-71). Zieloną fluorescencję wzbudzano światłem o długości fali 492 nm.

2.4.10. Procedury oznaczania aktywności agregatów komórkowych

Pomiar zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia

Zmiany wewnątrzkomórkowej zawartości jonów wapnia (Ca^{2+}) oznaczono za pomocą barwnika Fluo-4 AM, który jest wskaźnikiem wykazującym wzrost intensywności fluorescencji po związaniu jonów Ca^{2+} .

W pierwszym etapie prac przygotowano roztwór wyjściowy o stężeniu 5 mM rozpuszczając zawartość fiołki (50 μg) zawierającej barwnik Fluo-4 AM w dimetylosulfotlenku (DMSO). Następnie, tak otrzymany roztwór wyjściowy rozcieńczono w medium hodowlanym do hodowli komórek INS-1E do stężenia końcowego 5 μM . Dynamiczne zmiany cytoplazmatycznego stężenia jonów Ca^{2+} określono zarówno w warunkach przepływowych (w mikrosystemie przepływowym) jak i w warunkach statycznych (w mikrosystemie przepływowym po zatrzymaniu przepływu oraz na płytkach U-kształtnych). Doświadczenie przeprowadzono po 24 godzinach od wysiania komórek na płytkę/wprowadzenia komórek do systemu w dwóch wariantach:

- po inkubacji uzyskanych agregatów komórek INS-1E z roztworem glukozy o stężeniu 30 mM (przygotowanym w buforze Krebsa-Ringera),
- po inkubacji komórek z buforem Krebsa-Ringera.

Analizę pojedynczego agregatu prowadzono przez 60 min od momentu podania czynnika stymulującego (glukoza) lub warunków kontrolnych (bufor Krebsa-Ringera) z zastosowaniem odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego sprzężonego z kamerą CCD (Olympus IX-71) oraz z wykorzystaniem programu CellSens Dimension (Olympus).

Zbieranie danych do analizy opierało się na wykonywaniu zdjęć przez 60 min w następującej sekwencji:

- przez pierwsze 5 min od podania czynnika stymulującego w odstępach czasowych wynoszących 0,5 min,
- przez kolejnych 20 min w odstępach czasowych wynoszących 1 min
- przez kolejnych 35 min w odstępach czasowych wynoszących 10 min.

- *Płytki U-kształtne*

Badania rozpoczęto od usunięcia medium hodowlanego z analizowanych dołków zawierających agregaty komórek INS-1E. Następnie, do dołków dodano po 100 μ l roztworu Fluo-4 AM i inkubowano przez 45 min w 37°C, 5% CO₂. Po tym czasie, płytkę umieszczono pod mikroskopem fluorescencyjnym, zebrano roztwór Fluo-4 AM i przemyto dołki buforem Krebsa-Ringera. Na tym etapie wykonano pierwsze zdjęcie (czas 0, brak stymulacji roztworem zawierającym glukozę). Następnie, z dołków usuwano bufor Krebsa-Ringera i dodano roztwór glukozy o stężeniu 30 mM (próba badana) lub świeżą porcję buforu Krebsa-Ringera (kontrola). Przez kolejne 60 min wykonywano zdjęcia tak jak opisano powyżej w tym podrozdziale.

- *Mikrosystem przepływowy IV*

Badania rozpoczęto od wprowadzenia przygotowanego roztworu Fluo-4 AM do mikrosystemu zawierającego agregaty komórek INS-1E (3 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min). Następnie, mikroukłady inkubowano przez 45 min w 37°C, 5% CO₂. Po tym czasie, mikrosystemy umieszczono pod mikroskopem fluorescencyjnym i przepłukano buforem Krebsa-Ringera (3 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min). Po przepłukaniu wykonano pierwsze zdjęcie (czas 0, brak stymulacji roztworami zawierającymi glukozę). Następnie, do mikrosystemów wprowadzano roztwór glukozy o stężeniu 30 mM lub świeżą porcję buforu Krebsa-Ringera. Na tym etapie obserwację prowadzono w dwóch wariantach:

- Warunki statyczne - po wprowadzeniu roztworu glukozy zatrzymano przepływ i przez kolejne 60 min prowadzono analizę w warunkach statycznych (60 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min).
- Warunki dynamiczne – przez 60 min prowadzono analizę w warunkach ciągłego przepływu roztworu glukozy (60 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min).

Barwienie immunofluorescencyjne

W celu potwierdzenia składu oraz lokalizacji komórek α i β budujących pseudowyspę wykonano dwuetapową procedurę barwienia immunofluorescencyjnego z wykorzystaniem przeciwciał. Barwienie prowadzono po 24 h od wysiania/wprowadzenia komórek zarówno dla pseudowysp uzyskanych z wykorzystaniem płytek U-kształtnych jak i mikrosystemu przepływowego IV.

- *Płytki U-kształtne*

Po 24 h od wysiania komórek na U-kształtną płytkę 96-dołkową, usuwano medium hodowlane i przemywano pseudowyspy DPBS. Następnie, w celu utrwalenia komórek do każdego z dołków dodano po 100 μ l paraformaldehydu o stężeniu 4% (przygotowanego w DPBS) i inkubowano w temperaturze pokojowej (RT) przez 10 min. Po tym czasie, z dołków hodowlanych usuwano roztwór paraformaldehydu. W celu permabilizacji błon komórkowych dodano po 100 μ l 0,5% roztworu Triton X-100 (przygotowanego w DPBS) i inkubowano przez 10 min w RT. Następnie, z dołków usuwano roztwór Triton X-100, przemyto komórki DPBS, dodano po 100 μ l roztworu 2% albuminy surowicy bydlęcej (BSA w 0,1% Triton X-100) i inkubowano 50 min w RT. Roztwór BSA dodano w celu blokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał. Po 50 min inkubacji, zebrano roztwór z dołków i dodano po 100 μ l mieszaniny roztworów monoklonalnych przeciwciał I-rzędowych (1:200 w 2% BSA) skierowanych przeciwko insulinie oraz przeciwko glukagonowi (mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko insulinie i królicze monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko glukagonowi) i inkubowano 24 h w lodówce (4°C). W kolejnym etapie, pseudowyspy przemyto roztworem DPBS i dodano po 100 μ l roztworu przeciwciał drugorzędowych (1:100 w 2% BSA): II-rzędowego przeciwciała anty-glukagon (anty-mysie IgG sprzężone z Alexa Fluor 594) i II-rzędowego przeciwciała anty-insulina (anty-królicze IgG sprzężone z Alexa Fluor 488). Pseudowyspy z przeciwciałami inkubowano 45 min w RT. W końcowym etapie DNA komórek wybarwiono barwnikiem Hoechst 33258 (1 μ g/ml w medium hodowlanym do komórek INS-1E oraz α -TC1-6 zmieszanym w stosunku objętościowym 1:1), dodając do dołków hodowlanych po 100 μ l roztworu tego barwnika. Po 15 min inkubacji, komórki w dołkach hodowlanych przemywano roztworem DPBS. W celu prowadzenia obserwacji z wykorzystaniem skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego (Fluoview FV10i, Olympus) przeniesiono agregaty komórkowe na szkiełko nakrywkowe.

- *Mikrosystem przepływowy IV*

Procedurę barwienia immunofluorescencyjnego w mikrosystemie przepływowym prowadzono w taki sam sposób jak w przypadku barwienia wyżej opisanych pseudowysp uzyskanych z wykorzystaniem 96-cio dołkowych płytek U-kształtnych. Różnicę stanowiło to, że wszystkie roztwory wprowadzone zostały do mikrosystemu przepływowego z wykorzystaniem pompy perystaltycznej przy prędkości przepływu 10 μ l/min przez 3 min.

Dzięki zastosowaniu w konstrukcji mikrosystemu szkiełka nakrywkowego obserwację wybarwionych pseudowysp przy użyciu skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego (Fluoview FV10i, Olympus) prowadzono bezpośrednio w mikrosystemie przepływowym.

Analiza sekrecji insuliny i glukagonu – mikrosystem przepływowy IV

W celu potwierdzenia funkcjonalności pseudowysp wykonano testy sekrecji insuliny i glukagonu po stymulacji komórek roztworami glukozy o stężeniu 2,75 mM (**LG, low glucose**) oraz 16,5 mM (**HG, high glucose**), przygotowanych w buforze Krebsa-Ringera. Test prowadzono 24h po wprowadzeniu komórek do mikrosystemu przepływowego. Badanie rozpoczęto od usunięcia medium hodowlanego z mikrosystemów. W tym celu do mikrosystemu wprowadzono wężykiem wlotowym roztwór DPBS (3 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min). Następnie, do mikrosystemu wprowadzono bufor Krebsa-Ringera (3 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min) i inkubowano przez 1 h. Po tym czasie, do jednej z komór mikrosystemu wprowadzono (3 min, prędkość przepływu: 10 μ l/min) roztwór glukozy o stężeniu 2,75 mM (LG), a do drugiej roztwór glukozy o stężeniu 16,5 mM (HG) i ponownie inkubowano przez 1h w 37°C, 5% CO₂. Po tym czasie, z komór mikrosystemu wypłukano roztwory, zbierając próbki do probówek typu eppendorf. Otrzymane próbki przechowywano w temperaturze – 20 °C do czasu wykonania testu ELISA. Wydzielanie insuliny i glukagonu z otrzymanych agregatów komórkowych potwierdzono po wykonaniu analizy sekrecji za pomocą zestawu Rat/Mouse Insulin ELISA Kit (Millipore) oraz Glucagon Chemiluminescent ELISA Kit (Millipore) według instrukcji podanych przez producenta. Absorbancję (450 nm i 590 nm) – w przypadku testu insuliny i luminescencję (~425 nm) w przypadku testu glukagonu zmierzono w czytniku płytek wielodołkowych (Tecan Infinite 200 Pro).

Analiza wpływu PAHSA na opracowany model pseudowyspy w warunkach przepływowych

Badano wpływ wybranych związków z rodziny nowoodkrytych lipidów (PAHSA) na zmiany w morfologii, proliferację oraz sekrecję insuliny i glukagonu z pseudowysp hodowanych w mikrosystemie przepływowym IV. Związki PAHSA składają się z kwasu palmitynowego (PA) zestryfikowanego do grupy hydroksylowej kwasu hydroksystearynowego (HSA). Regioizomer (np. 5-PAHSA, 9-PAHSA) jest determinowany przez położenie rozgałęzionego węgla. Związki te są endogennymi lipidami o potencjalnych właściwościach

zwiększających tolerancję glukozy, sekrecję insuliny i GLP-1 (glukagonopodobny peptyd 1) oraz redukujących odpowiedź zapalną.

Badania przeprowadzono w warunkach przepływowych z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego IV. Wyjściowe roztwory 5-PAHSA i 9-PAHSA o stężeniu 10 mg/ml rozcieńczono w medium hodowlanym stanowiącym mieszaninę pożywki hodowlanej INS-1E oraz α -TC1-6 (zmieszane w stosunku objętościowym 1:1). W ten sposób przygotowano roztwory robocze o stężeniach: 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, 100 μ M. Po 24 h od wprowadzenia komórek do mikrosystemu przepływowego IV (czas potrzebny do uzyskania procesu agregacji) przygotowane roztwory wprowadzano wężykiem wlotowym przez 3 min, przy prędkości przepływu 10 μ l/min. Agregaty komórek α -TC1-6 i INS-1E (w stosunku gęstości 1:2) inkubowano z roztworami 5-PAHSA lub 9-PAHSA przez 24 h (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie, wykonywano testy:

- Ocena stopnia sferyczności i średnicy pseudowysp - test wykonywano każdego dnia hodowli pseudowysp po 24 h, 48 h i 72 h po ich inkubacji z roztworem o odpowiednim stężeniu 5-PAHSA lub 9-PAHSA. Test wykonano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 2.4.9. *Metody oceny proliferacji, przeżywalności i aktywności metabolicznej wysp*, w sekcji „Oznaczanie zmian średnicy agregatów – analiza agregacji”.
- Test proliferacji – test wykonywano każdego dnia hodowli po 24 h, 48 h i 72 h inkubacji z roztworem o odpowiednim stężeniu 5-PAHSA lub 9-PAHSA. Test wykonano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 2.4.9. *Metody oceny proliferacji, przeżywalności i aktywności metabolicznej wysp*, w sekcji „Test żywotności AlamarBlue”.
- Immunobarwienie – barwienie immunofluorescencyjne insuliny i glukagonu przeprowadzono po 24 h od wprowadzenia kokultury do mikrosystemu przepływowego IV. Barwienie prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 2.4.10 *Procedury oznaczania aktywności agregatów komórkowych* w sekcji „Barwienie immunofluorescencyjne”.
- Sekrecja insuliny i glukagonu – analizę sekrecji insuliny i glukagonu przeprowadzono po 48 h inkubacji pseudowysp z roztworami 5-PAHSA lub 9-PAHSA w odpowiednich stężeniach. Test prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 2.4.10 *Procedury oznaczania aktywności agregatów*

komórkowych w sekcji „Analiza sekrecji insuliny i glukagonu – mikrosystem przepływowy IV”.

Analiza statystyczna

Wszystkie badania w ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono w minimum trzech niezależnych próbach ($n = 3$). Z otrzymanych wyników obliczono średnią oraz odchylenie standardowe (SD). W celu określenia istotności statystycznej uzyskanych danych przeprowadzono test t-Studenta (w przypadku porównań jednokrotnych dwóch grup eksperymentalnych) lub test ANOVA (przy porównaniach wielokrotnych). Przedział ufności ustalono na poziomie 95% (poziom istotności statystycznej $\alpha = 0.05$). Wyniki oznaczone na wykresach za pomocą gwiazdki oznaczają różnice istotne statystycznie. Wszystkie wyniki przedstawione na wykresach odniesiono do kontroli (pierwszy dzień wykonywania pomiarów) lub kontroli negatywnej (komórki nietraktowane badanym związkiem).

3. Wyniki

3.1. Opracowanie mikrosystemu przepływowego do hodowli trójwymiarowych (3D) struktur komórkowych

3.1.1. Dobór parametrów geometrii mikrosystemu przepływowego (badania z wykorzystaniem mikrosystemów przepływowych I-IV)

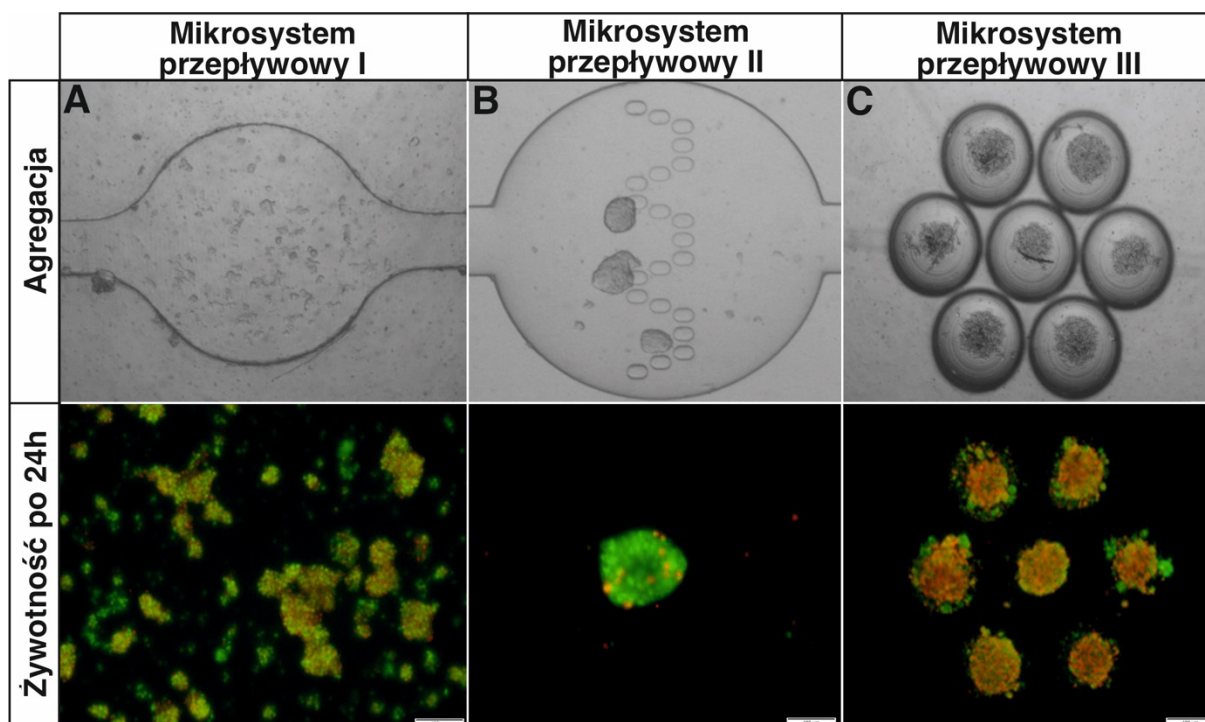
Prace rozpoczęto od wykonania badań testowych agregacji komórek w trzech różnych mikrosystemach przepływowych, których geometrie zostały przedstawione na rycinie II.1 w podrozdziale 2.4.1 *Projekt geometrii mikrosystemów przepływowych*. Wszystkie testowane mikrosystemy przepływowe wykonano z dwóch warstw poli(dimetylosiloksanu) (PDMS).

Geometria pierwszego (I) mikrosystemu opierała się na okrągłej komorze hodowlanej o wymiarach: 1 mm (długość) x 1 mm (szerokość) x 200 μm (wysokość). Powierzchnia komory hodowlanej wynosiła 0,78 mm^2 . Mikrosystem przepływowy o takiej geometrii został wcześniej wykorzystany do hodowli kardiomioblastów szczurzych (komórek H9C2) [104]. Na tym etapie badań, wykorzystanie tego mikrosystemu do badań miało na celu sprawdzenie czy proces

agregacji komórek β wysp trzustkowych będzie możliwy na powierzchni na powierzchni polimeru - PDMS w przestrzeni nieograniczonej dodatkowymi mikrostrukturami.

Kolejnym wykorzystanym systemem był mikrosystem przepływowy II zawierający w swojej geometrii okrągłą komorę hodowlaną o wymiarach 1 mm x 1 mm wyposażoną w rząd 21 sinusoidalnie ułożonych podłużnych mikropilar o wymiarach 60 μm (długość) x 45 μm (szerokość) x 100 μm (wysokość). Ten mikrosystem został wykorzystany w celu sprawdzenia czy poprzez ograniczenie powierzchni komory hodowlanej dodatkowymi mikrostrukturami proces agregacji będzie ułatwiony. Mikropillary miały na celu zatrzymanie przepływu zawiesiny i unieruchomienie komórek.

Trzecim wykorzystanym mikrosystemem (III) przepływowym był system do hodowli sferoidów komórkowych. Posiada on w swojej geometrii sieć mikrokanałów (szerokość 100 μm i głębokość 100 μm) oraz mikrokomór (średnica 2700 μm i głębokość 100 μm). Rzędy mikrokomór mają wspólny wlot i trzy oddzielne wyloty, a każda mikrokomora zawiera siedem mikrodołków w kształcie litery U o wymiarach 500 x 500 μm , przeznaczonych do tworzenia i hodowli sferoidów. Zasada tworzenia trójwymiarowych struktur opierała się na grawitacyjnym opadaniu komórek na dno mikrodołka wykonanego z PDMS i ich samoagregacji. Zastosowanie mikrodołków miało na celu wspieranie agregacji komórek a także odseparowanie uzyskanych struktur od zbyt wysokich naprężeń ścinających panujących w komorze hodowlanej. Geometria została szerzej scharakteryzowana w pracy Dr inż. Agnieszki Żuchowskiej [117] i z powodzeniem wykorzystana do hodowli sferoidów złożonych z komórek nowotworowych płuc (A549) oraz prawidłowych fibroblastów płuc (MRC-5). We wszystkich trzech powyżej opisanych mikrosystemach przepływowych prowadzono hodowlę komórek β wysp trzustkowych (INS-1E). Po 24 h od wprowadzenia komórek do mikrosystemów przepływowych przeprowadzono analizę stopnia agregacji oraz żywotności komórek. Wyniki przedstawiono na rycinie II.2



Rycina II. 2 . Hodowla komórek INS-1E w mikrosystemach przepływowych. A) Agregacja oraz żywotność komórek w mikrosystemie I wyposażonym w mikrokomorę o okrągłym kształcie. B) Agregacja oraz żywotność komórek w mikrosystemie II z mikrokomorą wyposażoną w sinusoidalnie ułożone mikropilary. C) Agregacja oraz żywotność komórek w mikrosystemie III zawierającym w geometrii U-kształtne dołki.

Dobór odpowiednich warunków panujących w mikroukładzie przepływowym jest niezwykle istotny dla opracowania modelu komórkowego, szczególnie modelu odwzorowującego trójwymiarową strukturę agregatu. Komórki wysp trzustkowych mogą wykazywać zdolność do samoagregacji i przy zachowaniu odpowiednich warunków tworzyć sferyczne agregaty komórkowe charakteryzujące się wysoką żywotnością i brakiem nekrotycznego rdzenia. W przypadku pracy z komórkami tworzącymi trójwymiarowe (3D) struktury należy dobrać powierzchnie do wzrostu, która wykazywać będzie cechy wspierające agregację komórek. Jedną z takich cech jest hydrofobowość materiału, która powoduje ograniczenie wzrostu komórek na powierzchni, a tym samym wspiera ich wzajemną agregację. W pierwszej części badań zdecydowano się sprawdzić czy zastosowanie hydrofobowego materiału w konstrukcji mikrosystemu przepływowego pozwoli na uzyskanie sferycznych agregatów komórek β wysp trzustkowych. Na tym etapie do wykonania mikrosystemu I wybrano polimer - PDMS, który jest biokompatybilnym materiałem o właściwościach hydrofobowych. Po 24 h od wprowadzenia komórek do mikrosystemu przepływowego I zauważono, że komórki utworzyły nieregularne skupiska o zróżnicowanych kształtach i rozmiarach (ryc. I.2.A). Te obserwacje potwierdziły, że hydrofobowa powierzchnia PDMS

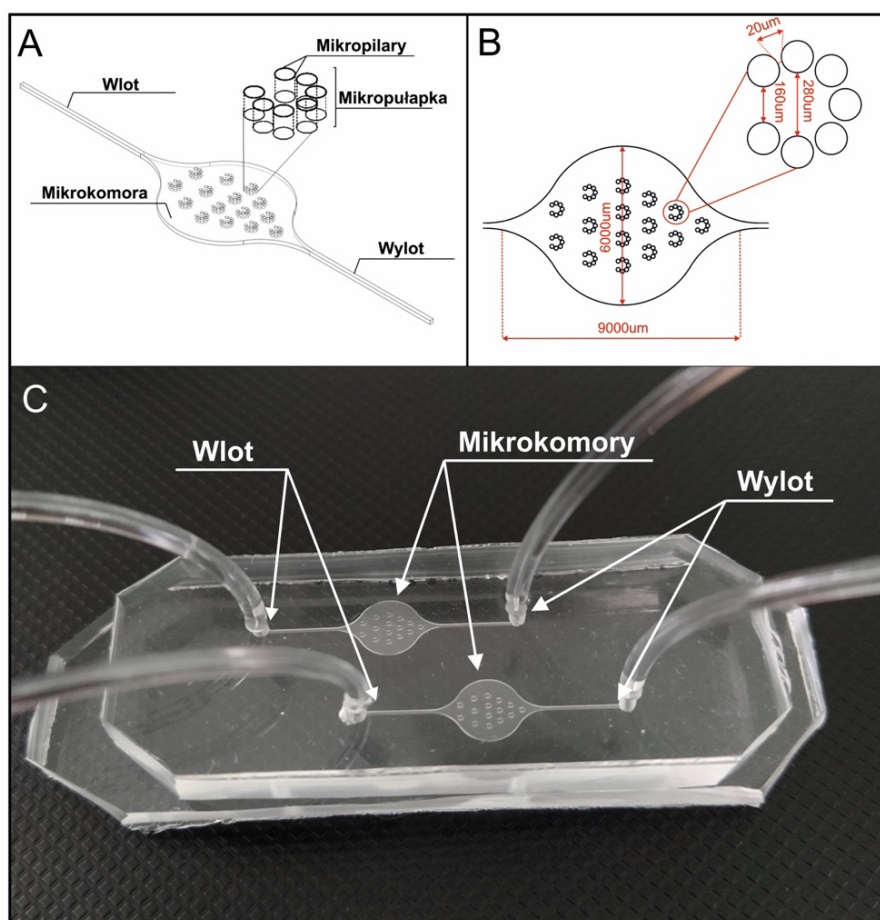
sprzyja grupowaniu się komórek INS-1E. Jednak, po przeprowadzeniu barwienia różnicowego potwierdzono obecność komórek martwych w uzyskanych skupiskach. Może to wskazywać na występowanie zbyt dużych naprężeń ścinających związanych z bezpośrednim przepływem wprowadzanych czynników przez komorę zawierającą hodowane skupiska komórek.

Poza doбором odpowiedniego materiału, na proces agregacji komórek oraz zminimalizowanie naprężeń ścinających ma również wpływ kształt komory hodowlanej i dobór odpowiednich mikrostruktur. Do najczęściej stosowanych rozwiązań należy wykorzystanie mikrokanalów o różnych wysokościach, rzędów mikropilar czy mikrodołków [46]. W kolejnym etapie badań wykorzystano mikrosystem II wyposażony w okrągłą komorę hodowlaną z rzędem sinusoidalnie ułożonych mikropilar (ryc. II.2.B). Po przeprowadzeniu testu agregacji komórek w mikrosystemie II zauważono, że część wprowadzonych komórek została zatrzymana przez rząd mikropilar. Te zatrzymane komórki grupowały się i po 24 h utworzyły agregaty o nieregularnych kształtach i rozmiarach. Po wykonaniu barwienia różnicowego zauważono, że większość komórek budujących agregat to komórki żywe (ryc. II.2.B). Na tej podstawie można wnioskować, że zastosowanie dodatkowych struktur (mikropilar) w geometrii komory hodowlanej korzystnie wpływa na zwiększenie żywotności komórek. Trzecim mikrosystemem wykorzystanym do testów wstępnych był mikrosystem przepływowy III zawierający w swojej geometrii komorę hodowlaną wyposażoną w mikrodołki. Takie rozwiązanie jest często wykorzystywane w badaniach dotyczących wysp trzustkowych [109], [111]. Jak pokazano na rysunku II.2.C. komórki INS-1E wprowadzane do mikrosystemu III po 24 h hodowli tworzyły sferyczne agregaty o zbliżonych kształtach i rozmiarach. Po przeprowadzeniu barwienia różnicowego zauważono, że w uzyskanych strukturach przeważały komórki martwe zlokalizowane głównie w rdzeniu agregatu, co może wskazywać na utrudnioną dyfuzję składników odżywczych do wnętrza agregatu. Z punktu widzenia opracowania modelu wyspy trzustkowej występowanie rdzenia nekrotycznego nie jest pożądane.

3.1.2. Geometria mikrosystemu przepływowego IV

Na podstawie badań wstępnych opisanych w powyższym rozdziale zaprojektowano mikrosystem przepływowy IV do tworzenia i hodowli sferycznych agregatów składających się z komórek wysp trzustkowych. Jako materiał konstrukcyjny wybrano PDMS.

Geometria opracowanego mikrosystemu przepływowego składa się z dwóch identycznych mikrostruktur – komór hodowlanych wyposażonych w mikropilary. Takie rozwiązanie pozwoliło na jednoczesne prowadzenie eksperymentów dla próby badanej i dla próby kontrolnej w tych samych warunkach środowiskowych. Każda z mikrostruktur składa się z jednej eliptycznej komory hodowlanej o wymiarach: długość 9000 μm , szerokość 6000 μm , wysokość 200 μm , która wyposażona jest w jeden mikrokanal wlotowy oraz jeden mikrokanal wylotowy (każdy o wymiarach: długość 8000 μm , szerokość 200 μm , wysokość 200 μm). Eliptyczna komora hodowlana wyposażona jest w 15 okrągłych mikropułapek (średnica 280 μm , wysokość 200 μm), każda z mikropułapek zbudowana jest z 7 okrągłych mikropilar (145 długość μm , szerokość 145, wysokość 200 μm). Mikropilary ułożono w półokręgu w 20 μm odstępach, z przestrzenią wlotową otwartą na 160 μm w kierunku wprowadzania komórek, takie rozwiązanie umożliwia umieszczenie komórek w pułapkach i jednoczesne zapobieganie wypadaniu utworzonych agregatów. Zaprojektowanie mikropułapek złożonych z mikropilar w geometrii mikrosystemu pozwalało na ograniczenie powierzchni wzrostu komórek i jednoczesne wspieranie ich agregacji. Mikrokomory hodowlane ułożono zgodnie z dołkami hodowlanymi na standardowej płytce wielodołkowej Sarstedt 5022411, co pozwala na prowadzenie pomiarów z wykorzystaniem czytnika płytek wielodołkowych. Geometrię mikrosystemu przepływowego przedstawiono na rysunku II.3.



Rycina II. 3 Mikrosystem przepływowy do hodowli trójwymiarowego modelu wyspy trzustkowej. A) Schemat mikrostruktury opracowanego mikrosystemu przepływowego. B) Schemat mikrokomory hodowlanej oraz mikropułapki. C) Zdjęcie opracowanego, mikrosystemu przepływowego składającego się z dwóch warstw PDMS.

