

Koncepcją projektu jest opracowanie nowego podejścia opartego na zastosowaniu trójwymiarowego modelu wyspy trzustkowej („pseudowyspa”) w mikroprzepływowym systemie *Lab-on-a-Chip* w celu przeprowadzenia wysokowydajnych badań analizy funkcjonalnej wysp trzustkowych w warunkach fizjologicznych i stanie patologicznym.

W badaniach opracujemy trójwymiarowy model agregatu komórkowego („pseudowyspa”) składający się z dwóch najważniejszych dla przebiegu cukrzycy typu 2 linii komórkowych: komórek β (INS-1E), które wydzielają insulinę i komórek α (α -TC1-6) odpowiadających za wydzielanie glukagonu. Model ten zostanie opracowany z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego, dzięki któremu uzyskamy warunki zbliżone do panujących w organizmie. Badania rozpoczniemy od opracowania systemu mikroprzepływowego o geometrii, która pozwoli na uzyskanie trójwymiarowych agregatów komórkowych. Taki system wykonany zostanie z biokompatybilnych, odpowiednich dla hodowli komórkowej materiałów, które umożliwią obserwację i analizę uzyskanych wyników. Dodatkowo mikrosystem wykorzystany w badaniach umożliwi obserwacje zmian zachodzących w pojedynczej „pseudowyspie” o określonym, pożądanym rozmiarze. Ponieważ wyspy trzustkowe zbudowane są z wielu typów komórek występujących w ściśle określonym stosunku i lokalizacji drugim etapem badań będzie dobranie odpowiedniego składu komórkowego tak aby odzwierciedlić te proporcje. Potwierdzenie dobrze dobranego stosunku komórek uzyskamy dzięki przeprowadzeniu barwienia immunofluorescencyjnego oraz obserwacji uzyskanych struktur w przestrzeni trójwymiarowej. Kolejnym etapem badań będzie dobór odpowiednich warunków przepływu panujących w mikrosystemie tak aby w rezultacie uzyskać długoterminową hodowlę o wysokiej żywotności i stopniu proliferacji. Wpływ warunków przepływu zostanie oceniony na podstawie mikroskopowej oceny zmian w morfologii komórek oraz testów takich jak: Alamar Blue, BrdU, jodek propidyny/kalceina AM.

Kolejnym i ostatnim etapem naszej pracy będzie ocena wydzielania insuliny w opracowanym systemie w zależności od różnych warunków przepływu oraz od stężenia glukozy. Jako, że wydzielanie insuliny jest złożonym, dwuetapowym procesem o dynamicznej naturze uwalniania biomolekuł, należy prowadzić pomiary z wykorzystaniem metody umożliwiającej ocenę dużej ilości próbek w czasie. Większość badań odpisanych do tej pory w literaturze opiera się na jednokrotnym pomiarze insuliny, a uzyskane wyniki są jedynie średnią wydzielania w czasie, który upłynął od podania czynnika stymulującego. Na podstawie przeprowadzonych wcześniej badań oraz pomiaru ilości wydzielanej insuliny za pomocą immunoenzymatycznego testu ELISA dobierzemy odpowiednią dla ciągłego pomiaru wydzielania insuliny metodę. Na tym etapie podejmiemy próbę zastosowania detekcji z wykorzystaniem Rezonansu Plazmonów Powierzchniowych w opracowanym mikroukładzie przepływowym. Dzięki zastosowaniu takiej metody będziemy w stanie oznaczyć nawet śladowe ilości wydzielanej insuliny w próbkach o objętości rzędu kilkudziesięciu μ l i prowadzić te pomiary w czasie rzeczywistym.

Zespół podejmuje daną tematykę badawczą ze względu na możliwość głębszego poznania kinetyki zależnego od glukozy wydzielania insuliny. Pomysł wykorzystania mikroukładu przepływowego związany jest z rosnącą potrzebą stworzenia modelu wysepki trzustkowej odzwierciedlającego warunki panujące w organizmie. W proponowanym projekcie podejmiemy próbę stworzenia układu mikroprzepływowego, który zapewni idealne warunki dla długotrwałej hodowli „pseudowyspy”, obserwacji funkcji pojedynczej wysepki oraz pomiaru ilości wydzielanej insuliny. Wierzymy, że opracowany przez nas model może być uniwersalnym modelem dla prowadzenia dalszych badań w kierunku opracowania skutecznej metody diagnostycznej i terapii cukrzycy typu 2.