

Dominika Zając

**WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE
N-OLEINOILO-DOPAMINY, NOWEJ
LIPIDOWEJ POCHODNEJ DOPAMINY, Z
UWZGLĘDNIENIEM JEJ WPŁYWU NA
ODDYCHANIE U SZCZURÓW**

Rozprawa doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. Mieczysław Pokorski

Zakład Neurobiologii Oddychania
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Warszawa 2009

Powstanie niniejszej pracy nie byłoby możliwe bez pomocy wielu osób, którym niniejszym serdecznie dziękuję.

W szczególności chciałabym podziękować:

Panu Profesorowi Mieczysławowi Pokorskiemu za wskazanie pasjonującego tematu badawczego, nieskończoną cierpliwość, wyrozumiałość oraz wszechstronną pomoc.

Dziękuję Panu Profesorowi Zbigniewowi Czarnockiemu z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego za syntezy i dostarczanie badanego przez mnie związku.

Dziękuję Panu Doktorowi Zdzisławowi Matysiakowi z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za naukowe dyskusje pomocne w opracowywaniu tematu badań.

Rodzicom i Rodzeństwu za bezgraniczną cierpliwość i nieustające wsparcie,

oraz

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Neurobiologii Oddychania za pomoc i wspólnie spędzony czas.

*Badania były częściowo finansowane z grantu promotorskiego nr NN401 225834
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Warszawie*

Pozycje piśmiennictwa powstałe w oparciu o fragmenty niniejszej rozprawy:

- Pokorski M, Zajac D, Kapuscinski A, Matysiak Z, Czarnocki Z. Accumulation of radiolabelled N-oleoyl-dopamine in the rat carotid body. *Adv Exp Med Biol* 2006; 580:173-178.
- Zajac D, Matysiak Z, Czarnocki Z, Pokorski M. Membrane association of N-oleoyl-dopamine in the rat brain. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 4:403-408.
- Przegalinski E, Filip M, Zajac D, Pokorski M. N-oleoyl-dopamine increases locomotor activity in the rat. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19: 897-904.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	5
1.1. Właściwości biologiczne i chemiczne N-oleinoilo-dopaminy.....	5
1.2. Błony biologiczne i transport transbłonowy.....	8
1.3. Dopamina jako jeden z ważniejszych neuroprzekaźników.....	11
1.4. Podstawy regulacji oddychania.....	17
1.5. N-oleinoilo-dopamina jako nowa substancja łącząca cechy kwasu tłuszczowego i dopaminy.....	23
2. OGÓLNY CEL PRACY.....	24
3. METODYKA.....	26
3.1. <u>Przenikanie OLDA do mózgu szczura</u>	26
3.1.1. Wyznaczenie układu rozwijającego dla OLDA. Analiza próbek pod kątem OLDA z wykorzystaniem technik chromatografii cienkowarstwowej oraz spektrofotometrii UV/VIS.....	26
3.1.2. Wyznaczenie metody odzysku OLDA z frakcji lipidowej homogenatu mózgu szczura.....	27
3.1.3. Obecność OLDA we frakcji lipidowej homogenatu mózgu po podaniu dootrzewnowym.....	28
3.1.4. Otrzymywanie frakcji błonowej i cytozolowej homogenatu mózgu. Analiza próbek błonowych i cytozolowych pod kątem OLDA.....	28
3.1.5. Obecność OLDA we frakcji błonowej bądź cytozolowej homogenatu mózgu po podaniu dootrzewnowym; stabilność OLDA <i>in vivo</i>	29
3.2. <u>Stabilność OLDA <i>in vitro</i></u>	30
3.2.1. Stabilność dopaminy w zmodyfikowanym nieorganicznym buforze Krebsa w obecności i pod nieobecność warunków utleniających.....	30
3.2.2. Stabilność OLDA w nieorganicznym, zmodyfikowanym buforze Krebsa <i>in vitro</i> w obecności i pod nieobecność warunków utleniających	31
3.2.3. Stabilność OLDA we frakcji błonowej i cytozolowej homogenatu mózgu w obecności i pod nieobecność warunków utleniających.....	32

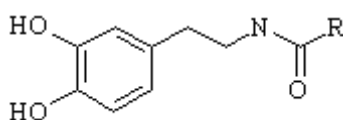
3.3.	<u>Możliwość O-metylacji OLDA w pozycji 3 za pośrednictwem katecholo-O-metylotransferazy (COMT)</u>	33
3.4.	<u>Wpływ OLDA na odpowiedź oddechową szczura na bodziec hipoksyjny</u>	34
3.4.1.	Przygotowanie zwierzęcia do doświadczenia.....	35
3.4.2.	Przebieg doświadczenia.....	36
3.4.3.	Analiza danych.....	37
4.	WYNIKI	38
4.1.	<u>Część biochemiczna</u>	38
4.1.1.	Przenikanie N-oleinoilo-dopaminy (OLDA) do tkanki nerwowej.....	38
4.1.2.	Stabilność OLDA w wybranych układach <i>in vitro</i>	43
4.1.3.	Możliwość O-metylacji OLDA za pośrednictwem katecholo-O-metylotransferazy (COMT) do N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopaminy (O-Me-OLDA).....	56
4.2.	<u>Część fizjologiczna</u>	60
4.2.1.	Wpływ OLDA na odpowiedź oddechową na hipoksję.....	61
4.2.2.	Wpływ OLDA na odpowiedź oddechową na hipoksję po podaniu haloperidolu (HAL).....	64
4.2.3.	Wpływ OLDA na odpowiedź oddechową na hipoksję po podaniu domperidonu (DOM).....	68
5.	DYSKUSJA	72
5.1.	Badania <i>in vitro</i>	73
5.2.	Badania <i>in vivo</i>	82
6.	KONKLUZJE	89
7.	STRESZCZENIE	90
8.	SPIS PIŚMIENNICTWA	97

1. WSTĘP

1.1. Właściwości biologiczne i chemiczne N-oleinoilo-dopaminy

N-acylo-dopaminy jako nowa klasa lipidowych pochodnych dopaminy

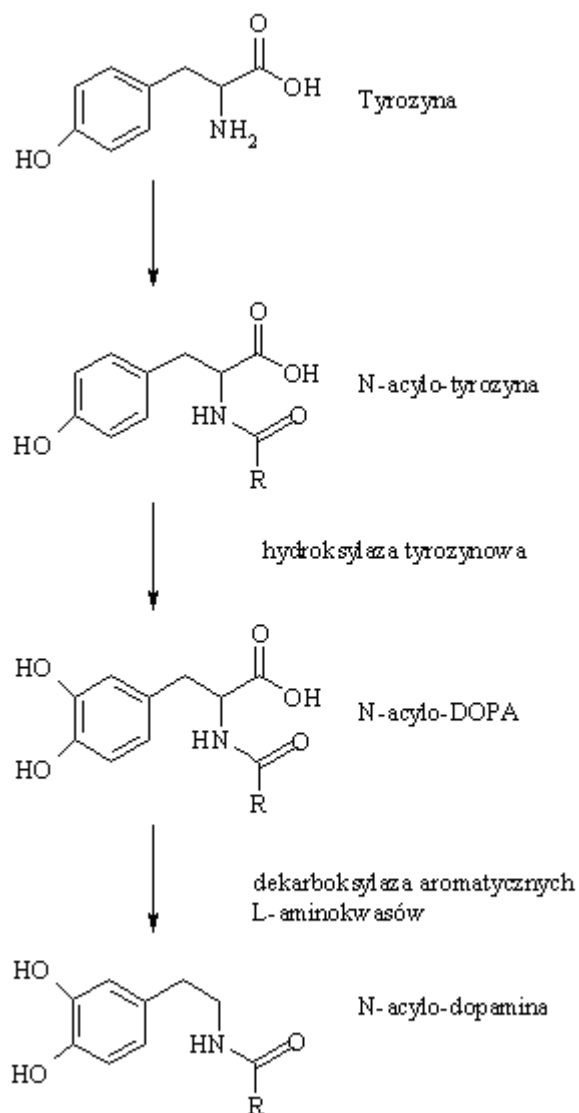
W skład N-acylo-dopamin wchodzi kwas tłuszczowy oraz dopamina. Te pierwsze są obecne w każdej komórce organizmu, gdzie pełnią zarówno funkcje budulcowe błon komórkowych, jak i w niektórych przypadkach energetyczne. Druga składowa, dopamina, jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych neuroprzekaźników układu nerwowego. W związku szeroką obecnością obu tych związków w organizmie pojawiło się w roku 1998 (1) pytanie o możliwość istnienia w ustroju amidów dopaminy i wyższych kwasów tłuszczowych, czyli N-acylo-dopamin. Związki te, o strukturze przedstawionej na Rys. 1.1.1. zostały w tym samym roku zsyntetyzowane równolegle przez dwa zespoły (2, 3), co umożliwiło poznanie ich podstawowych właściwości *in vitro*.



Rys 1.1.1. Struktura N-acylo-dopamin

Przełomem w badaniach nad N-acylo-dopaminami było wykrycie w 2003 czterech przedstawicieli tej grupy związków w mózgach ssaków (4). Związkami tymi są N-arachidonylo-dopamina (NADA), N-oleinoilo-dopamina (OLDA), N-stearnylo-dopamina (STERDA) i N-palmitynylo-dopamina (PALDA) (4). Wykazano, że N-acylo-dopaminy występują przede wszystkim w prążkowie oraz w istocie czarnej mózgu, zatem w regionach o wysokiej aktywności dopaminergicznej (4). Wskazuje to na możliwość

zblizonego do amin katecholowych szlaku syntezy. Zakłada się, że tyrozyna jest N-acylowana przez dany kwas tłuszczowy, by potem ulec hydroksylacji w pozycji 3 za pośrednictwem hydroksylazy tyrozynowej. Następnie ulega dekarboksylacji przez dekarboksylazę aromatycznych L-aminokwasów do odpowiednich N-acylo-dopamin (5). Proponowany szlak syntezy został przedstawiony na Rys. 1.1.2.

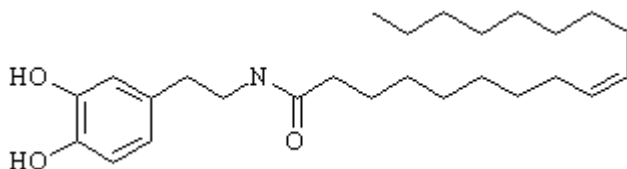


Rys 1.1.2. Schemat biosyntezy N-acylo-dopamin

Szlak związany z metabolizmem tej klasy związków nie jest do tej pory poznany, jednak przypuszcza się, że może być związany ze szlakiem metabolicznym dopaminy zakładającym zaangażowanie katecholo-O-metylotransferazy (COMT) i monoaminotransferazy (MAO). W przypadku N-acylo-dopamin szlak wymagający utlenienia grupy aminowej (MAO jako pierwszy enzym) nie jest możliwy, gdyż etap ten wiązałby się z uprzednią hydrolizą wiązania amidowego. Zatem jedyny teoretycznie możliwy szlak metabolizmu N-acylo-dopamin wiąże się z katecholo-O-metylo-transferazą i metylowaniem związków do pochodnych 3-O-metylo (4).

N-oleinoilo-dopamina (OLDA) jako szczególny przedstawiciel N-acylo-dopamin

Szczególnym przedstawicielem N-acylo-dopamin jest N-oleinoilo-dopamina, pochodna dopaminy i kwasu oleinowego. Jej akronimem jest OLDA, zaś pełna chemiczna nazwa N-[2-(3,4-dihydroksyfenylo)etylo]-9Z-oktadecenamid, potocznie zwanym „dopamidem oleinowym”. Jej struktura została przedstawiona na Rys. 1.1.3.



Rys 1.1.3. Struktura OLDA.

Sumaryczny wzór OLDA to $C_{26}H_{43}NO_3$. Jej masa molowa wynosi 417,62 g/mol. Występuje ona w postaci białego ciała stałego o strukturze igieł bądź kryształów. N-oleinoilo-dopamina jest rozpuszczalna w chloroformie, DMSO, etanolu i metanolu, przy czym jej roztwory w dwóch ostatnich rozpuszczalnikach są nietrwałe.

N-oleinoilo-dopamina jest dotąd słabo poznany związek. Z dotychczasowych prac wynika, że OLDA dobrze przenika przez barierę krew-mózg (6). Związek ten

wykazuje działanie dopamino-podobne działając pobudzająco na aktywność lokomotoryczną szczurów (7). Oddziałuje również z ośrodkowymi receptorami wanilloidowymi (TRPV1) (8). Receptory wanilloidowe są nieselektywnymi kanałami dla kationów. W wyniku ich aktywacji jony, głównie Ca^{2+} , które odgrywają wiodącą rolę w wielu kaskadach sygnałowych, napływają do wnętrza komórek (9). Receptory te są aktywowane przez specyficzne ligandy, mediatory stanu zapalnego, a także przez protony (niskie pH) oraz podwyższoną temperaturę. Pełnią rolę w przekazywaniu bólu (zwiększają intensywność doznań bólowych) oraz w odpowiedzi na stany zapalne. Inną właściwością OLDA, jako ligandu receptorów TRPV1, jest działanie kardioprotekcyjne w sytuacji uszkodzeń wynikających z reperfuzji po niedotlenieniu (10). Zaobserwowano również, że N-oleinoilo-dopamina hamuje syntezę DNA w komórkach Jurkat (linia nowotworowa limfocytów T). Ponadto, OLDA praktycznie całkowicie hamuje przejście komórek Jurkat do fazy S nie wykazując jednak działania cytotoksycznego, wykazuje więc działanie przeciwnowotworowe (11).

1.2. Błony biologiczne i transport transbłonowy

Właściwości błony biologicznej

Każda komórka oraz większość układów wewnątrzkomórkowych jest otoczona błoną plazmatyczną złożoną z lipidów, różnego rodzaju białek, takich jak, na przykład, kanały jonowe, enzymy, białka transportowe czy strukturalne. Same lipidy są układami złożonymi z hydrofobowej części kwasu tłuszczowego (część niepolarna układu – „ogonek”) i hydrofilowej „główki”. Błona lipidowa jest strukturą złożoną z dwóch „warstw”, przy czym za każdym razem ogon lipidowy jest skierowany do wewnątrz błony. Dzięki temu część hydrofilowa jest skierowana na zewnątrz układu. W skład lipidów

wchodzą fosfolipidy wpływające na ładunek i uporządkowanie błony, glikolipidy, sfingolipidy uczestniczące w komunikacji międzykomórkowej, sterole stabilizujące błony oraz wolne i zestryfikowane, nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe. Te ostatnie mogą zawierać od jednego do sześciu wiązań podwójnych przy dwunastu do dwudziestu czterech atomach węgla. Długość łańcucha oraz liczba wiązań wielokrotnych determinują właściwości biologiczne danego kwasu tłuszczowego (12, 13).

Kwasy tłuszczowe, szczególnie nienasycone, mogą ulec utlenieniu, np. poprzez reaktywne formy tlenu czy azotu, zaś każde takie uszkodzenie prowadzi do zmiany struktury błony, a co za tym idzie do zmiany jej właściwości, czyniąc ją np. bardziej przepuszczalną dla jonów wapnia. Podejrzewa się, że nadmierne utlenianie lipidów występuje w chorobach neurodegeneracyjnych (14).

Transport przez błony biologiczne

Transport przez błony biologiczne następuje na cztery sposoby w zależności od chemicznej natury transportowanej cząsteczki. Jest to: dyfuzja, transport bierny (przy współudziale nośnika, takiego jak kanał bądź białko transportowe, lecz bez nakładu energii), transport aktywny (wymagający nośnika i nakładu energii), a także układ egzo- i endocytozy (usuwanie/pobieranie cząsteczek za pośrednictwem pęcherzyków lipidowych). Niewielkie i niepolarne cząsteczki typu O_2 , N_2 , czy CO_2 , a także cząsteczki rozpuszczalne w lipidach przenikają przez błony na zasadzie dyfuzji. Transport oparty na zasadzie dyfuzji jest jednak ograniczony masą molową danej substancji (dla substancji hydrofilnych ok. 200 Da (15)) oraz jej rozpuszczalnością w lipidach wyrażoną za pomocą współczynnika podziału w układzie n-oktanol/woda. Przyjmuje się, że lipofilne cząsteczki o masie molowej do 700 Da są w stanie przeniknąć przez bariery biologiczne na zasadzie dyfuzji (16). Substancje hydrofilowe o masie powyżej 200 Da, lecz poniżej 600 Da mogą być

przenoszone przez wyspecjalizowane przenośniki (17). Jednak lipofilowość i masa molowa nie są jedynymi czynnikami warunkującymi przenikanie przez błony biologiczne. Wielu badaczy (17, 18, 19, 20) wskazuje również na znaczenie wiązań wodorowych i oddziaływań międzycząsteczkowych jako czynników odpowiedzialnych za przenikanie przez bariery biologiczne. Przyjmuje się jednak, że najważniejszą właściwością związku związaną z jego przenikaniem, jest jego lipofilowość.