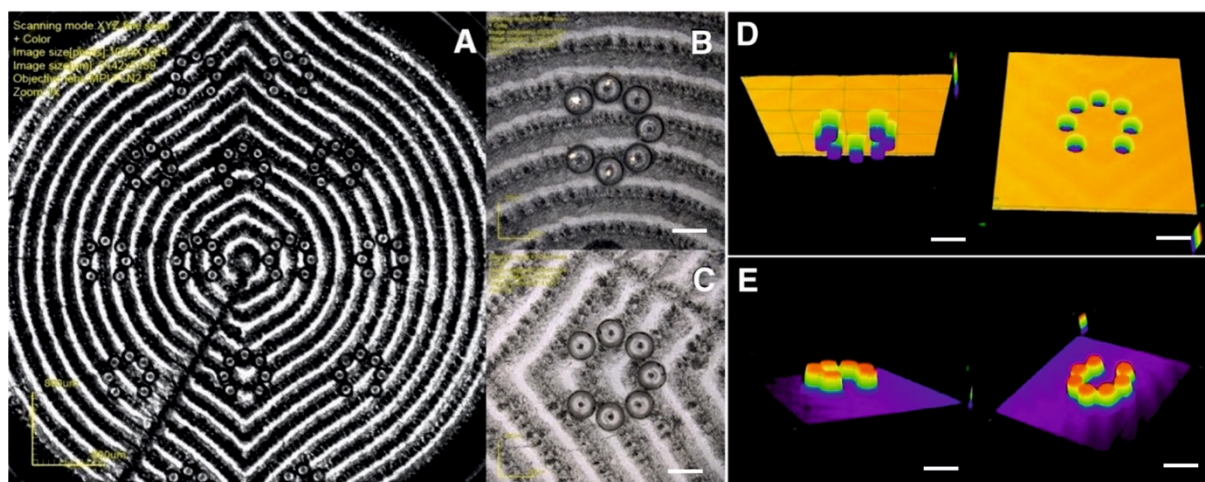
3.1.3. Określenie zgodności odwzorowania mikrostruktur

W celu porównania założonych (teoretycznych) wymiarów mikrosystemu z rzeczywistymi (eksperymentalnymi) wymiarami uzyskanymi po wytworzeniu mikrosystemu przepływowego IV wykonano analizę przy użyciu skaningowego mikroskopu laserowego 3D (LEXT). Ze względu na możliwe występowanie niedokładności na pieczętce PMMA, które zostałyby przeniesione na drodze replikacji na docelowe mikrosystemy dokonano pomiarów zarówno pieczętki wykonanej z PMMA jak i warstwy PDMS z odwzorowanymi mikrostrukturami. Uzyskane wartości porównane z wymiarami teoretycznymi przedstawiono w tabeli II.1.

Tabela II.1 Określenie zgodności odwzorowania mikrostruktur. Wymiary mikrosystemu przepływowego. Eksperymentalne wymiary mikroukładu określono z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu laserowego 3D. Uzyskane wartości porównano z wymiarami teoretycznymi.

	Wymiary teoretyczne [μm]	Wymiary eksperymentalne [μm]	
		Pieczątka PMMA	Warstwa PDMS
Szerokość mikrokanalu	200	207,51±2,83	227,25±4,90
Wysokość mikrokanalu	200	185,32±1,82	177,63±3,95
Średnica mikrokomory	6000	6005,64±10,56	5972,05±15,83
Wysokość mikrokomory	200	199,66±0,76	198,01±0,86
Średnica mikropilary	145	146,56±0,95	144,58±3,85
Wysokość mikropilary	200	200,24±0,96	199,09±1,24
Średnica mikropułapki	280	286,83±2,44	284,76±5,15
Szerokość wlotu do mikropułapki	160	161,24±1,07	160,62±0,00
Przerwy pomiędzy mikropilarami w mikropułapce	20	19,56±0,16	22,15±1,08

Po przeanalizowaniu wyników zauważono, że różnice między wymiarami teoretycznymi i eksperymentalnymi są niewielkie, a większość z nich nie przekracza kilku procent wartości teoretycznej. Dla większości analizowanych parametrów wymiary warstwy PDMS różnią się w większym % od wartości teoretycznej niż wymiary pieczętki z PMMA. Fakt ten może sugerować, że proces przygotowania odlewu ma wpływ na odwzorowanie mikrokomory. Niewielkie różnice pomiędzy wymiarami eksperymentalnymi i teoretycznymi mogą wynikać z charakteru procesu technologicznego przygotowania pieczętki i odlewu. Dodatkowo, przyczyną rozbieżności pomiędzy tymi parametrami może być zanieczyszczenie powierzchni pieczętki pyłem, a także czynnik ludzki i błędy podczas pomiaru. Na tej podstawie można stwierdzić, że wykorzystanie zarówno metody mikrofrezowania jak i metody odlewu pozwala na uzyskanie zaprojektowanych struktur z dokładnością 97%. Zdjęcia pieczętki PMMA i warstwy PDMS wykonane podczas pomiarów przedstawiono na rycinie II.IV



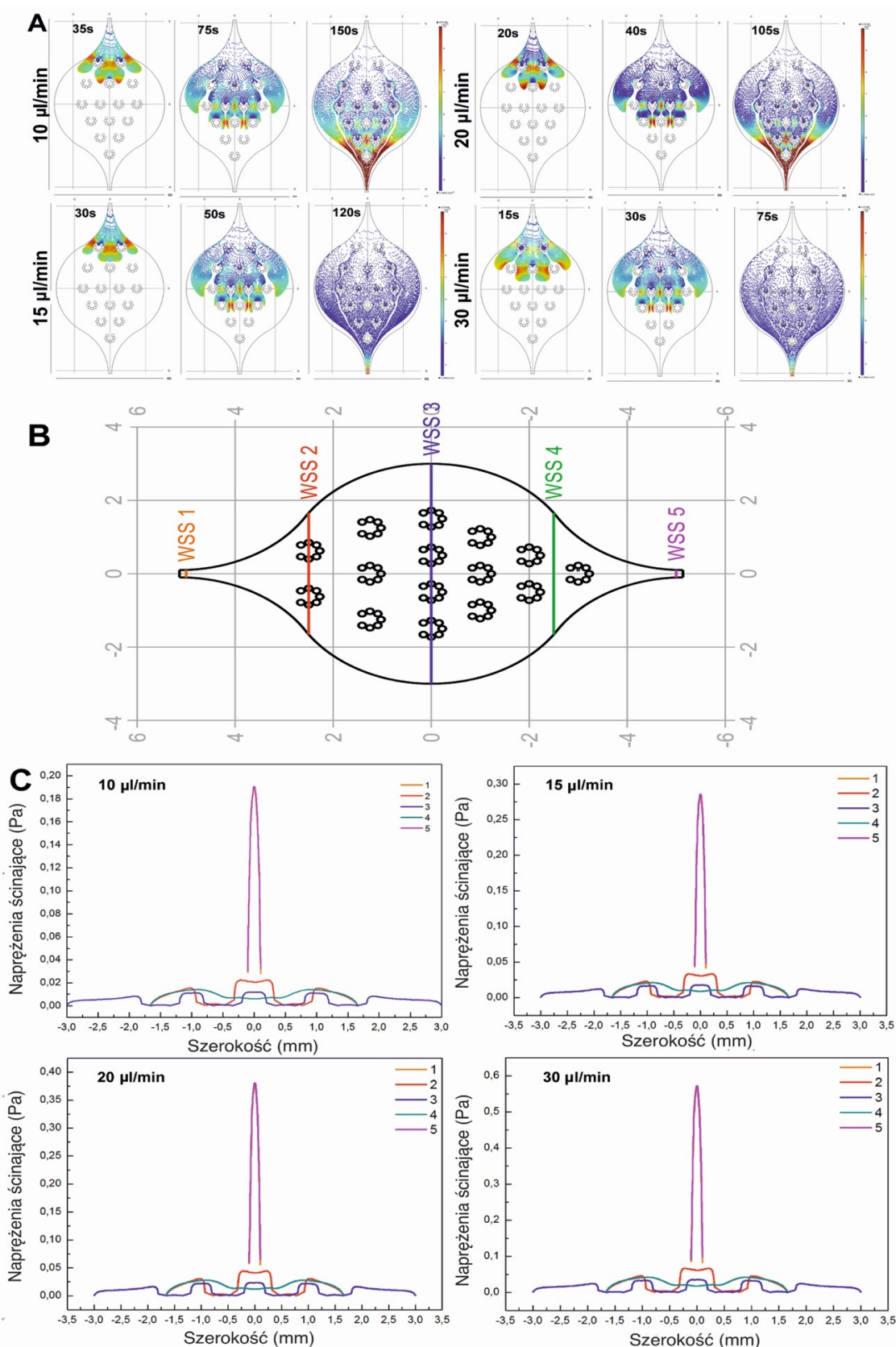
Rycina II. 4 Analiza wymiarów pieczętki PMMA oraz warstwy PDMS. Zdjęcia 2D (A,B,C) i 3D (D, E) pieczętki PMMA i warstwy PDMS uzyskane przy użyciu skaningowego mikroskopu laserowego 3D (LEXT). A) Zdjęcie mikrokomory odwzorowanej na pieczętce z PMMA B) Zdjęcie mikropułapki na warstwie PDMS. C) Zdjęcie mikropułapki na pieczętce z PMMA. D) Obraz mikropułapki na pieczętce z PMMA. E) Obraz mikropułapki na warstwie PDMS. Skala: 200 μm

3.1.4. Dobór parametrów hodowli komórek w mikrosystemie IV

Prędkość przepływu zawiesiny komórkowej oraz pożywki hodowlanej ma istotny wpływ na generowanie naprężeń ścinających, co z kolei może mieć pozytywny lub negatywny wpływ na agregację komórek oraz ich późniejszą hodowlę. W celu określenia odpowiednich warunków prowadzenia hodowli w mikrosystemie przepływowym IV wykonano symulację przepływu komórek i naprężeń ścinających przy użyciu modułu symulacyjnego Microelectromechanical Systems (MEMS) oprogramowania COM-SOL Multiphysics. Na podstawie symulacji dobrano odpowiednie warunki przepływu pożywki oraz prędkość wprowadzania komórek do mikrosystemu.

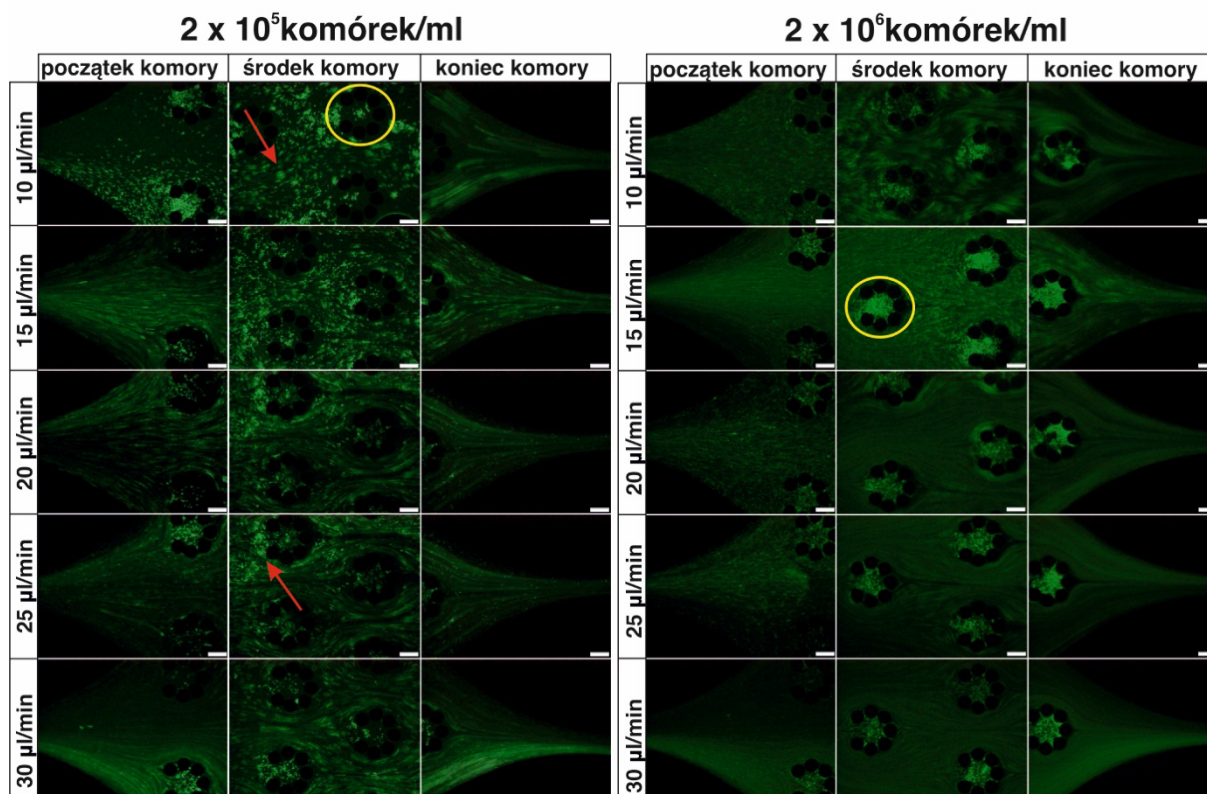
Wyniki symulacji przedstawiono na rycinie II.5 Symulacje przeprowadzono dla zawiesiny komórkowej o gęstości 2×10^6 komórek/ml przy prędkościach przepływu wynoszących: 10 $\mu\text{l/min}$, 15 $\mu\text{l/min}$, 20 $\mu\text{l/min}$, 30 $\mu\text{l/min}$. Dla każdej analizowanej prędkości przepływu zawiesiny komórkowej, komórki dostarczane były do całej komory hodowlanej i lokalizowały się w każdej z mikropułapek (rycina II.5 A). Naprężenia ścinające, powstające w komorze, zależały bezpośrednio od regionu komory, obecności mikropułapek oraz prędkości przepływu. Największe wartości tego parametru występowały w obszarach na wlocie i wylocie komory i były 20-krotnie większe niż wartości występujące w centralnej części komory. Większe naprężenia ścinające występowały w komorze w obszarze pomiędzy mikropułapkami, niż wewnątrz mikropułapki. Najbardziej równomierne i zarazem najniższe wartości tego

parametru zaobserwowano w centralnej części komory hodowlanej (patrz WSS 3 rycina II.5 B i C). Zauważono, że wartości naprężeń ścinających są proporcjonalne do prędkości przepływu, najwyższe wartości tego parametru w komorze pomiędzy mikropułapkami zaobserwowano przy największej prędkości przepływu - 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dla tej prędkości uzyskano trzykrotnie wyższe wartości niż dla prędkości przepływu 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Jednak dla każdej z analizowanych prędkości przepływu wartości naprężeń ścinających wewnątrz mikropułapek było bliskie 0. Dzięki zastosowaniu mikropułapek złożonych z mikropilar w geometrii mikrosystemu przepływowego zminimalizowano naprężenia ścinające występujące podczas przepływu roztworów przez komorę hodowlaną. Na podstawie analizy przeprowadzonych symulacji wybrano następujące wartości przepływów: do wprowadzania komórek wybrano prędkość przepływu równą 15 $\mu\text{l}/\text{min}$, natomiast do dostarczania pozostałych roztworów do hodowli - 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Rycina II. 5 Symulacje przepływu komórek i naprężeń ścinających wykonane przy użyciu modułu symulacyjnego Microelectromechanical Systems (MEMS) oprogramowania COM-SOL Multiphysics A) Modelowanie przepływu zawiesiny komórkowej w mikrokomorach dla komórek o gęstości 2×10^6 komórek/ml i różnych prędkościach przepływu (10, 15, 20 i 30 $\mu\text{l/min}$). B) Regiony mikrokomor, w których przeprowadzono symulacje naprężeń ścinających. C) Wykres liniowy rozkładu naprężeń ścinających.

W celu potwierdzenia parametrów otrzymanych w wyniku przeprowadzenia symulacji wykonano analizę przepływu i pułapkowania komórek INS-1E wybarwionych znacznikiem fluorescencyjnym CellTracker™ Green CMFD. Test prowadzono dla dwóch gęstości zawiesiny komórkowej wynoszącej 2×10^5 komórek/ml oraz 2×10^6 komórek/ml dla 5 różnych prędkości wprowadzania zawiesiny (10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 15 $\mu\text{L}/\text{min}$, 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$). Wyniki przedstawiono na rycinie II.6.



Rycina II. 6 Analiza rozkładu przepływu zawiesiny komórkowej w mikrokomorze oraz pułapkowania komórek w mikropułapkach. Przedstawione wyniki uzyskano dla dwóch gęstości wprowadzanej zawiesiny: 2×10^5 komórek/ml oraz 2×10^6 komórek/ml. Przedstawiono zdjęcia z trzech różnych obszarów komory mikrosystemu przepływowego (na wlocie, w środku oraz na wylocie komory). Żółtymi okręgami zaznaczono mikropułapki, czerwoną strzałką zaznaczono komórki agregujące w komorze, poza mikropułapkami. Skala: 200 μm .

Zauważono, że dla zawiesiny komórkowej o gęstości 2×10^6 komórek/ml przepływ oraz pułapkowanie komórek we wszystkich mikropułapkach było bardziej jednorodne niż dla zawiesiny o gęstości 2×10^5 komórek/ml. Podczas wprowadzania zawiesiny komórek o gęstości 2×10^5 komórek/ml dla każdej badanej prędkości przepływu tylko niewielka ilość komórek została unieruchomiona w mikropułapkach. W przeciwieństwie do tego, dla zawiesiny o gęstości 2×10^6 komórek/ml wszystkie mikropułapki były całkowicie wypełnione komórkami (wypełnioną pułapkę zaznaczono żółtym okręgiem na rycinie II.6).

Dla gęstości komórek 2×10^6 komórek/ml wprowadzanej przy prędkości przepływu 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ oraz 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ profil przepływu komórek był regularny w całym przekroju mikrokomory, natomiast dla prędkości 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ i 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ przepływ komórek kierowany był głównie wzdłuż ścianek mikrokomory. Zauważono również, że dla prędkości przepływu równej 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ komórki zaczynały agregować już po wpłynięciu do mikrokomory – poza pułapkami (zaznaczono czerwoną strzałką na rycinie II.6). Może to świadczyć o zbyt niskich prędkościach przepływu i szybkim procesie agregacji komórek INS-1E. Komórki wysp trzustkowych wykazują zdolność do samoagregacji, zbyt wolny przepływ zawiesiny komórkowej może powodować ich agregację jeszcze przed dopłynięciem do mikropułapek. Na podstawie tych obserwacji wnioskować można, że odpowiednia prędkość przepływu dla wprowadzania do mikrosystemu zawiesiny komórek o gęstości 2×10^6 komórek/ml wynosi 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ oraz 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów do dalszych badań z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego IV wybrano następujące parametry: gęstość zawiesiny komórkowej - 2×10^6 komórek/ml oraz prędkość jej wprowadzania - 15 $\mu\text{l}/\text{min}$.

W kolejnych etapach przeprowadzono również analizę rozkładu przepływu wprowadzanych roztworów w komorze hodowlanej oraz określono czas potrzebny do wypełnienia całej komory. Określenie czasu potrzebnego do wypełnienia komory było istotne w przypadku doboru odpowiednich parametrów prowadzenia wieloetapowych testów. W tym celu wykorzystano roztwór fluoresceiny o stężeniu $6,25 \times 10^{-5}$ M. Badania prowadzono wykorzystując dwie, wybrane na podstawie symulacji prędkości przepływu: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ oraz 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. Wyniki przedstawiono na rycinie II.7.

10 $\mu\text{l}/\text{min}$

	Pojawienie się roztworu fluoresceiny w mikrokomorze	Częściowe wypełnienie mikrokomory roztworem fluoresceiny			Całkowite wypełnienie mikrokomory roztworem fluoresceiny
początek komory	70s	75s	85s	100s	130s
środek komory	80s	85s	100s	130s	155s
koniec komory	105s	110s	120s	135s	170s

15 $\mu\text{l}/\text{min}$

	Pojawienie się roztworu fluoresceiny w mikrokomorze	Częściowe wypełnienie mikrokomory roztworem fluoresceiny			Całkowite wypełnienie mikrokomory roztworem fluoresceiny
początek komory	45s	50s	55s	65s	105s
środek komory	60s	65s	70s	80s	115s
koniec komory	75s	80s	90s	100s	130s

Rycina II. 7 Analiza rozkładu przepływu roztworu fluoresceiny w komorze hodowlanej przy zastosowaniu dwóch prędkości przepływu wynoszących odpowiednio 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ oraz 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. Przedstawiono wyniki uzyskane dla trzech różnych obszarów komory: wlotu do komory (początek komory), środka komory oraz wylotu z komory (koniec komory).

Na rycinie II.7 przedstawiono zdjęcia przepływu roztworu fluoresceiny w trzech różnych obszarach komory hodowlanej mikrosystemu IV: wlotu, środka i wylotu komory po określonym czasie od momentu rozpoczęcia wprowadzania roztworu.

Dla każdej części mikrokomory i każdego natężenia przepływu pierwsze zdjęcie pokazuje moment pojawienia się fluoresceiny w mikrokomorze. Kolejne trzy zdjęcia przedstawiają czas, po którym mikrokomora została częściowo wypełniona roztworem fluoresceiny, a ostatnie

zdjęcie ukazuje czas, po którym mikrokomora została całkowicie wypełniona roztworem fluoresceiny. Zgodnie z przypuszczeniami, czas potrzebny do wypełnienia mikrokomory zmniejsza się wraz ze wzrostem prędkości przepływu. Ponadto, dla tej samej wartości prędkości przepływu prędkość napełniania mikrokomory jest różna w różnych częściach mikrokomory – wlotowej, środkowej i wylotowej. Różnice te zmniejszają się wraz ze wzrostem natężenia przepływu. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że dla wybranych wartości natężenia przepływu wypełnienie fluoresceiną regularne w całym przekroju mikrokomory. Czas potrzebny do całkowitego napełnienia całej mikrokomory wprowadzonym roztworem fluoresceiny wyniósł: 170 s dla przepływu 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ oraz 130 s dla przepływu 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. Uzyskane wyniki pozwalają na określenie czasu wymaganego do całkowitego napełnienia mikrokomory wprowadzanym odczynnikami i dostarczenia tych odczynników do wszystkich komórek hodowanych w mikrosystemie. Dzięki określeniu tego parametru możliwe było precyzyjne określenie czasu przepływu roztworów w wieloetapowych procedurach, taki jak np. procedura barwienia immunofluorescencyjnego.

3.1.5. Podsumowanie i wnioski

Głównym celem zaprezentowanej części pracy było opracowanie mikrosystemu przepływowego, w którym możliwe będzie uzyskanie trójwymiarowych agregatów komórek wysp trzustkowych. Założono, że wykorzystanie hydrofobowych materiałów konstrukcyjnych oraz zaprojektowanie odpowiedniej geometrii mikrostruktur pozwoli na efektywne wprowadzenie komórek, ułatwienie procesu agregacji oraz uzyskanie sferycznych agregatów naśladujących morfologię wyspy trzustkowej. W tym celu przeprowadzono szereg badań wstępnych z wykorzystaniem trzech różnych mikrosystemów przepływowych. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że typ mikrostruktur mikroukładu ma znaczący wpływ na agregację komórek INS-1E i tworzenie trójwymiarowych struktur. Wykorzystanie mikrosystemu I potwierdziło możliwość otrzymania skupisk komórek INS-1E w układzie złożonym z dwóch warstw PDMS. Ponadto potwierdzono, że komórki w okrągłej komorze nie zawierającej w swojej geometrii dodatkowych struktur (jak np. dołki lub pilary) nie tworzą sferycznych agregatów, a otrzymane struktury charakteryzują się obecnością komórek martwych. Z tego względu kolejnym wykorzystanym systemem był mikrosystem II o okrągłej komorze, w której dodatkowo znajdował się rząd mikropilar. Zauważono, że obecność mikropilar ułatwia agregację komórek oraz minimalizuje naprężenia ścinające tym samym zwiększając żywotność komórek. Jednak sinusoidalne ułożenie mikropilar nie sprzyjało

tworzeniu sferycznych agregatów. Ostatnim badanym systemem był mikrosystem III, zawierający w swojej geometrii U-kształtne dołki. Możliwość otrzymywania sferycznych struktur w układach wyposażonych w U-kształtne dołki została szeroko opisana w literaturze. [110], [117]–[121]. Sferoidy otrzymywane w wyniku hodowli w systemach opartych na mikrodołkach to głównie modele tkanek nowotworowych składających się z komórek proliferujących oraz komórek objętych zmianami martwiczymi znajdujących się w centralnej części sferoidu [122]. Jednak w przypadku sferycznych agregatów naśladujących morfologię wyspy trzustkowej najważniejsze jest zapewnienie wysokiej żywotności komórek w całej objętości uzyskanego agregatu, co ma istotne znaczenie zwłaszcza w przypadku opracowywania struktur, które mogą zostać wykorzystane w transplantologii [123]. Tak jak przypuszczano w mikroukładzie III uzyskano sferyczne agregaty komórkowe, które pod względem morfologii odpowiadały wyspom trzustkowym. Natomiast zauważono, że otrzymane agregaty charakteryzują się występowaniem wyraźnego rdzenia martwiczego, co w przypadku modelu wyspy trzustkowej nie jest pożądane. W przeglądzie literaturowym niniejszej pracy przedstawiono badania prowadzone z wykorzystaniem systemów opartych na mikrodołkach. W opisanych doniesieniach literaturowych często jednak etap badania żywotności i określenia występowania rdzenia martwiczego jest pomijany. Na podstawie uzyskanych wyników badań wykonanych z wykorzystaniem mikrosystemów I, II oraz III zaprojektowano geometrię mikrosystemu IV do tworzenia, hodowli i obserwacji agregatów komórek wysp trzustkowych. Geometrię mikrosystemu zaprojektowano w oparciu o mikrokomory hodowlane wyposażone w 15 mikropułapek każda, dzięki czemu możliwa była obserwacja i analiza wielu agregatów w tym samym czasie. Do konstrukcji systemu wykorzystano dwie warstwy PDMS lub warstwę PDMS i szkiełko nakrywkowe, a komory hodowlane w geometrii mikrosystemu zostały zaprojektowane zgodnie z rozkładem dołków na standardowej płytce 96-cio dołkowej. Dzięki temu, możliwe będzie prowadzenie analiz „w urzędzeniu” w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem czytnika płytek wielodołkowych, skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego i odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego. Do wytworzenia zaprojektowanego mikrosystemu IV zastosowano technikę frezowania oraz metodę odlewu i potwierdzono bardzo dobre odwzorowanie założonych wymiarów przy wykorzystaniu tych dwóch metod.

W dalszych etapach na podstawie przeprowadzonych symulacji przepływu płynów wybrano odpowiednie wartości przepływu dla wprowadzania zawiesiny komórkowej oraz dostarczania składników odżywczych wynoszące odpowiednio: 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ oraz 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ponadto, potwierdzono, że obecność mikropułapek zbudowanych z mikropilar pozwoli na

zminimalizowanie wartości naprężeń ścinających działających bezpośrednio na uzyskane agregaty. Dobrane parametry potwierdzono doświadczalnie wykonując testy z wykorzystaniem roztworu fluoresceiny oraz zawiesiny komórkowej wybarwionej CellTrackerem™ Green CMFDA Dye. Określono również czas potrzebny do wypełnienia całej mikrokomory oraz dostarczenia wykorzystywanych roztworów do każdego z agregatów. Ponadto, potwierdzono, że obecność mikropułapek zbudowanych z mikropilar pozwoli na zminimalizowanie wartości naprężeń ścinających działających bezpośrednio na uzyskane agregaty.

Podsumowując, na tym etapie badań potwierdzono, że agregacja komórek i ich zdolność do tworzenia trójwymiarowych, sferycznych agregatów zależy w dużej mierze od geometrii mikrostruktur systemu przepływowego, a także odpowiednio dobranych warunków przepływu. Ponadto opracowano mikrosystem IV, który w dalszych etapach prac zostanie wykorzystany jako system do tworzenia i hodowli modelu pseudowyspy, a także dobrano odpowiednie warunki przepływu panujące w mikrosystemie przepływowym. Opisany w powyższym rozdziale mikrosystem przepływowy jest wynalazkiem chronionym patentem (PL239354, Mikrosystem przepływowy do tworzenia, hodowli oraz obrazowania fluorescencyjnego trójwymiarowych agregatów komórek wysp trzustkowych).

3.2. Opracowanie trójwymiarowego modelu wyspy trzustkowej

W poprzedniej części badań opracowano mikrosystem przepływowy do hodowli sferycznych agregatów komórkowych. Kolejnym etapem badań było opracowanie odpowiedniego modelu komórkowego, który odpowiadał będzie wyspie trzustkowej w warunkach *in vivo*. Tak jak przedstawiono w części literaturowej, wyspy trzustkowe są sferycznymi agregatami o specyficznym składzie komórkowym, strukturze i rozmiarze [124]. Na tym etapie badań podjęto próbę odwzorowania morfologii wyspy trzustkowej w opracowanym mikrosystemie przepływowym. W celu uzyskania agregatów o pożądanych średnicach, badania rozpoczęto od doboru odpowiedniej gęstości komórek – zarówno monokultury komórek INS-1E jak i kokultury złożonej z komórek INS-1E oraz α -TC1-6. Obecnie, najczęściej stosowaną i najszerzej opisaną w literaturze techniką tworzenia trójwymiarowych agregatów komórkowych są statyczne hodowle zawieszinowe na podłożach do hodowli tkankowych o nieadherentnych powierzchniach. Jako, że metoda ta jest dobrze poznana i szeroko scharakteryzowana [125], na tym etapie postanowiono rozpocząć badania od testów wstępnych w makroskali, z wykorzystaniem płytek wielodołkowych.

Założono, że wykorzystując zdolność komórek INS-1E do samoagregacji możliwe będzie uzyskanie sferycznych agregatów o pożądanym rozmiarach. W celu scharakteryzowania procesu agregacji monokultury oraz kokultury komórek, przeprowadzono badania zarówno w makroskali jak i mikroskali. W celu umożliwienia procesu agregacji komórek w makroskali wykorzystano 96-dołkowe płytki o U-kształtnym dnie, wykonane z polistyrenu (PS) i charakteryzujące się hydrofobową powierzchnią, która zapobiega adhezji komórek do podłoża. Założono, że modyfikacja dołków płytki czynnikiem zwiększającym hydrofobowość powierzchni zwiększy interakcję komórka-komórka, a obniży interakcję komórka-podłoże. Testy prowadzono w dwóch wariantach: na płytkach niemodyfikowanych oraz pokrytych 1% roztworem Pluronic, który jest syntetycznym, niejonowym środkiem powierzchniowo czynnym zapobiegającym adhezji komórek do podłoża [126].

