

Warszawa, 08.10.2014 r.

mgr inż. Katarzyna Jodko-Piórecka
Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
Pracownia Fizykochemicznych Podstaw Technologii Chemicznej

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

“Study on the role of catecholamines in the kinetics of lipid peroxidation”

(tytuł w języku polskim: „Badanie wpływu katecholamin na kinetykę peroksydacji lipidów”)

Promotor: dr hab. Grzegorz Litwinienko, prof. UW

Dopamina, adrenalina i noradrenalina - neuroprzekaźniki z grupy katecholamin, odgrywają kluczową rolę w przekazywaniu sygnału nerwowego w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Wyniki badań na liniach komórkowych wskazują, że związki te mogą również chronić komórki nerwowe przed szkodliwymi skutkami stresu oksydacyjnego, jednak mechanizm ich działania antyoksydacyjnego nie został dotąd opisany. Celem mojej rozprawy doktorskiej było ilościowe określenie właściwości antyoksydacyjnych wybranych katecholamin (dopaminy i jej prekursora - L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny, L-DOPA), w modelowych układach odwzorowujących układy biologiczne, tj. w środowisku wodnym oraz w układach heterogenicznych, zawierających zdyspergowane lipidy. Aby określić, w jakim stopniu aktywność antyoksydacyjna zależy od obecności ugrupowania katecholowego, badania dotyczące kinetyki i aktywności antyoksydacyjnej katecholamin uzupełniłam badaniami modelowych związków zawierających fragment katecholowy. Pomiary parametrów kinetycznych reakcji rodnikowych przeprowadziłam w trzech różnych układach modelowych: (i) w układzie homogenicznym zawierającym modelowy rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylo-hydrazylowy (**dpph[•]**), (ii) w układzie heterogenicznym składającym się z lipidu rozproszonego w micelach surfaktantu, (iii) w jednowarstwowych liposomach fosfolipidowych użytych jako model błony biologicznej.

Na podstawie pomiarów kinetycznych przeprowadzonych metodą zatrzymanego przepływu w serii rozpuszczalników organicznych (dla katecholi) i w roztworach woda / metanol o różnych pH (dla katecholamin) wykazałam, że wszystkie badane związki efektywnie redukują rodnik **dpph[•]**. Dotychczas zakładano, że reakcja między pochodnymi katecholu i wolnymi rodnikami przebiega według jednoetapowego mechanizmu przeniesienia atomu wodoru HAT (ang. *Hydrogen Atom Transfer*), jednak w mojej pracy doktorskiej zaobserwowałam, że szybkość reakcji pomiędzy katecholami / katecholaminami i rodnikiem **dpph[•]** rośnie wraz ze wzrastającym stopniem deprotonacji katecholowych grup hydroksylowych. Zjawisko to wyjaśniłam udziałem dwuetapowego mechanizmu SPLET (ang. *Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*) w reakcji neutralizowania rodnika **dpph[•]** przez badane związki.

Hipotezę o roli mechanizmu SPLET w reakcjach katecholi i katecholamin zweryfikowałam w układach heterogenicznych, określając wpływ 3,5-di-*tert*-butylokatecholu (DTBcat), dopaminy i L-DOPA na szybkość procesu peroksydacji linolanu metylu (MeLin) rozproszonego w micelach Tritonu X-100 (pomiaru przy pomocy elektrody tlenowej typu Clarka). Zdolność analizowanych