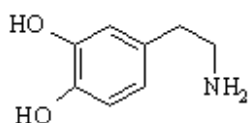
Większość amin biogennych, w tym amin katecholowych, ze względu na swoją polarność nie przenika przez błony biologiczne, o ile nie posiadają wyspecjalizowanego transportera. Jednak ze względu na neuroprzebieżnikowy charakter tych związków, muszą one być usunięte z przestrzeni synaptycznej zaraz po przekazaniu sygnału. Zajmują się tym transportery danego związku. Zazwyczaj są one związane kanałem jonowym i jako źródło napędu wykorzystują gradient elektrochemiczny. Niektóre z nich, w tym transporter dopaminy (DAT), biorą udział w regulacji wydzielania swojego ligandu (21).

W sytuacji, gdy nie ma możliwości bezpośredniego zastosowania danej substancji czynnej, czy to ze względu na jej niewielką biodostępność w danym sposobie podania, czy to ze względu na jej skutki uboczne poza układem docelowym, stosuje się tak zwane proleki (prodrugs). Są to pochodne substancji biologicznie czynnej, o niskiej aktywności własnej, uwalniające w pożądanym miejscu związek właściwy. Uwalnianie to może następować bądź to poprzez rozpad bądź przekształcenie proleku (22). Przykładem takiego proleku może być DOPA uwalniająca w mózgu dopaminę, a stosowana w zmniejszaniu objawów choroby Parkinsona.

1.3. Dopamina, jako jeden z ważniejszych neuroprzekaźników

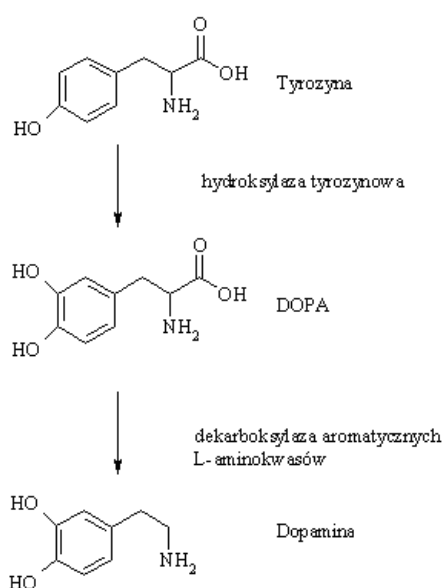
Właściwości chemiczne dopaminy

Dopamina jest jedną z amin katecholowych charakteryzujących się obecnością pierścienia aromatycznego podstawionego w pozycji 3' i 4' grupami hydroksylowymi. Jej pełna chemiczna nazwa to 4-(2-aminoetylo)benzeno-1,2-diol lub 3,4-dihydroksyfenyloetyloamina o strukturze pokazanej na Rys. 1.3.1.



Rys 1.3.1. Struktura dopaminy

Dopamina jest syntetyzowana na drodze przekształcenia L-tyrozyny za pomocą hydroksylazy tyrozyny w L-dihydroksyfenyloalaninę (L-DOPA). L-DOPA jest następnie dekarboksylowana za pośrednictwem dekarboksylazy aromatycznych L-aminokwasów do dopaminy. Jest również prekursorem noradrenaliny i adrenaliny (23). Szlak syntezy dopaminy jest przedstawiony na Rys. 1.3.2.



Rys. 1.3.2. Synteza dopaminy

Metabolizm dopaminy w ustroju zachodzi dwiema ścieżkami, prowadzącymi do tego samego produktu końcowego. Enzymami biorącymi udział w szlaku metabolicznym dopaminy są monoaminooksydaza (MAO) oraz katecholo-O-metylotransferaza (COMT). W zależności od enzymu działającego jako pierwszy, pierwszym produktem reakcji będzie kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy – DOPAC (MAO jako pierwszy enzym), bądź 3-metoksytyramina (3-O-metylo-dopamina), o ile pierwszym enzymem będzie COMT. Produktem końcowym w każdym przypadku (bez względu na kolejność działania enzymów) będzie kwas homowanilinowy (HVA).

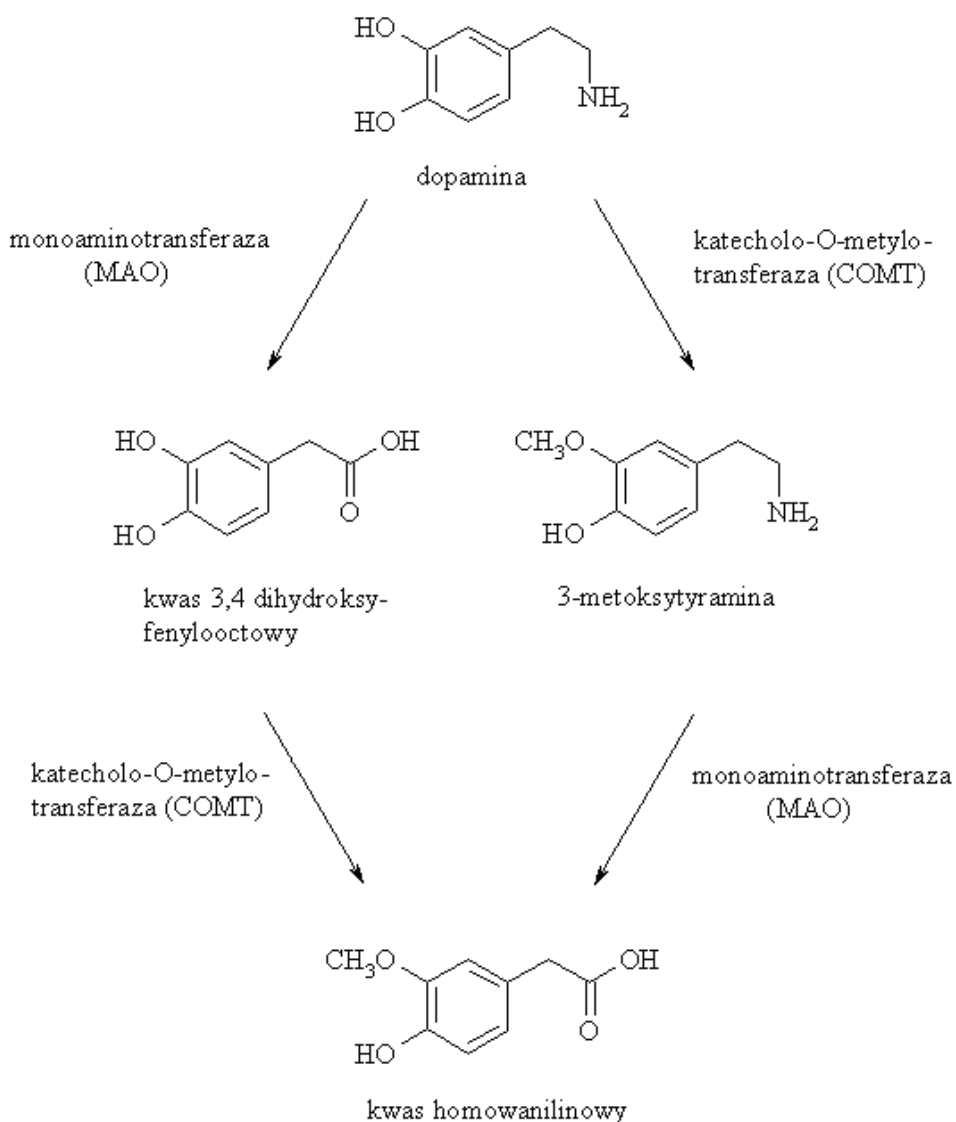
Katecholo-O-metylotransferaza (COMT, EC 2.1.1.6) jest enzymem katalizującym przeniesienie grupy metylowej z donora na grupę hydroksylową pierścienia katecholowego w pozycji 3. Występuje praktycznie w każdej tkance organizmu, przy czym jest spotykana w dwóch izoformach - błonowej i cytozolowej (24). Jej substratami są aminy katecholowe, ich pochodne oraz związki zawierające w swojej strukturze pierścienie katecholowe z wolnymi grupami hydroksylowymi. Donorem grupy metylowej jest S-adenozyno-L-metionina (SAM), zaś katalizatorem są jony magnezu. Inhibitorem reakcji są jony wapnia (25). Podczas reakcji powstaje odpowiednia O-metylo-pochodna aminy katecholowej oraz S-adenozyno-homocysteina (SAH), będąca jednocześnie inhibitorem reakcji (23, 25). Ścieżki rozkładu dopaminy przedstawiono na Rys. 1.3.3.

Substratami COMT są różne związki zawierające w swojej strukturze katechol, takie jak aminy katecholowe i ich pochodne (np. L-DOPA, stosowana w terapii choroby Parkinsona). Inhibitory COMT, takie jak entacapone, są wykorzystywane do zahamowania aktywności COMT poza mózgiem (26).

Drugim enzymem biorącym udział w metabolizmie dopaminy jest monoaminooksydaza. Występuje ona w dwóch formach MAO-A (działającej obwodowo) i

MAO-B (działającej ośrodkowo). Jej działanie polega na dezaminacji amin katecholowych.

Mimo obecności ściśle określonego metabolizmu dopaminy, w określonych warunkach, w tym w warunkach stresu oksydacyjnego, dochodzi do innych przemian dopaminy w ustroju – autooksydacji (27). Zgodnie z tym założeniem, dopamina jest przekształcana do chinonu najprawdopodobniej za pomocą oksydaz. Następnie chinon tworzy 5,6-dihydroksyindol, będącym monomerem neuromelaniny. Jej dokładna rola w układzie nerwowym nie jest znana, jednak wiadomo, że jest ona silnym chelatorem metali oraz, że bierze udział w procesach neurodegeneracji (28).



Rys 1.3.3. Metabolizm dopaminy *in vivo*

Dopamina nie jest substancją o znacznej stabilności. Jako neuroprzekaźnik ma ograniczony czas działania i co za tym idzie, również ograniczony czas półtrwania, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Wystawienie wodnego roztworu dopaminy na działanie światła słonecznego powoduje wytrącenie się czarnego osadu neuromelaniny (polimeru 5,6-dihydroksyindolu) (27). W warunkach *in vitro* trzygodzinna inkubacja roztworu dopaminy w Medium 199 (roztworze stosowanym w hodowlach komórkowych) w obecności tkanki przysadki powodowała spadek stężenia dopaminy o $\frac{1}{4}$, przy czym obecność przeciwutleniacza hamowała ten proces. W buforze Krebsa-Henseleita (o składzie zbliżonym do płynu wewnątrzkomórkowego) trzygodzinna inkubacja powodowała rozkład praktycznie całej dopaminy obecnej w układzie (29).

Właściwości biologiczne dopaminy

Dopamina jest ligandem 5 podtypów receptorów (D_{1-5}) podzielonych ze względu na oddziaływanie na wewnątrzkomórkowe efekторы na rodzinę D_1 (rec. D_1 , D_5) i rodzinę D_2 (D_2 , D_3 i D_4). Receptory dopaminowe są związane z białkami G, przy czym receptory D_1 i D_5 są pozytywnie sprzężone z cyklazą adenylanową, zaś D_{2-4} – negatywnie. Receptory dopaminowe modulują poziom jonów wapnia w komórce (receptory $D_{1,5}$, poprzez fosfolipazę C, zaś D_{2-4} poprzez oddziaływanie na błonowe kanały wapniowe). Ponadto receptory D_{2-4} zwiększają wydzielanie jonów potasu, co prowadzi do hiperpolaryzacji błony komórkowej (30). Przykładowymi agonistami receptorów dopaminowych są, oprócz samej dopaminy, również apomorfina, zaś antagonistami receptorów dopaminowych są przenikający przez barierę krew-mózg haloperidol i działający jedynie obwodowo domperidon (31, 32).

Dopamina jest jednym z głównych neuroprzekaźników występujących w organizmie. Receptory dopaminowe występują zarówno w obwodowym jak i w

ośrodkowym układzie nerwowym, przy czym jej działanie w obydwu układach jest od siebie oddzielone ze względu na nieprzenikanie przez barierę krew-mózg.

Jest odpowiedzialna, między innymi, za chemiczną regulację oddychania, działając w dwojaki sposób – ośrodkowo pobudzając, a obwodowo hamując odpowiedź oddechową (33, 34). Ponadto jest odpowiedzialna w OUN za regulację ciśnienia krwi, funkcje poznawcze (35), emocje, pobieranie pokarmu, pozytywne wzmocnienie, kontrolę napędu ruchowego, koordynację i napięcie mięśniowe (36) czy też za regulację hormonalną (30).

Receptory dopaminowe występują głównie w korze mózgowej, zwojach podstawy mózgu, ciele migdałowatym, śród- i tyłomózgowiu (w szczególności istocie czarnej, prążkowie i polu brzusznej nakrywki) tworząc cztery główne szlaki: nigro-striatalny (ruch i koordynacja), mezolimbiczny (układ nagrody, zachowania poznawcze, emocje), meзокortyczny (zachowania poznawcze) i guzkowo-lejkowy (regulacja hormonalna) (37). Zaburzenia w działaniu układu dopaminergicznego występują w chorobie Parkinsona, schizofrenii, ADHD oraz uzależnieniach.

Na poziomie obwodowego układu nerwowego dopamina zwiększa wydzielanie noradrenaliny w naczyniach krwionośnych, moduluje wydzielanie adrenaliny i noradrenaliny w nadnerczach, zwiększa filtrację i zmniejsza reabsorpcję sodu w nerkach. Poza tym zwiększa wydzielanie reniny (30).

Ponadto dopamina jest jednym z ważniejszych neuroprzekaźników zaangażowanych w chemiczną regulację oddychania zarówno na poziomie ośrodkowego, jak i obwodowego układu nerwowego, w szczególności kłębków szyjnych. W ośrodkowym układzie nerwowym dopamina występuje w strukturach wrażliwych na zmianę ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla oraz na pH zlokalizowanych w pniu mózgu (33). Ponadto stwierdzono jej obecność w neuronach nerwu zatokowego (odgałęzieniu nerwu językowo-gardłowego) (38), przekazującego informacje z obwodowych

chemoreceptorów, a prowadzącego do jądra pasma samotnego, gdzie następuje integracja sygnału z tych receptorów (39). Na poziomie kłębków szyjnych dopamina występuje w komórkach I typu. Dokładne działanie dopaminy w tym układzie nie jest do końca wyjaśnione. Wiadomo jednak, że hamuje ona odpowiedź na bodziec hipoksyjny (34), zaś zewnętrznie podawana powoduje spadek aktywności nerwu zatokowego (40), a co za tym idzie i wentylacji płucnej (41).

1.4. Podstawy regulacji oddychania

Oddychanie jest regulowane poprzez dwa niezależne od siebie mechanizmy związane z kontrolą dowolną oraz automatyczną. Układ kontroli dowolnej znajduje się w korze mózgowej, zaś automatycznej w rdzeniu przedłużonym. Tam też znajdują się neurony odpowiedzialne za generację ruchu oddechowego.

W regulację procesów oddychania są zaangażowane neurony leżące w rdzeniu przedłużonym oraz rdzeniu kręgowym. Neurony zlokalizowane w okolicy jądra pasma samotnego są neuronami wdechowymi, a ich zakończenia są związane z motoneuronami przeponowymi i międzyżebrowymi. Te neurony są również odpowiedzialne za integrację sygnałów docierających z nerwu błędnego i językowo-gardłowego. Znajdujące się w okolicy jądra dwuznacznego neurony są odpowiedzialne za generację ruchu oddechowego, zaś zlokalizowane w rejonie jądra przyśrodkowego okołoramiennego, za przełączanie pomiędzy wdechem a wydechem. Ponadto, wyróżnia się również neurony o projekcji do rdzenia kręgowego (43).