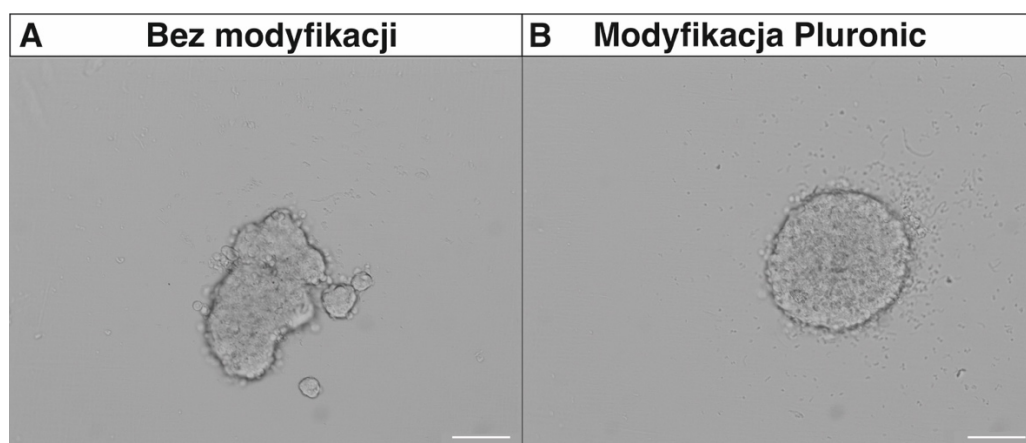
Na podstawie wyników uzyskanych po przeprowadzeniu badań z wykorzystaniem U-kształtnych płytek wielodołkowych postawiono hipotezę badawczą, że zastosowanie opracowanego mikrosystemu IV pozwoli na szybsze uzyskanie sferycznych agregatów odpowiadających wyspom trzustkowym. Ponadto założono, że panujące w systemie warunki przepływowe pozwolą na uzyskanie pseudowysp trzustki charakteryzujących się zbliżonymi wymiarami, wysokim stopniem agregacji i żywotności.

3.2.1. Badania z wykorzystaniem monokultury komórek INS-1E

3.2.1.1. Badanie agregacji, proliferacji i żywotności komórek w warunkach statycznych (makroskala)

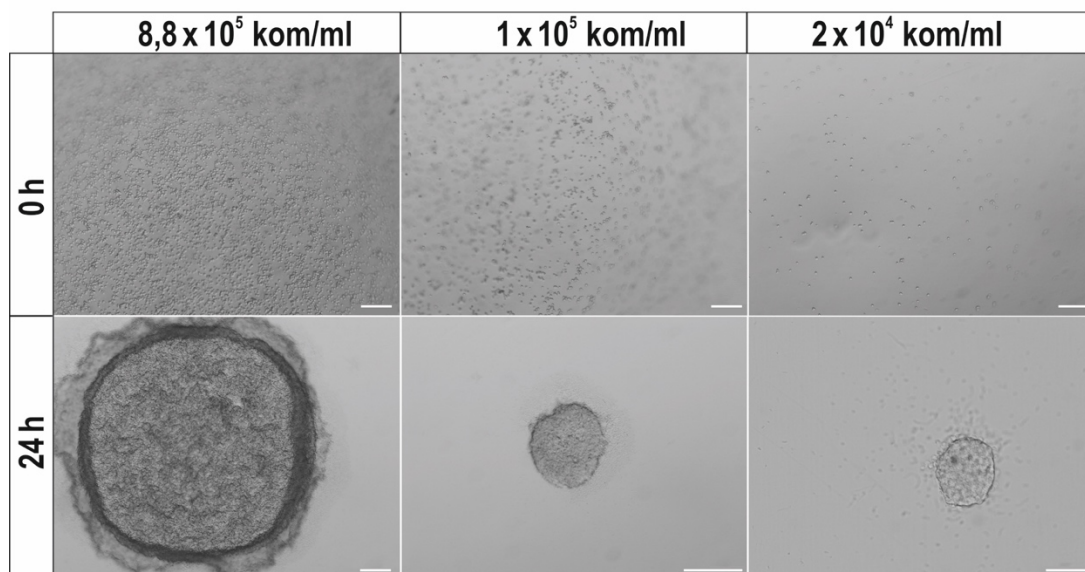
3.2.1.1.1. Test agregacji komórek INS-1E

W celu określenia odpowiednich warunków agregacji, a także porównania tego procesu w warunkach statycznych i przepływowych ten etap badań rozpoczął od testów wstępnych agregacji komórek INS-1E z wykorzystaniem 96-dołkowych płytek o U-kształtnym dnie. Testy agregacji przeprowadzono w dwóch wariantach: na płytkach bez dodatkowej modyfikacji oraz na płytkach modyfikowanych 1% roztworem Pluronic. Założono, że modyfikacja roztworem Pluronic pozwoli na przyspieszenie procesu agregacji i uzyskanie bardziej sferycznych struktur. Badania prowadzono z wykorzystaniem zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^5 komórek/ml (wybranej na podstawie danych literaturowych) [127], [128]. Analizę agregacji komórek INS-1E przeprowadzono po 24 h od wysiania zawiesiny na płytkę U-kształtną (rycina II.8).



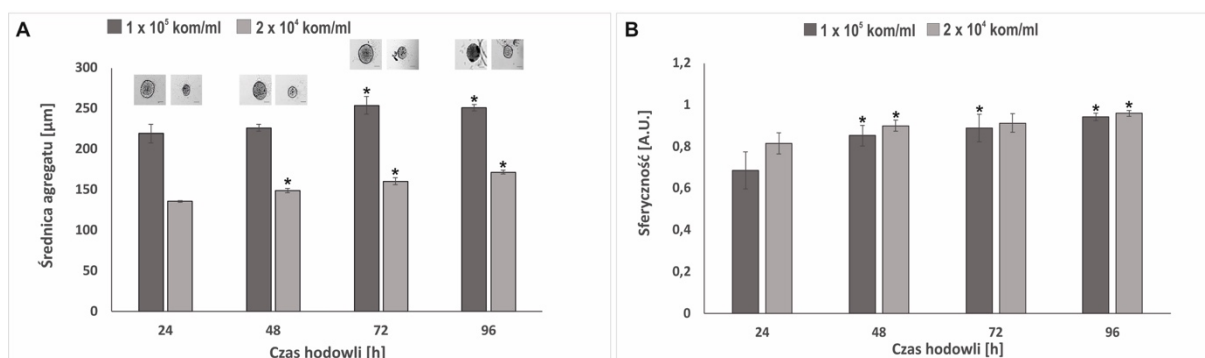
Rycina II. 8 Porównanie agregacji komórek INS-1E w płytkach U-kształtnych wielodołkowych niemodyfikowanych (A) oraz modyfikowanych 1% roztworem Pluronic (B). Zdjęcia wykonano po 24 h inkubacji od wysiania komórek na płytkę. Skala: 100 μm .

Na podstawie przeprowadzonych badań zauważono, że proces agregacji komórek INS-1E rozpoczynał się już po 2-3 h od wysiania komórek na płytkę, natomiast pełną agregację uzyskano po 24 h prowadzenia hodowli zarówno w przypadku dołków niemodyfikowanych jak i modyfikowanych roztworem Pluronic. W większości (90 %) niemodyfikowanych dołków uzyskano po kilka agregatów komórek charakteryzujących się nieregularnym kształtem oraz znacznymi różnicami w rozmiarach. W każdym z tych dołków uzyskiwano po kilka mniejszych agregatów o polu powierzchni 0,008 mm^2 charakteryzujących się sferycznością na poziomie 0,64 - 0,72 oraz jeden większy agregat o stopniu sferyczności 0,40 - 0,50 oraz polu powierzchni wynoszącym 0,183 mm^2 . Takie wartości stopnia sferyczności wskazują na niski poziom agregacji. Natomiast w każdym z dołków modyfikowanych roztworem Pluronic uzyskano po jednym sferycznym agregacie komórkowym o wymiarach około 200-260 μm . Agregaty te charakteryzowały się sferycznością na poziomie 0,65 - 0,77 i polem powierzchni ok 0,212 mm^2 . Analizując uzyskane wyniki potwierdzono zdolność komórek INS-1E do spontanicznej agregacji. Ponadto, zauważono pozytywny wpływ modyfikacji roztworem 1% Pluronic na proces agregacji komórek INS-1E. Z tego względu do kolejnych etapów badań mających na celu dobór odpowiedniej gęstości zawiesiny komórkowej do uzyskania sferycznych agregatów wybrano 96-dołkowe płytki U-kształtne modyfikowane roztworem Pluronic. W kolejnych etapach przeprowadzono badania z wykorzystaniem 3 różnych gęstości zawiesiny komórkowej: $8,8 \times 10^5$, 1×10^5 , 2×10^4 komórek/ml. Wyniki przedstawiono na rycinie II.9.



Rycina II. 9 Porównanie agregacji komórek INS-1E. Wyniki uzyskano po 24 h inkubacji zawiesiny komórkowej o gęstości: $8,8 \times 10^5$, 1×10^5 , 2×10^4 komórek/ml wysianej na wielodołkowe płytki U-kształtne modyfikowane 1% roztworem Pluronic. Skala: 200 μm .

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że dla każdej badanej gęstości zawiesiny komórkowej wszystkie komórki, w każdym z modyfikowanych dołków, po 24 h inkubacji utworzyły jeden, sferyczny agregat. Agregaty uzyskane w wyniku hodowli komórek o gęstości $8,8 \times 10^5$ komórek/ml charakteryzowały się dużą średnicą wynoszącą 1,70 mm i nieregularnymi krawędziami. Ponadto, po 24 h hodowli zaobserwowano degradację struktury agregatu (rycina II.9). Natomiast dla gęstości 1×10^5 komórek/ml zaobserwowano zadowalający stopień agregacji komórek, stopień sferyczności wynosił 0,71, a średnica 200 - 260 μm . Dla gęstości komórek 2×10^4 komórek/ml uzyskano najwyższe wartości stopnia sferyczności wynoszące 0,81. Natomiast średnica agregatu wynosiła 135-170 μm . Zarówno w przypadku agregatów uzyskanych dla gęstości 1×10^5 komórek/ml jak i 2×10^4 komórek/ml nie zauważono degradacji struktury przez cały czas trwania hodowli. Wyniki badań przedstawiono na rycinie II.9.



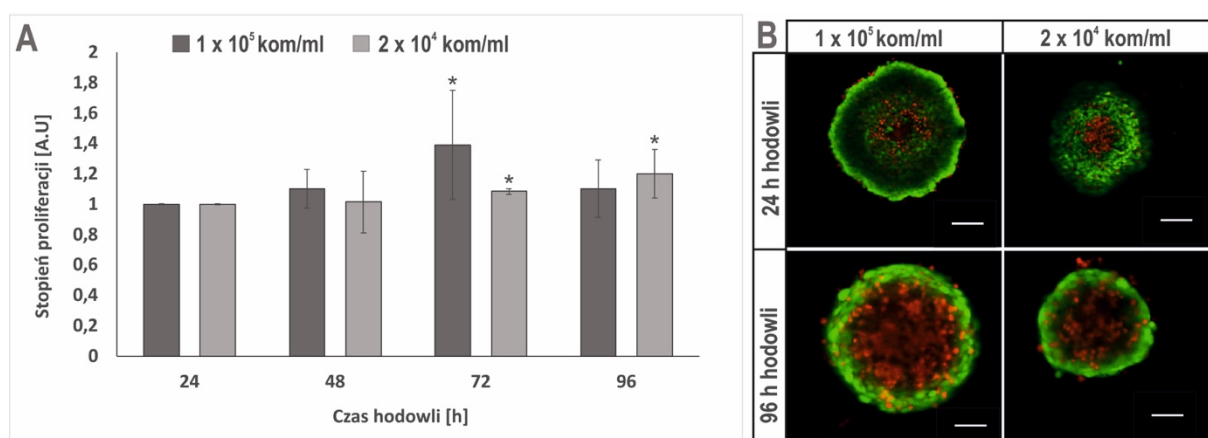
Rycina II. 10 Analiza średnicy (A) oraz sferyczności (B) agregatów komórek uzyskanych w wyniku hodowli komórek INS-1E na płytkach o U-kształtnym dnie. Wartości odniesienia w analizie statystycznej stanowiły wyniki uzyskane po 24 h inkubacji wysianych na dołek komórek. $n=3$ $p < 0,05$.

Na podstawie analizy powyższych wyników, do dalszych badań wybrano gęstość 1×10^5 komórek/ml oraz 2×10^4 komórek/ml. Odrzucono wartość gęstości komórek $8,8 \times 10^5$ komórek/ml, ze względu na uzyskany duży rozmiar agregatu oraz degradację jego struktury (rycina II.9). Analizę stanu hodowli agregatów komórkowych składających się z komórek INS-1E przeprowadzono po 24, 48, 72 i 96 h od wysiania zawiesiny na płytkę hodowlaną (rycina II.10). W kolejnych dniach hodowli, dla zawiesiny komórkowej o gęstości 2×10^4 komórek/ml zauważono stopniowy przyrost średnicy agregatów z $135 \mu\text{m}$ (24 h) do $172 \mu\text{m}$ (96 h). Uzyskane wyniki mogą wskazywać na prawidłową dyfuzję składników odżywczych i zwiększenie proliferacji komórek. Natomiast dla gęstości 1×10^5 komórek/ml zaobserwowano zmianę średnicy z $219 \mu\text{m}$ (24 h) na $254 \mu\text{m}$ (72 h), która jednak ostatniego dnia hodowli (96 h) zmniejszyła się do $250 \mu\text{m}$. Zaobserwowano również zmiany w stopniu sferyczności uzyskanych agregatów. Po 24 h od wysiania komórek, stopień sferyczności agregatów złożonych z komórek INS-1E o gęstości 2×10^4 komórek/ml był większy niż komórek o gęstości 1×10^5 komórek/ml i wynosił odpowiednio: 0,81 i 0,71. Świadczy to o uzyskaniu bardziej sferycznych struktur dla zawiesiny o mniejszej gęstości. Zarówno w przypadku komórek o gęstości 2×10^4 komórek/ml jak i 1×10^5 komórek/ml sferyczność wzrastała w kolejnych dniach hodowli, co świadczy o prawidłowym procesie agregacji. Dla komórek o gęstości 2×10^4 komórek/ml sferyczność wzrosła z 0,81 (24 h) do 0,96 (96 h), natomiast dla komórek o gęstości 1×10^5 komórek/ml sferyczność wzrosła z 0,71 (24 h) do 0,92 (96 h). Uzyskane wyniki potwierdzają wysoki stopień agregacji dla obu badanych gęstości, natomiast dla gęstości 2×10^4 komórek/ml już po 24 godzinach hodowli uzyskano wyższy stopień sferyczności, a w kolejnych dniach hodowli większe istotne statystycznie zmiany w przyroście średnicy agregatu. Na tym etapie potwierdzono, że komórki INS-1E posiadają zdolność do

samoistnego tworzenia trójwymiarowych agregatów komórkowych oraz że liczba komórek (gęstość zawiesiny) ma wpływ na proces agregacji.

3.2.1.1.2. Wpływ gęstości komórek INS-1E na proliferację i żywotność komórek w opracowanych agregatach

Liczba komórek (ich gęstość) ma znaczący wpływ na proces agregacji oraz wielkość uzyskanego agregatu, ale może mieć również znaczący wpływ na stopień żywotności i proliferacji uzyskanych agregatów komórkowych. W przypadku agregatów o większych średnicach ($>400\ \mu\text{m}$) może być utrudniona dyfuzja tlenu i składników odżywczych przez wielokomórkowe warstwy do wnętrza agregatu [129]. W celu określenia proliferacji i żywotności komórek w otrzymanych agregatach, przeprowadzono test z wykorzystaniem barwnika AlamarBlue oraz barwienie różnicowe z wykorzystaniem jodku propidyny i kalceiny-AM. Test z wykorzystaniem AlamarBlue prowadzono każdego dnia trwania hodowli, natomiast barwienie różnicowe pierwszego i ostatniego dnia hodowli (24 h oraz 96 h po wysianiu komórek na płytkę). Wyniki testów przedstawiono na rycinie II.11.



Rycina II. 11 A) Stopień proliferacji komórek INS-1E hodowanych z wykorzystaniem 96-dółkowych płytek U-kształtnych po 24, 48, 72 i 96 h hodowli. Uzyskane wyniki znormalizowano do wyników uzyskanych po 24 h hodowli, $n = 3$. * $p < 0,05$. B) Barwienie różnicowe hodowli komórek INS-1E kalceiną-AM (CAM; żywe komórki, kolor zielony) i jodkiem propidyny (PI; martwe komórki, kolor czerwony). Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. Przedstawione zdjęcia stanowią środkową warstwę każdego agregatu (przekrój na głębokości agregatu ok. $100\ \mu\text{m}$). Skala: $50\ \mu\text{m}$

Zauważono niewielki wzrost proliferacji komórek dla gęstości zawiesiny 2×10^4 komórek/ml natomiast rozrzut wyników pomiędzy powtórzeniami był na tyle duży, że nie można ich uznać za istotne statystycznie. Podobne wyniki uzyskano dla gęstości 1×10^5 komórek/ml, przy czym ostatniego dnia hodowli zanotowano spadek stopnia proliferacji

o około 30 % w stosunku do poprzedniego dnia. Wynik ten koreluje z zauważonym w poprzednich badaniach spadkiem średnicy agregatu. Podobnie jak w przypadku wyników dla gęstości 2×10^4 komórek/ml również zauważono duże różnice pomiędzy wynikami proliferacji dla kolejnych powtórzeń w poszczególnych dniach hodowli. Może to świadczyć o niejednorodnych rozmiarach agregatów w poszczególnych dołkach. W celu określenia stopnia żywotności komórek i zawartości komórek martwych w uzyskanych agregatach wykonano barwienie różnicowe z wykorzystaniem jodku propidyny i kalceiny-AM. Obserwacje prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, dlatego też niezbędne było przeniesienie uzyskanych agregatów z dołków płytki wielodołkowej na szalkę o odpowiednio przystosowanym dnie do analizy z wykorzystaniem tego typu mikroskopu. Po przeprowadzeniu barwienia różnicowego potwierdzono występowanie znacznej ilości komórek martwych (wybarwione jodkiem propidyny) wewnątrz agregatów (rycina II.11.B). Te wyniki mogą wskazywać na utrudnioną dyfuzję składników odżywczych do wnętrza agregatu komórkowego w warunkach statycznych. Dlatego też, w kolejnych etapach badań wykorzystano opracowany mikrosystem IV i założono, że warunki przepływowe pozwolą na uzyskanie agregatów o wysokiej żywotności komórek.

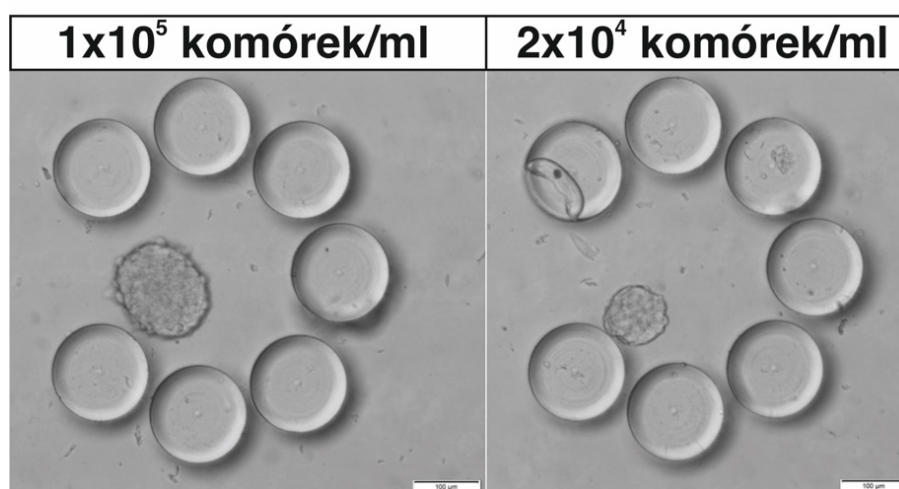
3.2.1.2. Badanie agregacji komórek oraz charakterystyka otrzymanych agregatów komórkowych w warunkach przepływowych

3.2.1.2.1. Test agregacji komórek w warunkach przepływowych

Po przeanalizowaniu wyników uzyskanych w badaniach wstępnych, założono, że zmiana warunków hodowli ze statycznych na przepływowe (dynamiczne) pozwoli na zwiększenie stopnia żywotności uzyskanych agregatów komórkowych. Założono również, że hydrofobowa powierzchnia PDMS wykorzystanego do konstrukcji systemu umożliwi tworzenie sferycznych agregatów, a dodatkowa modyfikacja powierzchni PDMS nie będzie konieczna. Ze względu na wykorzystanie przezroczystych materiałów konstrukcyjnych (PDMS oraz szkiełko nakrywkowe) analizę stanu hodowli prowadzono z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego sprzężonego z kamerą CCD (Olympus IX-71) oraz mikroskopu konfokalnego (Olympus FluoView). Zmiany morfologii oraz proces agregacji struktur uzyskanych w wyniku hodowli komórek w zaprojektowanym mikrosystemie przepływowym

IV (opisanym w punkcie 3.1.2. *Geometria mikrosystemu przepływowego IV*) obserwowano każdego dnia hodowli, tj. 24, 48, 72 oraz 96 h po wprowadzeniu komórek do mikrosystemu.

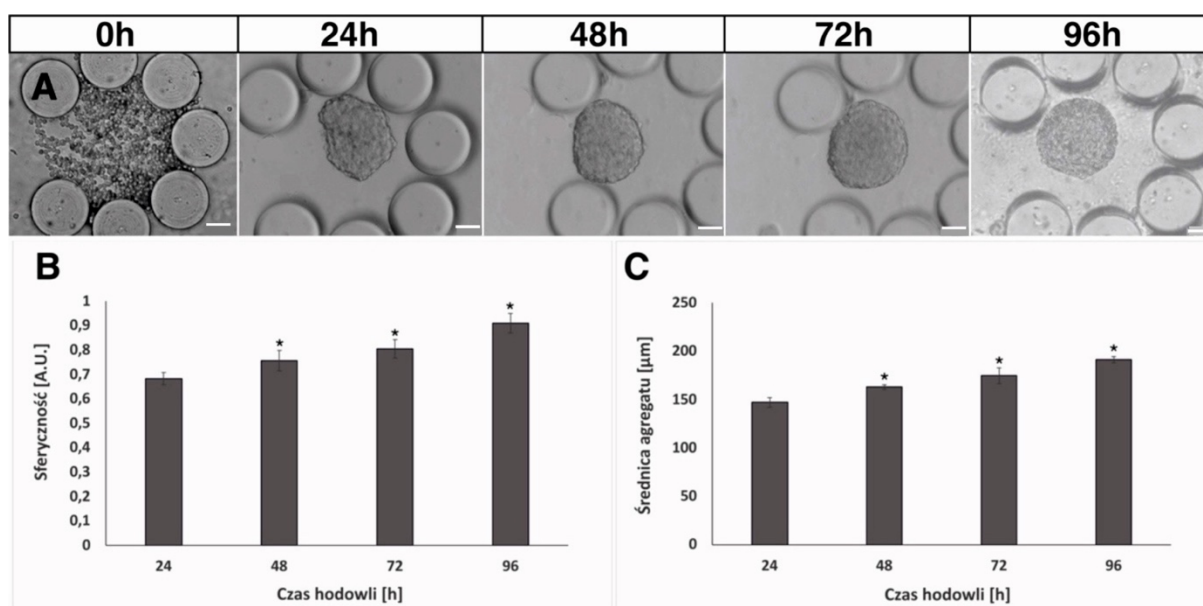
Tak jak w przypadku badań agregacji komórek z wykorzystaniem 96-dołkowych płytek U-kształtnych badania w mikrosystemie przepływowym IV rozpoczęto od hodowli monokultury komórek β (INS-1E). Na podstawie badań opisanych w rozdziale 3.2.1.1. *Badanie agregacji, proliferacji i żywotności komórek w warunkach statycznych (makroskala)*, do badań wybrano dwie gęstości zawiesiny komórkowej: 1×10^5 komórek/ml oraz 2×10^4 komórek/ml. Testy rozpoczęto od wprowadzenia zawiesiny komórkowej do mikrosystemu. W momencie wprowadzania komórek do mikrosystemu, każda z 15 mikropułapek oraz przestrzenie pomiędzy nimi zostały wypełnione zawiesiną komórkową. W celu usunięcia komórek, które nie zostały unieruchomione w mikropułapkach przemyto mikrosystem świeżą pożywką hodowlaną. Na tym etapie, w systemie pozostały wyłącznie komórki zatrzymane w mikropułapkach, które utworzyły nieregularne skupiska. Po 24 h inkubacji (5% CO₂, 37°C) komórki w każdej z 15 mikropułapek utworzyły kuliste agregaty. Wyniki agregacji uzyskanej po 24 h hodowli zostały przedstawione na rycinie II.12.



Rycina II. 12 Agregacja komórek INS-1E po 24 h od wprowadzenia do mikroukładu przepływowego zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^5 komórek/ml oraz 2×10^4 komórek/ml. Skala: 100 μ m.

Po wykonaniu analizy zauważono, że w przypadku wprowadzenia zawiesiny o gęstości 1×10^5 komórek/ml uzyskano sferyczne agregaty o średnicy wynoszącej 117 ± 5 μ m. Natomiast w przypadku wprowadzenia zawiesiny o gęstości 2×10^4 komórek/ml uzyskane agregaty charakteryzowały się średnicami wynoszącymi 92 ± 5 μ m. Wyspy trzustkowe w warunkach *in vivo* to sferyczne agregaty komórkowe o średnicy około 50-300 μ m [130]. Dlatego do dalszych badań zdecydowano się zwiększyć gęstość wprowadzanej zawiesiny komórkowej i wybrano

gęstość równą 2×10^6 komórek/ml. Proces agregacji zawiesiny komórek INS-1E o gęstości 2×10^6 komórek/ml w mikrosystemie przepływowym został przedstawiony na rycinie II.13.

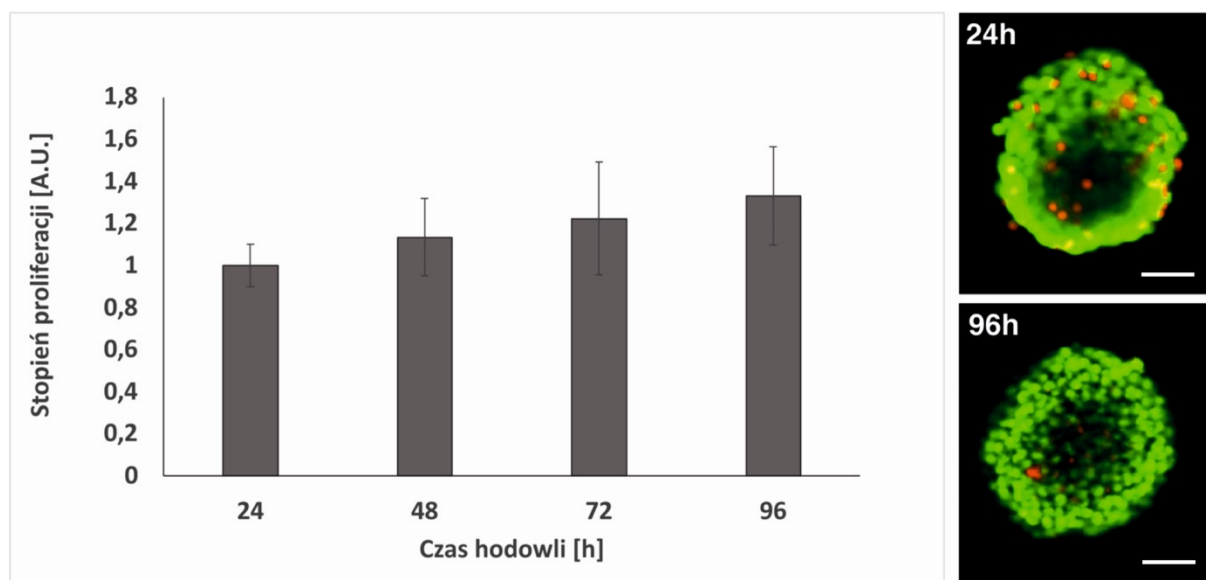


Rycina II. 13 Analiza agregacji komórek INS-1E po 24, 48, 72 i 96 h od wprowadzenia zawiesiny komórkowej do układu. Analiza średnicy B) oraz sferyczności C) agregatów uzyskanych w wyniku hodowli komórek INS-1E. Wartości odniesienia w analizie statystycznej stanowiły wyniki uzyskane po 24 h inkubacji wprowadzonych do mikrosystemu komórek. Gwiazdki oznaczają istotne statystycznie różnice, $n=3$, $p < 0,05$. Skala: 50 μm .

Po 24 h inkubacji komórek o gęstości 2×10^6 komórek/ml w mikrosystemie przepływowym IV zauważono, że komórki w każdej z 15 mikropułapek utworzyły kuliste agregaty o wymiarach 145–165 μm . W kolejnych dniach hodowli (48, 72, 96 h) zauważono stopniowy przyrost średnicy agregatu, co świadczyć może o prawidłowej dyfuzji składników odżywczych do wnętrza agregatu i zwiększeniu stopnia proliferacji komórek. Zaobserwowano również zmiany w stopniu sferyczności uzyskanych agregatów. Po 24 h od wprowadzenia komórek, sferyczność agregatów złożonych z komórek INS-1E wynosiła 0,68, natomiast po 96 h hodowli stopień sferyczności wzrósł do 0,91. Ponadto, dzięki zastosowaniu pułapek złożonych z mikropilar w geometrii mikrosystemu agregaty komórkowe były unieruchomione co zapobiegało migracji oraz usunięcia komórek z mikrosystemu. Przez cały czas trwania hodowli nie zauważono zarówno uszkodzeń i deformacji struktury, jak i migracji agregatów komórkowych poza pułapki hodowlane.

