

Głównym celem przedstawionego projektu jest kompleksowa charakterystyka właściwości sekrecyjnych oraz zdolności do różnicowania się ludzkich jajnikowych komórek ziarnistych (GCs) oraz komórek cumulusa (CCs). Realizacja celu polegać będzie na ocenie szybkości proliferacji/migracji GCs i CCs w czasie rzeczywistym, podczas ich długoterminowej hodowli *in vitro*, w trzech rodzajach medium hodowlanego (medium podstawowym, medium różnicującym w kierunku osteoblastów i chondrocytów, medium kondycjonowanym pozyskiwanym po hodowli zarodków ludzkich). Ponadto, zostanie podjęta próba określenia interakcji pomiędzy GCs i CCs utrzymywanych w ko-hodowli w powyższych mediach hodowlanych. Szczególnie istotna będzie ocena wpływu medium kondycjonowanego z nad hodowli zarodków ludzkich na potencjał różnicowania się badanych komórek. Charakterystyka właściwości sekrecyjnych GCs i CCs polegać będzie na ich analizie proteomicznej/metabolomicznej oraz analizie składu medium, w którym były hodowane.

W celu realizacji powyższych celów podjęte zostaną następujące zadania badawcze:

- hodowla GCs, CCs i ko-hodowla GCs i CCs w systemie 3D,
- analiza tempa proliferacji/migracji GCs, CCs, GCs+CCs w czasie rzeczywistym w poszczególnych mediach hodowlanych przy wykorzystaniu metody RTCA (The Real Time Cell Analyzer),
- określenie poziomów ekspresji znanych markerów genetycznych, komórek macierzystych w izolowanych GCs, CCs, GCs+CCs za pomocą metod immunofluorescencyjnych,
- analiza proteomiczna/metabolomiczna składu białkowego: komórek GCs, CCs (z oddzielnych hodowli i ko-hodowli), medium otrzymywanego po zakończonej hodowli powyższych komórek, a także medium otrzymywanego z nad zarodków ludzkich przy wykorzystaniu metody spektrometrii mas (NanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS),
- analiza transkryptomu zróżnicowanych komórek, pochodzących z GCs, CCs, GCs+CCs przy użyciu technik molekularnych (mikromacierze ekspresyjne, RT-qPCR)

Fizjologia GCs i CCs wydaje się bardzo dobrze poznana, nie do końca jednak wiadomo jakie właściwości zyskują one podczas długoterminowej hodowli w warunkach *in vitro*. Przypuszcza się, że GCs posiadają właściwości komórek macierzystych, a zatem pod wpływem odpowiedniego czynnika różnicującego, mogą przekształcić się w inny rodzaj komórek. Nie wiadomo natomiast czy komórki CCs również posiadają taką właściwość. Ze względu na bliskie sąsiedztwo obu typów komórek oraz wspólne pochodzenie, wydaje się to być wysoce prawdopodobne. Jak dotąd skupiano się jedynie na właściwościach fizjologicznych CCs, głównie ich interakcjach z oocytem. Dlatego też, jednym z celów projektu jest szczegółowa charakterystyka transkryptomyczna i metabolomiczna CCs, oraz ocena ich zdolności proliferacyjnych/migracyjnych i potencjału do różnicowania w inne typy komórek.

W ostatnich latach, zainteresowanie badaczy zyskuje stosowanie mediów kondycjonowanych, pozyskiwanych z hodowli komórkowych. Szczególnie obiecujące wydaje się być medium z nad zarodków ludzkich hodowanych *in vitro*. Zawiera ono substancje/czynniki/metabolity uwalniane przez zarodek, podczas jego proliferacji i wzrostu. Zarodki utrzymywane są w hodowli, w medium hodowlanym do momentu osiągnięcia stadium blastocysty. Medium to po transferze zarodka do macicy pacjentki stanowi materiał odpadowy. Zasadnym wydaje się zbadanie i ewentualne wykorzystanie takiego medium jako suplementu w innych hodowlach komórkowych. Jak dotąd nie określono dokładnie jego składu, a także nie wykazano jego wpływu na proces różnicowania się komórek. Być może, jak dotąd niedoceniany, materiał odpadowy będzie miał istotny wpływ na tempo i kierunek różnicowania się GCs i CCs.

W przedstawionym projekcie zakłada się uzyskanie zróżnicowanych osteoblastów i chondrocytów, które mogłyby zostać wykorzystane w medycynie regeneracyjnej i transplantologii. Ponadto, identyfikacja składników medium pozyskiwanego po hodowli zarodków ludzkich pozwoli określić jego potencjał terapeutyczny i możliwość jego wykorzystania jako suplementu podczas procesu różnicowania komórek macierzystych w inne typy komórek.

Innowacyjne podejścia w tym projekcie to: wykorzystanie medium kondycjonowanego pozyskiwanego po hodowli zarodków ludzkich, ko-hodowla GC i CC z użyciem insertów, ocena potencjału GCs i CCs do różnicowania się w inne typy komórek oraz identyfikacja markerów genetycznych odpowiedzialnych za ten proces, a także interdyscyplinarność i możliwość zastosowania powstałych komórek w medycynie regeneracyjnej i rekonstrukcyjnej.