Sygnały przekazywane do nerwu błędnego, a następnie do pnia mózgu pochodzą między innymi z receptorów płucnych. Są one podzielone na kategorie:

- 1) wolno adaptujące mechanoreceptory (wrażliwe na rozciąganie płuc w czasie wdechu; ich pobudzenie prowadzi do zmian częstości i głębokości wdechu);

- 2) receptory szybko adaptujące się (podnabłonkowe, wrażliwe na bodźce chemiczne w drogach oddechowych, ich pobudzenie prowadzi do pobudzenia aktywności oddechowej, a także do ziewnięcia);
- 3) receptory okołokapilarne (wolne zakończenia w ścianie pęcherzyków płucnych wokół naczyń kapilarnych, ulegają pobudzeniu przy podrażnieniu płuc chemikaliami bądź obecnością płynu w płucach);
- 4) receptory oskrzelowe włókien aferentnych typu C. (42)

Chemiczna regulacja oddychania następuje zarówno na poziomie ośrodkowego, jak i obwodowego układu nerwowego. W mózgu występuje strefa wrażliwa na zmiany pH w płynie mózgowo-rdzeniowym, a także w płynie tkankowym mózgu, wywołane przez zmiany ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla. Strefa ta znajduje się na brzusznej powierzchni opuszki. Uważa się, że obszar chemowrażliwy odpowiada za ok. 70% napędu oddechowego wywołanego działaniem CO₂. Zwiększone ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla zwiększa wentylację celem usunięcia CO₂ i pobrania O₂ (42).

Do receptorów obwodowych zalicza się receptory aortalne oraz kłębki szyjne unerwione, odpowiednio, nerwem aortalnym i zatokowym. Oba typy receptorów są wrażliwe na zmiany ciśnienia parcjalnego tlenu, spadek pH czy też na podwyższenie ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla we krwi (42). W obwodowej regulacji oddychania, szczególnie pod wpływem bodźca hipoksyjnego, największą rolę pełnią kłębki szyjne.

Hipoksja jako jeden z bodźców pobudzających chemiczną regulację oddychania

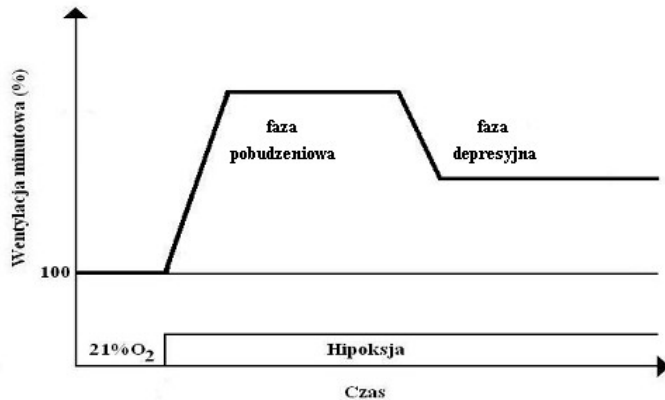
Mianem hipoksji określa się szeroko rozumiane stany niedoboru tlenu. W zależności od poziomu, na którym zaszło zaburzenie w dostawie tlenu wyróżnia się 4 rodzaje hipoksji:

- 1) hipoksję hipoksyjną, w której obserwuje się spadek ciśnienia parcjalnego we krwi na skutek niedostatecznej ilości tlenu we wdychanym powietrzu;
- 2) hipoksję krążeniową, w przypadku której PaO_2 jest normalne, zaś krew z różnych przyczyn nie utlenia tkanek;
- 3) hipoksję anemiczną związaną z niedostatecznym wiązaniem tlenu przez hemoglobinę krwi;
- 4) hipoksję histotoksyczną, podczas której prawidłowa ilość dostarczanego tlenu jest nieprawidłowo metabolizowana na poziomie komórkowym. (34)

W badaniach nad chemiczną regulacją oddychania stosowana jest hipoksja hipoksyjna, zwana dalej po prostu hipoksją. Bodziec hipoksyjny może mieć charakter „steady-state” lub o typie oddychania zwrotnego, czyli wdech powietrzem wydychanym ze stopniowo narastającym poziomem bodźca hipoksyjnego.

Odpowiedź oddechowa na bodziec hipoksyjny o typie „steady-state” jest dwufazowa: podczas pierwszej jej części, tak zwanej fazy pobudzeniowej, następuje wzrost aktywności oddechowej, nawet o 100% w stosunku do wentylacji początkowej, a następnie spadek objętości oddechowej utrzymujący się jednak powyżej wartości oddychania w normoksji (44, 45). Schemat odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny przedstawiono na Rys. 1.4.1.

Przyjmuje się, że za pierwszą, pobudzeniową fazę odpowiadają obwodowe chemoreceptory, jakimi są kłębki szyjne (46). W drugiej, późniejszej części odpowiedzi włączają się także ośrodkowe układy chemowrażliwe. Odpowiedź na hipoksję następuje w ciągu sekund od zaistnienia bodźca (47, 48).



Rys. 1.4.1. Odpowiedź oddechowa na bodziec hipoksyjny

Obecnie przyjmuje się dwa modele „czucia” tlenu na poziomie komórkowym: model mitochondrialny i model błonowy. Pierwszy zakłada zmiany w cyklu oddechowych pod wpływem zmniejszonej dostawy tlenu prowadzące do zmniejszenia syntezy ATP. Skutkuje to zwiększoną aktywnością kanałów potasowych, depolaryzacją błony komórkowej, napływem jonów wapnia i wyrzutem neuroprzekaźników. W tym miejscu model mitochondrialny zazębia się z modelem błonowym. Model ten również zakłada wyrzut neuroprzekaźników wywołany napływem wapnia przez kanały jonowe zależne od potencjału. Jednak sama zmiana potencjału błonowego jest zależna od kanałów potasowych. Przypuszcza się zatem, że strukturami wrażliwymi na zmiany ilości tlenu mogą być kanały potasowe (49).

Kłębki szyjne, jako najważniejsze obwodowe chemoreceptory

W generowaniu reakcji na bodziec hipoksyjny biorą udział głównie kłębki szyjne oraz kłębki aortalne. Przyjmuje się, że kłębki szyjne odpowiadają za ok. 90% odpowiedzi na hipoksję, zaś ich udział w procesie oddychania w warunkach normalnych wynosi ok. 10-20% (34). Same kłębki szyjne są niewielkimi organami o wadze u szczura ok. 0,06 mg. Są one zlokalizowane na rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej i silnie ukrwione za sprawą

licznych naczyń kapilarnych (50). Z tego powodu są one organami o największym przepływie krwi w całym organizmie – przepływ ten sięga 2000 ml/100 g tkanki/min (51). Kłębki szyjne są unerwione poprzez nerw zatokowy będący odgałęzieniem nerwu językowo-gardłowego, przy czym do kłębka szyjnego dochodzą również zakończenia pochodzące z nerwu błędnego. Sygnały pochodzące z kłębka szyjnego docierają do jądra pasma samotnego, a dalej do struktur ponadopuszkowych i brzusznej grupy neuronów w opuszce (34). Morfologicznie rzecz ujmując, kłębki szyjne składają się z dwóch typów komórek: komórek typu I i typu II. Komórki typu I są komórkami chemosensorycznymi, zaś komórki typu drugiego pełnią rolę podporową (47, 50). W komórkach typu I występują liczne ziarnistości zawierające neuroprzekaźniki, takie jak aminy katecholowe (w tym dopamina), acetylocholina, substancja P, czy enkefaliny, co wskazuje zaangażowanie wielu neuroprzekaźników i neuromodulatorów w przekaznictwo bodźca (50). Pobudzenie kłębków szyjnych przez bodziec hipoksyjny skutkuje zmianą potencjału błonowego i wydzielanie z pęcherzyków presynaptycznych neuroprzekaźników, które, już na poziomie nerwu, w zależności od swojego charakteru odpowiednio modulują jego aktywność (48).

Przyjmuje się, że kluczową rolę w transdukcji na poziomie kłębka szyjnego odgrywa dopamina (52). Jej zawartość waha się od 11,3 do 24,7 (średnio 17) pmol/parę kłębków (53). Przyjmuje się, że w większości przypadków hamuje ona odpowiedź na bodziec hipoksyjny (34), zaś zewnętrznie podawana powoduje spadek aktywności nerwu zatokowego (40), a co za tym idzie i wentylacji (41). Nie oznacza to jednak, że jest neuroprzekaźnikiem hamującym. Jednocześnie bowiem, jej wydzielanie jest wprost proporcjonalne do siły bodźca i aktywności nerwu zatokowego, zwiększając wentylację. Takie zachowanie jest charakterystyczne dla neuroprzekaźników pobudzających. Dopamina jest zatem kontrowersyjnym neuroprzekaźnikiem o niewyjaśnionej do końca charakterystyce (39). Warto podkreślić, że dopamina działając poprzez swoje receptory

moduluje potencjał błonowy, prowadząc do dalszego wyrzutu kolejnych neuroprzebieżników (30, 47). Dodatkowym, poza jej pobudzająco-hamującym charakterem, utrudnieniem w badaniach nad rolą dopaminy w przebieżnictwie na poziomie kłębków szyjnych jest bardzo krótki czas jej działania, zarówno naturalnie wydzielonej, jak i podanego egzogennie. Dzieje się tak ze względu na praktycznie równoczesną syntezę i rozkład dopaminy w komórkach odpowiednio pre- i postsynaptycznych (54).

1.5. N-oleinoilo-dopamina, jako nowa substancja łącząca cechy kwasu tłuszczowego i dopaminy

W literaturze jest wiele niejasności związanych z właściwościami biologicznymi N-oleinoilo-dopaminy. Brak jest doniesień na temat jej losów w ustroju, rozumianych jako stabilność czy metabolizm, choć skoro występuje endogennie, musi być syntetyzowana na konkretnej drodze, a także rozkładana. Nieznana jest jej dokładna rola fizjologiczna. OLDA jest również ciekawa ze względu na związki, z których jest zbudowana: kwas oleinowy i dopaminę. O ile właściwości biologiczne kwasu oleinowego są znane, o tyle za działaniem biologicznym dopaminy, szczególnie na poziomie jej roli w chemicznej regulacji oddychania, kryje się wiele pytań i wątpliwości. Dopamina wykazuje przeciwstawne działanie w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Ze względu na jej nieprzenikanie przez bariery biologiczne, a także szybki rozpad, badania są utrudnione. Wydaje się, że OLDA jako lipidowa pochodna dopaminy, powinna przenikać przez bariery biologiczne, a także, ze względu na obecność grupy amidowej, wykazywać zwiększoną w stosunku do cząsteczki-matki trwałość. Umożliwiłoby to jej zastosowanie w badaniach nad rolą dopaminy. Zastanawiająca jest możliwość oddziaływania OLDA na chemiczną regulację oddychania, czy wykazywałaby ona podobny do dopaminy wpływ na odpowiedź na bodziec hipoksyjny.

2. OGÓLNY CEL PRACY

Ogólnym celem pracy jest zbadanie biologicznych właściwości N-oleinoilo-dopaminy, związanych z przechodzeniem do tkanki nerwowej, stabilnością cząsteczki, możliwością jej O-metylacji za pośrednictwem katecholo-O-metylotransferazy oraz oddziaływaniem na chemiczną regulację oddychania, w której kluczową rolę odgrywa dopamina obecna w kłębkach szyjnych.

Cele szczegółowe są następujące:

IN VITRO

- **Czy N-oleinoilo-dopamina wbudowuje się w błony komórkowe?**
- **Jaka jest stabilność N-oleinoilo-dopaminy w warunkach imitujących płyn zewnątrzkomórkowy (w zmodyfikowanym buforze Krebsa), a także w zawiesinie błon komórek nerwowych w obecności i pod nieobecność warunków utleniających?**
- **Jaki jest wpływ jonów Ca^{2+} na stabilność cząsteczki N-oleinoilo-dopaminy?**
- **Czy N-oleinoilo-dopamina ulega reakcji O-metylacji w pozycji 3 za pośrednictwem katecholo-O-metylotransferazy?**

IN VIVO

- **Czy N-oleinoilo-dopamina przechodzi przez bariery biologiczne i wbudowuje się w układ błonowy mózgu szczura po podaniu dootrzewnowym?**
- **Czy N-oleinoilo-dopamina oddziałuje na oddychanie i na odpowiedzi oddechowe na hipoksję?**

- **Czy działanie N-oleinoilo-dopaminy na hipoksyjną wentylację płucną jest podobne do działania samej dopaminy, czy zachodzi ono za pośrednictwem układu dopaminergicznego?**
- **Zróźnicowanie między ośrodkowymi i obwodowymi, zachodzącymi przez komórki szyjne, efektami działania N-oleinoilo-dopaminy na chemiczną regulację oddychania poprzez stosowanie przechodzących i nieprzechodzących przez barierę krew-mózg antagonistów receptorów dopaminowych.**

3. METODYKA

Doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt zostały zaaprobowane przez Lokalną Komisję Etyczną do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

3.1. Przenikanie OLDA do mózgu szczura

3.1.1. Wyznaczenie układu rozwijającego dla OLDA. Analiza próbek pod kątem OLDA z wykorzystaniem technik chromatografii cienkowarstwowej oraz spektrofotometrii UV/VIS.

Pierwszym etapem tej części doświadczalnej było wyznaczenie układu rozwijającego, a także wizualizacji OLDA na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej Silica 60 F₂₅₄. Przyjęto układ rozwijający zawierający 95% CHCl₃ oraz 5% MeOH v/v. Wyznaczone techniki wizualizacji to światło ultrafioletowe o długości fali 254 i 365 nm oraz opary jodu.

W doświadczeniach z wykorzystaniem techniki chromatografii cienkowarstwowej jako techniki analitycznej, analizowane próbki zawieszano w 2 ml chloroformu. Następnie наносono po 0,05 ml roztworu na płytkę chromatograficzną Silica Gel 60 F₂₅₄ firmy Merck. Na jedną płytkę наносono maksymalnie 4 próbki, umieszczając na niej jednocześnie 0,025 ml roztworu OLDA o stężeniu 0,1 mg/ml po środku linii startowej jako standard. Płytkę rozwijano roztworem chloroform:metanol 95:5 v/v w wysyczonej uprzednio oparami mieszaniny rozwijającej szklanej komorze. Po pokonaniu przez rozpuszczalnik 90% płytki, usuwano ją z komory i suszono na powietrzu. Następnie uwidoczniono wynik rozdziału pod lampą UV (długość fali 254 i 365 nm) oraz w oparach jodu.

W doświadczeniach z wykorzystaniem spektrofotometrii UV/VIS jako techniki analitycznej, odpowiednio przygotowane i zatężone próbki analizowano

spektrofotometrycznie przy użyciu spektrofotometru UV/VIS Cintra 10e UV/VIS Spectrophotometer wyposażonego w oprogramowanie Spectral 1.70 (GBC Scientific Equipment Pty, Victoria, Australia). Próbkę pochodzącą z frakcji organicznej rozpuszczano w 0,20 ml chloroformu, zaś próbki pochodzące z frakcji wodnej w 0,20 ml metanolu i mieszano. Następnie próbki przenoszono do kwarcowych kuwet spektrofotometrycznych o drodze optycznej równej 1 mm i objętości 0,20 ml. Wykonywano widma UV/VIS badanej próbki w zakresie 190-1000 nm z próbkowaniem co 0,457 nm przy użyciu programu Spectral (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Victoria, Australia), a następnie przedstawiano je jako absorbcję w funkcji długości fali. Widma pochodzące z tego samego doświadczenia porównywano ze sobą. Do analizy wykorzystano program Microsoft Office oraz Origin.

3.1.2. Wyznaczenie metody odzysku OLDA z frakcji lipidowej homogenatu mózgu szczura

W kolejnym etapie określono możliwość wiązania się OLDA do homogenatu mózgu szczura oraz sprawdzono odzysk OLDA z roztworu lipidów mózgowych. W tym celu homogenizowano mózg pobrany uprzednio od szczura w 20 objętościach (v/m) mieszaniny chloroform:metanol 2:1 (v/v), dodano 6 mg OLDA (co odpowiada dawce 20 mg/kg przy założeniu masy szczura na poziomie 300 g) i pozostawiono na noc w lodówce. Następnie odsączono niehomogenizowane resztki i zatężono roztwór pod strumieniem azotu do objętości ok. 3 ml. Powstałą zawiesinę ekstrahowano dodając 2 ml wody i 1 ml chloroformu, intensywnie wytrząsano, a następnie rozdzielano fazy poprzez wirowanie (2000 x g, 4 min, 4°C). Do fazy wodnej dodawano następnie 2 ml chloroformu, zaś do fazy organicznej 2 ml wody, mieszano intensywnie i rozdzielano poprzez wirowanie. Czynności powtarzano 2-3 razy w zależności od tego, czy rozdzielone fazy były klarowne. Następnie zatężano próbki pod strumieniem azotu (faza organiczna) bądź na wirówce próżniowej

(faza wodna) i analizowano metodą chromatografii cienkowarstwowej na Silica Gelu 60 F₂₅₄ w układzie rozwijającym chloroform:metanol 95:5 v/v wobec OLDA jako standardu.