3.2.1.2.2. Wpływ warunków przepływowych na żywotność agregatów komórek INS-1E

Na tym etapie badań założono, że hodowla komórek INS-1E w warunkach przepływowych wpłynie na zwiększenie stopnia żywotności komórek. Geometria mikrosystemu IV została zaprojektowana tak, aby spełniać dwie główne funkcje: zapewnić unieruchomienie agregatów wewnątrz komory hodowlanej oraz umożliwić dyfuzję składników odżywczych do wnętrza agregatu przy jednoczesnym zminimalizowaniu naprężeń ścinających działających bezpośrednio na komórki. Analizę stanu hodowli prowadzono 24, 48, 72 oraz 96 h po wprowadzeniu komórek do mikrosystemu. Wyniki przedstawiono na rycinie II.14.



Rycina II. 14 Ocena stopnia proliferacji i żywotności komórek INS-1E hodowanych przez 96 h w mikrosystemie przepływowym. Agregaty komórkowe wybarwiono przy użyciu kalceiny-AM i jodku propidyny (komórki martwe – kolor czerwony, komórki żywe – kolor zielony). Skala: 50 μm

Na podstawie analizy wyników testu AlamarBlue prowadzonego przez 96 h trwania hodowli zaobserwowano stopniowy wzrost proliferacji komórek. Te obserwacje są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi zwiększania się średnicy uzyskanych agregatów. Zauważono występowanie niewielkiej liczby komórek martwych obecnych w całej objętości agregatu. Liczba komórek żywych zarówno po 24 h jak i 96 h wynosiła powyżej 95% całkowitej liczby komórek budujących agregat. Co więcej, nie potwierdzono występowania rdzenia martwiczego wewnątrz opracowanych agregatów komórkowych. Uzyskane wyniki

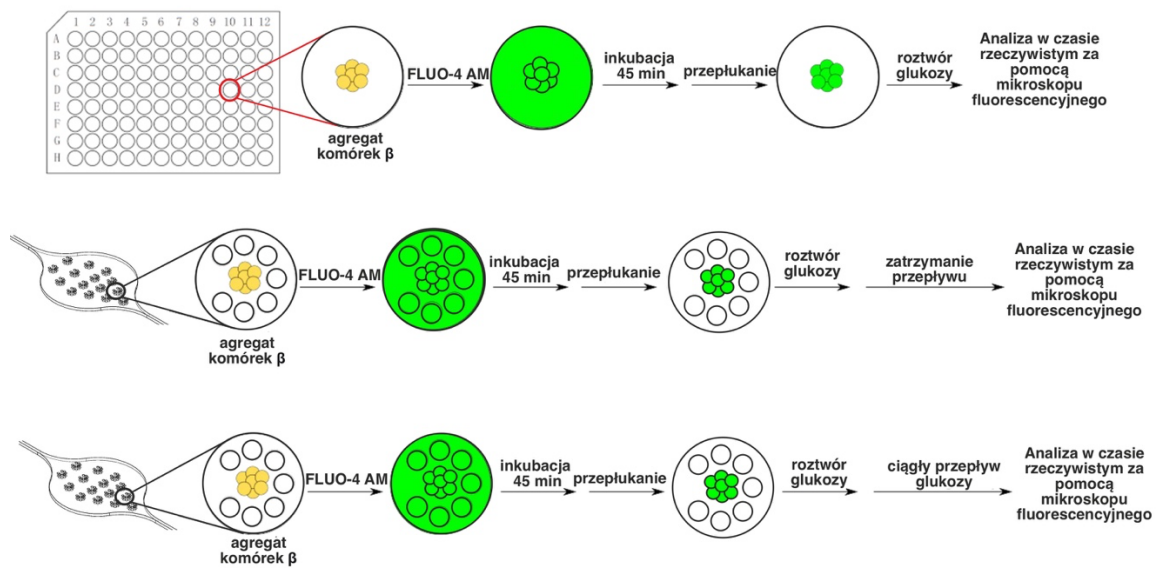
wskazują na wysoką żywotność uzyskanych agregatów. Może to wskazywać, że warunki przepływowe zwiększają dyfuzję tlenu i składników odżywczych do wnętrza agregatu oraz zapewniają prawidłową wymianę gazową pomiędzy agregatami a środowiskiem zewnętrznym. Na tym etapie badań potwierdzono, że geometria opracowanego mikrosystemu oraz dobrane warunki hodowli umożliwiały uzyskanie hodowli trójwymiarowych agregatów złożonych z komórek β (INS-1E) wysp trzustkowych.

3.2.1.3. Pomiar zmian jonów wapnia w odpowiedzi na stymulację roztworem glukozy

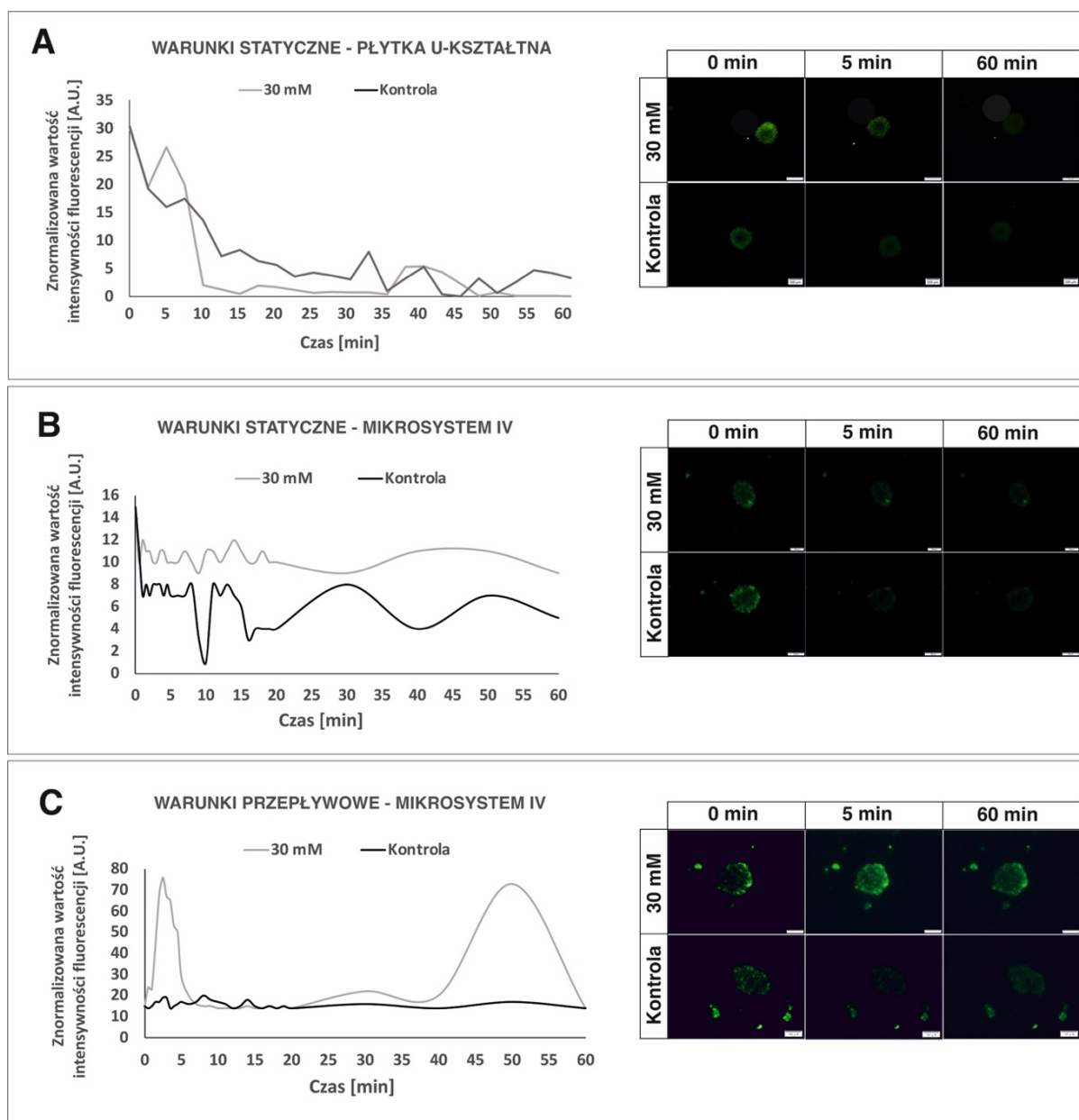
Komórki β wysp trzustkowych precyzyjnie reagują na zmiany stężenia glukozy i odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowej glikemii w organizmie [131]. W warunkach podwyższonego stężenia glukozy we krwi, komórki β wydzielają insulinę, co związane jest z oscylacyjnymi zmianami wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. [132]. W tej części badań określono poziom oscylacyjnych zmian stężenia jonów wapnia w komórkach β stymulowanych glukozą, zarówno w warunkach przepływowych jak i statycznych. W tym celu, agregaty komórek INS-1E hodowane w mikrosystemie przepływowym IV oraz w U-kształtnych płytkach 96-cio dołkowych inkubowano z roztworem Fluo-4 AM, który fluoryzuje po związaniu jonów wapnia Ca^{2+} . Następnie, prowadzono stymulację agregatów wykorzystując roztwór glukozy o stężeniu 30 mM lub bufor Krebsa-Ringera (kontrola). Badania prowadzono wykonując przez 60 min zdjęcia z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego sprzężonego z kamerą CCD (Olympus IX-71). Otrzymane wyniki analizowano przy pomocy programu cellSens Dimension (Olympus).

Badania prowadzono w warunkach statycznych (płytki U-kształtne, mikrosystem po zatrzymaniu przepływu - bez warunków przepływowych) oraz dynamicznych (mikrosystem w warunkach przepływowych).

Schemat przeprowadzonych badań przedstawiono na rycinie II.15.



Rycina II. 15 Schemat przedstawiający wykonanie analizy wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w agregatach komórek INS-1E hodowanych na 96-cio dołkowej płytce o U-kształtnym dnie oraz w mikrosystemie przepływowym IV.



Rycina II. 16 Wykres zależności znormalizowanych wartości intensywności fluorescencji pochodzącej od Fluo-4 związanego z jonami Ca^{2+} od czasu stymulacji agregatów złożonych z komórek INS-1E roztworem glukozy (30 mM oraz buforem Krebsa-Ringera). A) Stymulacja przeprowadzona w warunkach statycznych – hodowla agregatów na 96-cio dołkowej płytce U-kształtnej. B) Stymulacja przeprowadzona w warunkach statycznych – hodowla agregatów w mikroukładzie przepływowym IV (bez warunków przepływu). C) Stymulacja przeprowadzona w warunkach przepływowych – hodowla agregatów w mikroukładzie przepływowym IV (w warunkach ciągłego przepływu). Skala: 200 μm .

W pierwszym kroku przeprowadzono ciągłą stymulację (warunki przepływowe) agregatów komórek INS-1E w mikrosystemie przepływowym z wykorzystaniem roztworu glukozy lub buforu Krebsa-Ringera. Po stymulacji roztworem glukozy o stężeniu wynoszącym 30 mM zauważono dwufazowy wzrost intensywności fluorescencji pochodzącej od Fluo-4 związanego z jonami Ca^{2+} (rycina II.16 C). Pierwszy, wyraźny wzrost intensywności

fluorescencji zaobserwowano po około 3 min od rozpoczęcia stymulacji glukozą. Po tym czasie nastąpił spadek oraz stabilizacja poziomu intensywności fluorescencji, który związany jest z obniżeniem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Drugi wyraźny wzrost intensywności fluorescencji zaobserwowano po około 40 min stymulacji, który w ciągu kolejnych 10 min osiąga maksimum, a następnie spada i stabilizuje się. Te obserwacje są zgodne z doniesieniami literaturowymi na temat oscylacyjnego napływu jonów wapnia do komórki w warunkach podwyższonego stężenia glukozy [31], [133], [134]. W tym eksperymencie przeprowadzonym dla warunków kontrolnych (ciągły przepływ buforu Krebsa-Ringera) zauważono występowanie niewielkich zmian w intensywności fluorescencji, a co za tym idzie w napływie jonów wapnia do komórek. Te wahania poziomu intensywności fluorescencji nie były tak wyraźnie obserwowane jak w przypadku stymulacji glukozą oraz nie miały charakteru dwufazowego. Uzyskane wyniki są zgodne ze zmianami wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia występującymi w warunkach *in vivo*.

W kolejnym kroku przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem mikrosystemów przepływowych i warunków statycznych (zatrzymanie przepływu po wprowadzeniu roztworu glukozy lub buforu Krebsa-Ringera). Dla prowadzonego eksperymentu w warunkach kontrolnych zauważono niewielkie zmiany intensywności fluorescencji pochodzącej od Fluo-4 związanego z jonami Ca^{2+} trwające do ok. 15 min po wprowadzeniu roztworu i zatrzymaniu przepływu. Drugi, wzrost intensywności fluorescencji nastąpił po około 20-35 min oraz kolejny po 45-60 min od rozpoczęcia obserwacji. Tak jak w przypadku kontroli również w warunkach podwyższonego stężenia glukozy (30 mM) zaobserwowano niewielkie zmiany poziomu intensywności fluorescencji trwające do około 15 min od wprowadzenia roztworu glukozy. Drugi, niewielki wzrost intensywności fluorescencji był widoczny po około 35 min. W tym eksperymencie nie zaobserwowano istotnych różnic w zmianach stężenia jonów wapnia w komórkach pomiędzy stymulacją roztworem glukozy a warunkami kontrolnymi. Uzyskane wartości intensywności fluorescencji w warunkach statycznych były dużo mniejsze niż te obserwowane w warunkach przepływowych.

W ostatnim kroku przeprowadzono obserwacje napływu jonów wapnia do wnętrza agregatów komórek INS-1E w warunkach statycznych na płytkach 96-dołkowych o U-kształtnym dnie. W tym przypadku zarówno w warunkach kontrolnych jak i po stymulacji glukozą zaobserwowano stopniowy spadek intensywności fluorescencji pochodzącej od barwnika Fluo-4 związanego z jonami Ca^{2+} z niewielkimi wahaniami jej poziomu przez cały czas prowadzonych obserwacji. Brak różnic w stężeniu jonów wapnia pomiędzy warunkami podwyższonego stężenia glukozy a warunkami kontrolnymi nie odpowiada warunkom *in vivo*.

Podsumowując, wyłącznie dla eksperymentów prowadzonych w warunkach przepływowych, po stymulacji roztworem glukozy obserwowano wyraźny, dwufazowy wzrost poziomu intensywności fluorescencji pochodzący od zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} . Prowadzenie analizy z wykorzystaniem technik fluorescencyjnych, pozwalających na nieinwazyjne monitorowanie zmian zachodzących w komórkach w czasie rzeczywistym jest niezwykle istotne. Wykazano bowiem, że zaburzony napływ jonów wapnia do komórek może wskazywać na nieprawidłowe wydzielanie insuliny oraz dysfunkcję wysp trzustkowych. Jak opisano w literaturze wyspy trzustkowe myszy u których stwierdzono cukrzyce charakteryzowały się wysokim odsetkiem dysfunkcyjnych komórek β , które w ogóle nie wykazywały zmian w stężeniu jonów wapnia w odpowiedzi na stymulację roztworami o wysokim stężeniu glukozy [31]. W przeprowadzonych na tym etapie badaniach wykazano, że eksperymenty prowadzone w warunkach statycznych mogą nie wykazywać prawidłowej odpowiedzi na stymulację roztworami glukozy, a co za tym idzie odmiennie reagować na testowane środki terapeutyczne. W ramach tych badań potwierdzono, że zastosowanie opracowanego mikrosystemu przepływowego pozwala na monitorowanie zmian na poziomie komórkowym w czasie rzeczywistym.

3.2.1.4. Podsumowanie i wnioski

Głównym celem badań opisanych w niniejszym rozdziale było określenie odpowiednich warunków agregacji komórek INS-1E zarówno w warunkach statycznych (płytki U-kształtne) jak i przepływowych (mikrosystem IV). Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że zdolność komórek INS-1E do tworzenia sferycznych agregatów zależy w dużej mierze od rodzaju zastosowanego materiału jako powierzchni do hodowli komórek i gęstości zawiesiny komórkowej. Stopień agregacji komórek zależy od właściwości adhezyjnych komórek i interakcji pomiędzy integrzynami znajdującymi się na powierzchni błony komórkowej, a białkami macierzy wydzielanymi przez komórki [135]. Komórki INS-1E wykazują wysoką aktywność sekrecyjną, co ułatwia proces agregacji. Jednak w przypadku hodowli na płytkach wykonanych z PMMA interakcje pomiędzy komórką a powierzchnią płytki są często bardzo silne i przeważają nad interakcjami komórka-komórka [136]. Z tego powodu, w celu uzyskania sferycznych agregatów komórek INS-1E na wielodołkowych płytkach o U-kształtnym dnie konieczne było dodanie czynnika (Pluronic) zapobiegającego adhezji komórek do powierzchni płytki. Natomiast wykazano samoistną (bez dodatkowej modyfikacji powierzchni) agregację komórek INS-1E hodowanych w mikrosystemie przepływowym IV wyposażonym

w mikropułapki. Na tym etapie pokazano również, że w warunkach statycznych (na płytkach wielodołkowych) uzyskane agregaty komórek INS-1E charakteryzują się obecnością wyraźnego rdzenia złożonego z martwych komórek. Jest to prawdopodobnie związane z utrudnioną dyfuzją składników odżywczych do wnętrza agregatu w warunkach statycznych. Wykazano, że zmiana warunków hodowli ze statycznych na przepływowe (z wykorzystaniem mikrosystemu IV) wpływa na zwiększenie żywotności komórek w agregatach przez cały czas trwania hodowli. Ponadto, w hodowlach w warunkach przepływowych nie zaobserwowano rdzenia złożonego z komórek martwych. Jest to związane z obecnością mikropilar w geometrii mikrosystemu IV, które minimalizują naprężenia ścinające, zapewniają odpowiednią dyfuzję składników odżywczych oraz zapobiegają fragmentacji i wypłukiwaniu agregatów z mikrosystemu przepływowego. Udowodniono również, że agregaty komórkowe uzyskane w mikrosystemie przepływowym IV już od pierwszego dnia hodowli charakteryzowały się wyższym stopniem sferyczności i bardziej jednorodną strukturą niż agregaty komórkowe otrzymywane na płytkach wielodołkowych.

Badania prowadzone z wykorzystaniem barwnika Fluo-4 AM pozwoliły określić różnice w dynamicznym napływie jonów wapnia do komórek w warunkach przepływowych oraz statycznych. Wykazano, że opracowane agregaty złożone z komórek INS-1E w warunkach przepływowych charakteryzują się prawidłowymi, oscylacyjnymi zmianami w napływie jonów do wnętrza agregatu po stymulacji roztworami glukozy o stężeniu 30 mM. Takich zmian nie zauważono w warunkach statycznych (zarówno w makroskali jak i mikroskali). Uzyskane wyniki pokazują, że opracowany z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego model charakteryzuje się zbliżonym profilem odpowiedzi na stymulacje roztworami zawierającymi glukozę jak wyspy trzustkowe w warunkach *in vivo*, oraz pokazuje ograniczenia modeli opracowywanych w warunkach statycznych. Można więc wnioskować, że prowadzenie badań z wykorzystaniem modeli wysp trzustkowych w warunkach statycznych może nie odzwierciedlać prawidłowych zmian zachodzących w organizmie.

3.2.2. Badania z wykorzystaniem kokultury komórek

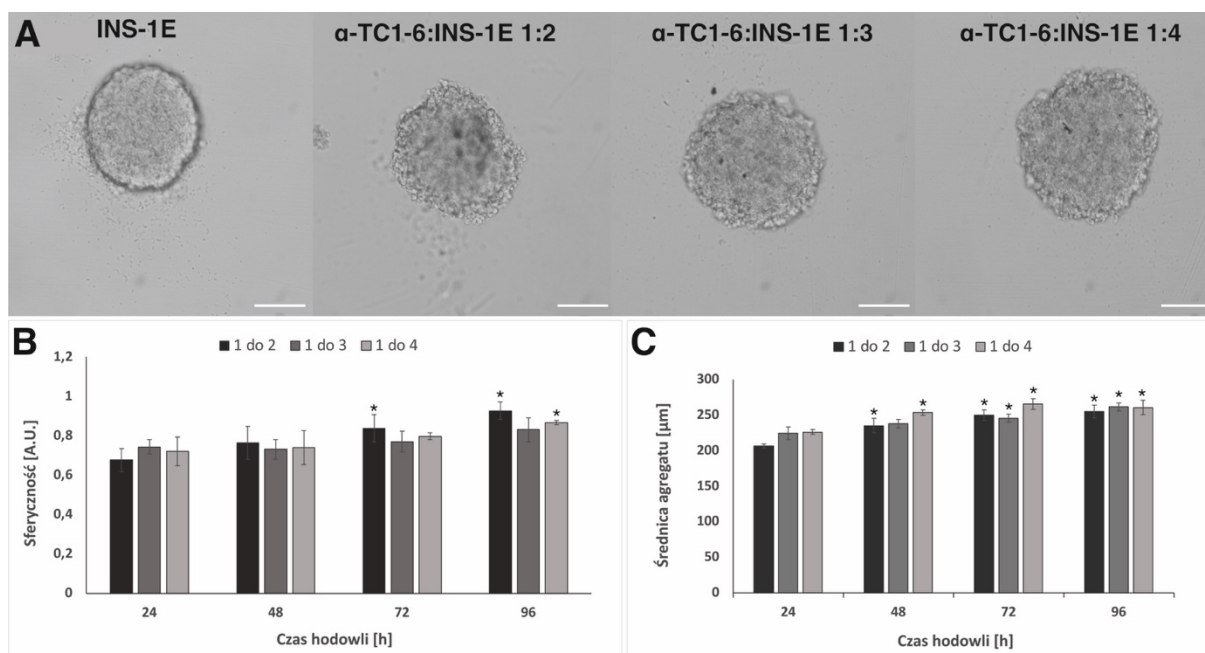
Wyspy trzustkowe to dobrze zdefiniowane struktury o określonym składzie i lokalizacji komórek. W warunkach fizjologicznych komórki α stanowią ~20% komórek i rozmieszczone są na obrzeżach wyspy trzustkowej, a komórki β znajdują się w rdzeniu wyspy i stanowią ~80% wszystkich komórek [8], [131]. Po przeprowadzeniu badań wstępnych z wykorzystaniem komórek INS-1E w kolejnych etapach prowadzono badania

z wykorzystaniem kokultury komórek α -TC1-6 oraz INS-1E. Badania te miały na celu odwzorowanie morfologii wyspy trzustkowej w warunkach *in vivo*. W tym etapie badań sprawdzono, czy zmiany w stosunku komórek α -TC1-6 do INS-1E wpłyną na żywotność komórek w opracowanym modelu, rozmiar pseudowyspy, a także zawartość i rozmieszczenie komórek w agregacie. Tak jak w poprzednich etapach pracy, badania rozpoczęto od testów wstępnych, prowadzonych z wykorzystaniem 96-dołkowych płytek o U-kształtnym dnie. Na podstawie wyników uzyskanych po przeprowadzeniu testów w makroskali podjęto próbę opracowania modelu wyspy trzustkowej złożonego z komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w opracowanym mikrosystemie przepływowym IV.

3.2.2.1. Badanie agregacji, proliferacji i żywotności kokultury komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w warunkach statycznych (makroskala)

3.2.2.1.1. Test agregacji komórek α -TC1-6 oraz INS-1E

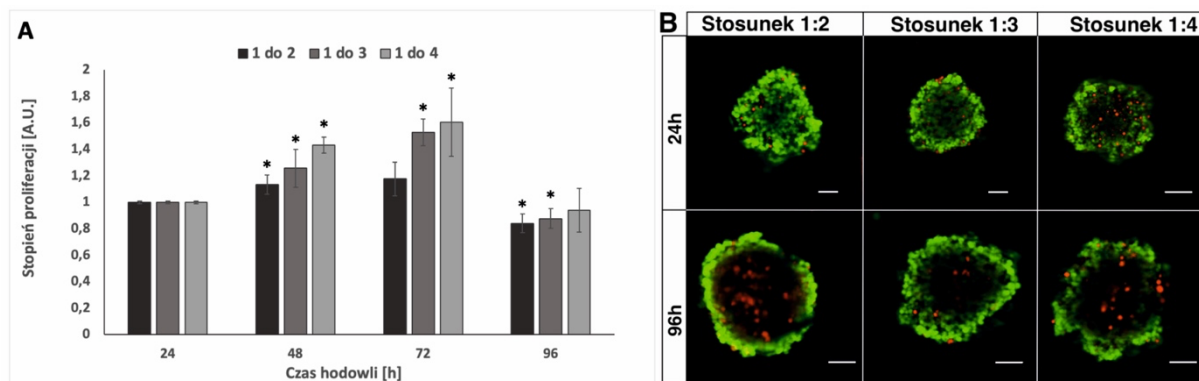
W poprzednich etapach prac wykazano zdolność komórek INS-1E do tworzenia trójwymiarowych agregatów. Na tym etapie pracy, założono, że agregacja komórek będzie się różnić w zależności od wykorzystywanego stosunku komórek α -TC1-6 do INS-1E. Na podstawie doniesień literaturowych wybrano trzy różne stosunki gęstości komórek: 1:2, 1:3 oraz 1:4. Na rycinie II.17 przedstawiono agregaty komórkowe otrzymane 24 h po wysianiu zawiesiny o gęstości 1×10^5 komórek/ml w wybranych stosunkach na 96-dołkową płytkę U-kształtną.



Rycina II. 17 Analiza stopnia agregacji komórek (A), sferyczności (B) oraz średnicy (C) agregatów uzyskanych w wyniku współhodowli komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w trzech różnych stosunkach gęstości (1:2, 1:3, 1:4) na płytkach o U-kształtnym dnie. Wartości odniesienia w analizie statystycznej stanowiły wyniki uzyskane po 24 h inkubacji wysianych na dół komórek. Gwiazdki oznaczają istotne statystycznie różnice, $n=3$, $p < 0,05$. Skala: 100 μm .

Zaobserwowano, że agregaty utworzone wyłącznie z komórek INS-1E miały najbardziej sferyczny kształt, co ma związek z większą zdolnością komórek INS-1E (niż α -TC1-6) do samoagregacji (silniejsze oddziaływania między komórkami). Zauważono, że agregaty otrzymane jako kokultura komórek α -TC1-6 oraz INS-1E zmieszanych w stosunku gęstości 1:2 charakteryzują się najmniej regularnym kształtem, najmniejszą średnicą oraz najniższym stopniem sferyczności. Jednak to właśnie w tym przypadku uzyskano największy przyrost średnicy uzyskanego agregatu w kolejnych dniach hodowli. Ponadto, agregaty otrzymane w wyniku kokultury komórek α -TC1-6 oraz INS-1E (stosunek gęstości 1:2) ostatniego dnia hodowli charakteryzowały się najwyższym stopniem sferyczności w porównaniu z pozostałymi testowanymi stosunkami komórek. Stopień sferyczności agregatów po 96 h hodowli wynosił odpowiednio: 0,93 dla komórek hodowanych w stosunku gęstości 1:2, 0,83 dla 1:3 oraz 0,87 dla 1:4. Ostatniego dnia hodowli, średnica agregatu uzyskanego w wyniku hodowli komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w stosunku gęstości 1:4 nieznacznie zmniejszyła się podczas gdy średnica dla 1:2 oraz 1:3 wzrosła w porównaniu do poprzedniego dnia hodowli (rycina II.17).

Kolejnym etapem było sprawdzenie czy zmiany w ilości danego typu komórek budujących agregat mają wpływ na proliferację i żywotność komórek. Wyniki przedstawiono na rycinie II.18.

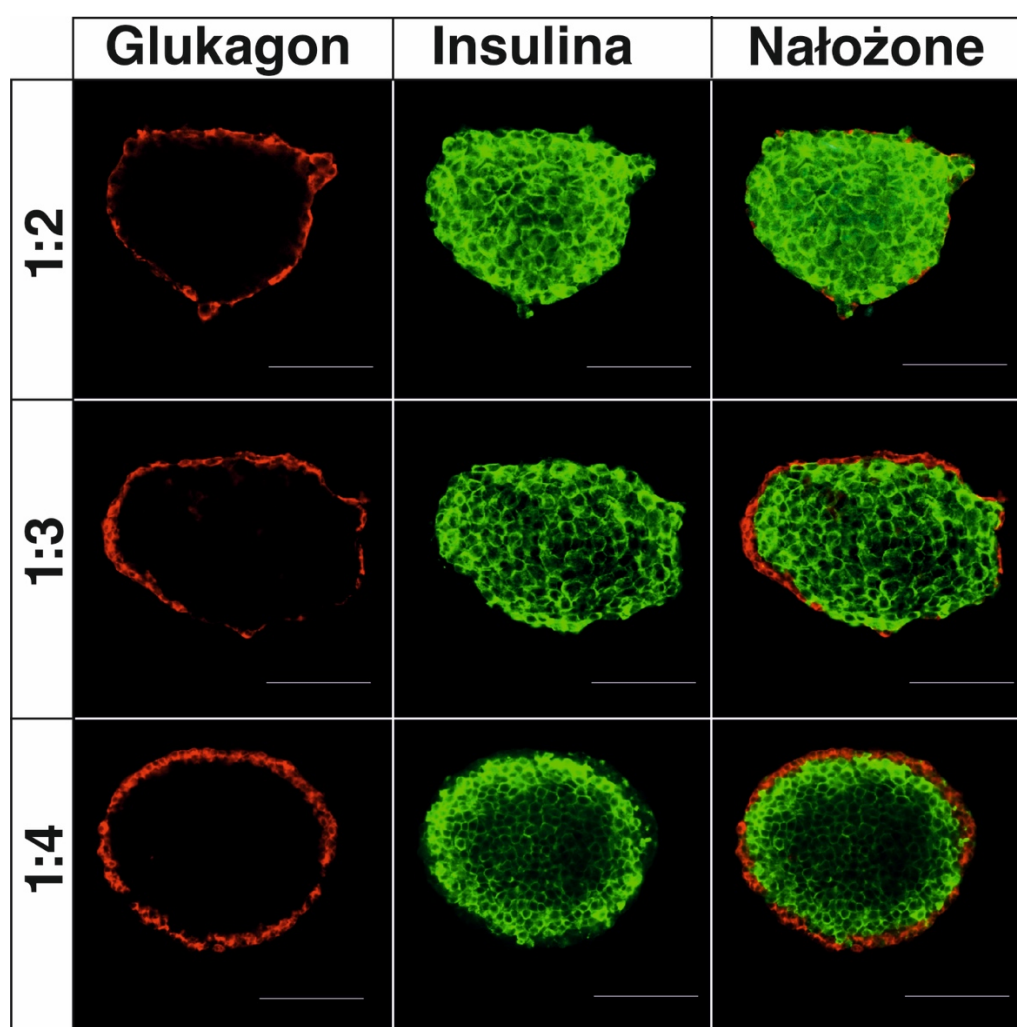


Rycina II. 18 Ocena stopnia proliferacji (A) i żywotności (B) agregatów komórkowych uzyskanych w wyniku wspólnej hodowli komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w trzech różnych stosunkach (1:2, 1:3, 1:4) na płytkach o U-kształtnym dnie. Agregaty komórkowe wybarwiono przy użyciu kalceiny-AM i jodku propidyny (komórki martwe – kolor czerwony, komórki żywe – kolor zielony). Gwiazdki oznaczają istotne statystycznie różnice, $p < 0,05$. Skala: 50 μ m.

