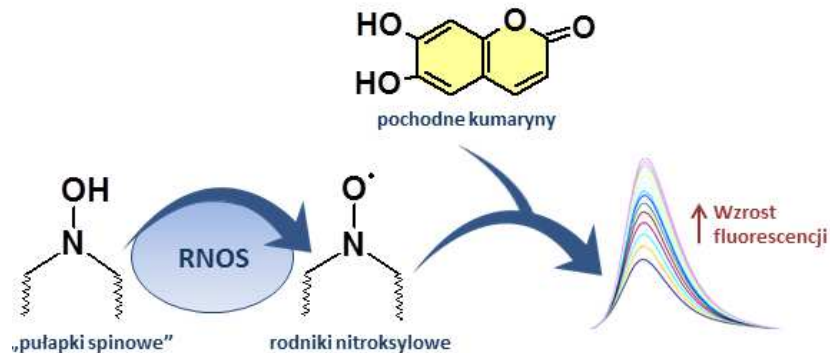


Głównym celem projektu badawczego jest zaprojektowanie innowacyjnej metody pomiaru całkowitej ilości różnych reaktywnych form azotu i tlenu (RNOS), będących prekursorami stresu oksydacyjnego. Metoda będzie polegać na identyfikacji, a następnie ilościowym oznaczeniu, z wykorzystaniem głównie wysokosprawnej chromatografii cieczowej, spektroskopii fluorescencyjnej oraz pochodnych kumaryny z dwoma podstawnikami hydroksylowymi w roli sensorów fluorescencyjnych – rodników nitroksylowych – powstałych w wyniku reakcji różnych „pułapek spinowych” (hydroksyloaminy, nitrony oraz związki nitrozowe) z badanymi RNOS. Wprowadzenie wyselekcjonowanych „pułapek spinowych” do modelowego roztworu buforowego, zawierającego różne RNOS, a następnie pomiar ilościowy powstałych rodników nitroksylowych stanowić będzie czułą, dokładną, stosunkowo tanią i szybką pośrednią metodę pomiaru poziomu stresu oksydacyjnego w badanej próbce. Dodatkowo, ten sam eksperyment zostanie przeprowadzony w materiale biologicznym – ekstraktach komórek nowotworowych piersi hodowanych w różnych warunkach, w tym między innymi w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego promieniowaniem jonizującym. Rysunek poniżej stanowi graficzne przedstawienie badań będących istotą niniejszego projektu.



W pierwszej kolejności zostaną zbadane reakcje pomiędzy grupą „pułapek spinowych” (hydroksyloaminy, nitrony, związki nitrozowe) a różnymi RNOS. Zidentyfikowane zostaną produkty tych reakcji oraz zaproponowane prawdopodobne mechanizmy. Struktury powstałych rodników nitroksylowych zostaną potwierdzone dzięki chromatograficznemu porównaniu z komercyjnie dostępnymi wzorcami. Dodatkowo, określona zostanie selektywność wybranych „pułapek spinowych” względem poszczególnych RNOS. W kolejnym etapie zostaną określone oddziaływania pomiędzy rodnikami nitroksylowymi (produktami reakcji „pułapek spinowych” z RNOS) a wyselekcjonowanymi fluoroforami (dihydroksylowe pochodne kumaryny). W przypadku czysto fizycznych oddziaływań określony zostanie mechanizm wygaszania fluorescencji (jakościowo i ilościowo) oraz wyznaczone zostaną stałe szybkości gaszenia fluorescencji. W przypadku reakcji chemicznych określona zostanie ich kinetyka oraz prawdopodobne mechanizmy. Dodatkowo zidentyfikowane zostaną produkty tych reakcji, zaś stężenia eksperymentalne powstałych rodników nitroksylowych zostaną określone na podstawie przygotowanych krzywych kalibracyjnych. Ostatecznie, wprowadzenie wyselekcjonowanych „pułapek spinowych” do roztworu zawierającego różne RNOS, a następnie pomiar ilościowy powstałych rodników nitroksylowych (na podstawie ich oddziaływań z odpowiednią pochodną kumaryny) umożliwi precyzyjne ustalenie całkowitej zawartości tych indywidualów. Stężenia użytych do eksperymentu „pułapek spinowych” zostaną dobrane w taki sposób, by zagwarantować całkowite związanie RNOS (ich brak po reakcji z „pułapkami spinowymi” zostanie potwierdzony z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych sensorów fluorescencyjnych). Dodatkowo, zostaną zbadane oddziaływania pomiędzy badanymi kumarynami a związkami będącymi w warunkach biologicznych potencjalnymi interferentami. By ocenić użyteczność proponowanej metody pomiaru poziomu stresu oksydacyjnego w badaniach biologicznych, zostaną przeprowadzone odpowiednie badania z wykorzystaniem ekstraktów otrzymanych przez lizę komórek raka piersi (linia MCF-7) hodowanych w trzech wariantach: (i) normalnego stężenia tlenu, (ii) normalnego stężenia tlenu i poddanych ekspozycji na promieniowanie jonizujące, co wywołuje stres oksydacyjny oraz (iii) w warunkach hipoksji.

Realizacja projektu zapoczątkuje niewątpliwie badania nad poszukiwaniem nowych biosensorów, które jeszcze efektywniej niż wyselekcjonowane przez nas „pułapki spinowe” będą wiązały się z różnymi RNOS, a tym samym neutralizowały ich negatywne działanie. Wyniki uzyskane z jej zastosowaniem wykorzystane mogą zostać w badaniach biologicznych do identyfikacji w komórkach miejsc, w których stężenie reaktywnych form azotu i tlenu jest alarmująco wysokie, jak również do ustalenia granicznego stężenia RNOS, przy którym obserwowane są skutki wystąpienia stresu oksydacyjnego. W konsekwencji mogą one wpłynąć na rozwój metod diagnostyki i leczenia różnych schorzeń obejmujących m. in.: choroby układu naczyniowego, zaburzenia neurologiczne, zapalne choroby stawów czy choroby płuc. Zaprojektowana w ramach realizacji projektu metoda może znaleźć zastosowanie w szeroko pojętej biotechnologii, w diagnostyce medycznej, a w przyszłości także w przemyśle farmaceutycznym.