związków do zapobiegania utlenianiu lipidu określiłam w szerokim zakresie pH od 4,0 do 10,0 i porównałam z aktywnością 2,2,5,7,8-pentametylo-6-hydroksychromanu (PMHC) jako analogu α -tokoferolu. DTBcat i PMHC efektywnie hamują proces utleniania lipidów powodując pojawienie się okresu indukcji - DTBcat w pH 4,0 – 8,0, a PMHC w całym badanym zakresie pH. Aktywność obydwu substancji jest typowa dla antyoksydantów interwencyjnych, czyli związków hamujących proces utleniania lipidów dzięki bezpośredniej reakcji z rodnikami peroksyłowymi. Wyzaczyłam stałe szybkości reakcji PMHC i DTBcat z rodnikami peroksyłowymi (k_{inh}) dla całego badanego zakresu pH. Wzrost k_{inh} w miarę alkalizowania środowiska świadczy o udziale mechanizmu SPLET w procesie przerywania łańcucha peroksydacji. Badania zaprezentowane w mojej pracy doktorskiej są pierwszym eksperymentalnym dowodem na obecność ścieżki SPLET w układzie heterogenicznym. W pH 9,0 - 10,0 DTBcat traci właściwości antyoksydacyjne, co wytłumaczyłam procesem generowania anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) w reakcji anionorodników semichinonowych (powstających w reakcji DTBcat z rodnikami peroksyłowymi) z tlenem molekularnym.

Podczas utleniania linolanu metylu zdyspergowanego w wodzie za pomocą niejonowego surfaktantu (Tritonu X-100) w pH 4,0 – 7,0 dopamina i L-DOPA wykazują jedynie działanie retardacyjne (obniżają szybkość utleniania, lecz nie powodują okresu indukcji). Efekt retardacyjny jest spowodowany reakcją katecholamin z rodnikami inicjatora (obecnymi w fazie wodnej). Niezdolność katecholamin do zapobiegania procesowi utleniania lipidów wyjaśniłam zbyt słabym oddziaływaniem tych związków z micelami surfaktantu - DA i L-DOPA są obecne głównie w fazie wodnej. W pH 9,0 - 10,0 dopamina i L-DOPA przyspieszają peroksydację, działając jak prooksydanty, co (podobnie jak dla modelowego katecholu) wytłumaczyłam podatnością anionorodników semichinonowych (powstających w reakcji katecholamin z rodnikami inicjatora) na reakcję z tlenem molekularnym i generowaniem $O_2^{\bullet-}$. Reakcja anionorodników semichinonowych z tlenem przebiega bardzo wolno w fizjologicznym zakresie pH, jednak akumulacja $O_2^{\bullet-}$ może być szkodliwa i może tłumaczyć toksyczność wysokich stężeń katecholamin obserwowaną *in vitro*. Wobec tego, celowe jest neutralizowanie szkodliwych rodników semichinonowych, na przykład za pomocą innych wprowadzonych do układu związków o właściwościach antyoksydacyjnych.

W kolejnym etapie pracy doktorskiej badałam wpływ pH na aktywność antyoksydacyjną mieszanin antyoksydantów zawierających katecholaminy. Mieszanina PMHC z dopaminą lub z L-DOPA wykazuje szczególnie silny efekt synergistyczny (czyli wzmocnienie działania antyoksydacyjnego) w pH 7,0 – 8,0. Zaproponowałam mechanizm tego zjawiska, zgodnie z którym PMHC neutralizuje rodniki peroksyłowe a powstający rodnik fenoksyłowy PMHC jest regenerowany przez rodnik semichinonowy katecholaminy (regeneracja PMHC zachodzi na granicy faz woda / micela). W efekcie tej reakcji powstają produkty nierodnikowe: chinon katecholaminy i PMHC. Wynik ten może mieć znaczenie dla układów biologicznych, gdzie naturalnie obecne są mieszaniny antyoksydantów. Katecholaminy mogą zwiększać ochronę antyoksydacyjną układów zawierających nawet śladowe ilości α -tokoferolu a α -tokoferol może uczestniczyć w usuwaniu szkodliwych rodników semichinonowych ze środowiska komórkowego.

Brak aktywności antyoksydacyjnej dopaminy i L-DOPA w układzie micelarnym wyjaśniłam niewielkim powinowactwem tych katecholamin do miceli Tritonu X-100. Ponieważ w fizjologicznym pH obydwie katecholaminy mają dodatnio naładowaną grupę aminową, postawiłam hipotezę, że powinny one oddziaływać elektrostatycznie z błonami fosfolipidowymi.