Zaobserwowano, że w każdym przypadku stopień proliferacji uzyskanych agregatów wzrastał po 24, 48 i 72 h prowadzenia hodowli, natomiast po 96 h stopień proliferacji spadał o około 20 % w porównaniu do wyników uzyskanych pierwszego dnia prowadzenia hodowli (24 h) i o około 60% w porównaniu do wyników uzyskanych dla dnia poprzedniego (72h). Po przeanalizowaniu wyników barwienia różnicowego zauważono, że w przypadku agregatów uzyskanych w wyniku hodowli kokultury komórek α -TC1-6 oraz INS-1E (zmieszanych w stosunku gęstości 1:4) już po 24 h prowadzenia hodowli obecna jest znaczna liczba komórek martwych zlokalizowanych głównie w rdzeniu agregatu. Może to wynikać z faktu, że w tym przypadku w skład agregatu wchodzi czterokrotnie więcej komórek INS-1E niż α -TC1-6. Komórki INS-1E charakteryzują się wysoką zdolnością do samoagregacji, co z kolei może skutkować najbardziej „upakowaną” strukturą, a tym samym najbardziej utrudnioną dyfuzją tlenu i składników odżywczych do wnętrza agregatu przez wielokomórkowe warstwy. Po 96 h prowadzenia hodowli we wszystkich testowanych stosunkach gęstości komórek zauważono wzrost liczby komórek martwych zlokalizowanych w rdzeniu agregatu. Spadek proliferacji i żywotności komórek budujących agregat może być związany z utrudnioną dyfuzją składników odżywczych do wnętrza agregatu w warunkach statycznych.

3.2.2.1.2. Określenie lokalizacji komórek budujących agregat w warunkach statycznych

Tak jak wspomniano wcześniej, wyspy trzustkowe to sferyczne agregaty charakteryzujące się specyficznym i ściśle określonym ułożeniem komórek α oraz β . Dlatego też, kolejnym etapem badań było określenie lokalizacji i zawartości komórek INS-1E oraz α -TC1-6 w agregatach otrzymanych z wykorzystaniem U-kształtnych płytek wielodołkowych. Po 24 h od wysiania komórek na płytkę przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne z wykorzystaniem przeciwciał. Po wykonaniu procedury barwienia, agregaty komórkowe przeniesiono na szkiełko nakrywkowe i wykonano analizę w 2D i 3D z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego (Olympus FluoView). Wyniki barwienia immunofluorescencyjnego przedstawiono na rysunku II.19.



Rycina II. 19 Potwierdzenie lokalizacji komórek α i β w uzyskanych z wykorzystaniem płytek o U-kształtnym dnie agregatach komórkowych. Barwienie glukagonu (Alexa Fluor 594 – komórki czerwone) i insuliny (Alexa Fluor 488 – komórki zielone). Skala: 100 μ m.

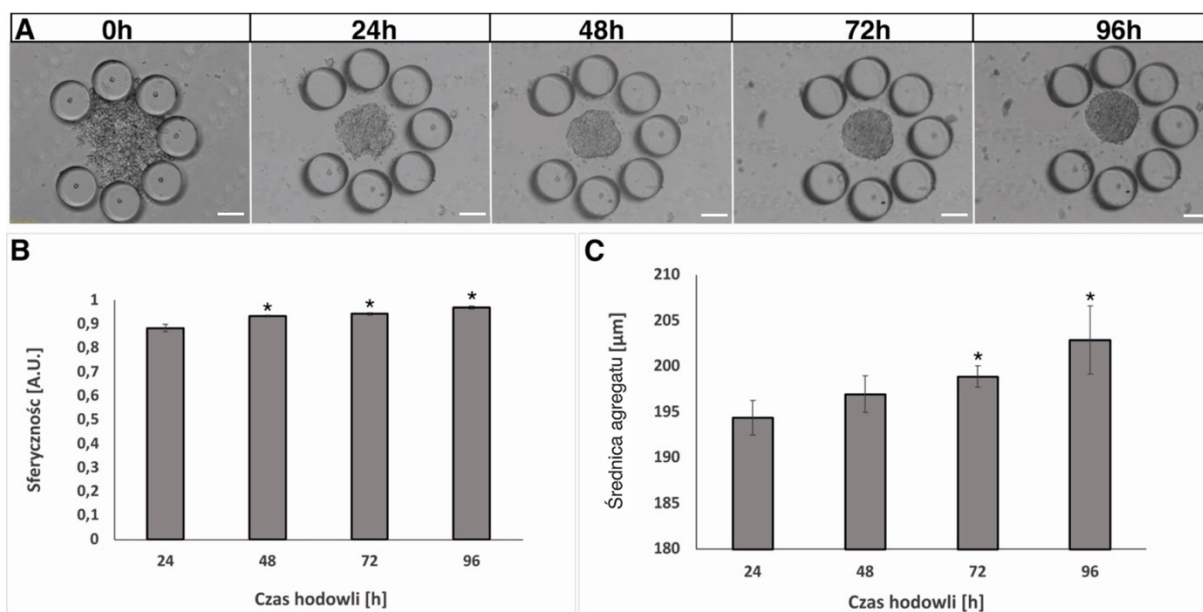
Zauważono, że w przypadku każdego wybranego stosunku gęstości komórek α -TC1-6 do INS-1E, komórki odpowiedzialne za sekrecję insuliny (INS-1E) lokalizowały się w rdzeniu agregatu (komórki wybarwione na zielono), a komórki odpowiedzialne za sekrecję glukagonu (α -TC1-6) znajdowały się na peryferiach agregatu (komórki wybarwione na czerwono) otaczając komórki INS-1E. Taki rozkład komórek może być spowodowany silniejszymi oddziaływaniami pomiędzy komórkami INS-1E i ich szybszemu grupowaniu się w sferyczne struktury. Ponadto, najwyższe wartości intensywności fluorescencji insuliny zaobserwowano w przypadku agregatów uzyskanych po hodowli komórek w stosunku gęstości 1:2. Opracowane agregaty komórkowe morfologicznie pod względem wielkości, struktury, składu i lokalizacji komórek α oraz β odpowiadały wyspom trzustkowym w warunkach *in vivo*. Uzyskane wyniki pokazują możliwość odwzorowania struktury wyspy trzustkowej z wykorzystaniem wielodołkowych płytek o U-kształtnym dnie.

3.2.2.2. Badanie agregacji, proliferacji i żywotności kokultury komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w warunkach przepływowych (mikroskala)

3.2.2.2.1. Test agregacji komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w warunkach przepływowych

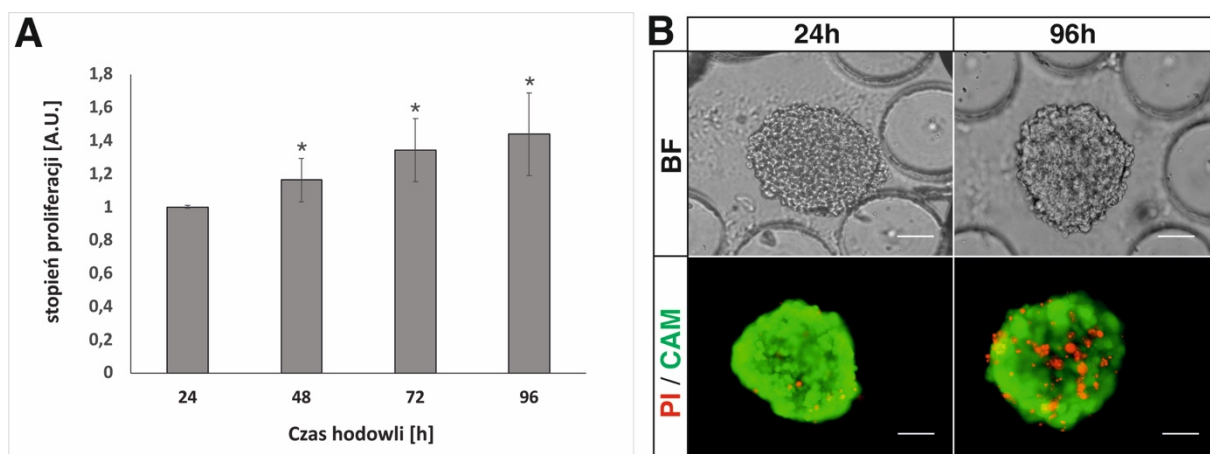
Na podstawie badań opisanych we wcześniejszych rozdziałach niniejszej pracy do opracowania modelu wyspy trzustkowej w mikrosystemie przepływowym wybrano stosunek gęstości komórek α do β wynoszący 1:2 oraz gęstość wprowadzanej zawiesiny równą 2×10^6 komórek/ml.

Tak jak w przypadku badań z wykorzystaniem monokultury komórek INS-1E, w momencie wprowadzania komórek do komory mikrosystemu, każda z 15 mikropułapek oraz przestrzenie pomiędzy nimi zostały wypełnione zawiesiną komórkową, która po przepłukaniu świeżą pożywką została usunięta z przestrzeni pomiędzy pułapkami. Po 24 h inkubacji (5% CO₂, 37°C) komórki w każdej z mikropułapek utworzyły kuliste agregaty o wymiarach 185 - 197 μ m. Następnie, utworzone agregaty z powodzeniem hodowano przez kolejne 72 h. Proces agregacji przedstawiono na rycinie II.20



Rycina II. 20 A) Analiza agregacji kokultury komórek α -TC1-6 oraz INS-1E zmieszanych w stosunku gęstości 1:2 po 24 h od wprowadzenia zawiesiny komórkowej do mikroukładu. B) Analiza zmian średnicy uzyskanych agregatów hodowanych w mikrosystemie przez 96 h. C) Analiza zmian sferyczności uzyskanych agregatów hodowanych przez 96 h. Wartości odniesienia w analizie statystycznej stanowiły wyniki uzyskane po 24 h inkubacji wysianych na dółek komórek. Gwiazdki oznaczają istotne statystycznie różnice, $n=3$, $p < 0,05$. Skala: 100 μm .

Agregaty uzyskane w wyniku kokultury komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w opracowanym mikrosystemie przepływowym już od pierwszego dnia prowadzenia hodowli charakteryzowały się wysokim stopniem sferyczności. Po 24 h od wprowadzenia komórek do mikrosystemu przepływowego IV stopień sferyczności agregatów wynosił 0,88 i wzrastał każdego kolejnego dnia hodowli, osiągając 0,97 ostatniego dnia (96 h). Zauważono również istotny wzrost średnicy agregatu, która z około 94 μm uzyskanych po 24 h hodowli wzrosła do ok. 203 μm ostatniego dnia hodowli, co może świadczyć o wysokim stopniu proliferacji komórek. W celu weryfikacji tych obserwacji oraz oceny wpływu wybranych warunków panujących w układzie mikroprzepływowym na opracowany model pseudowyspy (tj. szybkości przepływu, czasu inkubacji i odpowiedniej gęstości komórek) przeprowadzono test żywotności i proliferacji. Test prowadzono każdego dnia trwania hodowli (od 24 do 96 h hodowli). Wyniki przedstawiono na rycinie II.21.



Rycina II. 21 Wspólna hodowla komórek α -TC1-6 oraz INS-1E zmieszanych w stosunku gęstości 1:2 po 24, 48 i 72 h hodowli w opracowanym mikrosystemie przepływowym IV. A) Analiza stopnia proliferacji opracowanych agregatów, $n = 3$ * $p < 0,05$. B) Barwienie różnicowe z wykorzystaniem kalceiny-AM (CAM; żywe komórki, kolor zielony) i jodkiem propidyny (PI; martwe komórki, kolor czerwony). Skala: 50 μ m

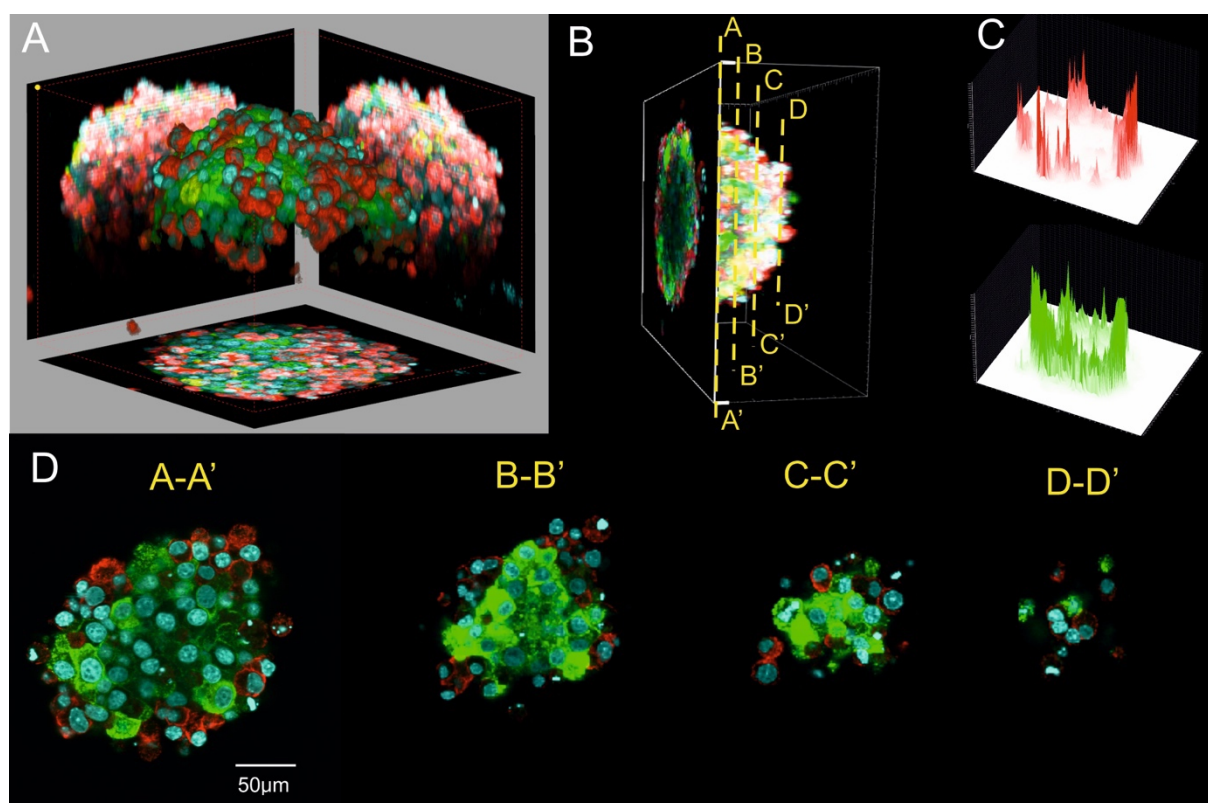
Wykazano, wzrost stopnia proliferacji opracowanych agregatów komórkowych każdego dnia prowadzonej hodowli. Stopień proliferacji w porównaniu z pierwszym dniem hodowli (24 h) wzrósł do 1,16; 1,34 i 1,44 odpowiednio po 48, 72 i 96 h (rycina II.21 A). W kolejnym etapie przeprowadzono test żywotności barwiąc uzyskane agregaty komórkowe z wykorzystaniem jodku propidyny oraz kalceiny-AM. Uzyskane wyniki wykazały wysoką żywotność uzyskanych agregatów zarówno pierwszego (24 h) jak i ostatniego (96 h) dnia hodowli. Liczba komórek martwych pierwszego oraz ostatniego dnia hodowli była nieznaczna i wynosiła odpowiednio $\pm 5\%$, ± 15 . Ponadto, w otrzymanych agregatach nie zaobserwowano występowania rdzenia martwiczego. Wyniki uzyskane na tym etapie prac pokazują, że zmiana warunków ze statycznych (płytki U-kształtne) na przepływowe (mikrosystem IV) wpływa na znaczne zwiększenie stopnia proliferacji oraz żywotności komórek. Może to być związane z geometrią mikrosystemu i zastosowaniem mikropułapek zbudowanych z mikropilar, które umożliwiają dostarczanie składników odżywczych do wnętrza agregatu przy jednoczesnym zminimalizowaniu naprężeń ścinających związanych z przepływem pożywki hodowlanej.

3.2.2.2.2. Ocena składu i lokalizacji komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w opracowanym modelu wyspy trzustkowej warunkach przepływowych

W poprzednich etapach badań opracowano mikrosystem przepływowy IV, w którym uzyskano sferyczne agregaty złożone zarówno z monokultury jak i kokultury. W kolejnym etapie badań kluczowym było potwierdzenia prawidłowej architektury oraz odpowiedniego

rozmieszczenia komórek w opracowanych agregatach komórkowych. W tym celu, przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne i wyznakowano komórki odpowiedzialne za sekrecję insuliny oraz glukagonu.

Dzięki zastosowaniu szkiełka nakrywkowego o grubości $170 \pm 5 \mu\text{m}$ w konstrukcji mikrosystemu przepływowego możliwa była obserwacja uzyskanych agregatów w 3D z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego bezpośrednio w systemie bez konieczności przenoszenia agregatów do analizy. Dzięki temu ryzyko uszkodzenia struktury zostało zminimalizowane. Wyniki barwienia immunofluorescencyjnego przedstawiono na rycinie II. 22.



Rycina II. 22 Ocena lokalizacji komórek α i β poprzez barwienie immunofluorescencyjne glukagonu (Alexa Fluor 594, kolor czerwony) i insuliny (Alexa Fluor 488, kolor zielony). Jądra komórkowe wybarwiono przy użyciu barwnika Hoechst 33258 (kolor niebieski). A) Obraz uzyskany w wyniku analizy otrzymanego agregatu komórkowego w widoku 3D z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. B) Kolejne warstwy agregatu w których prowadzono analizę C) Analiza intensywności fluorescencji w poszczególnych lokalizacjach agregatu (komórki β w rdzeniu, komórki α na obrzeżach agregatu). D) Zdjęcie przestrzennego rozmieszczenia komórek α i β z kilku wybranych warstw (przedstawionych w punkcie B) tej samej pseudowyspy.

Dzięki połączeniu precyzyjnego znakowania insuliny i glukagonu znajdujących się w komórkach α - i β oraz analizy całych agregatów komórkowych (wzdłuż osi Z, warstwa po warstwie) możliwe było określenie dokładnej lokalizacji obu typów komórek budujących opracowany model. Potwierdzono, że agregaty komórkowe, uzyskane w wyniku współhodowli

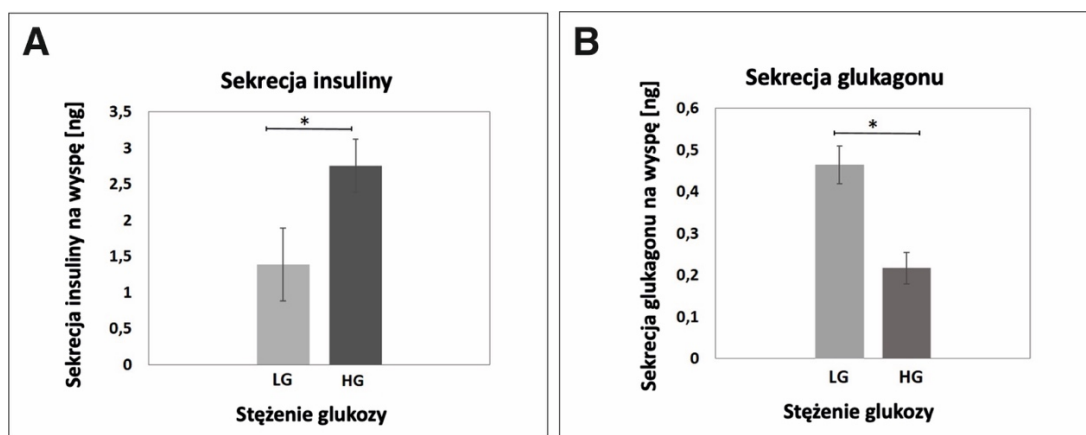
komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w stosunku gęstości 1:2 w mikrosystemie przepływowym IV, miały taką samą architekturę (pod względem wielkości, morfologii oraz rozmieszczenia komórek α i β) jak wyspy trzustkowe w warunkach *in vivo*. Otrzymane pseudowyspy komórkowe były sferyczne i dobrze zorganizowane, komórki β znajdowały się w rdzeniu agregatu, natomiast komórki α były rozmieszczone obwodowo (rycina II.22). Ponadto, w celu potwierdzenia rozmieszczenia komórek w agregacie przeprowadzono analizę intensywności fluorescencji. Wysoką intensywność fluorescencji pochodzącą od insuliny (kolor zielony) zaobserwowano wewnątrz agregatu, a wysoką intensywność fluorescencji pochodzącą od znakowania glukagonu (kolor czerwony) na zewnętrznej części agregatu potwierdzając tym samym prawidłową dystrybucję komórek w opracowanym modelu. Na tym etapie badań potwierdzono, że z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego IV możliwe jest uzyskanie sferycznych agregatów charakteryzujących się wysokim stopniem proliferacji i żywotności, które pod względem składu i lokalizacji komórek odpowiadają wyspie trzustkowej w organizmie.

3.2.2.3. Ocena funkcjonalności pseudowysp opracowanych z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego IV

Funkcjonalność wysp trzustkowych określa się między innymi poprzez ocenę ich zdolności do wydzielania insuliny i glukagonu w odpowiedzi na stymulację glukozą [137]. W momencie dostarczenia do wyspy trzustkowej roztworu glukozy o wysokim stężeniu, wydzielanie insuliny wzrasta. W tym samym czasie następuje zmniejszenie wydzielania glukagonu. Odwrotnie jest w przypadku niskiego stężenia glukozy. W takiej sytuacji poziom sekrecji insuliny powinien być niski przy jednoczesnym wysokim poziomie wydzielanego glukagonu [138], [139].

Jednym z kluczowych etapów niniejszej pracy było określenie wydzielania insuliny i glukagonu z opracowanego z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego IV modelu pseudowyspy po inkubacji z różnymi stężeniami glukozy. W związku z tym przeprowadzono badania funkcjonalności agregatów komórek α i β wykonano testy wydzielania insuliny i glukagonu 24 h po wprowadzeniu komórek do systemu przepływowego. Test przeprowadzono po stymulacji agregatów roztworami o niskim (2,75 mM) i wysokim (16,5 mM) stężeniu glukozy. Dzięki zaprojektowaniu dwóch identycznych mikrokomór w jednym mikrosystemie stymulacje roztworami glukozy o wysokim i niskim stężeniu

przewodzone w tym samym mikrosystemie, w tych samych warunkach. Otrzymane wyniki przedstawiono na rycinie II. 23.



Rycina II. 23 A) Analiza sekrecji insuliny i (B) glukagonu po stymulacji roztworem glukozy o stężeniu wynoszącym 16,5 mM (HG) lub 2,75 mM (LG), $n \geq 3$. * $p < 0,05$.

Po przeprowadzeniu analizy uzyskanych wyników zauważono znaczne różnice w sekrecji zarówno insuliny jak i glukagonu po stymulacji roztworami o niskim oraz wysokim stężeniu glukozy. Poziom wydzielania insuliny w układzie mikroprzepływowym wynosił 1,38 ng na pseudowyspę po stymulacji roztworem o stężeniu glukozy wynoszącym 2,75 mM. Natomiast, w przypadku stymulacji pseudowysp roztworem glukozy o stężeniu 16,5 mM zanotowano wydzielanie 2,75 ng insuliny na pseudowyspę. Stanowi to niemalże dwukrotny wzrost ilości wydzielonej insuliny w porównaniu do poziomu uzyskanego po stymulacji roztworem o niskim stężeniu glukozy. Dla poziomu wydzielania glukagonu zaobserwowano odwrotną zależność, 0,47 i 0,21 ng glukagonu na pseudowyspę było wydzielane odpowiednio w warunkach niskiego i wysokiego stężenia glukozy. Uzyskane wyniki potwierdzają zdolność opracowanego modelu do prawidłowej odpowiedzi na stymulację roztworami glukozy. Wyniki te potwierdziły, że agregaty komórek INS-1E i α -TC1-6 hodowane w układzie mikroprzepływowym są w pełni funkcjonalne.

3.2.2.4. Podsumowanie i wnioski

W tej części pracy podjęto próbę odwzorowania struktury wyspy trzustkowej z wykorzystaniem kokultury dwóch najważniejszych w kontekście cukrzycy typów komórek: α (α -TC1-6) oraz β (INS-1E). Kluczowym krokiem był dobór odpowiedniego stosunku

gęstości komórek α -TC1-6 do INS-1E, tak aby możliwie jak najlepiej odwzorować warunki *in vivo*. Ścisłe określona architektura wyspy trzustkowej może mieć kluczowe znaczenie dla prawidłowej komunikacji między komórkami budującymi wyspę, a tym samym dla prawidłowej sekrecji hormonów.

Wyniki uzyskane na tym etapie badań wykazały, że komórki α -TC1-6 oraz INS-1E zmieszane w stosunku gęstości 1:2, 1:3, 1:4 i hodowane jako kokultura tworzą sferyczne agregaty komórkowe zarówno w mikrosystemach przepływowych jak i w 96-cio dołkowych płytkach o U-kształtnym dnie zmodyfikowanych roztworem Pluronic. W literaturze znaleźć można przykłady trójwymiarowych modeli komórkowych złożonych z komórek wysp trzustkowych hodowanych w warunkach statycznych z wykorzystaniem min. płytek wielodołkowych [125], [140]. Najczęściej w tych badaniach wykorzystuje się wyizolowane wyspy trzustkowe, komórki β lub komórki macierzyste [130]. Jednym z ważniejszych aspektów jest utrzymanie wysokiej żywotności takich modeli komórkowych w hodowlach długoterminowych. W tej części badań potwierdzono możliwość tworzenia trójwymiarowych pseudowysp metodą tradycyjną z wykorzystaniem płytek o U-kształtnym dnie. Natomiast uzyskane pseudowyspy charakteryzowały się niskim stopniem proliferacji i dużym udziałem komórek martwych zlokalizowanych głównie w rdzeniu agregatu. Wywnioskowano, że może mieć to związek z utrudnioną dyfuzją składników odżywczych do wnętrza agregatu hodowanego na płytkach wielodołkowych w warunkach statycznych. Ponadto, podczas hodowli trójwymiarowych modeli komórkowych tradycyjnymi metodami napotkać można problemy związane z uszkodzeniem komórek. Agregaty nie są związane z podłożem, a tym samym nie są unieruchomione, co zwiększa ryzyko ich uszkodzenia lub wypłukania z dołków hodowlanych na etapie zmiany roztworów przy prowadzeniu wieloetapowych eksperymentów. Ponadto, konieczność przenoszenia agregatów np. na szkiełka nakrywkowe w przypadku analizy z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego w kilku przypadkach przeprowadzonych eksperymentów generowała kolejne uszkodzenia struktury. Na tym etapie założono, że zmiana warunków hodowli ze statycznych (makroskala) na dynamiczne/przepływowe (mikroskala) pozwala na uzyskanie agregatów charakteryzujących się wyższym poziomem sferyczności, proliferacji oraz brakiem nekrotycznego rdzenia niż w przypadku wykorzystania płytek o U-kształtnym dnie. Ponadto, w przypadku wykorzystania opracowanego mikrosystemu przepływowego IV analiza parametrów hodowli, składu komórkowego pseudowyspy oraz sekrecji insuliny i glukagonu została wykonana w czasie rzeczywistym w mikrosystemie bez konieczności przenoszenia agregatów na inne podłoża. W kolejnych etapach badań wykazano prawidłowy rozkład

komórek w opracowanych pseudowyspach – komórki INS-1E zlokalizowane były wewnątrz (w rdzeniu) pseudowyspy natomiast komórki α -TC1-6 na obrzeżach, otaczając komórki INS-1E. W literaturze pokazano, że takie ułożenie komórek może mieć związek ze zróżnicowaną ekspresją cząsteczek adhezyjnych komórek (CAM), a dokładniej CAM neuronalnych (N-CAM), w obu typach komórek, która jest odpowiedzialna za powstanie i utrzymanie architektury wysp [141], [142].