3.1.3. Obecność OLDA we frakcji lipidowej homogenatu mózgu po podaniu dootrzewnowym

W identyczny sposób postępowano w doświadczeniu właściwym, mającym na celu wyznaczenie przenikania OLDA do mózgu. Podano OLDA w dawce 20 mg/kg w DMSO szczurowi rasy Wistar. Szczur został po godzinie uśpiony. Wykonano perfuzję solą fizjologiczną przez lewą komorę serca i pobrano mózg. Dalsze postępowanie było identyczne jak podczas prób ślepych, z tą jednak różnicą, że nie dodawano już OLDA do powstałego homogenatu.

3.1.4. Otrzymywanie frakcji błonowej i cytozolowej homogenatu mózgu.

Analiza próbek błonowych i cytozolowych pod kątem OLDA.

Fracje błonową i cytozolową homogenatu mózgu szczura otrzymano zgodnie z przepisem podanym przez Xu i wsp. (55). Świeżo pobrany mózg szczura zważono, a następnie homogenizowano na lodzie w 5 objętościach (v/m) buforu izolacyjnego o składzie (w mmol/l): MgCl₂ x 6 H₂O 2,5; KHCO₃ 1; Tris x HCl 2; EDTA 3; benzamidyna 0,1; PMSF/EtOH 0,1 (dodane tuż przed użyciem). Niezhomogenizowane pozostałości zwirowano przy przeciążeniu 2000 x g, w temperaturze 4°C przez 10 min. Nadsącz (właściwy homogenat) przeniesiono do specjalnych probówek i wirowano w 40000 x g przez 15 min w temperaturze 4°C na ultrawirówce L7 Ultracentrifuge (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). Następnie pobrano nadsącz, umieszczono go w osobnym naczyniu, a osad zawieszono w 2 ml buforu izolacyjnego i ponownie wirowano. Czynności te powtórzono. Połączone nadsącze uznano za fazę cytozolową homogenatu mózgu

szczura, zaś osad, zawieszony w 1 ml buforu izolacyjnego, za frakcję błonową. Pomiedzy doświadczeniami próbki przechowywano w temperaturze -80°C.

Z analizowanych pod kątem OLDA próbek, zarówno frakcji błonowej jak i cytozolowej, strącano białka przy pomocy 0,1 ml 8% kwasu trichlorooctowego, zwirowano osad (2000 x g, 4 min, 4°C) i ekstrahowano OLDA 4 x 0,25 ml chloroformu. Fazę wodną zwirowano celem usunięcia resztek fazy organicznej w identycznych warunkach. Roztwory połączono w ramach danej fazy i próbki i zatężono pod azotem (faza organiczna) lub na wirówce próżniowej (faza wodna). Próbki analizowano metodami chromatografii cienkowarstwowej w podanych powyżej warunkach.

3.1.5. Obecność OLDA we frakcji błonowej bądź cytozolowej homogenatu mózgu po podaniu dootrzewnowym; stabilność OLDA *in vivo*

Na wstępie określono możliwość odzysku OLDA z frakcji błonowej i cytozolowej homogenatu mózgu szczura. W tym celu uzyskano w poniżej opisany sposób frakcję błonową i cytozolową mózgu, a następnie dodano do nich po 6 mg OLDA. Ilość ta odpowiada dawce 20 mg/kg u szczura. Następnie wyekstrahowano OLDA z obu frakcji w opisany poniżej sposób; uzyskane próbki poddano analizie metodą TLC.

W kolejnym doświadczeniu rozpuszczono OLDA w dawce 20 mg/kg w 0,3 ml DMSO, a następnie podano szczurowi rasy Wistar o wadze 290-300 g. Po upływie 1, 2, 3, bądź 24 h od podania uspiono szczura przy pomocy mieszaniny uretanu (70 mg/100 g) i α -chloralozy (12 mg/100 g), a następnie przeprowadzono perfuzję solą fizjologiczną przez lewą komorę serca i pobrano mózg. Otrzymano frakcje błonową oraz cytozolową zgodnie z podaną przez Xu i wsp. (55), a opisaną powyżej metodą. Uzyskane próbki analizowano w powyżej podany sposób (punkt 3.1.4.)

3.2. Stabilność OLDA *in vitro*

3.2.1. Stabilność dopaminy w zmodyfikowanym nieorganicznym buforze Krebsa w obecności i pod nieobecność warunków utleniających

Stabilność dopaminy w nieorganicznym, zmodyfikowanym buforze Krebsa *in vitro* pod nieobecność warunków utleniających

Świeżo przygotowany, zmodyfikowany bufor Krebsa o składzie (w mmol/l) NaCl 118,4; KCl 6; NaH₂PO₄ x 2 H₂O 0,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2,5 (dodawany po ustabilizowaniu się pH) wysycano 5% dwutlenkiem węgla w powietrzu przez ok. godzinę aż do uzyskania pH równego 7,4. Następnie dodawano chlorowodorek dopaminy w takiej ilości, by uzyskać roztwór 1 mmol/l. Po intensywnym mieszaniu pobierano próbkę początkową, a pozostałą mieszaninę umieszczano w cieplarni w temperaturze 36°C na mieszadle. Co 15 min pobierano próbkę o objętości 0,5 ml i natychmiast analizowano ją spektrofotometrycznie.

Stabilność dopaminy w nieorganicznym, zmodyfikowanym buforze Krebsa *in vitro* w obecności warunków utleniających

W przypadku wyznaczenia stabilności dopaminy w nieorganicznym buforze Krebsa w warunkach utleniających postępowano w identyczny sposób jak powyżej, jednak na samym początku reakcji dodawano do układu H₂O₂, tak by jego końcowe stężenie wynosiło 5% (56). Dalej postępowano z próbkami w identyczny sposób jak opisano to powyżej.

3.2.2. Stabilność OLDA w nieorganicznym, zmodyfikowanym buforze Krebsa *in vitro* w obecności i pod nieobecność warunków utleniających

Wszystkie doświadczenia mające na celu określenie stabilności OLDA w układzie *in vitro* miały podobny przebieg. Ponadto w każdym doświadczeniu stężenie pracujące OLDA wynosiło 1 mmol/l. Wybór takiego stężenia wynikał z wykonanej krzywej kalibracyjnej (absorbancja w funkcji stężenia); przy tym stężeniu absorbancja w maksimum wynosiła ok. 1, co jest wartością optymalną.

Równoległe do każdego doświadczenia wykonywano w identyczny sposób doświadczenie kontrolne. Jediną różnicą był brak OLDA w roztworze.

Stabilność OLDA w buforze Krebsa pod nieobecność warunków utleniających

Świeżo przygotowany, zmodyfikowany bufor Krebsa o składzie (w mmol/l) NaCl 118,4; KCl 6; NaH₂PO₄ x 2 H₂O 0,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2,5 (dodawany po ustabilizowaniu się pH; chlorek wapnia był dodawany tylko w doświadczeniach, w których jony wapnia były niezbędne; w badaniach nad stabilnością OLDA w buforze Krebsa pod nieobecność jonów wapnia, składnik ten był pomijany) wysycano 5% dwutlenkiem węgla w powietrzu do uzyskania pH równego 7,4. Następnie zawieszano OLDA w 2-3 kroplach Tween80 i uzupełniano do takiej objętości, by roztworem badanym był roztwór 1 mmol/l, i umożliwiały wykonanie zadanej liczby pomiarów. Po 10 min silnego mieszania (do uzyskania jednolitego roztworu) pobierano próbkę początkową, a pozostałą mieszaninę umieszczano w cieplarni w temperaturze 36°C na mieszadle. Po zadany czasie pobierano kolejne próbki. Próbkę o objętości 0,5 ml ekstrahowano 4 x 0,25 ml chloroformu, łączono fazy organiczne w ramach danej próbki i zatężano pod strumieniem azotu. Fazę wodną zwirowywano (2000 x g, 5 min, 4°C) w celu usunięcia pozostałości fazy organicznej, a następnie zatężano w wirówce próżniowej. W identyczny sposób postępowano ze wszystkimi próbkami pobranymi w przedziale czasowym 0-8 godz.

Stabilność OLDA w buforze Krebsa w obecności warunków utleniających

Doświadczenia tej części projektu badawczego wykonywano w identyczny sposób jak opisano to powyżej. Jediną różnicą było dodanie do buforu Krebsa, przed zawieszeniem w OLDA, nadtlenu wodoru, tak by końcowe jego stężenie wynosiło 5% (56).

3.2.3. Stabilność OLDA we frakcji błonowej i cytozolowej homogenatu mózgu w obecności i pod nieobecność warunków utleniających

Fracje błonową i cytozolową homogenatu mózgu szczura przygotowano zgodnie z opisem podanym w punkcie 3.1.4.

Stabilność OLDA we frakcji błonowej i cytozolowej homogenatu mózgu szczura pod nieobecność warunków utleniających

Zarówno z frakcją błonową jak i frakcją cytozolową postępowano w identyczny sposób. OLDA zawieszano w 2-3 kroplach Tween80 i uzupełniano zawiesiną błon bądź cytozolu w buforze Krebsa (błony) bądź izolacyjnym (cytozol), w zależności od doświadczenia z dodatkiem bądź bez jonów wapnia o stężeniu 2,5 mmol/l, do takiej objętości, by roztworem badanym był roztwór 1 mmol/l względem OLDA, i umożliwiła wykonanie zadanej liczby pomiarów. Po 10 min silnego mieszania (do uzyskania jednolitego roztworu) pobierano próbkę początkową, a pozostałą mieszaninę umieszczano w cieplarni w temperaturze 36°C na mieszadle; kolejne próbki pobierano w zadanych odstępach czasowych. Próbkę oczyszczano i analizowano zgodnie z procedurą podaną w punkcie 3.1.4.

Stabilność OLDA we frakcji błonowej homogenatu mózgu szczura w obecności warunków utleniających

Stabilność OLDA w uprzednio utlenionej frakcji błonowej homogenatu mózgu szczura

Przygotowane zgodnie z powyżej opisanym przepisem błony zawieszono w buforze izolacyjnym i utleniano przez godzinę w obecności 5% nadtlenu wodoru (55). Następnie odwirowywano nadsącz przy 40000 x g, przez 15 min, w 4°C. Osad zawieszano w buforze izolacyjnym i oznaczano mianem utlenionych błon. Dalsze postępowanie było identyczne jak w poprzednio opisanym doświadczeniu.

Stabilność OLDA w błonach po inkubacji OLDA z błonami na godzinę przed wystąpieniem warunków utleniających

Doświadczenie przeprowadzono w podobny sposób jak w doświadczeniach nad stabilnością OLDA w zawieszynie błon pod nieobecność warunków utleniających. Przygotowaną zawieszinę błon wzbogacano zawiesziną OLDA w Tween80 do stężenia pracującego 1 mmol/l, mieszano intensywnie przez 10 min aż do uzyskania jednolitej zawiesziny. Następnie inkubowano OLDA w błonach w temperaturze 36°C przy jednoczesnym intensywnym mieszaniu. Po godzinie dodano nadtlenu wodoru do stężenia 5% i rozpoczęto reakcję. Dalej postępowano identycznie jak w powyżej opisanych doświadczeniach.

3.3. Możliwość O-metylacji OLDA w pozycji 3 za pośrednictwem katecholo-O-metylotransferazy (COMT)

Przygotowano 3 równoległe próbki: kontrolę „zerową” (zawierającą wszystkie reagenty, analizowaną natychmiast po rozpoczęciu reakcji), kontrolę „właściwą” (zawierającą wszystkie reagenty za wyjątkiem enzymu COMT, analizowaną po upływie zaplanowanego czasu reakcji) i próbkę właściwą (zawierającą wszystkie reagenty,

analizowaną po upływie zaplanowanego czasu reakcji). Na początku przygotowano bufor bazowy zawierający PBS o pH 8 i 10 mM Mg²⁺. Bufor służył do rozpuszczania i rozcieńczenia pozostałych składników.

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w objętości 0,5 ml. Na tę objętość odważono 0,5 mg katecholo-O-metylotransferazy (o aktywności 1,107 μmol substratu/godz.), 0,865 mg (1,107 μmol) S-adenozylu-L-metioniny (SAM) i 0,463 mg (1,107 μmol) OLDA. SAM rozpuszczono w 0,1 ml buforu bazowego, COMT w 0,1 ml 1% roztworu albuminy w buforze bazowym, zaś OLDA w 1 kropli Tween80, a następnie 0,1 ml buforu bazowego. Roztwory połączono i uzupełniono buforem bazowym do objętości 0,5 ml. W kontroli „właściwej”, roztwór COMT zastąpiono 0,1 ml buforu bazowego. Próbkę, prócz kontroli „zerowej”, pozostawiono w cieplarni w temperaturze 37°C przez 75 min. Następnie wirowano je przez 10 min przy 1200 x g w 4°C, odrzucono osad, a nadsącz ekstrahowano 4 x 0,25 ml chloroformu uzyskując frakcję organiczną. Ekstrakty połączono w obrębie tej samej próbki, zatężono je pod strumieniem azotu i rozpuszczono w 0,2 ml chloroformu. Frakcje wodne ponownie odwirowano w tych samych warunkach. Obie frakcje analizowano spektrofotometrycznie natychmiast po ich uzyskaniu. Kontrolę „zerową” przygotowano w identyczny sposób, pominięto jednak inkubację.

3.4. Wpływ OLDA na odpowiedź oddechową szczura na bodziec hipoksyjny

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w podobny sposób; różniły się między sobą obecnością bądź nieobecnością dodatkowego cyklu związanego z podaniem antagonisty i rejestracją odpowiedzi oddechowej po podaniu. Doświadczenia wykonano na 36 szczurach. Zwierzęta zostały podzielone na trzy grupy doświadczalne, różniące się między sobą zestawem podanych środków farmakologicznych. W grupie, w której badano wpływ samej OLDA na odpowiedzi oddechowe na hipoksję umieszczono 8 szczurów. W

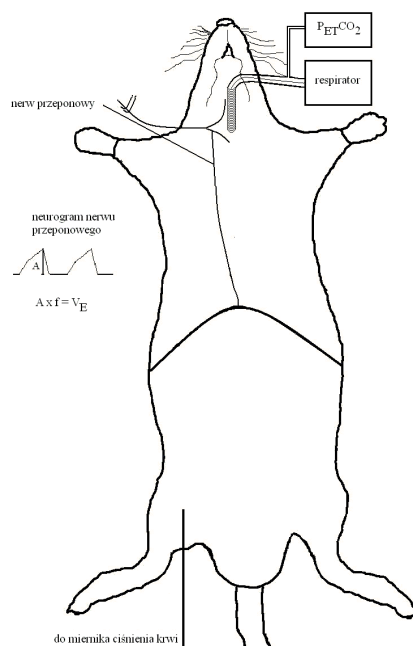
grupie, w której efekty OLDA były badane po podaniu haloperidolu (HAL), antagonisty receptorów dopaminowych przenikającego przez barierę krew-mózg, było 10, a w grupie po podaniu domperidonu (DOM), antagonisty nieprzenikającego przez barierę, 18 zwierząt.

