

**Tło.** Ludzki genom, jądrowy i mitochondrialny, jest narażony na różne endogenne i egzogenne czynniki uszkodzające. DNA ulega różnego rodzaju uszkodzeniom, w tym pęknięciom, i podlega ciągłej naprawie. Gdy poziom uszkodzeń wzrasta, wzrasta również prawdopodobieństwo nieudanej lub błędnej naprawy. Błędy w uszkodzeniu DNA mogą prowadzić do mutacji powodujących śmierć komórki, ale także do aberracji strukturalnych chromosomów i transformacji nowotworowej oraz do wzrostu poziomu cytozolowego DNA (fragmenty DNA znajdujące się poza jądrem i mitochondriami), które, jak się uważa, sprzyja zaburzeniom autoimmunologicznym. Uszkodzenie DNA jest szczególnie niebezpieczne dla dzielących się komórek, w tym komórek macierzystych i szpiku kostnego, chociaż uszkodzenia DNA są również niebezpieczne dla niedzielących komórek, takich jak neurony. Uważa się, że liczba endogennych nienaprawionych pęknięć DNA wzrasta wraz z wiekiem organizmu, jednak dostępne informacje opierają się na pomiarach pośrednich, a dokładne poziomy uszkodzeń endogennych w różnych tkankach ludzkich pozostają do zbadania.

**Hipoteza.** Liczba endogennych pęknięć DNA w jądrze komórkowym wzrasta wraz z wiekiem organizmu ssaka i jest silnie uzależniona od rodzaju tkanki. Związany z wiekiem wzrost liczby endogennych zmian DNA powoduje wzrost poziomu cytozolowego DNA.

**Cele.** Cele planowanych badań obejmują (i) ilościowe badania endogennych jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA w jądrach komórek różnych tkanek mysich i ludzkich w funkcji wieku organizmu, (ii) badania ilościowe endogennych jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA znajdujących się w eu- i heterochromatynie komórek z różnych tkanek oraz w komórkach replikujących i niereplikujących DNA, (iii) ilościowe badania jedno- i dwuniciowych pęknięć mitochondrialnego DNA w tkankach myszy i ludzi w różnym wieku, (iv) ilościowe określenie cytozolowych fragmentów DNA w komórkach różnych tkanek i odniesienie ich do wieku organizmu, (v) ocenę zależności między poziomami endogennych uszkodzeń DNA związanych z wiekiem a poziomami cytozolowego DNA w różnych tkankach, oraz (vi) ocenę ilości uszkodzeń endogennych i cytozolowego DNA w komórkach ludzkich hodowanych w warunkach laboratoryjnych, które są namnażane w celu wykorzystania jako przeszczepy skóry lub tkanki łącznej.

**Metody.** Dwie nowe, zaawansowane, bardzo czułe i specyficzne techniki bezpośredniego wykrywania jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA (sSTRIDE an dSTRIDE), w połączeniu z fluorescencyjną mikroskopią superrozdzielczą i wysokoczułą (dSTORM, mikroskopia szerokiego pola z detektorami EMCCD) otwierają nowe możliwości w wykrywaniu i ilościowym określaniu uszkodzeń endogennych i fragmentów cytozolowego DNA w różnych tkankach ludzkich i organizmach w różnym wieku. Te nowe podejścia można również dostosować do oceny jakości DNA w ludzkich keratynocytach i chondrocytach hodowanych w warunkach laboratoryjnych i przeznaczonych do przeszczepów.

**Znaczenie.** Planowane badania dostarczą informacji o poziomach endogennych pęknięć DNA w różnych tkankach myszy i człowieka oraz pozwolą na analizę korelacji pomiędzy poziomami endogennych uszkodzeń DNA a ilością cytozolowego DNA w różnych tkankach i organizmach w różnym wieku. Prace te otworzą również możliwość wykorzystania STRIDE do weryfikacji jakości DNA w wyhodowanych laboratoryjnie komórkach wykorzystywanych do przeszczepów skóry i tkanki łącznej.

**Dane wstępne.** We wstępnych eksperymentach z powodzeniem wykryto i określono ilościowo jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA, a także cytozole fragmenty DNA w skrawkach mrożeniowych różnych tkanek myszy, w tym mięśni prążkowych, wątroby i nerek.