Na tym etapie badań potwierdzono również, że opracowany z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego IV model pseudowyspy jest w pełni funkcjonalny. Funkcjonalność wysp trzustkowych określono poprzez ocenę ich zdolności wydzielniczej insuliny i glukagonu w odpowiedzi na stymulację glukozą [137]. Potwierdzono dwukrotny wzrost sekrecji insuliny po stymulacji roztworami o wysokiej zawartości glukozy w porównaniu ze stymulacją roztworami o niskiej zawartości glukozy. Ponadto, potwierdzono prawidłową sekrecję glukagonu – w warunkach wysokiego stężenia glukozy wydzielanie glukagonu było praktycznie dwukrotnie niższe niż w obecności niskiego stężenia glukozy. Wyniki badań stały się przedmiotem publikacji [143].

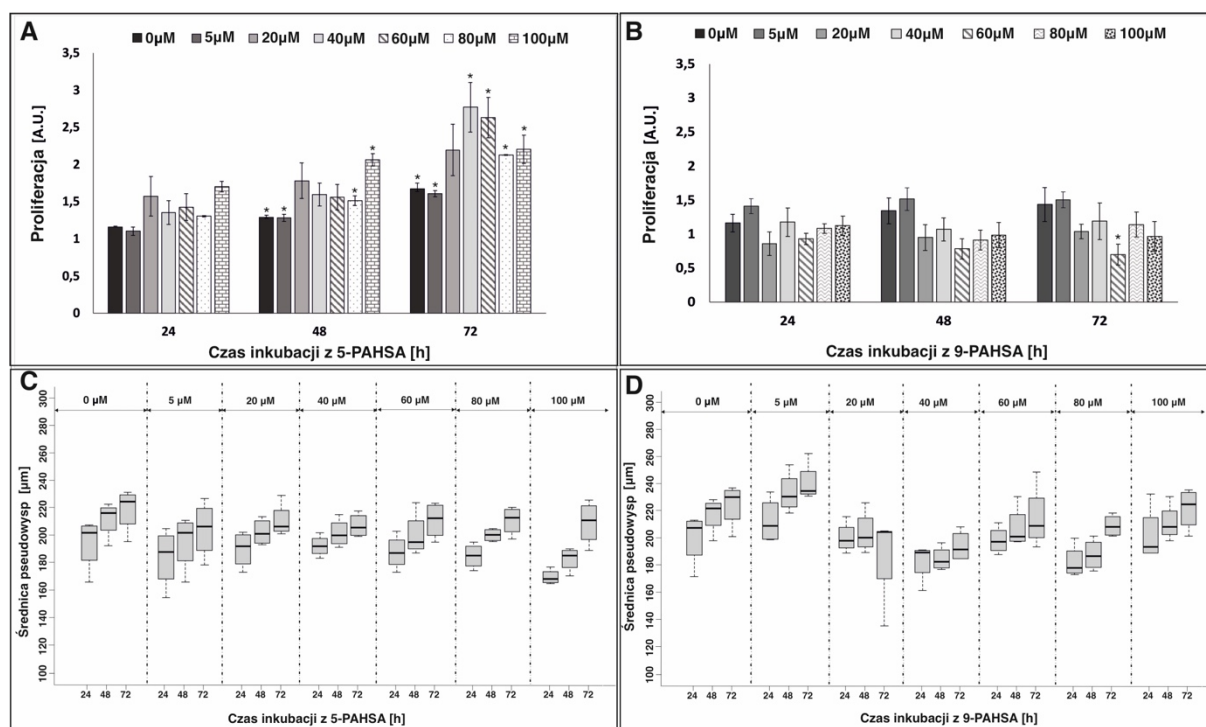
3.3. Ocena możliwości wykorzystania opracowanego systemu jako modelu do badań przesiewowych potencjalnych związków terapeutycznych

Obecnie, rosnąca liczba przypadków cukrzycy i powikłań związanych z jej rozwojem jest impulsem do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych i profilaktycznych. W kolejnych etapach pracy zdecydowano się przeprowadzić badania z wykorzystaniem dwóch izomerów estru kwasu palmitynowego i hydroksykwasu stearynowego (PAHSA): 5-PAHSA oraz 9-PAHSA i określić wpływ tych związków na opracowany model pseudowyspy.

Głównym celem tej części badań było określenie potencjalnego terapeutycznego wpływu wyżej opisanych izomerów PAHSA na opracowany model pseudowyspy, a także określenie możliwości wykorzystania opracowanego modelu jako uniwersalnego narzędzia wykorzystywanego do badań przesiewowych nowych terapeutyków. Na podstawie danych literaturowych założono, że inkubacja opracowanych z wykorzystaniem mikrosystemu IV pseudowysp z 5-PAHSA oraz 9-PAHSA będzie miała stymulujący wpływ na sekrecję insuliny i glukagonu. W związku ze sprzecznymi informacjami na temat wpływu tych związków na komórki wysp trzustkowych, postanowiono przeprowadzić testy z wykorzystaniem szerokiego zakresu stężeń (0-100 μ M) i określić ich wpływ na morfologię pseudowysp, żywotność i proliferację komórek oraz sekrecję insuliny i glukagonu.

3.3.1. Wpływ izomerów 5-PAHSA i 9-PAHSA na morfologię pseudowyp

W tym etapie badań przeprowadzono analizę stanu hodowli, zmian morfologii uzyskanych pseudowyp oraz stopnia proliferacji oraz żywotności po inkubacji z wybranymi stężeniami (5 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, 100 μ M) 5-PAHSA oraz 9-PAHSA z wykorzystaniem mikrosystemu IV. Wyniki przedstawiono na rycinie II. 24.



Rycina II. 24 Wpływ stymulacji różnymi stężeniami 5-PAHSA lub 9-PAHSA na proliferację komórek (A, C) oraz średnicę pseudowyp (B, D). Wyniki przedstawione na wykresach znormalizowano do pomiaru stopnia proliferacji 24 h po wprowadzeniu komórek do mikrosystemu przepływowego IV (bez inkubacji z 5-PAHSA lub 9-PAHSA), n=3 *p < 0,05.

Po przeprowadzeniu analizy nie zauważono cytotoksycznego wpływu związków 5-PAHSA oraz 9-PAHSA na opracowany model. Zauważono natomiast istotne różnice w stopniu proliferacji komórek pomiędzy inkubacją z 5-PAHSA a 9-PAHSA. Potwierdzono wysoki stopień proliferacji komórek po inkubacji ze wszystkimi wybranymi stężeniami 5-PAHSA. Wyższe wartości stopnia proliferacji uzyskano zarówno w stosunku do kontroli, jak i w stosunku do stymulacji tymi samymi stężeniami 5-PAHSA w dniu poprzednim. Po 24 h inkubacji pseudowyp z 5-PAHSA, największy wzrost stopnia proliferacji (w odniesieniu do pomiaru wykonanego dla tego samego mikrosystemu przed podaniem roztworu 5-PAHSA) zauważono dla inkubacji z 100 μ M 5-PAHSA. W tym przypadku stopień proliferacji wzrósł o 0,70. W kolejnych dniach tempo proliferacji komórek było wolniejsze –

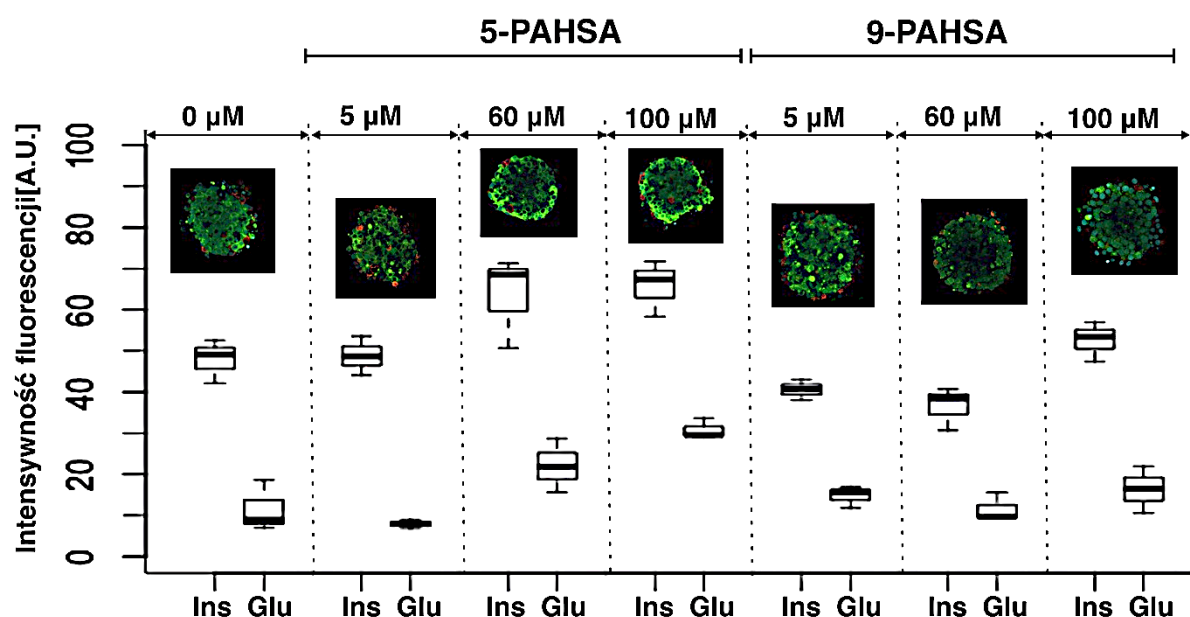
zaobserwowano wzrost o odpowiednio 0,36 (48 h inkubacji) oraz 0,14 (72 h inkubacji) w porównaniu do poprzedniego dnia. Po 72 h inkubacji pseudowysp z 5-PAHSA największy wzrost stopnia proliferacji (ponad dwukrotny w porównaniu z 24 h hodowli) odnotowano w przypadku stymulacji roztworem 5-PAHSA o stężeniu 40 μM i 60 μM . Proliferacja komórek wzrosła odpowiednio o 1,77 i 1,63. Dla inkubacji komórek z pozostałymi badanymi stężeniami 5-PAHSA tj. 5, 20 i 80 μM po 72 h uzyskano odpowiednio wzrost poziomu proliferacji o 0,60; 1,19; 1,13. Wartości stopnia proliferacji uzyskane dla kontroli (0 μM 5-PAHSA) były zbliżone do tych uzyskanych po inkubacji z 5 μM 5-PAHSA i wzrosły o odpowiednio 0,1; 0,28; 0,67.

W kolejnym kroku wykonano analizę przyrostu średnicy opracowanych agregatów. Zgodnie z oczekiwaniami odnotowano wzrost średnicy agregatu, co również może wskazywać na wysoki stopień proliferacji komórek. Średnice agregatów, a tym samym całkowita masa komórek po inkubacji z roztworami o każdym badanym stężeniu 5-PAHSA, zwiększała się w kolejnych dniach hodowli. Dla wszystkich badanych stężeń po 72 h inkubacji odnotowano wzrost o około 20-30 μm w stosunku do pierwszego dnia hodowli.

W przypadku inkubacji z roztworami 9-PAHSA tempo proliferacji nie było tak szybkie jak w przypadku inkubacji z roztworami 5-PAHSA. Po 24 h inkubacji z 20 μM 9-PAHSA zauważono spadek stopnia proliferacji o około 0,14 w porównaniu do wyników uzyskanych dla tego samego mikrosystemu przed inkubacją z roztworem 20 μM 9-PAHSA. Kolejnym badanym stężeniem, które spowodowało spadek stopnia proliferacji po 24 h inkubacji było 60 μM 9-PAHSA. W tym przypadku zanotowano spadek o około 0,7. Stopień proliferacji po 72 h ekspozycji na 5 μM , 40 μM , 80 μM 9-PAHSA w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla kontroli (pomiar przed rozpoczęciem inkubacji z 9-PAHSA) wzrósł odpowiednio o 0,50 i 0,19, 0,14. W przypadku inkubacji z 100 μM 9-PAHSA zauważono nieznaczny wzrost proliferacji po 24 h inkubacji (wzrost o 0,12), a następnie niewielki spadek stopnia proliferacji w kolejnych dniach stymulacji. Natomiast w przypadku inkubacji z 60 μM 9-PAHSA spadek stopnia proliferacji zaobserwowano już po 24 h inkubacji i wynosił on 0,93 (dla 24 h inkubacji), 0,78 (dla 48 h inkubacji) oraz 0,70 (dla 72 h inkubacji). Otrzymane wyniki korelują ze zmianami średnic agregatów po inkubacji z wybranymi stężeniami 9-PAHSA. Porównując te wyniki z wynikami uzyskanymi po inkubacji z 5-PAHSA we wszystkich badanych stężeniach zaobserwowano około dwukrotnie mniejszy wzrost stopnia proliferacji/żywności w porównaniu z proliferacją po inkubacji z 5-PAHSA.

3.3.2. Ocena wpływu związków 5-PAHSA i 9-PAHSA na lokalizację komórek w pseudowyspie

Jak wspomniano wcześniej, wyspy trzustkowe są dobrze zdefiniowanymi trójwymiarowymi strukturami o ściśle określonym składzie i lokalizacji komórek [144]. Zaburzenia w morfologii wysp trzustkowych mogą mieć wpływ na zaburzenia w komunikacji między komórkami, co z kolei może wpłynąć na prawidłowe wydzielanie insuliny i glukagonu. Z tego względu bardzo ważne jest utrzymanie prawidłowej morfologii pseudowyspy przez cały czas trwania hodowli. W celu potwierdzenia odpowiedniej struktury pseudowysp składających się z komórek α oraz β i oznaczenia insuliny i glukagonu po inkubacji z 5-PAHSA i 9-PAHSA przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne. Na podstawie przeprowadzonych wcześniej etapów badań zdecydowano się na wybór trzech granicznych stężeń: najwyższego – 100 μM , najniższego – 5 μM oraz środkowego - 60 μM . Wyniki barwienia przedstawiono na rycinie II. 25.



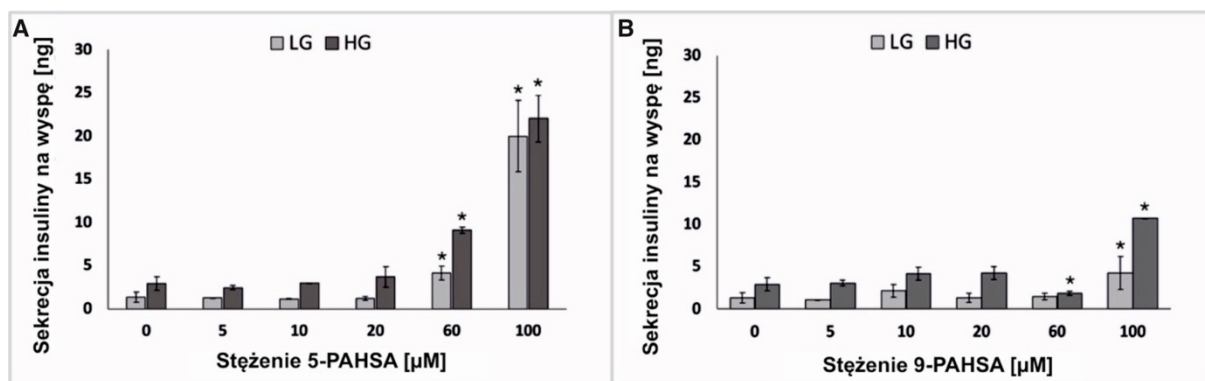
Rycina II. 25 Analiza zawartości insuliny i glukagonu przeprowadzona z wykorzystaniem metody barwienia immunofluorescencyjnego. Barwienie glukagonu (Alexa Fluor 594, kolor czerwony) i insuliny (Alexa Fluor 488, kolor zielony). Analizę intensywności fluorescencji poszczególnych hormonów przeprowadzono na podstawie obrazów uzyskanych z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego przy użyciu programu CellSens Dimension, $n = 3$.

Przedstawione na wykresach wartości uzyskano dla pseudowysp (24 h po wprowadzeniu komórek α -TC1-6 oraz INS-1E w stosunku 1:2 do mikrosystemu przepływowego) inkubowanych 48 h z roztworami 5-PAHSA o stężeniu 5 μM , 60 μM i 100 μM , roztworami

9-PAHSA o stężeniu 5 μM , 60 μM i 100 μM oraz medium hodowlanym (kontrola, 0 μM). Dla pseudowysp inkubowanych z każdym z wybranych stężeń 5-PAHSA oraz 9-PAHSA nie zauważono zmian w strukturze, tj. składzie i lokalizacji komórek. Potwierdzono prawidłowy proces agregacji komórek oraz lokalizację komórek INS-1E wewnątrz i komórek α -TC1-6 na zewnątrz pseudowyspy. Oznacza to, że oba izomery PAHSA nie wpływają na zaburzenie morfologii opracowanych pseudowysp. Zmiany w lokalizacji i ułożeniu komórek mogłyby wpłynąć na zmiany komunikacji międzykomórkowej, a tym samym na proces sekrecji hormonów. Zauważono również, że najwyższe poziomy intensywności fluorescencji insuliny i glukagonu w porównaniu do kontroli uzyskano dla 60 μM i 100 μM 5-PAHSA. Ponadto, zanotowano niewielki wzrost intensywności fluorescencji pochodzący od insuliny dla pseudowysp inkubowanych z 5 μM 5-PAHSA, natomiast w tym samym stężeniu 5-PAHSA poziom intensywności glukagonu delikatnie spadł. W przypadku inkubacji z 5 μM oraz 60 μM 9-PAHSA zauważono niższą intensywność zarówno insuliny jak i glukagonu w porównaniu do kontroli. Jedynie dla stężenia 9-PAHSA równego 100 μM zanotowano niewielki wzrost intensywności fluorescencji pochodzący od insuliny i glukagonu.

3.3.3. Wpływ izomerów 5-PAHSA i 9-PAHSA na stymulowane glukozą wydzielanie insuliny i glukagonu

Prawidłowe wydzielanie insuliny w odpowiedzi na stymulację glukozą jest głównym parametrem wskazującym na funkcjonalność komórek trzustki [145]. Na tym etapie badań przeprowadzono testy sekrecji insuliny po 48 h inkubacji z wybranymi stężeniami 5-PAHSA i 9-PAHSA. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych we wcześniejszych etapach prac wybrano następujące stężenia 5-PAHSA oraz 9-PAHSA: 5 μM , 60 μM oraz 100 μM . Natomiast ciekawym wydawało się również sprawdzenie jakie zmiany zachodzą w zakresie niższych stężeń – pomiędzy 0 μM a 20 μM , dlatego zdecydowano się przeprowadzić badania sekrecji insuliny i glukagonu również po inkubacji z 5 μM 10 μM 20 μM 5-PAHSA i 9-PAHSA. W tym etapie badań prowadzono 48 h inkubację pseudowysp uzyskanych z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego IV. Po tym czasie, przeprowadzono stymulację pseudowysp roztworami o niskim (2,75 mM) lub wysokim (16,5 mM) stężeniu glukozy według procedury opisanej w punkcie 2.4 *Analiza sekrecji insuliny i glukagonu*. Po przeprowadzeniu stymulacji zbierano próbki i analizowano przy użyciu immunoenzymatycznego testu ELISA. Wyniki przedstawiono na rycinie II.26.



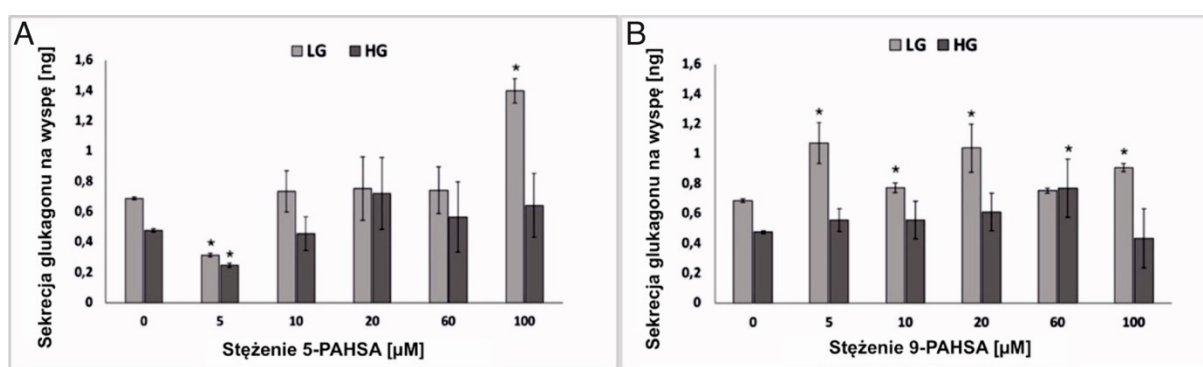
Rycina II. 26 Poziom sekrecji insuliny po 48 h inkubacji z 5-PAHSA (A) i 9-PAHSA (B) oraz stymulacji roztworem glukozy o niskim (LG; 2,75 mM) i wysokim (HG; 16,5 mM) stężeniu. Istotność statystyczną policzono względem kontroli (pseudowyspy inkubowane z medium hodowlanym, bez dodatku 5-PAHSA lub 9-PAHSA), $n \geq 3$. * $p < 0,05$.

W wyniku przeprowadzonych badań nie zaobserwowano istotnego wzrostu stymulowanego glukozą wydzielania insuliny po inkubacji z niższymi stężeniami 5-PAHSA (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M). Otrzymane wyniki były zbliżone do wyników uzyskanych dla kontroli (pożywka hodowlana) (rycina II. 10). Z kolei po inkubacji z roztworami o wyższym stężeniu 5-PAHSA zaobserwowano istotny wzrost poziomu wydzielania insuliny, po stymulacji glukozą. Poziom wydzielania insuliny po 48 h inkubacji z 60 μ M 5-PAHSA oraz stymulacji roztworem o stężeniu glukozy równym 2,75 mM wynosił 4,14 ng na pseudowyspę. Natomiast po 48 h inkubacji z 60 μ M 5-PAHSA oraz stymulacji roztworem o stężeniu glukozy równym 16,5 mM wynosił 9,12 ng na pseudowyspę. W przypadku inkubacji z 5-PAHSA o stężeniu 100 μ M sekrecja insuliny wynosiła 19,98 ng na wyspę (po stymulacji LG) i 22,02 ng na wyspę (po stymulacji HG). Uzyskany wynik pokazuje, że 5-PAHSA jest silnym stymulatorem sekrecji insuliny (nawet w przypadku braku stymulacji wywołanej glukozą). Natomiast w przypadku stymulacji pseudowysp roztworami 9-PAHSA nie zaobserwowano znaczących różnic w sekrecji insuliny w stężeniach 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, zarówno w warunkach wysokiego stężenia glukozy jak i niskiego. W przypadku 48 h inkubacji z 60 μ M 9-PAHSA zanotowano niewielki spadek wydzielania insuliny w porównaniu do kontroli. Po inkubacji z 60 μ M 9-PAHSA zanotowano sekrecję na poziomie 1,49 ng na wyspę (LG) oraz 1,84 ng na wyspę (HG), w porównaniu do 1,30 (LG), 2,93 (HG) dla kontroli. Natomiast po inkubacji z roztworem o stężeniu 100 μ M 9-PAHSA zaobserwowano wzrost wydzielania insuliny. Pseudowyspy w mikrosystemie przepływowym były w stanie wydzieląć 4,28 ng na wyspę i 10,71 ng na wyspę po stymulacji odpowiednio niskim i wysokim stężeniem glukozy. Był to

jednak ponad dwukrotnie mniejszy wzrost wydzielania insuliny niż po inkubacji z tym samym stężeniem 5-PAHSA.

3.3.4. Wpływ izomerów 5-PAHSA i 9-PAHSA na wydzielanie glukagonu

W kolejnym tym etapie badań przeprowadzono ocenę sekrecji glukagonu po inkubacji z wybranymi stężeniami 5-PAHSA lub 9-PAHSA (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 60 μ M, 100 μ M). Po 48 h inkubacji określono wydzielanie glukagonu z pseudowysp w warunkach niskiego (2,75 mM) oraz wysokiego (16,5 mM) stężenia glukozy. Wyniki przedstawiono na rycinie II. 27.



Rycina II. 27 Poziom sekrecji glukagonu po 48h inkubacji z 5-PAHSA Poziom sekrecji glukagonu po 48h inkubacji z 5-PAHSA lub 9-PAHSA oraz stymulacji roztworem glukozy o niskim (LG; 2,75 mM) i wysokim (HG; 16,5 mM) stężeniu. Istotność statystyczną policzono względem kontroli (pseudowyspy inkubowane z medium hodowlanym, dodatku 5-PAHSA lub 9-PAHSA) $n \geq 3$. * $p < 0,05$.

Po dokonaniu analizy wyników nie zaobserwowano istotnego wzrostu sekrecji glukagonu po inkubacji z niższymi stężeniami 5-PAHSA (5 μ M – 60 μ M). Dwukrotny wzrost (w porównaniu do kontroli) wydzielania glukagonu po stymulacji roztworem o niskim stężeniu (2,75 mM) glukozy zauważono po 48 h inkubacji z 100 μ M 5-PAHSA. Natomiast nie zaobserwowano takiego wzrostu sekrecji glukagonu przy tym samym stężeniu 5-PAHSA i stymulacji roztworem o wysokim stężeniu glukozy (16.5 mM). Uzyskany wynik jest prawidłowy – obecność glukozy hamuje wydzielanie glukagonu. Prawidłową odpowiedź na stymulację różnymi stężeniami glukozy (wyższa sekrecja przy niższym stężeniu glukozy i niższa przy wyższym) zaobserwowano w przypadku inkubacji z 10 μ M, 60 μ M, 100 μ M 5-PAHSA. Natomiast w przypadku inkubacji pseudowysp z 10 μ M oraz 60 μ M 5-PAHSA uzyskane wyniki nie różnią się istotnie od wyników uzyskanych dla warunków kontrolnych (inkubacja z medium bez PAHSA). W przypadku 9-PAHSA zauważono, że wydzielanie glukagonu w warunkach niskiego (2,75 mM) poziomu glukozy wzrosło po inkubacji z 5 μ M,

10 μM , 20 μM i 100 μM odpowiednio o: 0,39 ng, 0,09 ng, 0,36 ng, 0,23 ng na pseudowyspę. Natomiast dla tych samych stężeń 9-PAHSA i stymulacji roztworami o wysokim (16.5 mM) stężeniu glukozy nie zaobserwowano istotnych zmian w sekrecji glukagonu. Jedynie w przypadku inkubacji z 60 μM 9-PAHSA i stymulacji roztworami o wysokim (16.5 mM) stężeniu glukozy zanotowano wzrost wydzielania glukagonu o 0,30 ng na pseudowyspę (w porównaniu do kontroli). Wzrost ten nie różnił się jednak dla wyników uzyskanych w tym samym stężeniu 9-PAHSA, ale stymulacji roztworami o niskim stężeniu glukozy.

3.3.5. Podsumowanie i wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań potwierdzono, że inkubacja z roztworami 5-PAHSA we wszystkich badanych stężeniach nie miała toksycznego wpływu na struktury 3D opracowanego modelu złożonego z komórek wysp trzustkowych i znacząco zwiększała proliferację komórek. Zgodnie z oczekiwaniami średnice agregatów po inkubacji z 5-PAHSA zwiększały się w kolejnych dniach hodowli, z maksymalnym wzrostem o około 20-30 μm po 72 h inkubacji (w porównaniu do pierwszego dnia hodowli). Po inkubacji z wyższymi stężeniami 9-PAHSA (60 μM - 100 μM) odnotowano spadek proliferacji komórek, a po inkubacji z niższymi stężeniami (10 μM - 40 μM) wzrost stopnia proliferacji. Ponadto, w przypadku 9-PAHSA zaobserwowano również wzrost średnicy agregatów w kolejnych dniach hodowli, z maksymalnym wzrostem o 25 μm . Może to świadczyć o korzystnym wpływie badanych związków na proces proliferacji komórek α oraz β . Porównując wyniki otrzymane dla inkubacji pseudowysp z izomerami 9-PAHSA oraz 5-PAHSA we wszystkich badanych stężeniach zaobserwowano około dwukrotnie mniejszy wzrost stopnia proliferacji komórek po inkubacji z 9-PAHSA. Na tym etapie prac pokazano, że PAHSA (a zwłaszcza izomer 5-PAHSA) w szerokim zakresie stężeń ma bezpośredni, pozytywny wpływ na zwiększenie proliferacji komórek wysp trzustkowych hodowanych z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego IV.

W literaturze można znaleźć również doniesienia na temat wpływu związków PAHSA na sekrecję insuliny [53]. Zhou *et al.* przeprowadzili badania, w których podawano 5-PAHSA (0,1 mg/d) i 9-PAHSA (0,4 mg/d) przez podskórne pompy osmotyczne, myszom karmionym dietą wysokotłuszczową. Udowodniono, że przewlekłe podawanie 5-PAHSA i 9-PAHSA myszom HFD zwiększa poziom PAHSA w organizmie od ~1,4 do 3-krotnie, co skutkuje zwiększoną wrażliwością na insulinę i lepszą tolerancją glukozy [56]. W przeprowadzonych na

tym etapie pracy doktorskiej badaniach wykazano, wpływ związków PAHSA (a zwłaszcza 5-PAHSA) na zwiększenie sekrecji insuliny z opracowanych z wykorzystaniem mikrosytemu przepływowego pseudowysp. To z kolei może wskazywać na potencjalne właściwości terapeutyczne badanych związków. Ponadto, zauważono zwiększenie sekrecji glukagonu po stymulacji 5-PAHSA o stężeniu 100 μ M oraz po stymulacji 9-PAHSA w stężeniach 5, 10, 20 i 100 μ M. Jednak nie był to, aż tak wysoki wzrost jak w przypadku sekrecji insuliny. Otrzymane wyniki mogą wskazywać na preferowany wpływ związków PAHSA na komórki β wysp trzustkowych.

Przeprowadzone na tym etapie badania pokazują, że izomery 5-PAHSA oraz 9-PAHSA są aktywatorami sekrecji insuliny i glukagonu i wykazują właściwości potencjalnych środków terapeutycznych, a zatem mogą zostać wykorzystane w terapiach dysfunkcji wysp trzustkowych. Ponadto, na tym etapie wykazano możliwość zastosowania opracowanego mikrosytemu przepływowego IV jako uniwersalnego narzędzia do opracowania i hodowli modelu wyspy trzustkowej oraz testowania nowych, potencjalnych związków terapeutycznych. Wyniki badań przedstawione w powyższym rozdziale stały się przedmiotem publikacji naukowej [146].

