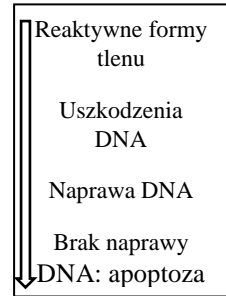


Celem proponowanego projektu jest **ocena bezpieczeństwa chondrocytów pozyskanych w wyniku procesu różnicowania komórek macierzystych, poddanych działaniu czynników przeciwnowotworowych**. Badania koncentrować się będą na mało poznanych do tej pory mechanizmach odpowiedzi komórek zróżnicowanych z komórek macierzystych na powstałe uszkodzenia materiału genetycznego. W komórkach poddanych działaniu promieniowania jonizującego oraz wybranych cytostatyków zgodnie z obowiązującymi protokołami terapeutycznymi zaplanowano następujące analizy:

- 1) poziomu reaktywnych form tlenu odzwierciedlającego stres oksydacyjny,
- 2) niebezpiecznych podwójnoniciowych uszkodzeń materiału genetycznego (DNA), powstałych zarówno poprzez bezpośrednie działanie promieniowania jonizującego, jak i wywołanych stresem oksydacyjnym,
- 3) uruchamianych mechanizmów naprawczych uszkodzonego materiału genetycznego,
- 4) poziomu programowanej śmierci (apoptozy) komórek w przypadku niewystarczającego stopnia naprawy DNA.
- 5) porównanie uruchamianych mechanizmów odpowiedzi komórkowej poszczególnych linii komórek macierzystych oraz komórek chondrocyto-podobnych pozyskanych od komórek macierzystych z dojrzałymi chondrocytami.



Materiałem badawczym w projekcie będą dwie linie pluripotencjalnych komórek (zdolnych do różnicowania w trzy listki zarodkowe): ludzkich embrionalnych oraz indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, a także ustalona linia dojrzałych, ludzkich chondrocytów. Proces różnicowania komórek macierzystych w kierunku chondrocytów zostanie przeprowadzony wcześniej opracowaną metodą.

Poszczególne analizy zostaną przeprowadzone w oparciu o następującą metodykę:

Ad. 1) pomiar cytometryczny z zastosowaniem barwnika emitującego fluorescencję w obecności reaktywnych form tlenu.

Ad. 2) pomiar cytometryczny fosforylacji histonu H2AX pozwalający na ilościową analizę dwuniciowych uszkodzeń DNA.

Ad. 3) analizę uruchomionych mechanizmów naprawczych zarówno na poziomie genów (odcinków DNA kodujących produkty białkowe), jak i białka.

Ad. 4) pomiar cytometryczny z zastosowaniem markera charakterystycznego dla komórki ulegającej reprogramowanej śmierci (apoptozy): wyznakowanej aneksyny V oraz jodku propidyny.

Zakładamy, że proces różnicowania, w wyniku którego otrzymujemy wyspecjalizowane komórki w istotny sposób wpływa na mechanizmy uruchamiane w komórkach w odpowiedzi na działanie czynników przeciwnowotworowych. Co więcej, mechanizmy te znacząco różnią się od procesów uruchamianych w komórkach macierzystych, z których pozyskujemy komórki zróżnicowane, jak i w pełni dojrzałych komórek pozyskanych od pacjentów. Wierzymy, że ma to bardzo duży wpływ na **stabilność genetyczną** komórek pochodnych od komórek macierzystych, co ma bezpośrednie odzwierciedlenie w bezpieczeństwie stosowania tych komórek w praktyce klinicznej. Obecnie terapie przeciwnowotworowe opierają się głównie na wykorzystaniu czynników powodujących uszkodzenia materiału genetycznego, a w konsekwencji śmierć komórek nowotworowych: promieniowania jonizującego i cytostatyków. Jednakże, wpływ promieniowania jonizującego i cytostatyków można zaobserwować we wszystkich komórkach organizmu. Bardzo często w komórkach, z uszkodzonym materiałem genetycznym dochodzi do powstawania mutacji, które są przyczyną wtórnych nowotworów. Ponadto, w ostatnich latach coraz większy nacisk kładzie się na ochronę zdrowych tkanek i narządów krytycznych podczas radioterapii. Medycyna regeneracyjna jest szybko rozwijającą się dziedziną, w której kluczową rolę zaczynają odgrywać komórki macierzyste. Ocena stabilności genetycznej komórek zróżnicowanych z pluripotencjalnych komórek macierzystych podczas stosowania terapii przeciwnowotworowych jest bardzo istotnym zagadnieniem ze względu na wzrastającą zachorowalność na nowotwory po 50 r.ż. Niestety, **niewiele wiadomo na temat mechanizmów uruchamianych przez nie w odpowiedzi na zastosowane terapie przeciwnowotworowe**. Należy podkreślić, że poszczególne komórki niezróżnicowane oraz zróżnicowane charakteryzują się odmienną **promieniowrażliwością**. Nie wiadomo, **czy mechanizmy odpowiedzi komórkowej komórek zróżnicowanych z komórek macierzystych bardziej przypominają te występujące w komórkach macierzystych, czy też w komórkach w pełni wyspecjalizowanych**. Wyniki zaplanowanych doświadczeń przyczynią się do rozwoju medycyny regeneracyjnej i radiobiologii oraz do opracowania w przyszłości protokołów klinicznych pozyskiwania **bezpiecznych** chondrocytów z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych uzyskanych od chorego w wyniku reprogramowania komórek ciała (somatycznych).