3.4.1. Przygotowanie zwierzęcia do doświadczenia

Szczury rasy Wistar ważące 290-310 g usypiano mieszaniną uretanu (70 mg/100 g) i α -chloralozy (12 mg/100 g). Wykonano tracheostomię oraz kaniulowano obie tętnice (do pomiaru ciśnienia krwi oraz do pobierania krwi) i jedną z żył udowych (do podawania dożylnie leków). Następnie zwiotczano mięśnie oddechowe bromkiem pipekuronium (Arduan, Genedon, Węgry), i zwierzęta poddano ciągłej sztucznej wentylacji. Kolejnym etapem było przecięcie nerwów błędnych i wypreparowanie oraz nałożenie na elektrodę nerwu przeponowego. Aktywność nerwu przeponowego była filtrowana, wzmacniana i integrowana za pomocą systemu NeuroLog System (Digitimer, Welwyn Garden, Wielka Brytania). Podczas całego doświadczenia kontrolowano ciśnienie krwi (za pomocą miernika ciśnienia krwi MCK-4011S firmy Temed), a także, przed i po epizodzie hipoksyjnym, ciśnienie parcjalne tlenu (PaO_2), dwutlenku węgla (PaCO_2) i pH. Wartości te były mierzone przy pomocy analizatora AVL Compact 2 Blood Gas Assembly (Roche Diagnostics, Graz, Austria) i regulowane w zależności od potrzeb zmianami wymuszonej wentylacji. Ponadto, utrzymywano temperaturę ciała zwierzęcia na poziomie 37-38°C. Schemat przygotowanego do doświadczenia zwierzęcia przedstawia Rys.3.4.1.

W sposób ciągły rejestrowano ciśnienie krwi, a także aktywność nerwu przeponowego uzyskując neurogram nerwu przeponowego. Przedmiotem analizy była amplituda oraz częstość zintegrowanej aktywności nerwu przeponowego. Średnie ciśnienie krwi tętnicznej (RR) wyliczano ze wzoru:

$$\text{RR} = \text{ciśnienie rozkurczowe} + 1/3 (\text{ciśnienie skurczowe} - \text{ciśnienie rozkurczowe}).$$



Rys. 3.4.1. Schemat ilustrujący przygotowanie zwierzęcia do doświadczenia

3.4.2. Przebieg doświadczenia

Po ustabilizowaniu się aktywności nerwu przeponowego mierzono parametry gazometryczne. Następnie w sposób losowy podawano bodziec hipoksyjny w postaci mieszanki 11 bądź 14% tlenu w azocie. Długość podawania bodźca zależała od kondycji zwierzęcia i nie przekraczała nigdy 3 min. Pod koniec trwania bodźca, lecz jeszcze w trakcie podawania mieszanki, pobierano krew do analizy gazometrycznej. Następnie, po 20 min oddychania powietrzem atmosferycznym, podawano w identyczny sposób drugi bodziec hipoksyjny. Kolejnym etapem doświadczenia było podanie antagonisty receptorów dopaminowych: haloperidolu (HAL), w dawce 0,3 mg/kg iv, bądź domperidonu (DOM) w dawce 3 mg/kg ip.

Po 20 min od iniekcji, ponownie podawano losowo bodziec hipoksyjny i postępowano dokładnie tak samo jak w rejestracjach kontrolnych. Następnie podawano N-oleinoilo-dopaminę (OLDA) w dawce 20 mg/kg ip. i po 20 min rejestrowano odpowiedzi

na oba bodźce hipoksyjne podane w opisany uprzednio sposób. Doświadczenie kończono przez uśmiercenie zwierzęcia przy pomocy letalnej dawki narkozy.

W przypadku doświadczeń mających na celu zbadanie wpływu OLDA na odpowiedź oddechową na bodziec hipoksyjny bez zablokowania receptorów dopaminowych D₂, pomijano cykl zawierający podanie antagonisty.

3.4.3. Analiza danych

Z neurogramu nerwu przeponowego wyznaczano częstość cykli oddechowych/min oraz amplitudę wdechu (odpowiadającą komponente objętościowej wentylacji). Na podstawie ich iloczynu obliczano ekwiwalent wentylacji minutowej, którą następnie przedstawiono w formie wartości względnych w stosunku do wartości wentylacji uzyskanych przed podaniem bodźca hipoksyjnego, przyjmując wartość wyjściową (przed podaniem bodźca) za 100%. Wyniki zostały przedstawione jako ekwiwalent wentylacji minutowej w funkcji czasu od momentu wystąpienia bodźca hipoksyjnego. W identycznej formie przedstawiono komponentę częstotliwościową i objętościową. Pomiary wykonywano w odstępach 20 sek. Wszystkie uzyskane dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SE.

Ze względu na stosunkowo niewielką, pod względem statystycznym, liczbę próbek, do porównań przebiegów odpowiedzi oddechowej zastosowano metody nieparametryczne. Porównań pomiędzy poszczególnymi punktami (w tym pomiędzy maksymalnymi odpowiedziami) w ramach trzech przebiegów dokonano za pomocą nieparametrycznej analizy wariancji Friedmana; poszczególne punkty doświadczalne (w tym maksymalne odpowiedzi) w obrębie dwóch przebiegów porównywano za pomocą testu Wilcozona. Porównania w obrębie danego przebiegu wykonano za pomocą nieparametrycznej analizy wariancji Friedmana. Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 5.0.

4. WYNIKI

4.1. CZĘŚĆ BIOCHEMICZNA

4.1.1. PRZENIKANIE N-OLEINOILO-DOPAMINY (OLDA) DO TKANKI NERWOWEJ SZCZURA

4.1.1.1. Wyznaczenie warunków doświadczalnych do analizy za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC oraz spektrofotometrii UV/VIS

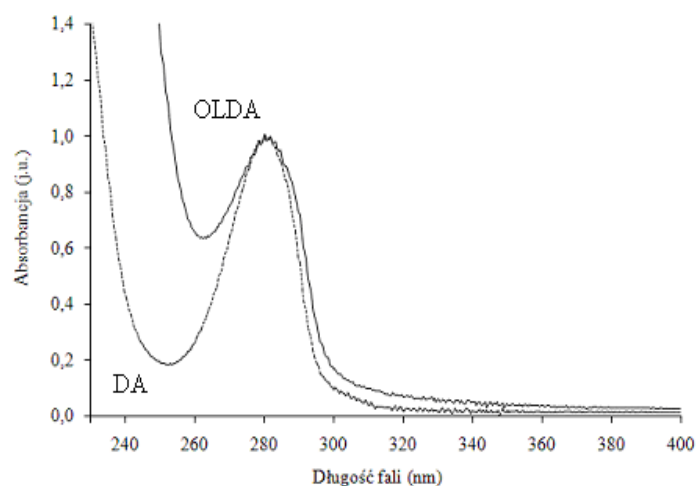
Przed przystąpieniem do badań nad właściwościami N-oleinoilo-dopaminy (OLDA) opracowałam metody analizy uzyskanych przeze mnie wyników. Stosowałam techniki chromatografii cienkowarstwowej TLC oraz spektrofotometrii UV/VIS.

Chromatografia cienkowarstwowa TLC

Wyzaczyłam układ rozwijający o takim charakterze, by współczynnik retencji OLDA mieścił się w granicach 0,2-0,8, a współczynniki retencji poszczególnych lipidów uzyskanych z homogenatu mózgu były różne od współczynnika retencji OLDA. Układem spełniającym te kryteria był układ chloroform:metanol 95:5 (v/v). Wybranymi przeze mnie technikami wizualizacji były opary jodu oraz światło ultrafioletowe o długości fali 254 i 365 nm. Wybarwione płytki były natychmiast fotografowane i archiwizowane.

Spektroskopia UV/VIS

Wykonałam widmo OLDA w chloroformie, a także widmo chlorowodoru dopaminy w wodzie. OLDA wykazuje absorbancję w zakresie ultrafioletu: maksimum absorbancji występuje przy 278-282 nm, minimum zaś występuje przy 262 nm. Dopamina (DA) wykazuje maksimum w zakresie 278-282 nm, a minimum przy 252 nm. Widma OLDA i chlorowodoru dopaminy przedstawiłam na Rys. 4.1.1.1.



Rys. 4.1.1.1. Widmo OLDA (linia ciągła) oraz chlorowodoru dopaminy (DA) (linia przerywana) (liczba niezależnych doświadczeń=3).

4.1.1.2. Odzysk OLDA z mieszaniny lipidów *in vitro*

W kolejnym etapie doświadczeń określiłam odzysk OLDA z mieszaniny lipidów występujących w homogenacie mózgu szczura. Procedury doświadczalne opisałam w rozdziale „Metodyka” - podpunkt 3.1.2.

Znaczny rozmiar „plamek” widocznych w miejscach naniesienia próbek bądź standardu wynika z właściwości chloroformu. Rozpuszczalnik ten ma tendencję do „rozlewania się” w miejscu naniesienia na płytkę chromatograficzną. Uzyskanie mniejszych „plamek” jest praktycznie niemożliwe.

W mieszaninie lipidów homogenatu mózgu szczura stwierdziłam obecność 7 frakcji lipidowych o współczynnikach retencji równych 0; 0,07; 0,37; 0,47; 0,59; 0,66; 0,77. W mieszaninie lipidów wzbogacanej OLDA wykryłam 8 frakcji lipidowych o współczynnikach retencji (R_f) równych 0; 0,07; 0,20; 0,37; 0,47; 0,59; 0,66; 0,77. Jedna z frakcji ($R_f=0,20$), nieobecna w pierwotnej mieszaninie lipidów, odpowiadała standardowi OLDA. Oznacza to, że:

- a) W mieszaninie lipidów pochodzących z homogenatu mózgu szczura nie ma substancji o współczynniku retencji równym bądź zbliżonym do współczynnika retencji OLDA;

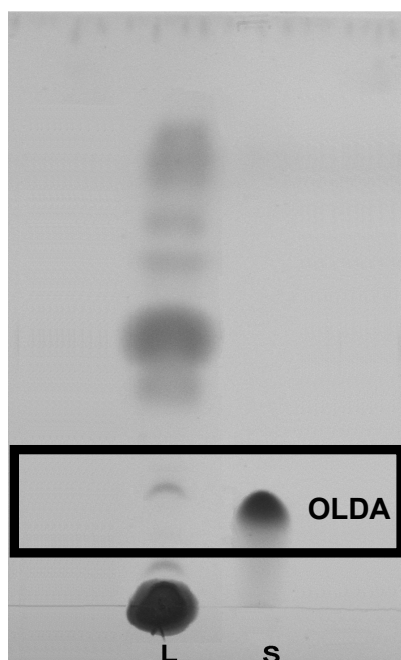
- b) Dodana do roztworu lipidów OLDA jest odzyskiwana w ilościach umożliwiającym przeprowadzenie chromatografii cienkowarstwowej.

Na podstawie tych obserwacji uznałam zaproponowaną przeze mnie metodę odzyskiwania OLDA z układu lipidowego za poprawną.

4.1.1.3. Przenikanie OLDA do frakcji lipidowej homogenatu mózgu szczura po podaniu dootrzewnowym

Kolejnym etapem doświadczeń było określenie przenikania OLDA do frakcji lipidowej po podaniu dootrzewnowym. Doświadczenie wykonałam zgodnie z opisem w dziale „Metodyka” w punkcie 3.1.3.

Zaobserwowałam we frakcji lipidowej uzyskanej po czasie 1, 2, 3 i 24 godz. od podania obecność 8 związków o różnych współczynnikach retencji równych 0; 0,07; 0,20; 0,37; 0,47; 0,59; 0,66; 0,77. Jeden ze związków wykazywał identyczny współczynnik retencji jak OLDA będąca standardem. Współczynnik ten wynosił 0,20. Przykładową płytkę TLC pokazującą uzyskane lipidy po 3 godz. od podania OLDA przedstawiłam na Rys. 4.1.1.2.



Rys. 4.1.1.2. Przenikanie OLDA do frakcji lipidowej mózgu szczura po podaniu dootrzewnowym. L – uzyskane lipidy, S – standard (OLDA). Prostokątne zaznaczenie wskazuje na obecność OLDA na wysokości standardu. Zdjęcie jest charakterystyczne dla 3 niezależnych doświadczeń.

Na podstawie powyżej opisanych obserwacji stwierdzam, że OLDA przenika do mózgu szczura, gdzie jest obecna w jego frakcji lipidowej. Ponadto obecność OLDA w kolejnych pobieranych próbkach czasowych (1, 2, 3 i 24 godz.) wskazuje na jej znaczną trwałość w ustroju.

4.1.1.4. Obecność OLDA we frakcji błonowej bądź cytozolowej po podaniu dootrzewnowym; stabilność OLDA *in vivo*

W tej części badań analizowałam możliwość wiązania się OLDA z błonami bądź przenikania do frakcji cytozolowej mózgu szczura. Doświadczenia przeprowadziłam zgodnie z opisem podanym w rozdziale „Metodyka” w podpunktach 3.1.4. i 3.1.5.

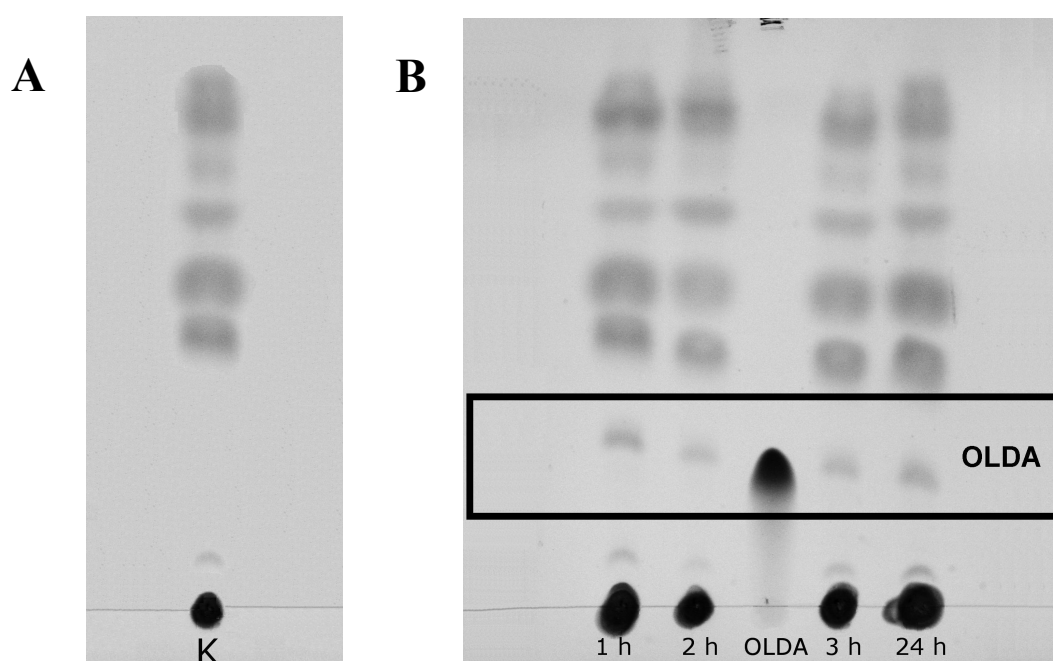
Określenie odzysku OLDA z frakcji błonowej i cytozolowej homogenatu mózgu szczura

Na początku doświadczenia uzyskałam frakcję błonową i cytozolową homogenatu mózgu szczura zgodnie z przepisem podanym przez Xu i wsp. (55), a opisanym w rozdziale „Metodyka” - punkt 3.1.4. Po dodaniu do zawiesin obydwu frakcji OLDA, wyekstrahowaniu z nich lipidów i poddaniu ich analizie chromatograficznej, stwierdziłam, że w mieszaninie lipidów uzyskanych z obu frakcji jest związek o współczynniku retencji równym współczynnikowi retencji OLDA.

Oznacza to, że przyjęta przeze mnie metoda odzyskiwania OLDA z frakcji błonowej i cytozolowej homogenatu mózgu szczura jest poprawna. Odzysk OLDA zachodzi z zadowalającą wydajnością, wystarczającą do przeprowadzenia analiz za pomocą wybranych przeze mnie technik. Na uzyskanych tu wynikach opierałam dalszą procedurę doświadczalną zarówno w doświadczeniach mających na celu wyznaczenie przenikania OLDA do frakcji błonowej bądź cytozolowej mózgu szczura, jak i w doświadczeniach nad stabilnością OLDA w układach błonowych i cytozolowych *in vitro*.

Wiązanie się OLDA z błonami i cytozolem mózgu szczura

Na płytce chromatograficznej opisującej ekstrakty organiczne z frakcji cytozolowej nie zaobserwowałam związku o podobnym współczynniku retencji (R_f) jak OLDA będąca w danym układzie standardem. Na płytce opisującej ekstrakty organiczne z frakcji błonowej wystąpiło 8 różnych związków o R_f równych 0; 0,07; 0,24-0,29; 0,42-0,45; 0,56-0,64; 0,66-0,68; 0,76-0,78; 0,86. OLDA jako standard miała w tych warunkach chromatograficznych R_f równy 0,24-0,26. Wartość ta odpowiadała wartości R_f jednego ze składników mieszaniny. Jednocześnie doświadczenia kontrolne wykonane na tkance pobranej od szczura bez uprzednio podanej OLDA wykazały brak jakiegokolwiek związku o R_f bliskiemu OLDA. Związek o R_f identycznym z R_f OLDA występował w każdym badanym zakresie czasowym, tzn. 1, 2, 3 i 24 godz. od podania. Rys. 4.1.1.3. przedstawia płytkę chromatograficzną z naniesionym organicznymi ekstraktami błon komórkowych po 1, 2, 3 i 24 godz. od dootrzewnowego podania OLDA. Prostokątne zaznaczenie wskazuje obecność OLDA w każdej z próbek na wysokości standardu.