III. Dyskusja wyników i wnioski

W ostatnich latach, ze względu na ciągle zwiększający się odsetek zachorowań na cukrzycę wrażliwa liczba badań prowadzonych na komórkach wysp trzustkowych. Dotychczas najszerzej stosowanym podejściem były konwencjonalne dwuwymiarowe hodowle komórkowe (2D) na płaskiej powierzchni szklanej lub polimerowej [65]. Natomiast w literaturze przedstawiono występowanie istotnych różnic w stopniu proliferacji, żywotności, komunikacji komórkowej i wydzielaniu insuliny między komórkami wysp trzustkowych hodowanymi jako monowarstwa komórkowa, a trójwymiarowe agregaty komórek [66]. Jedną z metod otrzymywania trójwymiarowych struktur jest wykorzystanie zdolności niektórych linii komórkowych do samoagregacji. W przypadku braku powierzchni o właściwościach adhezyjnych lub braku rusztowania, komórki mogą agregować i ulegać procesowi samoorganizacji podczas którego rozproszone komórki tworzą trójwymiarowe skupiska – agregaty [147]. Samoorganizacja odwzorowuje naturalne procesy zachodzące podczas embriogenezy, morfogenezy i organogenezy, a agregaty komórkowe naśladują architektoniczną i funkcjonalną charakterystykę natywnych tkanek. Istotną rolę w tym procesie odgrywają zarówno cząsteczki adhezji międzykomórkowej jak i sieć cytoszkieletu. [148]. Brak odpowiednich modeli badawczych, a także chęć prowadzenia eksperymentów zgodnie z zasadą 3R (ang. *Replacement, Reduction, Refinement*), która ma na celu zastąpienie wykorzystywania zwierząt laboratoryjnych przez inne, funkcjonalne modele badawcze było bodźcem do opracowania w pełni funkcjonalnego modelu pseudowyspy. Zgłębienie wiedzy na temat komórek wysp trzustkowych, a szczególnie komórek β odpowiedzialnych za sekrecję insuliny jest niezbędna do znalezienia nowych metod leczenia cukrzycy lub próby opracowania „sztucznej trzustki” co jest jednym z głównych celów medycyny regeneracyjnej [149]. W związku z tym w ramach obecnej pracy doktorskiej podjęto próbę opracowania modelu wyspy trzustkowej, który morfologią, składem i lokalizacją komórek odpowiadał będzie wyspie trzustkowej w warunkach *in vivo*. W badaniach wykorzystano komórki INS-1, które są komórkami β wysp trzustkowych i zostały szczegółowo scharakteryzowane jako linia komórkowa, która zawiera i wydziela insulinę w odpowiedzi na szeroki zakres stężeń glukozy i dlatego jest jedną z najczęściej wykorzystywanych linii komórkowych stosowanych do badania mechanizmów wydzielania insuliny [150]. W celu odwzorowania morfologii wyspy, a także zachowania komunikacji międzykomórkowej postanowiono wykorzystać w badaniach również drugą linię komórek wysp trzustkowych – komórki α -TC1-6, odpowiedzialne za wydzielanie glukagonu.

Modele, na których bada się zaburzenia wydzielania insuliny najczęściej opracowywane są z wykorzystaniem komórek β w hodowlach 2D/3D lub z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych. Model oparty na hodowlach 2D jest jednak niewystarczający i wykazuje znaczne różnice w sekrecji hormonów w porównaniu do warunków *in vivo* [151]. Ponadto, wydzielanie insuliny zależy od sygnalizacji między różnymi typami komórek, dlatego też model badawczy powinien być złożony z możliwie jak największej liczby komórek budujących wyspę [66]. Większość istniejących podejść do tworzenia trójwymiarowych hodowli komórek wysp trzustkowych opiera się na metodach samoorganizacji i wiszącej kropli w makroskali [69], [70], które szybko tracą swoje funkcje w hodowlach statycznych. Poza organizmami zwierzęcymi i modelami 2D oraz 3D otrzymywanymi tradycyjnymi metodami hodowli w makroskali, w literaturze zaprezentowano kilka rozwiązań opartych na wykorzystaniu systemów *Lab-on-a-chip* do hodowli komórek trzustki. Najczęściej są to systemy do hodowli trójwymiarowych modeli składających się z jednego typu komórek wysp trzustkowych [152] lub całych wyizolowanych wysp gryzoni [153]. W geometrii takich urządzeń przeważają rozwiązania oparte na U-kształtnych dołkach [109], [111], [154], które mogą nie być odpowiednie dla prowadzenia długoterminowej hodowli.

Dlatego też, w ramach niniejszej pracy doktorskiej opracowano nowy mikrosystem przepływowy typu *Lab-on-a-chip* do otrzymywania, hodowli oraz analizy trójwymiarowych agregatów złożonych z komórek wysp trzustkowych. Zastosowanie materiałów konstrukcyjnych takich jak PDMS, szkiełko nakrywkowe oraz zaprojektowanie geometrii mikrokomór tak by odpowiadała rozkładowi dołków na standardowej płytce 96-cio dołkowej pozwoliło na prowadzenie analiz w czasie rzeczywistym. Analizy te prowadzono z wykorzystaniem min. mikroskopu konfokalnego, czytnika płytek wielodołkowych, czy odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego w jednym urządzeniu, bez konieczności przenoszenia agregatów np. na płytki czy szalki. Ponadto, najważniejszą zaletą tego urządzenia jest możliwość otrzymania w nim modelu komórkowego, który morfologią oraz składem i lokalizacją komórek α i β odpowiada wyspie trzustkowej w warunkach *in vivo*.

W ramach pracy przeprowadzono szereg testów optymalizacyjnych mających na celu opracowanie urządzenia odpowiedniego dla prowadzenia zarówno etapu otrzymywania pseudowysp, ich stabilnej hodowli, a także łatwego sposobu obserwacji i analizy wydzielanych metabolitów i hormonów. Badania rozpoczęto od hodowli komórek odpowiedzialnych za sekrecję insuliny – komórek INS-1E. Zbadano wpływ geometrii mikrostruktur oraz parametrów hodowli (gęstość zawiesiny, prędkość wprowadzania, wartości naprężeń ścinających, czas podawania roztworów) na proces agregacji oraz poziom żywotności i proliferacji komórek.

Wykazano również różnice pomiędzy modelem hodowanym w opracowanym mikrosystemie oraz modelem hodowanym w warunkach statycznych – na wielodołkowych płytkach o U-kształtnym dnie. Udowodniono, że zmiana warunków ze statycznych na przepływowe korzystnie wpływa na utrzymanie wysokiego stopnia proliferacji i żywotności przez cały czas trwania hodowli, a także mają korzystny wpływ na skrócenie czasu agregacji komórek. Ponadto, wykazano różnice w wewnątrzkomórkowym stężeniu jonów wapnia pomiędzy hodowlą statyczną a przepływową, co może istotnie wpływać na różnice w profilu wydzielania hormonów.

W dalszych etapach prac opracowano model pseudowyspy składający się z dwóch najważniejszych dla przebiegu cukrzycy linii komórkowych – komórek α (α -TC1-6) wydzielających glukagon oraz β (INS-1E) odpowiedzialnych za sekrecję insuliny. W ramach prac dobrano (na podstawie badań z wykorzystaniem wielodołkowych płytek o U-kształtnym dnie) odpowiednie warunki hodowli oraz stosunek komórek, tak aby odwzorować unikalną strukturę wyspy trzustkowej znajdującej się w organizmie. Istotnym etapem prac było przeprowadzenie testów sekrecji insuliny i glukagonu. Prawidłowe wydzielanie hormonów jest krytycznym warunkiem uzyskania w pełni funkcjonalnego modelu wyspy trzustkowej [155]. Dzięki opracowaniu odpowiedniej geometrii mikrostruktur możliwe było prowadzenie badań zarówno dla kontroli jak i różnych stężeń glukozy w tych samych warunkach środowiskowych. Przeprowadzenie immunoenzymatycznego testu ELISA potwierdziło prawidłowy profil sekrecji hormonów z opracowanego modelu pseudowyspy, co daje możliwość jego zastosowania w badaniach potencjalnych czynników patogennych oraz nowych środków terapeutycznych.

W ostatnim etapie prac przedstawiono możliwość zastosowania opracowanego urządzenia do badań potencjalnych środków terapeutycznych. W tym celu wykorzystano dwa izomery PAHSA: 5-PAHSA oraz 9-PAHSA. Związek ten wybrano ze względu na jego naturalne występowanie w organizmie oraz istniejące przesłanki dowodzące o jego właściwościach skutecznie zwiększających wydzielanie insuliny. Na tym etapie badań najważniejsze były dwa aspekty: dowód na to, że PAHSA ma szansę być całkowicie bezpiecznym środkiem terapeutycznym stosowanym w leczeniu cukrzycy typu 2 oraz dowód, że opracowany system *Lab-on-a-chip* może służyć jako uniwersalne urządzenie do badań przesiewowych leków.

Przedstawione w literaturze badania nad tymi związkami opierają się głównie na zwierzęcych modelach cukrzycy i długoterminowym oznaczaniu poziomu insuliny oraz przyrostu masy ciała czy badaniu wydzielania insuliny na izolowanych wyspach trzustki [52], [57]. W przeciwieństwie do tego, w rozprawie doktorskiej przeprowadzono badania

z wykorzystaniem trójwymiarowego modelu pseudowyspy (złożonego z komórek α i β wysp trzustkowych) w warunkach przepływowych. Określono wpływ szerokiego zakresu stężeń 5-PAHSA i 9-PAHSA na proliferację komórek, zmianę średnicy pseudowysp, oraz stymulowane glukozą wydzielanie insuliny i glukagonu. W przebiegu cukrzycy komórki β stopniowo tracą zdolność do proliferacji, co powoduje zmniejszenie wydzielania insuliny [156]. Dlatego też, ważne jest badanie potencjalnych środków terapeutycznych pod kątem ich wpływu na proliferację komórek. Dotychczas badano wpływ PAHSA na proliferację komórek mysich głównie w zakresie niższych stężeń wynoszących 0 - 20 μM , natomiast badania sekrecji insuliny prowadzono w zakresie wyższych stężeń (40 - 100 μM) [55], [57]. Potwierdzono, że PAHSA ma wpływ na zmniejszenie apoptotycznej i nekrotycznej śmierci komórek β oraz zwiększenie ich żywotności. Obecnie proponowanym mechanizmem tego zjawiska jest redukcja stresu ER i sygnalizacji MAPK [57]. W niniejszej pracy doktorskiej dowiedziono, że izomery PAHSA wykazują potencjalne właściwości terapeutyczne i bezpośredni pozytywny wpływ na komórki α i β . Najlepsze wyniki uzyskano stosując 60, 100 μM 5-PAHSA i 100 μM 9-PAHSA. Otrzymane wyniki są zgodne z niektórymi wcześniej opisanymi doniesieniami literaturowymi o możliwym wpływie izomerów PAHSA na zwiększenie przeżywalności i usprawnienie funkcjonowania komórek β .

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej pozwoliły na opracowanie w pełni funkcjonalnego modelu wyspy trzustkowej z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego. Dzięki opracowanemu modelowi możliwe było przeprowadzenie badań określających wpływ różnych czynników na komórki wysp trzustkowych. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

1. Istnieją istotne różnice w stopniu agregacji proliferacji i żywotności komórek pomiędzy modelami 3D otrzymywanymi tradycyjnymi metodami hodowli (płytki U-kształtne) oraz modelami 3D z wykorzystaniem warunków przepływowych;
2. Opracowanie mikrosystemu przepływowego zawierającego w swojej geometrii mikropułapki złożone z mikropilar pozwoliło na tworzenie, hodowlę oraz analizę pseudowysp (sferycznych agregatów złożonych z komórek α oraz β wysp trzustkowych) w warunkach zbliżonych do *in vivo*;
3. Substancje z grupy PAHSA: 5-PAHSA oraz 9-PAHSA wykazują potencjalne właściwości terapeutyczne poprzez zwiększenie wydzielania insuliny i glukagonu;

4. Opracowany system może być z powodzeniem wykorzystany do badań przesiewowych nowych leków, pozwalając jednocześnie na zredukowanie wykorzystywania zwierząt laboratoryjnych do badań podstawowych;
5. Opracowany mikrosystem przepływowy w przyszłości może pomóc w zdobyciu większej wiedzy na temat wydzielania hormonów, komunikacji między komórkami oraz w opracowaniu skuteczniejszych metod leczenia.

IV. Literatura

- [1] S. M. Hartig i A. R. Cox, „Paracrine signaling in islet function and survival”, *J Mol Med (Berl)*, t. 98, nr 4, s. 451–467, kwi. 2020, doi: 10.1007/s00109-020-01887-x.
- [2] M. Brissova i in., „Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy”, *J Histochem Cytochem*, t. 53, nr 9, s. 1087–1097, wrz. 2005, doi: 10.1369/jhc.5C6684.2005.
- [3] F. Aragón, M. Karaca, A. Novials, R. Maldonado, P. Maechler, i B. Rubí, „Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human alpha-cells”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, t. 1850, nr 2, s. 343–351, luty 2015, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.11.005.
- [4] C. L. Prado, A. E. Pugh-Bernard, L. Elghazi, B. Sosa-Pineda, i L. Sussel, „Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 101, nr 9, s. 2924–2929, mar. 2004, doi: 10.1073/pnas.0308604100.
- [5] K. Raghay, R. Gallego, J.-Y. Scoazec, T. Garcia-Caballero, i G. Morel, „Different ghrelin localisation in adult human and rat endocrine pancreas”, *Cell Tissue Res*, t. 352, nr 3, s. 487–494, cze. 2013, doi: 10.1007/s00441-013-1593-y.
- [6] M. E. Cerf, „Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance”, *Front Endocrinol (Lausanne)*, t. 4, s. 37, mar. 2013, doi: 10.3389/fendo.2013.00037.
- [7] D. Bosco i in., „Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans”, *Diabetes*, t. 59, nr 5, s. 1202–1210, maj 2010, doi: 10.2337/db09-1177.
- [8] D. J. Steiner, A. Kim, K. Miller, i M. Hara, „Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition”, *Islets*, t. 2, nr 3, s. 135–145, cze. 2010, doi: 10.4161/isl.2.3.11815.
- [9] M. F. Brereton, E. Vergari, Q. Zhang, i A. Clark, „Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination?”, *J Histochem Cytochem*, t. 63, nr 8, s. 575–591, sie. 2015, doi: 10.1369/0022155415583535.
- [10] K. Sigmundsson i in., „Culturing functional pancreatic islets on α 5-laminins and curative transplantation to diabetic mice”, *Matrix Biol*, t. 70, s. 5–19, wrz. 2018, doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.018.
- [11] A. Llacua, B. J. de Haan, S. A. Smink, i P. de Vos, „Extracellular matrix components supporting human islet function in alginate-based immunoprotective microcapsules for treatment of diabetes”, *J Biomed Mater Res A*, t. 104, nr 7, s. 1788–1796, lip. 2016, doi: 10.1002/jbm.a.35706.

- [12] G. G. M. Pinkse, W. P. Bouwman, R. Jiawan-Lalai, O. T. Terpstra, J. A. Bruijn, i E. de Heer, „Integrin signaling via RGD peptides and anti-beta1 antibodies confers resistance to apoptosis in islets of Langerhans”, *Diabetes*, t. 55, nr 2, s. 312–317, luty 2006, doi: 10.2337/diabetes.55.02.06.db04-0195.
- [13] H.-Y. Chang, S.-L. Chen, M.-R. Shen, M.-L. Kung, L.-M. Chuang, i Y.-W. Chen, „Selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, impairs E-cadherin-mediated cell adhesion and alters calcium homeostasis in pancreatic beta cells”, *Sci Rep*, t. 7, nr 1, Art. nr 1, cze. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-03747-0.
- [14] S. E. Townsend i M. Gannon, „Extracellular Matrix–Associated Factors Play Critical Roles in Regulating Pancreatic β -Cell Proliferation and Survival”, *Endocrinology*, t. 160, nr 8, s. 1885–1894, sie. 2019, doi: 10.1210/en.2019-00206.
- [15] P. Rorsman i M. Braun, „Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets”, *Annu Rev Physiol*, t. 75, s. 155–179, 2013, doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183754.
- [16] J.-C. Henquin, „Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues”, *Diabetes*, t. 53 Suppl 3, s. S48-58, grudz. 2004, doi: 10.2337/diabetes.53.suppl_3.s48.
- [17] D. L. Curry, L. L. Bennett, i G. M. Grodsky, „Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas”, *Endocrinology*, t. 83, nr 3, s. 572–584, wrz. 1968, doi: 10.1210/endo-83-3-572.
- [18] J. Dehghany i in., „A Spatial Model of Insulin-Granule Dynamics in Pancreatic β -Cells”, *Traffic*, t. 16, nr 8, s. 797–813, sie. 2015, doi: 10.1111/tra.12286.
- [19] N. Gustavsson i in., „Impaired insulin secretion and glucose intolerance in synaptotagmin-7 null mutant mice”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 105, nr 10, s. 3992–3997, mar. 2008, doi: 10.1073/pnas.0711700105.
- [20] F. R. Castiello, K. Heileman, i M. Tabrizian, „Microfluidic perfusion systems for secretion fingerprint analysis of pancreatic islets: applications, challenges and opportunities”, *Lab Chip*, t. 16, nr 3, s. 409–431, sty. 2016, doi: 10.1039/C5LC01046B.
- [21] V. Poitout, „Fatty Acids and Insulin Secretion: From FFAR and Near?”, *Diabetes*, t. 67, nr 10, s. 1932–1934, paź. 2018, doi: 10.2337/dbi18-0027.
- [22] R. Veluthakal i D. C. Thurmond, „Emerging Roles of Small GTPases in Islet β -Cell Function”, *Cells*, t. 10, nr 6, s. 1503, cze. 2021, doi: 10.3390/cells10061503.
- [23] „Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes - PubMed”. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12475783/> (dostęp 14 czerwiec 2022).

- [24] J. D. McGarry, „Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes”, *Diabetes*, t. 51, nr 1, s. 7–18, sty. 2002, doi: 10.2337/diabetes.51.1.7.
- [25] K. M. Habegger, K. M. Heppner, N. Geary, T. J. Bartness, R. DiMarchi, i M. H. Tschöp, „The metabolic actions of glucagon revisited”, *Nat Rev Endocrinol*, t. 6, nr 12, s. 689–697, grudz. 2010, doi: 10.1038/nrendo.2010.187.
- [26] I. Rix, C. Nexøe-Larsen, N. C. Bergmann, A. Lund, i F. K. Knop, „Glucagon Physiology”, w *Endotext*, K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, J. Purnell, R. Sahay, F. Singer, M. A. Sperling, C. A. Stratakis, D. L. Trence, i D. P. Wilson, Red. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000. Dostęp: 6 maj 2022. [Online]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279127/>
- [27] N. S. Schwartz, W. E. Clutter, S. D. Shah, i P. E. Cryer, „Glycemic thresholds for activation of glucose counterregulatory systems are higher than the threshold for symptoms.”, *J Clin Invest*, t. 79, nr 3, s. 777–781, mar. 1987.
- [28] J.-C. Henquin, N. Ishiyama, M. Nenquin, M. A. Ravier, i J.-C. Jonas, „Signals and pools underlying biphasic insulin secretion”, *Diabetes*, t. 51 Suppl 1, s. S60-67, luty 2002, doi: 10.2337/diabetes.51.2007.s60.
- [29] Z. Wang i D. C. Thurmond, „Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis – roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins”, *J Cell Sci*, t. 122, nr 7, s. 893–903, kwi. 2009, doi: 10.1242/jcs.034355.
- [30] A. Takahashi, P. Camacho, J. D. Lechleiter, i B. Herman, „Measurement of Intracellular Calcium”, *Physiological Reviews*, t. 79, nr 4, s. 1089–1125, sty. 1999, doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1089.
- [31] J. H. R. Kenty i D. A. Melton, „Testing Pancreatic Islet Function at the Single Cell Level by Calcium Influx with Associated Marker Expression”, *PLOS ONE*, t. 10, nr 4, s. e0122044, kwi. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0122044.
- [32] Y. Rong i C. W. Distelhorst, „Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis”, *Annu Rev Physiol*, t. 70, s. 73–91, 2008, doi: 10.1146/annurev.physiol.70.021507.105852.
- [33] J. Levy, J. R. Gavin, i J. R. Sowers, „Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism?”, *Am J Med*, t. 96, nr 3, s. 260–273, mar. 1994, doi: 10.1016/0002-9343(94)90152-x.

- [34] A. T. Kharroubi i H. M. Darwish, „Diabetes mellitus: The epidemic of the century”, *World J Diabetes*, t. 6, nr 6, s. 850–867, cze. 2015, doi: 10.4239/wjd.v6.i6.850.
- [35] E. M. Schmidt, J. Barnes, C. Chen, J. Trafton, S. Frayne, i A. H. S. Harris, „Patient and Health Care Factors Associated With Long-term Diabetes Complications Among Adults With and Without Mental Health and Substance Use Disorders”, *JAMA Network Open*, t. 2, nr 9, s. e1912060, wrz. 2019, doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.12060.
- [36] K. Kaura Parbhakar, L. C. Rosella, S. Singhal, i C. R. Quiñonez, „Acute and chronic diabetes complications associated with self-reported oral health: a retrospective cohort study”, *BMC Oral Health*, t. 20, nr 1, s. 66, mar. 2020, doi: 10.1186/s12903-020-1054-4.
- [37] „International Diabetes Federation - Home”. <https://idf.org/> (dostęp 18 maj 2022).
- [38] C. Solis-Herrera, C. Triplitt, C. Reasner, R. A. DeFronzo, i E. Cersosimo, „Classification of Diabetes Mellitus”, w *Endotext*, K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrière, M. Levy, E. A. McGee, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, J. Purnell, R. Sahay, F. Singer, M. A. Sperling, C. A. Stratakis, D. L. Trencie, i D. P. Wilson, Red. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000. Dostęp: 6 maj 2022. [Online]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279119/>
- [39] B. Haris i in., „Clinical features, epidemiology, autoantibody status, HLA haplotypes and genetic mechanisms of type 1 diabetes mellitus among children in Qatar”, *Sci Rep*, t. 11, s. 18887, wrz. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-98460-4.
- [40] S. Brunton, „Pathophysiology of Type 2 Diabetes: The Evolution of Our Understanding”, *J Fam Pract*, t. 65, nr 4 Suppl, s. supp_az_0416, kwi. 2016.
- [41] N. S. Shah i in., „Trends in Gestational Diabetes at First Live Birth by Race and Ethnicity in the US, 2011-2019”, *JAMA*, t. 326, nr 7, s. 660–669, sie. 2021, doi: 10.1001/jama.2021.7217.
- [42] D. T. Broome, K. M. Pantalone, S. R. Kashyap, i L. H. Philipson, „Approach to the Patient with MODY-Monogenic Diabetes”, *J Clin Endocrinol Metab*, t. 106, nr 1, s. 237–250, sty. 2021, doi: 10.1210/clinem/dgaa710.
- [43] „Cukrzyca. Ukryta pandemia 2014”, *PFED*. <http://www.pfed.org.pl/1/post/2014/09/cukrzyca-ukryta-pandemia-2014.html> (dostęp 18 maj 2022).
- [44] J. J. Marín-Peñalver, I. Martín-Timón, C. Sevillano-Collantes, i F. J. Del Cañizo-Gómez, „Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus”, *World J Diabetes*, t. 7, nr 17, s.

354–395, wrz. 2016, doi: 10.4239/wjd.v7.i17.354.

[45] J. B. Sneddon *i in.*, „Stem Cell Therapies for Treating Diabetes: Progress and Remaining Challenges”, *Cell Stem Cell*, t. 22, nr 6, s. 810–823, cze. 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.05.016.

[46] P. Sokolowska, J. Janikiewicz, E. Jastrzebska, Z. Brzozka, i A. Dobrzyn, „Combinations of regenerative medicine and Lab-on-a-chip systems: New hope to restoring the proper function of pancreatic islets in diabetes”, *Biosensors and Bioelectronics*, t. 167, s. 112451, lis. 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112451.

[47] S. Maikoo, D. Makayane, I. N. Booyesen, P. Ngubane, i A. Khathi, „Ruthenium compounds as potential therapeutic agents for type 2 diabetes mellitus”, *Eur J Med Chem*, t. 213, s. 113064, mar. 2021, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.113064.

[48] R. K. Al-Ishaq, M. Abotaleb, P. Kubatka, K. Kajo, i D. Büsselberg, „Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels”, *Biomolecules*, t. 9, nr 9, s. E430, wrz. 2019, doi: 10.3390/biom9090430.

[49] M. M. Yore *i in.*, „Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects”, *Cell*, t. 159, nr 2, s. 318–332, paź. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.035.

[50] K. Brejchova, L. Balas, V. Paluchova, M. Brezinova, T. Durand, i O. Kuda, „Understanding FAHFAs: From structure to metabolic regulation”, *Prog Lipid Res*, t. 79, s. 101053, lip. 2020, doi: 10.1016/j.plipres.2020.101053.

[51] P. L. Wood, „Fatty Acyl Esters of Hydroxy Fatty Acid (FAHFA) Lipid Families”, *Metabolites*, t. 10, nr 12, s. 512, grudz. 2020, doi: 10.3390/metabo10120512.

[52] E. Pflimlin *i in.*, „Acute and Repeated Treatment with 5-PAHSA or 9-PAHSA Isomers Does Not Improve Glucose Control in Mice”, *Cell Metabolism*, t. 28, nr 2, s. 217–227.e13, sie. 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.028.

[53] I. Syed *i in.*, „Palmitic Acid Hydroxy Stearic Acids Activate GPR40 Which is Involved in Their Beneficial Effects on Glucose Homeostasis”, *Cell Metab*, t. 27, nr 2, s. 419–427.e4, luty 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.01.001.

[54] J. Lee *i in.*, „Branched Fatty Acid Esters of Hydroxy Fatty Acids (FAHFAs) Protect against Colitis by Regulating Gut Innate and Adaptive Immune Responses”, *J Biol Chem*, t. 291, nr 42, s. 22207–22217, paź. 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.703835.

[55] A. R. Schultz Moreira *i in.*, „9-PAHSA Prevents Mitochondrial Dysfunction and Increases the Viability of Steatotic Hepatocytes”, *Int J Mol Sci*, t. 21, nr 21, s. E8279, lis. 2020, doi: 10.3390/ijms21218279.

[56] P. Zhou *i in.*, „PAHSAs enhance hepatic and systemic insulin sensitivity through direct

and indirect mechanisms”, *J Clin Invest*, t. 129, nr 10, s. 4138–4150, paź. 2019, doi: 10.1172/JCI127092.

[57] I. Syed *i in.*, „PAHSAs attenuate immune responses and promote β cell survival in autoimmune diabetic mice”, *J Clin Invest*, t. 129, nr 9, s. 3717–3731, wrz. 2019, doi: 10.1172/JCI122445.

[58] Y.-M. Wang, H.-X. Liu, i N.-Y. Fang, „High Glucose Concentration Impairs 5-PAHSA Activity by Inhibiting AMP-Activated Protein Kinase Activation and Promoting Nuclear Factor-Kappa-B-Mediated Inflammation”, *Front Pharmacol*, t. 9, s. 1491, sty. 2019, doi: 10.3389/fphar.2018.01491.

[59] M. Riecan, V. Paluchova, M. Lopes, K. Brejchova, i O. Kuda, „Branched and linear fatty acid esters of hydroxy fatty acids (FAHFA) relevant to human health”, *Pharmacology & Therapeutics*, t. 231, s. 107972, mar. 2022, doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107972.

[60] M. Durlík i K. Baumgart-Gryn, „Almost 200 Pancreas Transplantations: A Single-Center Experience”, *Transplant Proc*, t. 50, nr 7, s. 2124–2127, wrz. 2018, doi: 10.1016/j.transproceed.2018.02.097.

[61] M. Kaviani i N. Azarpira, „Insight into microenvironment remodeling in pancreatic endocrine tissue engineering: Biological and biomaterial approaches”, *Tissue Eng Regen Med*, t. 13, nr 5, s. 475–484, paź. 2016, doi: 10.1007/s13770-016-0014-1.

[62] H. I. Marri i S. I. Al-Sunousi, „Pancreatic β Cell Mass Death”, *Front Pharmacol*, t. 7, s. 83, kwi. 2016, doi: 10.3389/fphar.2016.00083.

[63] M. Wszola *i in.*, „Endoscopic Islet Autotransplantation Into Gastric Submucosa-1000-Day Follow-up of Patients”, *Transplant Proc*, t. 50, nr 7, s. 2119–2123, wrz. 2018, doi: 10.1016/j.transproceed.2018.02.138.

[64] S. A. Kumar, M. Delgado, V. E. Mendez, i B. Joddar, „Applications of stem cells and bioprinting for potential treatment of diabetes”, *World J Stem Cells*, t. 11, nr 1, s. 13–32, sty. 2019, doi: 10.4252/wjsc.v11.i1.13.

[65] M. Kapałczyńska *i in.*, „2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures”, *Arch Med Sci*, t. 14, nr 4, s. 910–919, cze. 2018, doi: 10.5114/aoms.2016.63743.

[66] H. Guo-Parke, J. T. McCluskey, C. Kelly, M. Hamid, N. H. McClenaghan, i P. R. Flatt, „Configuration of electrofusion-derived human insulin-secreting cell line as pseudoislets enhances functionality and therapeutic utility”, *Journal of Endocrinology*, t. 214, nr 3, s. 257–265, wrz. 2012, doi: 10.1530/JOE-12-0188.

[67] „Humane Society International”, *Humane Society International*. <https://www.hsi.org/>

(dostęp 2 marzec 2022).

