**Cel projektu**

W badaniach planujemy sprawdzić, czy substancje takie jak fitokannabinoidy a dokładnie CBD (kannabidiol) oraz ekstrakt z rośliny konopi leczniczych (*Cannabis sativa*), które nie wywołują efektów psychoaktywnych, w połączeniu z modulacją układu endokannabinoidowego mogą redukować proces NETozy w otoczeniu mikrośrodowiska nowotworowego

**Opis badań**

Proces NETozy to jeden z mechanizmów obronnych neutrofilów, czyli komórek należących do naszego układu odpornościowego. Neutrofile jako pierwsza linia obrony naszego organizmu, migrują do miejsca objętego stanem zapalnym i wykorzystując, m.in. NETozę do eliminowania drobnoustrojów, komórek martwiczych, czy też komórek nowotworowych. NEToza polega na dekondensacji chromatyny, czyli rozluźnieniu struktury DNA i wydzieleniu z wnętrza komórki, tzw. zewnątrzkomórkowych sieci DNA. Mechanizm ten prowadzi niestety do śmierci litycznej neutrofilów, przez którą komórki obumierają i nie mogą dalej pełnić sowich funkcji, takich jak, np. fagocytoza, czy degranulacja. Wydzielone sieci DNA są bogato ozdobione różnorodnymi białkami a przede wszystkim enzymami, które mogą prowadzić do degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej (substancji otaczającej komórki) a nawet uszkodzenia tkanek. Mechanizm ten jest szczególnie istotny w mikrośrodowisku nowotworowym, ponieważ panuje w nim stan przewlekłego zapalenia, do którego bardzo intensywnie rekrutowane są neutrofile. Ponadto komórki nowotworowe uwalniają czynniki chemotaktyczne nasilające migrację i generowanie NETozy neutrofilów. W efekcie dochodzi do uwalnianie dużych ilości pułapek DNA a tym samym enzymów proteolitycznych, które mogą, m.in., wspierać uwalnianie komórek nowotworowych ze zrębu guza nowotworowego i umożliwiać powstawanie przerzutów.

**1.** W pierwszej części naszych badań chcemy sprawdzić, czy CBD, ekstrakt z konopi leczniczych oraz modulacja układu endokannabinoidowego (hamowanie / aktywacja receptorów tego układu) może redukować NETozę neutrofilów wywołaną trzema różnymi czynnikami: PMA (powszechnie stosowany induktor NETozy samobójczej), mediami kondycjonowanymi znad komórek nowotworowych oraz przygotowanym przez nas koktajlem czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe. Neutrofile izolowane będą z krwi obwodowej zdrowych dawców. Do analizy przygotowanych próbek planujemy wykorzystać cytometrię przepływową oraz technikę WesterBlot.

**2.** W drugiej części badań planujemy sprawdzić, czy przy zastosowaniu CBD lub ekstraktu z konopi leczniczy i równocześnie modulacja układu endokannabinoidowego (hamowanie / aktywacja receptorów tego układu) redukcja NETozy będzie miała wpływ na proprzerzutowy charakter komórek nowotworowych. Konkretnie, chcemy dokonać koinkubacji neutrofilów z komórkami nowotworowymi w obecności wybranych przez nas związków redukujących NETozę. Następnie wykorzystując metodę RT-qPCR chcemy sprawdzić, czy regulacja NETozy ma związek z profilem ekspresji wybranych przez nas genów, które to są charakterystyczne dla komórek nowotworowych mających wysoki potencjał przerzutowy.

**Powody dla których podjęto tematykę badawczą**

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wskazują, że zarówno fitokannabinoid CBD jak i ekstrakt z konopi leczniczych, czy też modulacja działania układu endokannabinoidowego mogą redukować NETozę neutrofilów w środowiskach objętym stanem zapalnym. Doniesienia dotyczą jednak różnych modeli chorobowych za wyjątkiem chorób nowotworowych i ich mikrośrodowska. Ponadto dokładny mechanizm działania fitokannabinoidów jak i układu endokannabinoidowego w kontekście redukowania NETozy i nadmienrje aktywacji neutrofilów nie został w pełni poznany. Zaproponowane przez nas badania wskazują na niezgłębioną do tej pory niszę badawczą i skupiają się na zupełnie nowym problemie, którego próba poznania może wskazać drogę do stworzenia skutecznej terapii ograniczającej NETozę neutrofilów w mikrośrodowisku nowotworowym a tym samym powstawanie przerzutów nowotworowych.

**Najważniejsze spodziewane efekty**

Oczekujemy, że zastosowanie CBD lub ekstraktu z konopi leczniczych wraz z modulacją układu endokannabinoidowego pozwoli redukować proces NETozy generowany przede wszystkim mediami kondycjonowanymi oraz czynnikami wydzielanymi przez komórki nowotworowe. Ponadto oczekujemy, że ograniczenie NETozy będzie wiązało się z redukcją poziomu ekspresji genów związanych z procesem tworzenia przerzutów a wyniki naszych badań będą podstawą do kontynuowania zgłębiania poruszonego przez nas problemu badawczego.