Rys. 4.1.1.3. Płytki chromatograficzne z naniesionymi organicznymi ekstraktami błon komórkowych bez dodania OLDA (A) oraz po 1, 2, 3 i 24 godz. od dootrzewnowego podania OLDA (B). Prostokątne zaznaczenie widoczne na płytce B wskazuje obecność OLDA, po jej podaniu *in vivo*, w każdej z próbek na wysokości standardu. Zdjęcie jest charakterystyczne dla 3 niezależnych doświadczeń.

Otrzymane wyniki wskazują, że OLDA nie przenika do fazy cytozolowej mózgu szczura po podaniu dootrzewnowym. Natomiast we frakcji błonowej występuje związek o R_f zbliżonym bądź identycznym z R_f OLDA. Ze względu na brak związku zlokalizowanego na wysokości OLDA w badaniach kontrolnych, stwierdziłam, że obserwowanym związkiem jest OLDA. OLDA występowała w frakcji błonowej we wszystkich badanych przedziałach czasowych: po 1, 2, 3 i 24 godz. od podania. Wskazuje to na znaczną stabilność OLDA w układzie błonowym po podaniu dootrzewnowym.

4.1.2. STABILNOŚĆ OLDA W WYBRANYCH UKŁADACH *IN VITRO*

W tej części doświadczalnej rozumiem pod terminem „próbka” roztwór zawierający pierwotnie N-oleinoilo-dopaminę (OLDA) bądź dopaminę, zaś pod terminem „kontrola” – roztwór nie zawierający OLDA czy dopaminy, który był poddawany równolegle identycznym procedurom doświadczalnym.

Wszystkie doświadczenia mające na celu określenie stabilności OLDA w zadanych układach powtarzałam 3 razy. Przedstawione tu wykresy są charakterystycznymi wykresami dla trzech doświadczeń. Wszystkie inkubacje prowadziłam w stałej temperaturze 36°C.

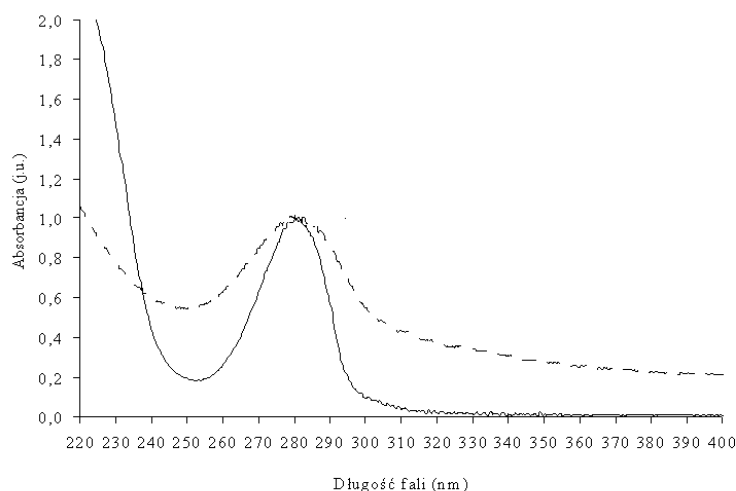
4.1.2.1. Stabilność dopaminy w nieorganicznym, zmodyfikowanym buforze Krebsa *in vitro*

Stabilność dopaminy w nieorganicznym, zmodyfikowanym buforze Krebsa *in vitro* pod nieobecność warunków utleniających

Widmo dopaminy na początku inkubacji miało charakterystyczny kształt z wyraźnie zaznaczonym maksimum przy 280 nm i minimum przy 252 nm. Było ono identyczne z widmem wzorca chlorowodoru dopaminy w roztworze wodnym.

Podczas całej inkubacji maksimum nie zmieniło swojego położenia, zaś położenie minimum począwszy od 4 godz. inkubacji zmieniało się w kierunku mniejszych długości fali (do 246 nm).

Absorbancja w maksimum była stała podczas trwania doświadczenia. Absorbancja w minimum na całym przebiegu doświadczenia rosła, jednak znacząca różnica w absorbancji wystąpiła pomiędzy minimum próbki a minimum widma uzyskanego na początku inkubacji. Widmo kontrolne oraz widmo po 4 godz. od rozpoczęcia inkubacji pokazałam na Rys. 4.1.2.1. Z powyższych obserwacji wynika, że dopamina jest stabilna w nieorganicznym, zmodyfikowanym buforze Krebsa w zadanych warunkach przez 4-5 godz.



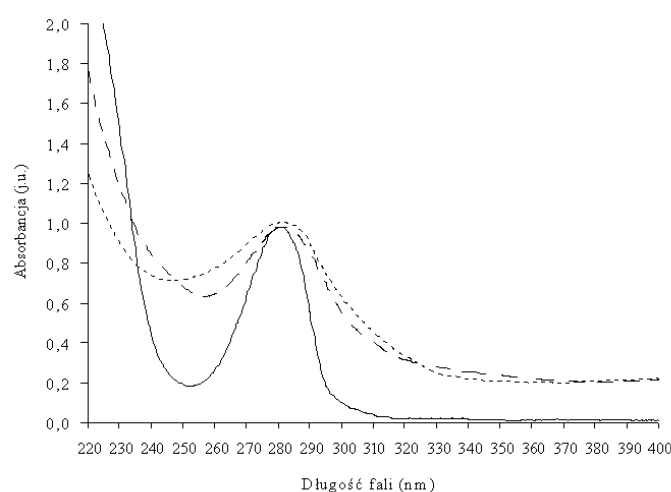
Rys. 4.1.2.1. Widmo roztworu dopaminy w zmodyfikowanym buforze Krebsa na początku inkubacji (linia ciągła) i po 4 godz. od rozpoczęcia inkubacji (linia przerywana) (liczba powtórzeń=3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

Stabilność dopaminy w nieorganicznym, zmodyfikowanym buforze Krebsa *in vitro* w obecności warunków utleniających

W roztworze dopaminy w zmodyfikowanym buforze Krebsa pozbawionym jonów wapnia widmo uzyskane przed wystąpieniem warunków utleniających było identyczne z widmem wzorca dopaminy z wyraźnie zaznaczonym maksimum przy 280 nm i minimum

przy 252 nm. Po wystąpieniu warunków utleniających zmiany w widmie były widoczne już po 30 min od rozpoczęcia inkubacji. Przejawiały się one nieznacznym wzrostem absorbancji w minimum, którego położenie zmieniało się w kierunku wyższych długości fali. Począwszy od 120 min od początku inkubacji absorbancja w minimum gwałtownie rosła. Położenie minimum nie było stałe: po 120 min osiągnęło $\lambda=255$ nm, zaś po 240 min – 246 nm. Ponadto zaobserwowałam zmianę kształtu widm roztworu po wystąpieniu warunków utleniających. Widma próbki na początku inkubacji, po 120 i 240 min przedstawiłam na Rys. 4.1.2.2.

Widmo roztworu dopaminy w zmodyfikowanym buforze Krebsa zawierającym jony wapnia w stężeniu 2,5 mmol/l było przed wystąpieniem warunków utleniających identyczne z widmem wzorca z wyraźnie zaznaczonym maksimum przy 280 nm i minimum przy 252 nm.

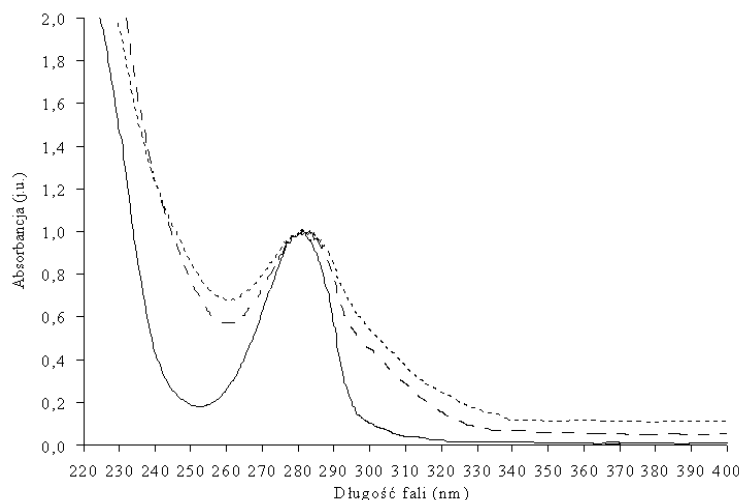


Rys 4.1.2.2. Widma roztworu dopaminy w buforze Krebsa pozbawionym jonów wapnia w obecności warunków utleniających na początku inkubacji (linia ciągła), po 120 min (linia przerywana) oraz po 240 min (linia kropkowana) od wystąpienia warunków utleniających (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

Po wystąpieniu warunków utleniających pierwsze, niewielkie, zmiany w widmie pojawiły się już po 30 min. Po 60 min od początku inkubacji, wartość absorbancji w minimum znacząco rosła. Jednocześnie położenie minimum zmieniało się z 252 nm do 260 nm.

Nie zaobserwowałam dalszych zmian położenia punktów charakterystycznych widma, jednakże jego kształt różnił się od widma wzorcowego. Widmo wzorcowe oraz widma uzyskane po 60 i 120 min od wystąpienia warunków utleniających przedstawiłam na Rys.

4.1.2.3.



Rys. 4.1.2.3. Widma roztworu dopaminy w buforze Krebsa wzbogaconym jonami wapnia w obecności warunków utleniających na początku inkubacji (linia ciągła), po 60 min (linia przerywana) oraz 120 min (linia kropkowana) od wystąpienia warunków utleniających (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

Powyższe obserwacje wskazują na stabilność dopaminy w zmodyfikowanym buforze Krebsa rzędu 4 godz. Jednocześnie dopamina jest podatna na utlenianie, a podatność ta ma związek z obecnością jonów wapnia w roztworze - w obecności jonów wapnia dopamina ulega przekształceniu w przeciągu 60 min zaś pod nieobecność tych jonów w przeciągu 120 min inkubacji w temperaturze 36°C. Pomimo wystąpienia pierwszych zmian w podobnym czasie, nieobecność jonów wapnia spowalnia reakcję utleniania dopaminy.

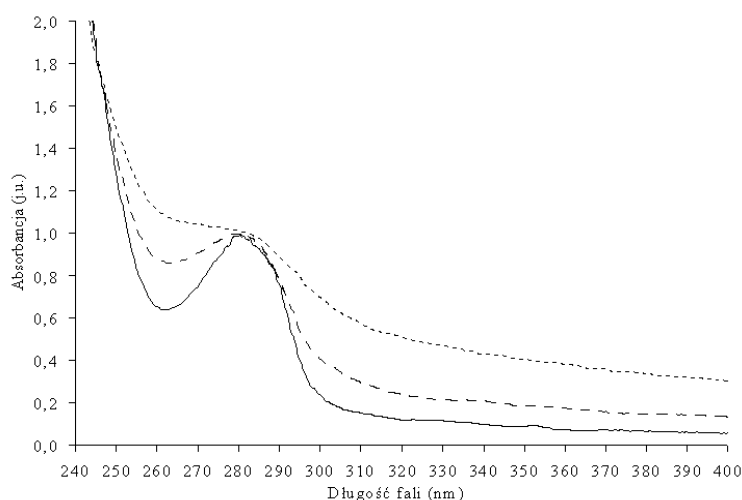
4.1.2.2. Stabilność OLDA w nieorganicznym zmodyfikowanym buforze Krebsa *Stabilność OLDA w nieorganicznym zmodyfikowanym buforze Krebsa przy braku warunków utleniających*

Widmo frakcji organicznej, wyekstrahowanej z mieszaniny reakcyjnej na początku

inkubacji było identyczne z widmem wzorca N-oleinoilo-dopaminy z wyraźnie zaznaczonym minimum przy $\lambda=262$ nm, zaś maksimum $\lambda=278-282$ nm. Widma frakcji organicznej roztworu kontrolnego były niezmiennie w czasie.

W fazie organicznej próbki położenie maksimum było stałe w czasie. Do 3 godz. włącznie położenie minimum było stałe, podobnie jak wartości absorbancji. Począwszy od 4 godz. od początku inkubacji absorbancja w minimum rosła, jednak jego położenie było wyraźnie zaznaczone i równe minimum widma wyjściowego. Po 6-7 godz. nie można było określić położenia minimum; wartości absorbancji obserwowane dla długości fali odpowiadającej pierwotnemu minimum przewyższały wartości absorbancji pierwotnego maksimum. Widma uzyskane na początku inkubacji, po 4 i 8 godz. od jej rozpoczęcia przedstawiłam na Rys. 4.1.2.4.

Widma fazy wodnej zarówno roztworu próbki jak i roztworu kontrolnego były identyczne i niezmiennie w czasie.



Rys. 4.1.2.4. Widma OLDA w nieorganicznym buforze Krebsa uzyskane na początku doświadczenie (linia ciągła), po 4 (linia przerywana) i 8 godz. od rozpoczęcia inkubacji (linia kropkowana) (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

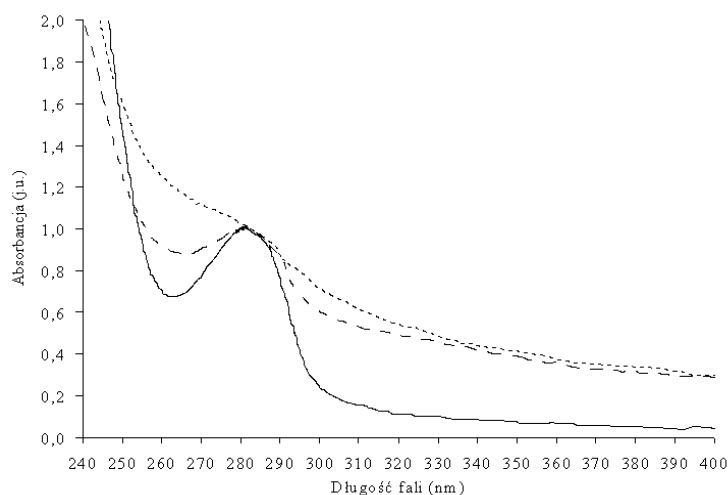
Stabilność OLDA w nieorganicznym zmodyfikowanym buforze Krebsa w obecności warunków utleniających

Układ wzbogacony o jony wapnia

Widma frakcji organicznej roztworu kontrolnego były identyczne i niezmiennie w

czasie. Widmo frakcji organicznej roztworu próbki przed wystąpieniem warunków utleniających było identyczne z widmem standardu. W ciągu całej inkubacji maksima kolejnych próbek nie zmieniły położenia. Począwszy od 2 godz. absorbancja w minimum gwałtownie rosła; po 5 godz. nie można było określić położenia maksimum, zaś absorbancja w punkcie odpowiadającym pierwotnie minimum przewyższała wartość absorbancji maksimum. Widmo frakcji organicznej uzyskane na początku inkubacji oraz 2 i 6 godz. po wystąpieniu warunków utleniających przedstawiłam na Rys. 4.1.2.5.

Widma fazy wodnej, zarówno roztworu kontroli jak i próbki, były identyczne i nie zmienne w czasie.