- [68] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, i K. M. Yamada, „Taking cell-matrix adhesions to the third dimension”, *Science*, t. 294, nr 5547, s. 1708–1712, lis. 2001, doi: 10.1126/science.1064829.
- [69] D. Jia, D. Dajusta, i R. A. Foty, „Tissue surface tensions guide in vitro self-assembly of rodent pancreatic islet cells”, *Developmental Dynamics*, t. 236, nr 8, s. 2039–2049, 2007, doi: 10.1002/dvdy.21207.
- [70] M. J. Ware *i in.*, „Generation of Homogenous Three-Dimensional Pancreatic Cancer Cell Spheroids Using an Improved Hanging Drop Technique”, *Tissue Eng Part C Methods*, t. 22, nr 4, s. 312–321, kwi. 2016, doi: 10.1089/ten.TEC.2015.0280.
- [71] B. Bao, J. Jiang, T. Yanase, Y. Nishi, i J. R. Morgan, „Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly”, *FASEB J*, t. 25, nr 1, s. 255–264, sty. 2011, doi: 10.1096/fj.10-155291.
- [72] L. P. Ferreira, V. M. Gaspar, i J. F. Mano, „Bioinstructive microparticles for self-assembly of mesenchymal stem Cell-3D tumor spheroids”, *Biomaterials*, t. 185, s. 155–173, grudz. 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.007.
- [73] Y. H. Jo *i in.*, „Pseudoislet of hybrid cellular spheroids from commercial cell lines”, *Transplant Proc*, t. 45, nr 8, s. 3113–3117, paź. 2013, doi: 10.1016/j.transproceed.2013.07.051.
- [74] S. Pathak *i in.*, „Engineered islet cell clusters transplanted into subcutaneous space are superior to pancreatic islets in diabetes”, *FASEB J*, t. 31, nr 11, s. 5111–5121, lis. 2017, doi: 10.1096/fj.201700490R.
- [75] X. Shi, L. Sun, J. Jiang, X. Zhang, W. Ding, i Z. Gan, „Biodegradable polymeric microcarriers with controllable porous structure for tissue engineering”, *Macromol Biosci*, t. 9, nr 12, s. 1211–1218, grudz. 2009, doi: 10.1002/mabi.200900224.
- [76] S. Chun *i in.*, „Adhesive growth of pancreatic islet cells on a polyglycolic acid fibrous scaffold”, *Transplant Proc*, t. 40, nr 5, s. 1658–1663, cze. 2008, doi: 10.1016/j.transproceed.2008.02.088.
- [77] A. M. Smink *i in.*, „A Retrievable, Efficacious Polymeric Scaffold for Subcutaneous Transplantation of Rat Pancreatic Islets”, *Ann Surg*, t. 266, nr 1, s. 149–157, lip. 2017, doi: 10.1097/SLA.0000000000001919.
- [78] S. Hinderer, S. L. Layland, i K. Schenke-Layland, „ECM and ECM-like materials - Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy”, *Adv Drug Deliv Rev*, t. 97, s. 260–269, luty 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.019.
- [79] S.-H. Mirmalek-Sani *i in.*, „Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for

endocrine pancreas bioengineering”, *Biomaterials*, t. 34, nr 22, s. 5488–5495, lip. 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054.

[80] N. Sultana, „1 - Mechanical and biological properties of scaffold materials”, w *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*, Y. Deng i J. Kuiper, Red. Woodhead Publishing, 2018, s. 1–21. doi: 10.1016/B978-0-08-100979-6.00001-X.

[81] J. Visser i in., „Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibres”, *Nat Commun*, t. 6, nr 1, Art. nr 1, kwi. 2015, doi: 10.1038/ncomms7933.

[82] T. Haque i in., „In vitro study of alginate-chitosan microcapsules: an alternative to liver cell transplants for the treatment of liver failure”, *Biotechnol Lett*, t. 27, nr 5, s. 317–322, mar. 2005, doi: 10.1007/s10529-005-0687-3.

[83] S. Bonner-Weir i in., „In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 97, nr 14, s. 7999–8004, lip. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.14.7999.

[84] D. J. Hamilton, C. A. Séguin, J. Wang, R. M. Pilliar, R. A. Kandel, i BioEngineering of Skeletal Tissues Team, „Formation of a nucleus pulposus-cartilage endplate construct in vitro”, *Biomaterials*, t. 27, nr 3, s. 397–405, sty. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.007.

[85] B. Szabó, A. Borbó, i P. Fürjes, „[Lab-on-a-chip systems in the point-of-care diagnostics]”, *Orv Hetil*, t. 156, nr 52, s. 2096–2102, grudz. 2015, doi: 10.1556/650.2015.30326.

[86] L. Kim, Y.-C. Toh, J. Voldman, i H. Yu, „A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells”, *Lab Chip*, t. 7, nr 6, s. 681–694, cze. 2007, doi: 10.1039/b704602b.

[87] K. Kamei i in., „3D printing of soft lithography mold for rapid production of polydimethylsiloxane-based microfluidic devices for cell stimulation with concentration gradients”, *Biomed Microdevices*, t. 17, nr 2, s. 36, kwi. 2015, doi: 10.1007/s10544-015-9928-y.

[88] S.-S. D. Carter i in., „PDMS leaching and its implications for on-chip studies focusing on bone regeneration applications”, *Organs-on-a-Chip*, t. 2, s. 100004, grudz. 2020, doi: 10.1016/j.ooc.2020.100004.

[89] R. Rauti i in., „Transforming a well into a chip: A modular 3D-printed microfluidic chip”, *APL Bioengineering*, t. 5, nr 2, s. 026103, cze. 2021, doi: 10.1063/5.0039366.

[90] H. Hirama i in., „Glass-based organ-on-a-chip device for restricting small molecular absorption”, *J Biosci Bioeng*, t. 127, nr 5, s. 641–646, maj 2019, doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.10.019.

[91] X. Li, S. M. George, L. Verneti, A. H. Gough, i D. L. Taylor, „A glass-based,

continuously zonated and vascularized human liver acinus microphysiological system (vLAMPS) designed for experimental modeling of diseases and ADME/TOX”, *Lab Chip*, t. 18, nr 17, s. 2614–2631, sie. 2018, doi: 10.1039/C8LC00418H.

[92] H. Jang *i in.*, „Fabrication of Glass Microchannel via Glass Imprinting using a Vitreous Carbon Stamp for Flow Focusing Droplet Generator”, *Sensors*, t. 18, nr 1, Art. nr 1, sty. 2018, doi: 10.3390/s18010083.

[93] V. Carvalho *i in.*, „3D Printing Techniques and Their Applications to Organ-on-a-Chip Platforms: A Systematic Review”, *Sensors*, t. 21, nr 9, Art. nr 9, sty. 2021, doi: 10.3390/s21093304.

[94] H. Becker i C. Gärtner, „Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems”, *Anal Bioanal Chem*, t. 390, nr 1, s. 89–111, sty. 2008, doi: 10.1007/s00216-007-1692-2.

[95] S. W. Song *i in.*, „One-Step Generation of a Drug-Releasing Hydrogel Microarray-On-A-Chip for Large-Scale Sequential Drug Combination Screening”, *Adv Sci (Weinh)*, t. 6, nr 3, s. 1801380, luty 2019, doi: 10.1002/advs.201801380.

[96] C. Y. Chan, V. N. Goral, M. E. DeRosa, T. J. Huang, i P. K. Yuen, „A polystyrene-based microfluidic device with three-dimensional interconnected microporous walls for perfusion cell culture”, *Biomicrofluidics*, t. 8, nr 4, s. 046505, lip. 2014, doi: 10.1063/1.4894409.

[97] F. Deiss, A. Mazzeo, E. Hong, D. E. Ingber, R. Derda, i G. M. Whitesides, „Platform for high-throughput testing of the effect of soluble compounds on 3D cell cultures”, *Anal Chem*, t. 85, nr 17, s. 8085–8094, wrz. 2013, doi: 10.1021/ac400161j.

[98] M. I. Khot *i in.*, „Characterising a PDMS based 3D cell culturing microfluidic platform for screening chemotherapeutic drug cytotoxic activity”, *Sci Rep*, t. 10, nr 1, Art. nr 1, wrz. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-72952-1.

[99] S. I. Montanez-Sauri, D. J. Beebe, i K. E. Sung, „Microscale screening systems for 3D cellular microenvironments: platforms, advances, and challenges”, *Cell Mol Life Sci*, t. 72, nr 2, s. 237–249, sty. 2015, doi: 10.1007/s00018-014-1738-5.

[100] K. Ziolkowska, E. Jedrych, R. Kwapiszewski, J. Lopacinska, M. Skolimowski, i M. Chudy, „PDMS/glass microfluidic cell culture system for cytotoxicity tests and cells passage”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, t. 145, nr 1, s. 533–542, mar. 2010, doi: 10.1016/j.snb.2009.11.010.

[101] D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin, i D. E. Ingber, „Reconstituting organ-level lung functions on a chip”, *Science*, t. 328, nr 5986, s. 1662–1668,

cze. 2010, doi: 10.1126/science.1188302.

[102] E. J. Weber *i in.*, „Human kidney on a chip assessment of polymyxin antibiotic nephrotoxicity”, *JCI Insight*, t. 3, nr 24, s. 123673, grudz. 2018, doi: 10.1172/jci.insight.123673.

[103] M. Kitsara, D. Kontziampasis, O. Agbulut, i Y. Chen, „Heart on a chip: Micro-nanofabrication and microfluidics steering the future of cardiac tissue engineering”, *Microelectronic Engineering*, t. 203–204, s. 44–62, sty. 2019, doi: 10.1016/j.mee.2018.11.001.

[104] A. Kobuszewska *i in.*, „Heart-on-a-Chip: An Investigation of the Influence of Static and Perfusion Conditions on Cardiac (H9C2) Cell Proliferation, Morphology, and Alignment”, *SLAS Technol*, t. 22, nr 5, s. 536–546, paź. 2017, doi: 10.1177/2472630317705610.

[105] S. Hassan *i in.*, „Liver-on-a-Chip Models of Fatty Liver Disease”, *Hepatology*, t. 71, nr 2, s. 733–740, luty 2020, doi: 10.1002/hep.31106.

[106] D. Shav, R. Gotlieb, U. Zaretsky, D. Elad, i S. Einav, „Wall Shear Stress Effects on Endothelial-Endothelial and Endothelial-Smooth Muscle Cell Interactions in Tissue Engineered Models of the Vascular Wall”, *PLOS ONE*, t. 9, nr 2, s. e88304, luty 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0088304.

[107] S. Kakaç, B. Kosoy, D. Li, i A. Pramuanjaroenkij, *Microfluidics Based Microsystems: Fundamentals and Applications*. Springer, 2010.

[108] K. S. Sankar, B. J. Green, A. R. Crocker, J. E. Verity, S. M. Altamentova, i J. V. Rocheleau, „Culturing pancreatic islets in microfluidic flow enhances morphology of the associated endothelial cells”, *PLoS One*, t. 6, nr 9, s. e24904, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0024904.

[109] Y. Jun *i in.*, „In vivo-mimicking microfluidic perfusion culture of pancreatic islet spheroids”, *Sci Adv*, t. 5, nr 11, s. eaax4520, lis. 2019, doi: 10.1126/sciadv.aax4520.

[110] Y.-C. Chen, X. Lou, Z. Zhang, P. Ingram, i E. Yoon, „High-Throughput Cancer Cell Sphere Formation for Characterizing the Efficacy of Photo Dynamic Therapy in 3D Cell Cultures”, *Sci Rep*, t. 5, s. 12175, lip. 2015, doi: 10.1038/srep12175.

[111] K. Hirano *i in.*, „Closed-channel culture system for efficient and reproducible differentiation of human pluripotent stem cells into islet cells”, *Biochem Biophys Res Commun*, t. 487, nr 2, s. 344–350, maj 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.062.

[112] M. S. Kim, H. Hwang, Y.-S. Choi, i J.-K. Park, „Microfluidic Micropillar Arrays for 3D Cell Culture”, *The Open Biotechnology Journal*, t. 2, nr 1, sie. 2008, doi: 10.2174/1874070700802010224.

[113] J. S. Mohammed, Y. Wang, T. A. Harvat, J. Oberholzer, i D. T. Eddington,

„Microfluidic device for multimodal characterization of pancreatic islets”, *Lab Chip*, t. 9, nr 1, s. 97–106, sty. 2009, doi: 10.1039/b809590f.

[114] M. Nourmohammadzadeh *i in.*, „Microfluidic Array for Real-Time Live-Cell Imaging of Human and Rodent Pancreatic Islets”, *Lab Chip*, t. 16, nr 8, s. 1466–1472, kwi. 2016, doi: 10.1039/c5lc01173f.

[115] D. T. T. Nguyen, D. van Noort, I.-K. Jeong, i S. Park, „Endocrine system on chip for a diabetes treatment model”, *Biofabrication*, t. 9, nr 1, s. 015021, luty 2017, doi: 10.1088/1758-5090/aa5cc9.

[116] „atto-deiner-plasma-cleaner.pdf”. Dostęp: 9 czerwiec 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.umu.se/contentassets/9f8c0a0dda844a09b42336a77868b84e/atto-deiner-plasma-cleaner.pdf>

[117] A. Zuchowska, E. Jastrzebska, K. Zukowski, M. Chudy, A. Dybko, i Z. Brzozka, „A549 and MRC-5 cell aggregation in a microfluidic Lab-on-a-chip system”, *Biomicrofluidics*, t. 11, nr 2, s. 024110, mar. 2017, doi: 10.1063/1.4979104.

[118] Y. Chen, D. Gao, H. Liu, S. Lin, i Y. Jiang, „Drug cytotoxicity and signaling pathway analysis with three-dimensional tumor spheroids in a microwell-based microfluidic chip for drug screening”, *Anal Chim Acta*, t. 898, s. 85–92, paź. 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.10.006.

[119] T. Anada *i in.*, „Three-dimensional cell culture device utilizing thin membrane deformation by decompression”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, t. 147, nr 1, s. 376–379, maj 2010, doi: 10.1016/j.snb.2010.01.065.

[120] K. Lee *i in.*, „Gravity-oriented microfluidic device for uniform and massive cell spheroid formation”, *Biomicrofluidics*, t. 6, nr 1, s. 014114-014114–7, mar. 2012, doi: 10.1063/1.3687409.

[121] K. Kwapiszewska, A. Michalczyk, M. Rybka, R. Kwapiszewski, i Z. Brzózka, „A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening”, *Lab Chip*, t. 14, nr 12, s. 2096–2104, maj 2014, doi: 10.1039/C4LC00291A.

[122] J. B. Kim, „Three-dimensional tissue culture models in cancer biology”, *Semin Cancer Biol*, t. 15, nr 5, s. 365–377, paź. 2005, doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.002.

[123] L. Zhan *i in.*, „Pancreatic islet cryopreservation by vitrification achieves high viability, function, recovery and clinical scalability for transplantation”, *Nat Med*, s. 1–11, mar. 2022, doi: 10.1038/s41591-022-01718-1.

[124] H.-H. Huang, S. Harrington, i L. Stehno-Bittel, „The Flaws and Future of Islet Volume Measurements”, *Cell Transplant*, t. 27, nr 7, s. 1017–1026, lip. 2018, doi: 10.1177/0963689718779898.

- [125] J. Hilderink *i in.*, „Controlled aggregation of primary human pancreatic islet cells leads to glucose-responsive pseudoislets comparable to native islets”, *J Cell Mol Med*, t. 19, nr 8, s. 1836–1846, sie. 2015, doi: 10.1111/jcmm.12555.
- [126] T. Tharmalingam, H. Ghebeh, T. Wuerz, i M. Butler, „Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells”, *Mol Biotechnol*, t. 39, nr 2, s. 167–177, cze. 2008, doi: 10.1007/s12033-008-9045-8.
- [127] C. C. Miranda *i in.*, „A Dynamic 3D Aggregate-Based System for the Successful Expansion and Neural Induction of Human Pluripotent Stem Cells”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, t. 16, 2022, Dostęp: 22 kwiecień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2022.838217>
- [128] M. Ibuki, I. Horiguchi, i Y. Sakai, „A novel tool for suspension culture of human induced pluripotent stem cells: Lysophospholipids as a cell aggregation regulator”, *Regenerative Therapy*, t. 12, s. 74–82, grudz. 2019, doi: 10.1016/j.reth.2019.03.008.
- [129] J. Kim, H. Kigami, i T. Adachi, „Characterization of self-organized osteocytic spheroids using mouse osteoblast-like cells”, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, t. advpub, 2020, doi: 10.1299/jbse.20-00227.
- [130] Y. Ichihara, R. Utoh, M. Yamada, T. Shimizu, i Y. Uchigata, „Size effect of engineered islets prepared using microfabricated wells on islet cell function and arrangement”, *Heliyon*, t. 2, nr 6, s. e00129, cze. 2016, doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00129.
- [131] P. V. Röder, B. Wu, Y. Liu, i W. Han, „Pancreatic regulation of glucose homeostasis”, *Exp Mol Med*, t. 48, nr 3, Art. nr 3, mar. 2016, doi: 10.1038/emm.2016.6.
- [132] J. Dolenšek *i in.*, „Membrane Potential and Calcium Dynamics in Beta Cells from Mouse Pancreas Tissue Slices: Theory, Experimentation, and Analysis”, *Sensors*, t. 15, nr 11, Art. nr 11, lis. 2015, doi: 10.3390/s151127393.
- [133] C. S. Nunemaker *i in.*, „Individual mice can be distinguished by the period of their islet calcium oscillations: is there an intrinsic islet period that is imprinted in vivo?”, *Diabetes*, t. 54, nr 12, s. 3517–3522, grudz. 2005, doi: 10.2337/diabetes.54.12.3517.
- [134] P. Gilon, R. M. Shepherd, i J. C. Henquin, „Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ as evidences in single pancreatic islets”, *J Biol Chem*, t. 268, nr 30, s. 22265–22268, paź. 1993.
- [135] G. Beaune *i in.*, „How cells flow in the spreading of cellular aggregates”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, t. 111, nr 22, s. 8055–8060, cze. 2014, doi: 10.1073/pnas.1323788111.
- [136] L. Adenis *i in.*, „Experimental and modeling study of the formation of cell aggregates

with differential substrate adhesion”, *PLOS ONE*, t. 15, nr 2, s. e0222371, luty 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0222371.

[137] S. E. Kahn, M. E. Cooper, i S. Del Prato, „Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future”, *Lancet*, t. 383, nr 9922, s. 1068–1083, mar. 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(13)62154-6.

[138] „Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective”. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4020243/> (dostęp 10 marzec 2022).

[139] W. Liu *i in.*, „Abnormal regulation of glucagon secretion by human islet alpha cells in the absence of beta cells”, *EBioMedicine*, t. 50, s. 306–316, lis. 2019, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.11.018.

[140] L. Jiang, Y. Shen, Y. Liu, L. Zhang, i W. Jiang, „Making human pancreatic islet organoids: Progresses on the cell origins, biomaterials and three-dimensional technologies”, *Theranostics*, t. 12, nr 4, s. 1537–1556, 2022, doi: 10.7150/thno.66670.

[141] V. Cirulli, D. Baetens, U. Rutishauser, P. A. Halban, L. Orci, i D. G. Rouiller, „Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation”, *J Cell Sci*, t. 107 (Pt 6), s. 1429–1436, cze. 1994, doi: 10.1242/jcs.107.6.1429.

[142] F. C. Wieland, C. A. van Blitterswijk, A. van Apeldoorn, i V. L. S. LaPointe, „The functional importance of the cellular and extracellular composition of the islets of Langerhans”, *Journal of Immunology and Regenerative Medicine*, t. 13, s. 100048, sie. 2021, doi: 10.1016/j.regen.2021.100048.

[143] P. Sokolowska, K. Zukowski, J. Janikiewicz, E. Jastrzebska, A. Dobrzyn, i Z. Brzozka, „Islet-on-a-chip: Biomimetic micropillar-based microfluidic system for three-dimensional pancreatic islet cell culture”, *Biosens Bioelectron*, t. 183, s. 113215, lip. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2021.113215.

[144] O. Cabrera, D. M. Berman, N. S. Kenyon, C. Ricordi, P.-O. Berggren, i A. Caicedo, „The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function”, *PNAS*, t. 103, nr 7, s. 2334–2339, luty 2006, doi: 10.1073/pnas.0510790103.

[145] E. Mann 1, M. Sunni 2, i and M. D. Bellin 2, „Secretion of Insulin in Response to Diet and Hormones”, *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, grudz. 2020, doi: 10.3998/panc.2020.16.

[146] P. Sokolowska, E. Jastrzebska, A. Dobrzyn, i Z. Brzozka, „Investigation of the Therapeutic Potential of New Antidiabetic Compounds Using Islet-on-a-Chip Microfluidic Model”, *Biosensors*, t. 12, nr 5, Art. nr 5, maj 2022, doi: 10.3390/bios12050302.

[147] T. Toyoda *i in.*, „Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and

iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells”, *Stem Cell Res*, t. 14, nr 2, s. 185–197, mar. 2015, doi: 10.1016/j.scr.2015.01.007.

[148] T.-M. Achilli, J. Meyer, i J. R. Morgan, „Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids”, *Expert Opin Biol Ther*, t. 12, nr 10, s. 1347–1360, paź. 2012, doi: 10.1517/14712598.2012.707181.

[149] M. Klak *i in.*, „Bionic Organs: Shear Forces Reduce Pancreatic Islet and Mammalian Cell Viability during the Process of 3D Bioprinting”, *Micromachines (Basel)*, t. 12, nr 3, s. 304, mar. 2021, doi: 10.3390/mi12030304.

[150] S. Ullrich, K. B. Abel, S. Lehr, i R. Greger, „Effects of glucose, forskolin and tolbutamide on membrane potential and insulin secretion in the insulin-secreting cell line INS-1”, *Pflugers Arch*, t. 432, nr 4, s. 630–636, sie. 1996, doi: 10.1007/s004240050179.

[151] A. Chowdhury *i in.*, „Signaling in insulin-secreting MIN6 pseudoislets and monolayer cells”, *J Proteome Res*, t. 12, nr 12, s. 5954–5962, grudz. 2013, doi: 10.1021/pr400864w.

[152] A. Essaouiba *i in.*, „Analysis of the behavior of 2D monolayers and 3D spheroid human pancreatic beta cells derived from induced pluripotent stem cells in a microfluidic environment”, *J Biotechnol*, t. 330, s. 45–56, mar. 2021, doi: 10.1016/j.jbiotec.2021.02.009.

[153] K. Heileman, J. Daoud, C. Hasilo, M. Gasparrini, S. Paraskevas, i M. Tabrizian, „Microfluidic platform for assessing pancreatic islet functionality through dielectric spectroscopy”, *Biomicrofluidics*, t. 9, nr 4, s. 044125, sie. 2015, doi: 10.1063/1.4929652.

[154] S. H. Lee *i in.*, „Microphysiological Analysis Platform of Pancreatic Islet β -Cell Spheroids”, *Adv Healthc Mater*, t. 7, nr 2, sty. 2018, doi: 10.1002/adhm.201701111.

[155] S. N. Patel, C. E. Mathews, R. Chandler, i C. L. Stabler, „The Foundation for Engineering a Pancreatic Islet Niche”, *Front Endocrinol (Lausanne)*, t. 13, s. 881525, 2022, doi: 10.3389/fendo.2022.881525.

[156] A. Sjöholm, „Diabetes mellitus and impaired pancreatic beta-cell proliferation”, *J Intern Med*, t. 239, nr 3, s. 211–220, mar. 1996, doi: 10.1046/j.1365-2796.1996.377740000.x.

Podziękowania

Pragnę złożyć szczególne podziękowania **prof. dr hab. inż. Zbigniewowi Brzózce** oraz **prof. dr hab. Agnieszce Dobrzyń** za okazane wsparcie, opiekę naukową, nieocenioną pomoc i wiarę w powodzenie prowadzonych przeze mnie badań.

Dziękuję **dr hab. inż., prof. uczelni Elżbiecie Jastrzębskiej** za wprowadzenie w świat mikrofluidyki, wszechstronną pomoc, wsparcie merytoryczne oraz cenne rady.

Dziękuję **dr inż. Kamilowi Żukowskiemu** za wykonanie pieczętek mikrosystemu przepływowego IV z wykorzystaniem techniki mikrofrezowania oraz wykonanie symulacji przepływu komórek i naprężeń ścinających przy użyciu modułu symulacyjnego Microelectromechanical Systems (MEMS) oprogramowania COM-SOL Multiphysics.

Dziękuję **dr inż. Agnieszce Żuchowskiej, dr inż. Magdalenie Flont** oraz **dr inż. Annie Skarżyńskiej** za udostępnienie mi swoich mikrosystemów przepływowych do przeprowadzenia badań wstępnych.

Dziękuję pracownikom Katedry Biotechnologii Medycznej **prof. dr hab. inż. Arturowi Dybko, prof. dr hab. inż. Michałowi Chudemu** oraz **dr hab. inż. prof. uczelni Ilonie Grabowskiej-Jadach** za okazane wsparcie i cenne rady.

Serdecznie dziękuję byłym i obecnym doktorantom Katedry Biotechnologii Medycznej (**Sandrze, Kasi, Kasprowi, Dominikowi, Bartkowi, Oli, Dominice, Ewelinie, Edycie, Asi**) za okazane wsparcie, stworzenie przyjaznej i twórczej atmosfery pracy oraz wspólne poszukiwanie rozwiązań stawianych problemów badawczych.

Serdecznie dziękuję pracownikom Pracowni Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN (**dr Justynie Janikiewicz, dr Anecie Dobosz, dr Ewelinie Krogulec**) za współpracę, pomoc oraz miłą atmosferę pracy.

Dziękuję dyplomantkom: **p. Annie Grabowskiej** oraz **p. Magdalenie Kopińskiej** za pomoc przy realizacji i opracowaniu wyników badań.

Szczególne podziękowania kieruję do moich **Przyjaciół, Rodziny i bliskich** za cierpliwość, wyrozumiałość, motywację oraz nieustającą wiarę w powodzenie realizacji moich pomysłów.

Niniejsza praca była współfinansowana w ramach programów:

- NCN PRELUDIUM 17 (no. UMO-2019/33/N/ST4/02416).
- Projekt Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie "Od chemii do bioinnowacji" TRI-BIO-CHEM realizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego



Publikacje związane z tematyką doktoratu

1. **Sokolowska P.**, Jastrzebska E., Dobrzyn A., Brzozka Z., Investigation of the therapeutic potential of new antidiabetic compounds using Islet-on-a-chip microfluidic model, *Biosensors* 2022, 12(5):302.
2. **Sokolowska P.**, Zuchowska A., Brzozka Z., Why can organoids improve current Organ-on-Chip platforms? *Organoids* 2022, 1, 69–84.
3. **Sokolowska P.**, Żukowski K., Janikiewicz J., Jastrzębska E., Dobrzyń A., Brzózka Z. Islet-on-a-chip: Biomimetic micropillar-based microfluidic system for three-dimensional pancreatic islet cell culture. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 183, 1-8.
4. **Sokolowska P.**, Janikiewicz J., Jastrzębska E., Dobrzyń A., Brzózka Z. Combinations of regenerative medicine and Lab-on-a-chip systems: new hope to restoring the proper function of pancreatic islets in diabetes. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 167, 1-11.
5. **Sokolowska, P.**, Grabowska, A., Żukowski, K., Brzozka, Z., Dobrzyn, A. Micropillar-based microfluidic system for studies of 3D pancreatic islet structures. *MicroTAS 2020 - 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 2020, 987–988.
6. Brzozka Z., **Sokolowska P.**, Żukowski K., Janikiewicz J., Jastrzębska E., Dobrzyń A., Lab-on-a-Chip System for Developing and Fluorescence Imaging a Three-Dimensional Model of Pancreatic Islets Under Flow Conditions. *2020ECS Meeting Abstracts MA2020-01(27): 1984- 1984*.

Publikacje niezwiązane z tematyką doktoratu

1. **Sokolowska P.**, Żukowski K., Lasocka I., Szulc-Dabrowska L., Jastrzębska E. Human mesenchymal stem cell (hMSC) differentiation towards cardiac cells using a new microbioanalytical method. *Analyst*, 2020, 145, 3017-3028.
2. Jastrzebska E., Zuchowska A., Flis S., **Sokolowska P.**, Bulka M., Dybko A., Brzozka Z. Biological characterization of the modified poly(dimethylsiloxane) surfaces based on cell attachment and toxicity assays. *Biomicrofluidics*, 2018, 12, 044105.
3. Kobuszevska A., **Sokolowska P.** Jastrzebska E. Cardiac Cell Culture Technologies: Microfluidic and On-Chip Systems, *Rozdział 9: Cardiac Cell Culture Microtechnologies*

Based on Stem Cells. red. E. Jastrzebska, Z.Brzozka, Springer, 201-225 (rozdział w monografii).

4. **Sokołowska P.**, Jesion I., Szulc-Dabrowska L., Zukowski K., Jastrzebska E., Brzozka Z. Stem cell differentiation into heart cells using a microchip integrated with a digitally controlled microdispenser, 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS, 2018, 4, 2415-2416.

Patenty:

Sokołowska P., Żukowski K., Brzózka Z., Jastrzębska E., Dobrzyń A., Janikiewicz J., Mikrosystem przepływowy do tworzenia, hodowli oraz obrazowania fluorescencyjnego trójwymiarowych agregatów komórek wysp trzustkowych, 2021 PL239354.

Nagrody:

1. Kierownik grantu Preludium 17 finansowanego przez Narodowe centrum Nauki pt.: "Opracowanie nowego podejścia opartego na zastosowaniu trójwymiarowego modelu wyspy trzustkowej w mikroprzepływowym systemie *Lab-on-a-Chip* w celu przeprowadzenia wysokowydajnej analizy funkcjonalnej w warunkach fizjologicznych i stanie patologicznym".
2. Nagroda za najlepszą publikację naukową - Best Paper, Warszawa, 2021.
3. Tony B. Academic Travel Award, Society for Laboratory Automation and Screening's Programe Committee, USA, San Diego, 2019.

Wystąpienia konferencyjne:

19 wystąpień ustnych oraz posterowych na konferencjach międzynarodowych i krajowych.