

Reaktywne formy tlenu (ROS), reaktywne formy azotu (RNS), a także inne rodzaje wolnych rodników mogą mieć szkodliwy wpływ na organizmy na poziomie komórkowym, jednakże ich wytwarzanie jest również fizjologicznym procesem niezbędnym dla wielu reakcji metabolicznych. Krew odgrywa szczególną rolę w mechanizmie stresu oksydacyjnego, gdyż usuwa szkodliwe produkty, w tym wiele czynników utleniających. Podstawą projektu jest zbadanie zmian wywołanych w erytrocytach, co jest nietypowym podejściem do zagadnienia stresu oksydacyjnego. Wcześniejsze badania w tym zakresie skupiały się głównie na innych frakcjach krwi, głównie krwinkach białych. Wiedza na temat zmian w erytrocytach jest znacznie uboższa, co uzasadnia potrzebę poszerzenia wiedzy podstawowej właśnie w tym zakresie. Informacja na temat markerów stresu oksydacyjnego zmierzonych *in situ* w erytrocytach może odzwierciedlać poziom stresu oksydacyjnego w krwi, jak również może stanowić potencjalny biomarker ogólnego poziomu stresu oksydacyjnego w organizmie, co byłoby niezwykle przydatne w badaniach nad progresją chorób cywilizacyjnych. Erytrocyty wykazują uszkodzenia oksydacyjne poprzez charakterystyczne zmiany w rozmiarze, kształcie i morfologii komórki, jak również zmiany biochemiczne, strukturalne i funkcjonalne. Wszystkie te parametry mają wpływ lub są związane ze zmianami w innych frakcji krwi i jej ogólnych właściwości, takich jak zwiększonej lepkości i zaburzenie przepływu.

Dlatego też, celem projektu jest kompleksowa ocena stresu oksydacyjnego na poziomie erytrocytów z wykorzystaniem innowacyjnej technologii. Zastosowanie kombinacji technik takich jak spektroskopii ramanowskiej (RS), spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni (FT-IR) oraz mikroskopii sił atomowych (AFM) wraz z uzupełnieniem o techniki referencyjne (UV-Vis, pomiary parametrów biochemicznych, barwienia, gazometria krwi, ektocytometria) dostarczy nowej wiedzy na temat biochemicznych, mechanicznych i funkcjonalnych markerów poziomu stresu oksydacyjnego w erytrocytach.

Badania można podzielić na trzy etapy:

1. **Charakterystyka indukowanego stresu oksydacyjnego *in situ* w izolowanych erytrocytach pobranych od zwierząt kontrolnych**, która umożliwi detekcję biochemicznych, mechanicznych i funkcjonalnych markerów dla zmian: hemoglobiny, lipidów i białek wewnątrz błony komórkowej erytrocytów, właściwości mechanicznych, takich jak sztywność i topografia komórki; właściwości funkcjonalnych, takich jak odkształcalność i agregacja oraz biochemicznych dla treści pęcherzyków wydzielniczych produkowanych przez erytrocyty.
2. **Definicja i opis możliwych biochemicznych, mechanicznych i funkcyjnych markerów stresu oksydacyjnego erytrocytów** dla typu induktora wywołującego uszkodzenie, rodzaju erytrocytów (izolowane od zdrowych myszy kontrolnych oraz od mysiego modelu stresu oksydacyjnego) oraz dla izolowanych erytrocytów *versus* erytrocytów w pełnej krwi.
3. **Badania RS/IR/AFM na wybranych markerach i ocena poziomu stresu oksydacyjnego *in vitro/ex vivo* dla erytrocytów pobranych od modeli mysich chorób cywilizacyjnych**, które współdzielą ścieżkę etiologiczną, w której stres oksydacyjny odgrywa ważną rolę, takich jak mysy model cukrzycy, miażdżycy czy przerzutowości nowotworowej.

Na podstawie danych literaturowych oraz naszych wstępnych wyników można wnioskować, że wykorzystanie w projekcie kombinacji technik spektroskopii ramanowskiej, IR i AFM, uzupełnionych o techniki referencyjne, umożliwi nie tylko jakościowo nowy opis poziomu stresu oksydacyjnego w erytrocytach, ale również może stanowić innowacyjny zestaw technik do jego łatwiejszej detekcji i opisu. Spektroskopia RS wykorzystuje zalety immersyjnej spektroskopii konfokalnej, jak również umożliwia na otrzymanie informacji dotyczących biochemicznych zmian w próbce na poziomie molekularnym. Spektroskopia IR, że nie tylko umożliwia wykrycie zmian jakościowych, ale również łatwe ilościowe oznaczenie wielu zmian biochemicznych. Obie techniki, mają ogromny potencjał diagnostyczny także w badaniach erytrocytów. AFM może dostarczyć informacji na temat mechanicznych markerów uszkodzenia komórek nawet z pojedynczego ogniwa zmian patologicznych, również w przypadku erytrocytów, co sprawia, że to obiecująca metoda w diagnostyce stresu oksydacyjnego. Co więcej, techniki te umożliwiają przeprowadzenie analizy na niewielkiej ilości krwi. Uzyskane dane komputerowe (zbiór widm, map i obrazów - Ramana/IR/AFM), które przechowują informacje molekularną, strukturalną, biochemiczną i mechaniczną, mogą być przechowywane do dalszej analizy.

Projekt bezpośrednio umożliwi na poszerzenie obecnej wiedzy dotyczącej zmian w erytrocytach na skutek stresu oksydacyjnego i stworzenie bardzo unikalnej grupy badawczej, która wykorzystuje nowe zastosowania technologii opartej na technikach spektroskopowych i obrazowania do analizy erytrocytów, jak również prezentuje nową koncepcję badania stresu oksydacyjnego. Otrzymane wyniki zostaną opublikowane w międzynarodowych czasopismach o wysokim czynnikiem wpływu, i prezentowane na konferencjach międzynarodowych i polskich. Dodatkowo projekt przyczyni się do stworzenia metodologii pomiaru poziomu stresu oksydacyjnego w erytrocytach opartej na innowacyjnej kombinacji technik IR /RS/AFM co może zostać użyte do badań modeli mysich chorób cywilizacyjnych.