Rys. 4.1.2.5. Widmo OLDA nieorganicznie zmodyfikowanym buforze Krebsa wzbogaconym o jony wapnia przed wystąpieniem warunków utleniających (linia ciągła), po 2 (linia przerywana) i po 6 godz. (linia kropkowana) od rozpoczęcia inkubacji (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

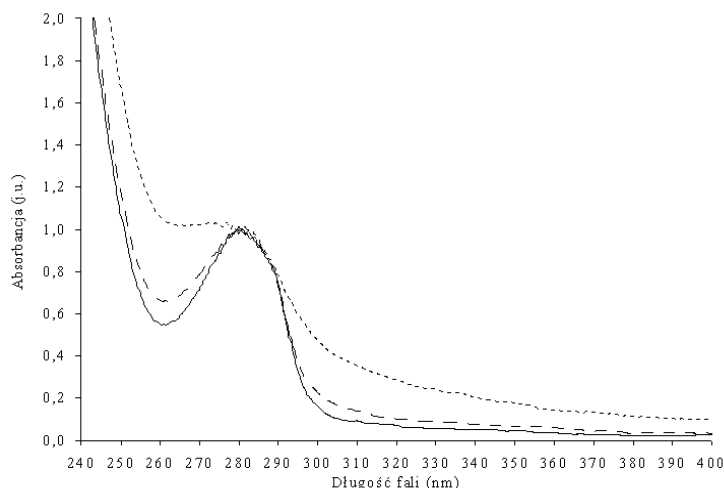
Układ pozbawiony jonów wapnia

We frakcji organicznej roztworu kontrolnego nie zaobserwowałam zmian w czasie – widma były identyczne przez cały czas trwania inkubacji.

Widmo fazy organicznej próbki uzyskane przed wystąpieniem warunków utleniających było identyczne z widmem standardu. W kolejnych widmach, uzyskanych do 3 godz. włącznie, nie zaobserwowałam zmian. Dopiero w 4 godz. od rozpoczęcia inkubacji wartości absorbancji w minimum zaczęły rosnąć, by po 5 godz. przewyższyły wartości

pierwotnego maksimum. Od tego momentu nie można było jednoznacznie określić położenia minimum. Widmo frakcji organicznej uzyskane na początku inkubacji oraz 2 i 6 godz. po wystąpieniu warunków utleniających przedstawiłam na Rys. 4.1.2.6.

Widma fazy wodnej, zarówno roztworu kontroli jak i próbki, były identyczne i niezmiennie w czasie.



Rys. 4.1.2.6. Widmo OLDA w nieorganicznym zmodyfikowanym buforze Krebsa pozbawionym jonów wapnia przed wystąpieniem warunków utleniających (linia ciągła), po 2 (linia przerywana) i po 6 godz. (linia kropkowana) od rozpoczęcia inkubacji (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

Powyższe wyniki wskazują na zbliżoną do dopaminy stabilność OLDA w nieorganicznym zmodyfikowanym buforze Krebsa. Jednocześnie podatność OLDA na utlenianie jest dwukrotnie mniejsza niż dopaminy i zależna od obecności jonów wapnia. Podobnie jak w przypadku dopaminy brak jonów wapnia stabilizuje OLDA.

4.1.2.3. Stabilność OLDA w układzie błonowym i cytozolowym homogenatu mózgu szczura

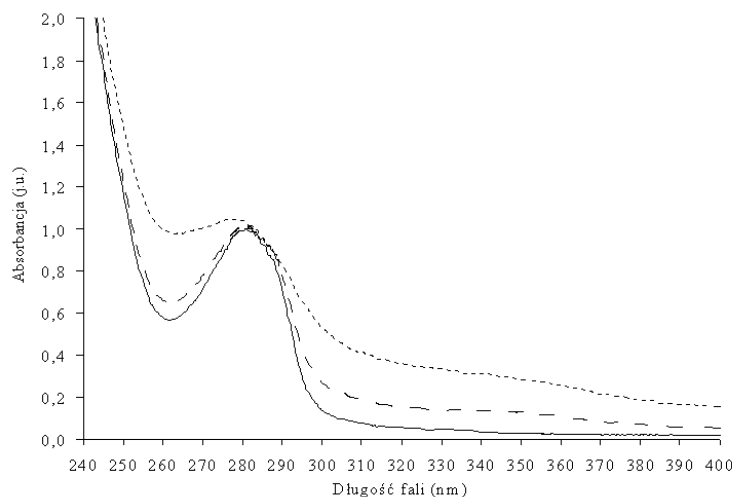
Stabilność OLDA w układzie błonowym i cytozolowym homogenatu mózgu szczura przy braku warunków utleniających

Układ błonowy wzbogacony o jony wapnia

Widma frakcji organicznej roztworu kontrolnego były przez cały czas trwania doświadczenia identyczne i niezmiennie w czasie. Widmo próbki na początku

doświadczenia było identyczne z widmem wzorcowym. Przez pierwsze 17 godz. od początku inkubacji z frakcją błonową homogenatu mózgu szczura widma pozostawały niezmiennie z wyraźnie zaznaczonym minimum ($\lambda=262$ nm) i maksimum ($\lambda=281$ nm). Następnie, od 18 godz. absorbancja w minimum rosła, by po 21 godz. osiągnąć wartości zbliżone do tych obserwowanych w maksimum. Widma uzyskane na początku inkubacji, po 17 i 21 godz. przedstawiłam na Rys. 4.1.2.7.

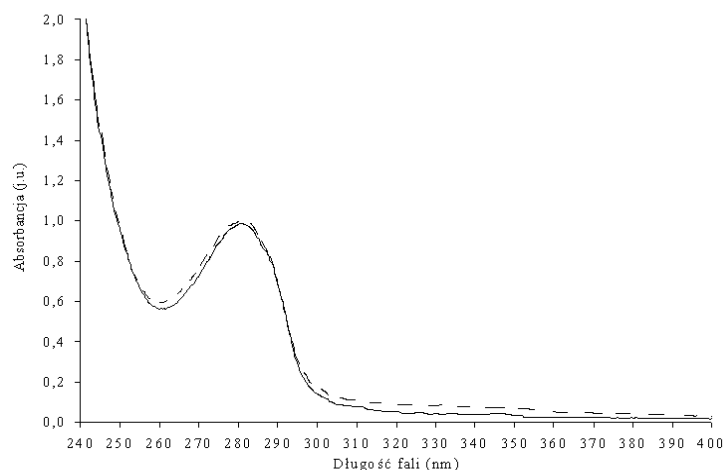
Widma frakcji wodnych zarówno roztworów kontrolnych jak i próbki były identyczne i niezmiennie w czasie.



Rys. 4.1.2.7. Widmo OLDA w układzie błonowym homogenatu mózgu szczura wzbogaconym o jony wapnia pod nieobecność warunków utleniających. Linia ciągła przedstawia widmo uzyskane na początku inkubacji, przerywana widmo po 17 godz., zaś kropkowana po 21 godz. od rozpoczęcia inkubacji (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

Układ błonowy pozbawiony jonów wapnia

Widma frakcji organicznej kontroli, jak i frakcji wodnych kontroli i próbki były niezmiennie w czasie. W widmach roztworu próbki w zawieszynie błon komórkowych pozbawionego jonów wapnia nie zaobserwowałam zmian przez 24 godz. od rozpoczęcia inkubacji. Zarówno położenie minimum i maksimum, jak i wartości absorbancji pozostały stałe podczas trwania inkubacji. Widma uzyskane na początku inkubacji oraz po 24 godz. od jej rozpoczęcia przedstawiam na Rys. 4.1.2.8.

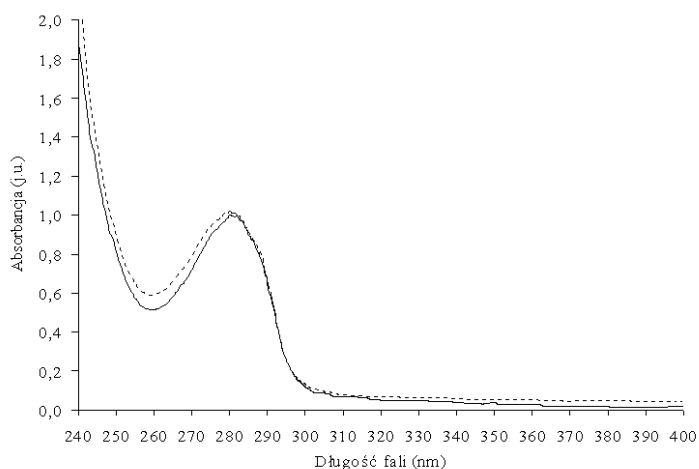


Rys. 4.1.2.8. Widma OLDA w układzie błonowym pozbawionym jonów wapnia pod nieobecność warunków utleniających. Linia ciągła opisuje widmo uzyskane na początku inkubacji, zaś przerywana po 24 godz. od jej rozpoczęcia (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

Układ cytozolowy wzbogacony o jony wapnia

W układzie cytozolowym wzbogaconym o jony wapnia w stężeniu 2,5 mmol/l, widma frakcji organicznej kontroli były identyczne przez cały czas trwania inkubacji. W widmach roztworu próbnego nie zaobserwowałam zmian ani w położeniu minimum bądź maksimum (odpowiednio $\lambda=262$ nm i $\lambda=281$ nm), ani w wartościach absorbancji. Widmo uzyskane na początku oraz po 24 godz. inkubacji przedstawiłam na Rys. 4.1.2.9.

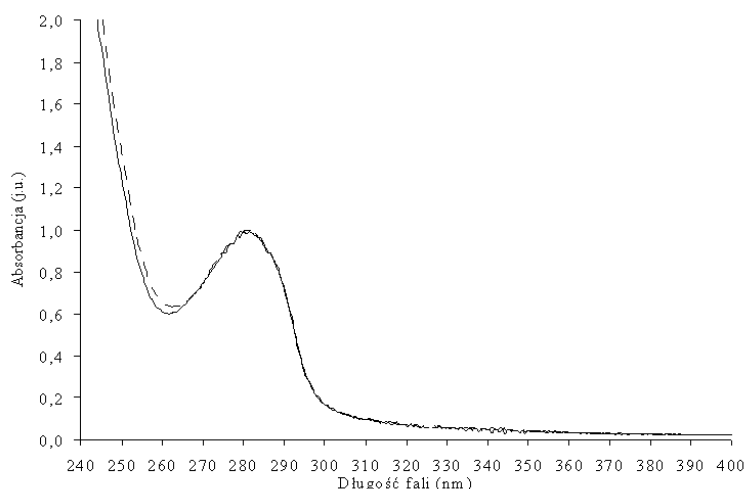
Widma frakcji wodnych roztworów kontroli i próbki były identyczne i niezmiennie w czasie.



Rys. 4.1.2.9. Widma OLDA w układzie cytozolowym wzbogaconym o jony wapnia uzyskane na początku (linia ciągła) i po 24 godz. (linia przerywana) inkubacji (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

Układ cytozolowy pozbawiony jonów wapnia

Widma frakcji organicznej kontroli oraz frakcji wodnych kontroli i próbki pozostawały niezmiennie przez cały czas inkubacji. Nie zaobserwowałam zmian w widmie frakcji organicznej; widma uzyskane na początku inkubacji oraz po 24 godz. były identyczne z widmem wzorca. Na Rys. 4.1.2.10. przedstawiłam widma uzyskane na początku i po 24 godz. inkubacji.



Rys. 4.1.2.10. Widma OLDA w układzie cytozolowym pozbawionym jonów wapnia. Linia ciągła przedstawia widmo uzyskane na początku inkubacji, zaś linia przerywana – po 24 godz. (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C)

Z powyżej opisanych wyników wynika, że OLDA w układzie błonowym homogenatu mózgu szczura wzbogaconym o jony wapnia pozostaje niezmienną przez 17 godz. Nieobecność tych jonów przedłuża stabilność OLDA w układzie błonowym do przynajmniej 24 godz. W układzie cytozolowym stabilność OLDA nie zależy od jonów wapnia i wynosi 24 godz. Zatem brak jonów wapnia bądź obecność układu cytozolowego stabilizuje OLDA.

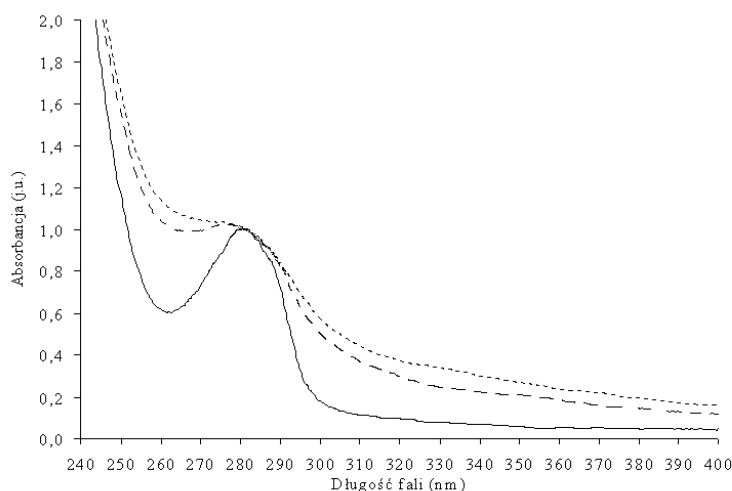
Stabilność OLDA w układzie błonowym homogenatu mózgu szczura w obecności warunków utleniających

Stabilność OLDA w uprzednio utlenionych błonach homogenatu mózgu szczura wzbogaconych o jony wapnia

W zawiesinie uprzednio utlenionych błon zawierającej jony wapnia w stężeniu 2,5 mmol/l frakcja organiczna roztworu kontrolnego była niezmienna w czasie. We frakcji organicznej próbki zaobserwowałam duży wzrost absorbancji w minimum już po 16 godz. od wystąpienia warunków utleniających – wartości absorbancji w minimum były niewiele mniejsze od wartości w maksimum, jednak obydwie te punkty były widoczne. Po 18 godz. rozróżnienie minimum i maksimum nie było możliwe.

Na Rys. 4.1.2.11. przedstawiłam widmo uzyskane na początku, po 16 i po 20 godz. od wystąpienia warunków utleniających.

Widma fazy wodnej kontroli oraz próbki były stałe w czasie.



Rys. 4.1.2.11. Widma OLDA w zawiesinie uprzednio utlenionych błon komórkowych wzbogaconych o jony wapnia. Linia ciągła przedstawia widmo wyjściowe, linia przerywana widmo uzyskane po 16, zaś kropkowaną po 20 godz. od wystąpienia warunków utleniających (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

Stabilność OLDA w uprzednio utlenionych błonach pozbawionych jonów wapnia

W pozbawionym jonów wapnia układzie uprzednio utlenionych błon, nie zaobserwowałam zmian w widmach frakcji kontroli. W widmie frakcji organicznej próbki

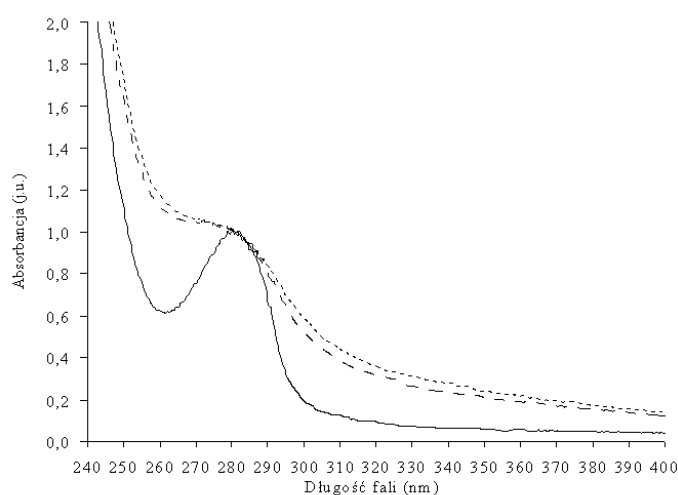
zaobserwowałam zanik minimum po 16 godz. od rozpoczęcia inkubacji – nie było odróżnialne od maksimum. Na Rys. 4.1.2.12. przedstawiłam widmo wyjściowe oraz widma uzyskane po 16 i 24 godz. od wystąpienia warunków utleniających.

Widma fazy wodnej kontroli i próbki były stałe w czasie.

