

1. NAUKOWY CEL PROJEKTU

Tlenek azotu (NO) jest jedną z głównych cząsteczek przekaźnikowych, zaangażowanych w utrzymanie prawidłowej równowagi naczyniowej w układzie krwionośnym człowieka poprzez udział w obniżeniu ciśnienia krwi oraz rozkurczu mięśni gładkich. Działanie NO jest kontrolowane, między innymi, przez białka hemowe, które uczestniczą zarówno we wzmocnieniu, jak i osłabieniu działania rozkurczowego tlenku azotu. Znaczenie białek hemowych zależy od stanu utleniania jonu żelaza znajdującego się w ich pierścieniu porfirynowym – **białka ferrohewowe** (z jonem żelaza Fe^{2+}) **powodują wychwyt NO oraz w konsekwencji zablokowanie jego działania**, podczas gdy **białka ferrihewowe** (z jonem żelaza Fe^{3+}) **oddziałują z NO w sposób odwracalny umożliwiając jego dyfuzję oraz podtrzymując bioaktywność**. Jednakże dokładna rola białek ferrihewowych pozostaje niejasna, ponieważ żadna z aktualnie dostępnych metod badawczych nie umożliwia jednoczesnej detekcji, rozróżnienia i charakterystyki dystrybucji przestrzennej białek ferro- i ferrihewowych. Celem niniejszego projektu jest opracowanie **unikatowej metodologii obrazowania z wykorzystaniem rezonansowej spektroskopii ramanowskiej (rR)**, która pozwoli na **zbadanie nieodkrytych aspektów regulacji bioaktywności NO przez białka ferrihewowe oraz umożliwi lepsze zrozumienie mechanizmów regulujących przekazywanie NO w erytrocytach oraz ścianie naczyń**.

2. STOSOWANA METODOLOGIA

Metodologia projektu będzie specjalnie zaprojektowana w oparciu o obrazowanie rR z wykorzystaniem wzbudzenia o długości fali 405 nm (rezonansowe wzmocnienie sygnału od białek hemowych), wsparte obrazowaniem ramanowskim z wykorzystaniem wzbudzenia 532 nm (sygnał od lipidów oraz pozostałych białek w próbce) oraz pomiarami polaryzacyjnymi (zmiana płaszczyzny światła wzbudzającego w celu uzyskania dodatkowych informacji strukturalnych). To unikatowe połączenie pozwoli na **przewodzenie pomiarów w sposób nie wymagający dodatkowych znaczników oraz przygotowania próbki**, których **wyniki dostarczą informacji o obecności białek hemowych w próbce, ich rozróżnieniu na białka ferro- oraz ferrihewowe wraz z precyzyjną lokalizacją w badanym materiale**. Metodologia zostanie skorelowana w oparciu o uznane metody histologiczne oraz immunohistochemiczne. Wpływ białek ferrihewowych na przekazywanie NO zostanie dodatkowo sprawdzony z wykorzystaniem takich technik jak: spektroskopia absorpcyjna UV-Vis i EPR, ELISA oraz chemiluminescencja.

3. POWODY PODJĘCIA TEMATYKI BADAWCZEJ

Odkrycie, że nieznanym w latach 80 czynnikiem rozkurczającym pochodzenia śródbłonkowego (z ang. *endothelium-derived relaxing factor*, EDRF) jest tlenek azotu, okazało się sporym przełomem w medycynie układu krwionośnego. Główną wskazówką do tego odkrycia okazała się hemoglobina – białko hemowe, które w stanie utlenienia jonu żelaza Fe^{2+} jest zdolne nie tylko do odwracalnego wiązania tlenu, lecz także do wychwytu oraz blokowania bioaktywności NO. Jednakże, jak się później okazało, hemoglobina w stanie Fe^{3+} również oddziałuje z NO prowadząc do powstania nietrwałego kompleksu, umożliwiającego dyfuzję NO oraz podtrzymanie jego właściwości rozkurczowych. Dlatego też uznano, że białka ferrihewowe mogą odgrywać istotną rolę w fizjologii działając jako przekaźniki NO (np. w postaci kompleksu) lub jako produkty przejściowe w tworzeniu trwalszych połączeń (np. SNO-Hb). Ostatnie lata przyniosły również inne przykłady białek hemowych, takich jak α -globina oraz cytoglobina, w których stan utlenienia Fe^{3+} jest kluczowy w kontekście bioaktywności NO. Jednak pomimo intensywnych badań, **wciąż pozostaje niejasne, czy podtrzymanie bioaktywności NO w erytrocytach oraz ścianie naczyń zależy tylko od zapewnienia braku dostępnych białek ferrohewowych** (które wychwytyują i dezaktywują NO) czy też **kluczowa pozostaje obecność białek ferrihewowych** (które podtrzymują i wspierają działanie NO).

4. SPODZIEWANE EFEKTY

Realizacja projektu pozwoli na **zaprojektowanie unikatowej metodologii obrazowania rR do detekcji, rozróżnienia oraz charakterystyki dystrybucji przestrzennej białek ferro- i ferrihewowych**, co rzuci nowe światło na **istotność białek ferrihewowych w kontekście regulacji bioaktywności NO w układzie krwionośnym** oraz doprowadzi do **lepszego zrozumienia tego niezwykłego przymierza pomiędzy przekazywaniem NO a erytrocytami i ścianą naczyń**.