Termodynamika tych oddziaływań nie została dotąd wyznaczona, dlatego stosując Różnicową Kalorymetrię Skaningową (DSC) zbadalam wpływ katecholamin na zachowanie termotropowe lipidów, a za pomocą Izotermicznego Miareczkowania Kalorymetrycznego (ITC) wyznaczyłam parametry termodynamiczne oddziaływania katecholamin z jednowarstwowymi liposomami utworzonymi przez neutralne i anionowe fosfolipidy (odpowiednio: 1,2-dimirystoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholinę, DMPC, oraz 1,2-dimirystoilo-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol, DMPG). Wykazałam, że stała wiązania dopaminy z błoną lipidową rośnie wraz ze wzrostem ładunku błony i osiąga wartość maksymalną dla liposomów utworzonych tylko przez DMPG. Efekt ten jest zgodny z wynikami badań DSC dotyczącymi przejść fazowych w liposomach (żel \leftrightarrow faza ciekłokrystaliczna). Na podstawie tych obserwacji zaproponowałam prosty model wiązania dopaminy z błonami fosfolipidowymi, w którym oddziaływania mają przede wszystkim charakter elektrostatyczny a dopamina wiąże się powierzchniowo z błoną, bez wnikania do hydrofobowego wnętrza dwuwarstwy. Wyniki moich badań mikrokalorymetrycznych są pierwszym ilościowym opisem oddziaływania dopaminy z błonami lipidowymi. Oddziaływanie to może mieć istotne konsekwencje biologiczne: związanie dopaminy z błoną neuronalną może wpływać na konformacje tkwiących w błonie receptorów (efekt anestetyczny), a także może zwiększać dostępność dopaminy dla białek błonowych. Ponadto, oddziaływanie z błonami lipidowymi może mieć kluczowe znaczenie dla aktywności antyoksydacyjnej dopaminy.

Wyniki badań mikrokalorymetrycznych wskazują, że dopamina oddziałuje z liposomami utworzonymi przez DMPC i DMPG w stosunku molowym 3:1 czyli o ładunku odpowiadającym ładunkowi membrany synaptycznej. W ostatnim etapie pracy zweryfikowałam zdolność dopaminy do zapobiegania procesowi utleniania MeLin zachodzącemu w błonie o takim składzie fosfolipidowym (jako związek odniesienia użyłam PMHC). Zarówno dopamina jak i PMHC okazały się efektywnymi antyoksydantami interwencyjnymi w układzie liposomalnym. Różnica w aktywności dopaminy w układzie micelarnym i w liposomach wskazuje na to, że właściwości antyoksydacyjne dopaminy zależą od oddziaływania ze środowiskiem, w którym zachodzi proces utleniania.

Różnice w aktywności dopaminy w trzech przebadanych przeze mnie układach modelowych (tj. w mieszaninie wody z metanolem, micelach Tritonu X-100 i liposomach DMPC / DMPG) wskazują, że kompletny obraz aktywności antyoksydacyjnej można uzyskać jedynie w wyniku badań przeprowadzonych w kilku komplementarnych układach modelowych, ponieważ aktywność antyoksydacyjna silnie zależy od środowiska reakcji. Dane otrzymane dla lipidów utlenianych w środowisku dwuwarstwy lipidowej są dobrym wyznacznikiem właściwości antyoksydacyjnych w układach biologicznych. Dane te są obiecujące i wskazują na potencjalną zdolność modelowej katecholaminy – dopaminy, do neutralizowania rodników peroksydowych w układach biologicznych.

Podsumowując, badania przedstawione w mojej rozprawie doktorskiej zaowocowały ilościowym opisem właściwości antyoksydacyjnych wybranych katecholamin (dopaminy i L-DOPA) w układach fizykochemicznie zbliżonych do układów biologicznych. Otrzymana w ramach projektu charakterystyka oddziaływania dopaminy z błonami lipidowymi umożliwiła powiązanie właściwości antyoksydacyjnych tego neuroprzekaźnika z siłą jego oddziaływania z mikrośrodowiskiem reakcji (błoną lipidową).