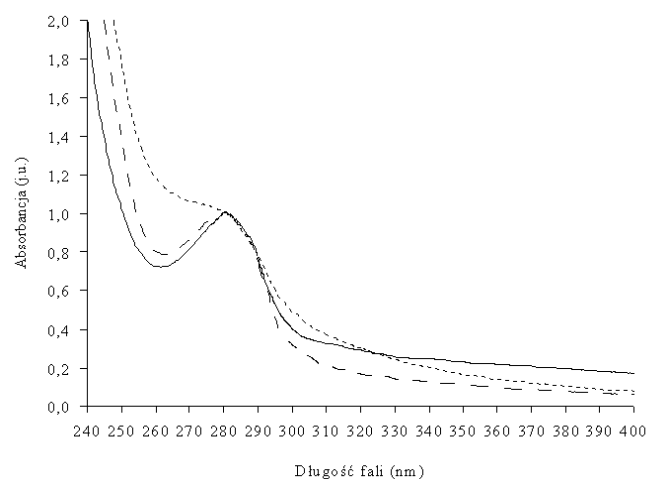
Stabilność OLDA inkubowanej w zawieszynie błon z dodatkiem jonów wapnia poddanej następnie działaniu warunków utleniających

W układzie inkubowanej przez 60 min w zawieszynie błon OLDA w obecności jonów wapnia 2,5 mmol/l poddanej następnie utlenieniu widma frakcji organicznej kontroli były stałe w czasie. Widmo frakcji organicznej próbki zmieniło się począwszy od 16 godz. od wystąpienia warunków utleniających; wartości absorbancji w minimum zaczęły rosnąć. W 19 godz. od początku reakcji minimum zaniknęło. Widmo OLDA uzyskane przed wystąpieniem warunków utleniających, a także po 16 i 19 godz. od ich wystąpienia przedstawiłam na Rys. 4.1.2.13.

Widma frakcji wodnych roztworu kontroli i próbki były identyczne i niezmiennie w czasie.



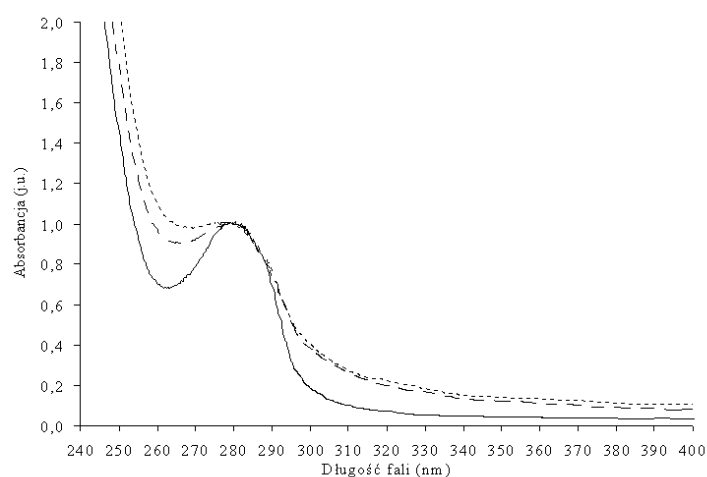
Rys. 4.1.2.12. Widma OLDA w zawieszynie utlenionych uprzednio błon komórkowych pozbawionych jonów wapnia uzyskane na przed (linia ciągła), po 16 (linia przerywana) i po 24 godz. od wystąpienia warunków utleniających (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).



Rys. 4.1.2.13. Widma OLDA inkubowanej w zawiesinie błon komórkowych z dodatkiem jonów wapnia poddanej następnie działaniu warunków utleniających przed ich wystąpieniem (linia ciągła) oraz po 16 (linia przerywana) i 19 (linia kropkowana) godz. od ich wystąpienia (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

Stabilność OLDA inkubowanej w zawiesinie błon pozbawionych jonów wapnia poddanej następnie działaniu warunków utleniających

W układzie inkubowanej w zawiesinie błon OLDA pozbawionych jonów wapnia, a następnie poddanej utlenieniu, widma frakcji organicznej kontroli były niezmiennie w czasie. W widmie fazy organicznej próbki zaobserwowałam po 16 godz. wzrost absorbancji w minimum, które zaniknęło po 23 godz. od wystąpienia warunków utleniających. Widma uzyskane przed i po 16 oraz 24 godz. od wystąpienia warunków utleniających przedstawiłam na Rys. 4.1.2.14. Frakcje wodne roztworów kontroli i próbki były identyczne i niezmiennie w czasie.



Rys. 4.1.2.14. Widma OLDA inkubowanej w zawiesinie błon komórkowych z dodatkiem jonów wapnia poddanej następnie działaniu warunków utleniających przed ich wystąpieniem (linia ciągła) oraz po 16 (linia przerywana) i 24 (linia kropkowana) godz. od ich wystąpienia (liczba powtórzeń =3; inkubacja była prowadzona w stałej temperaturze 36°C).

Z powyższych doświadczeń wynika, że zawiesina błon homogenatu mózgu szczura chroni OLDA przed utlenianiem. Proces ten nie jest zależny od jonów wapnia.

Jednocześnie uszkodzone utlenianiem błony stanowią słabszą ochronę niż nieuszkodzone.

Podsumowując, OLDA wykazuje w układzie nieorganicznego, zmodyfikowanego buforu Krebsa porównywalną z dopaminą stabilność, jednak jest od niej mniej podatna na utlenianie. Szybkość utleniania jest zwiększona w obecności jonów wapnia. W układzie homogenatu mózgu szczura nieobecność jonów wapnia w frakcji błonowej bądź obecność frakcji cytozolowej stabilizuje OLDA, która w tym środowisku jest znacznie stabilniejsza niż w nieorganicznym buforze Krebsa. Ponadto, układ błonowy chroni OLDA przed utlenieniem bez względu na obecność jonów wapnia.

4.1.3. MOŻLIWOŚĆ O-METYLACJI OLDA ZA POŚREDNICTWEM KATECHOLO-O-METYLOTRANSFERAZY (COMT) DO N-OLEINOILO- 3'-O-METYLO-DOPAMINY (O-ME-OLDA)

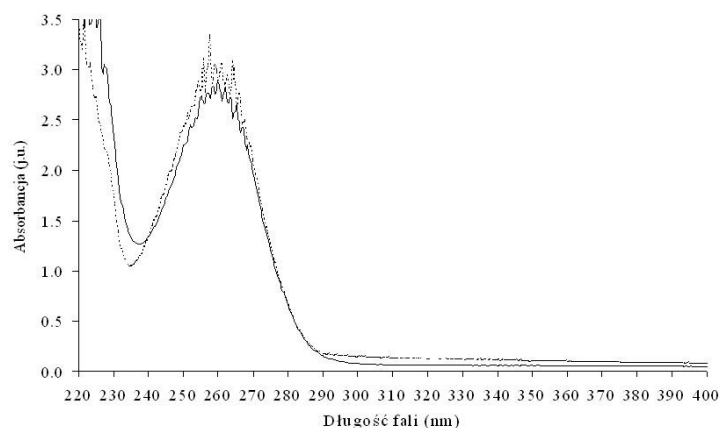
Doświadczenia prowadziłam w sposób opisany w rozdziale „Metodyka” w punkcie 3, w trzech powtórzeniach. W prowadzonej przeze mnie reakcji substratami były S-adenozyl-L-metionina (SAM) – donor grupy metylowej oraz N-oleinoilo-dopamina (OLDA), a produktami S-adenozyl-L-homocysteina (SAH) oraz, prawdopodobnie, N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopamina (O-Me-OLDA). Spektrofotometrycznej analizie poddałam zatężone fazy wodne i organiczne (w których znajdowała się OLDA) następujących próbek: kontroli „właściwej” (zawierającej wszystkie reagenty prócz enzymu COMT analizowanej po założonym czasie reakcji), kontroli „zerowej” (w której były obecne wszystkie reagenty, w tym enzym, która była analizowana natychmiast po rozpoczęciu reakcji) oraz próbki (zawierającej wszystkie reagenty, analizowanej po zadanym czasie reakcji).

W związku z tym, że widma uzyskane dla obu faz (wodnej i organicznej) w kontroli „właściwej” oraz kontroli „zerowej” były identyczne, w dalszym opisie pominęłam kontrolę „zerową”, a termin „kontrola” odnosi się do kontroli „właściwej”. Obecność kontroli „zerowej” miała na celu oznaczenie absorbancji ew. tła występującego na początku reakcji, a wynikającego z obecności enzymu.

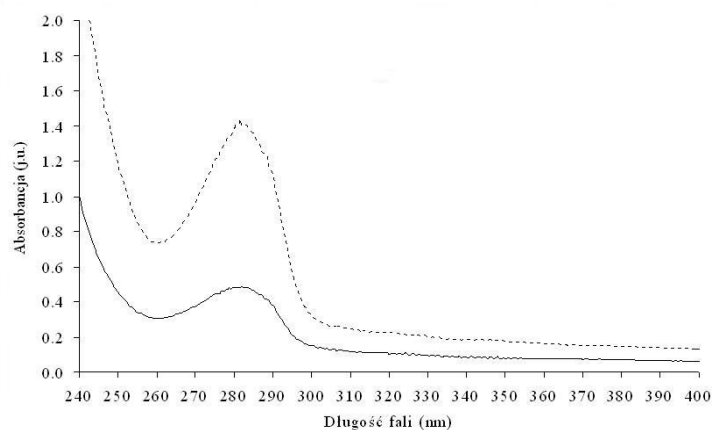
Pod terminem próbka rozumiem fazę wodną i fazę organiczną uzyskaną bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej. Pozostałe, przedstawione poniżej widma OLDA i O-Me-OLDA zostały wykonane na potrzeby niniejszego opisu z czystych związków.

W widmach fazy wodnej kontroli oraz próbki, maksimum występowało przy tej samej długości fali ($\lambda=259$ nm), zaś położenie minimum zmieniło się z $\lambda=234$ nm (kontrola) do $\lambda=237$ nm (próbka). Położenie minimum kontroli jest charakterystyczne dla SAM (substrat), zaś położenie minimum próbki dla SAH (produkt reakcji). W widmach fazy organicznej zaobserwowałam znaczące zmniejszenie się absorbancji próbki w stosunku do kontroli; położenie maksimum obu układów było identyczne ($\lambda=278-282$ nm) i równe położeniu maksimum zarówno OLDA (substrat) jak i O-Me-OLDA (domniemany produkt). Jednocześnie położenie minimum próbki ($\lambda=260$ nm) było różne od położenia minimum kontroli ($\lambda=262$ nm). Uzyskane widma przedstawiłam na Rys. 4.1.3.1. (faza wodna) i Rys. 4.1.3.2. (faza organiczna).

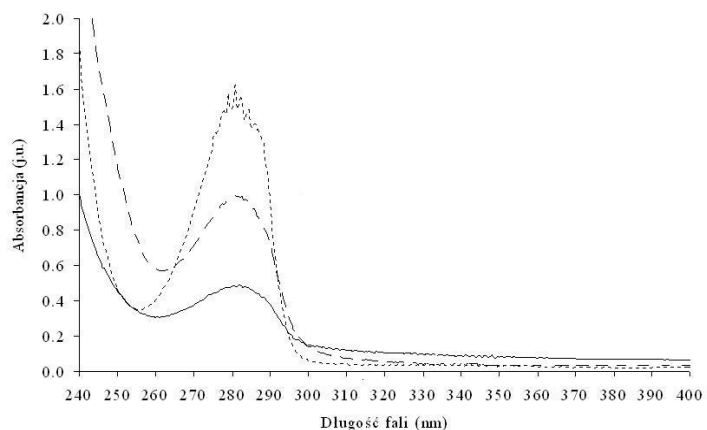
Minimum próbki było zlokalizowane pomiędzy minimami substratu (OLDA, $\lambda=262$ nm) oraz domniemanego produktu (O-Me-OLDA, $\lambda=255$ nm) (Rys. 4.1.3.3). Po dodaniu do siebie widm OLDA oraz O-Me-OLDA (których suma byłaby widmem uzyskanym dla układu zawierającego zarówno OLDA jak i O-Me-OLDA) otrzymałam widmo odpowiadające widmu próbki ($\lambda_{\max}=278-282$ nm; $\lambda_{\min}=260$ nm). Przedstawiłam je wraz z widmem próbki na Rys. 4.1.3.4.



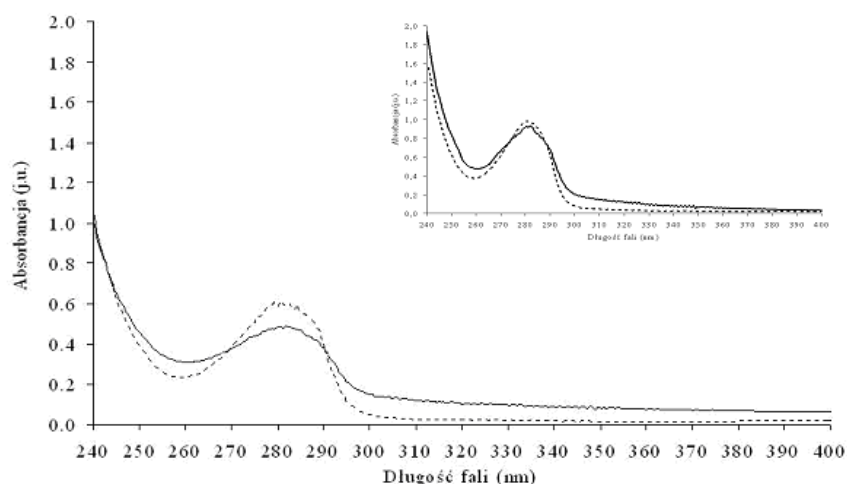
Rys.4.1.3.1. Widmo fazy wodnej z próbki (linia ciągła) i kontroli (linia przerywana). Oba widma pochodzą z mieszanin reakcyjnych (liczba powtórzeń =3; reakcje były prowadzone w temperaturze 37°C przez 75 min).



Rys.4.3.1.2. Widma fazy organicznej z próbki (linia ciągła) i kontroli (linia przerywana). Oba widma pochodzą z mieszanin reakcyjnych (liczba powtórzeń =3; reakcje były prowadzone w temperaturze 37°C przez 75 min).



Rys.4.1.3.3. Widma próbki pochodzącej z mieszaniny reakcyjnej (linia ciągła), OLDA (substratu – linia przerywana) oraz O-Me-OLDA (domniemanego produktu – linia kropkowana) (liczba powtórzeń =3).



Rys. 4.1.3.4. Widmo próbki pochodzącej z mieszaniny reakcyjnej (linia ciągła) oraz sumaryczne widmo OLDA i O-Me-OLDA (linia przerywana). Wstawka przedstawia te same widma po normalizacji – widmo próbki z mieszaniny reakcyjnej i widmo sumaryczne praktycznie nakładają się na siebie, co wskazuje na obecność w mieszaninie reakcyjnej zarówno OLDA jak i O-Me-OLDA (liczba powtórzeń =3).

Na podstawie powyższych obserwacji stwierdziłam, że zachodzi reakcja O-metylacji OLDA za pośrednictwem COMT. Wskazuje na to obecność w fazie wodnej próbki SAH, oraz, w fazie organicznej, O-Me-OLDA. Reakcja O-metylacji *in vitro* jest reakcją równowagową, co potwierdza obecność zarówno substratu (OLDA) jak i produktu (O-Me-OLDA) w mieszaninie reakcyjnej.

4.2. CZĘŚĆ FIZJOLOGICZNA

Doświadczenia wykonałam na 36 szczurach. Zwierzęta zostały podzielone na trzy grupy doświadczalne, różniące się między sobą zestawem podanych środków farmakologicznych. W grupie, w której badałam wpływ samej OLDA na odpowiedzi oddechowe na hipoksję umieściłam 8 szczurów. W grupie, w której efekty OLDA były badane po podaniu haloperidolu (HAL), antagonisty receptorów dopaminowych przenikającego przez barierę krew-mózg, było 10, a w grupie po podaniu domperidonu (DOM), antagonisty nieprzenikającego przez barierę, 18 zwierząt. Podział i liczebność grup podałam w Tabeli 4.2.1.

Tabela 4.2.1. Podział i liczebność grup doświadczalnych.

Grupa	I podany związek	II podany związek	Liczebność
I	OLDA	----	8
II	HAL	OLDA	10
III	DOM	OLDA	18

Wszystkie doświadczenia zostały wykonane zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale „Metodyka” w punkcie 3.4. W niniejszym rozdziale rozumiem pod pojęciem amplitudy (A) (odpowiednika komponenty objętościowej) amplitudę sygnału uzyskanego z rejestracji zintegrowanej aktywności nerwu przeponowego, która koresponduje z objętością oddechową, a pod pojęciem częstości (f) (odpowiednika komponenty częstotliwościowej oddychania) – liczbę cykli oddechowych na minutę. Iloczyn tych czynników jest ekwiwalentem wentylacji minutowej (V_E).

Pod pojęciem „kontrola” rozumiem wyniki uzyskane podczas pomiarów kontrolnych, tzn. pomiarów wykonanych na początku doświadczenia przed podaniem jakichkolwiek związków. Pojęcia HAL i DOM oznaczają w niniejszym opisie pomiary wykonane po podaniu HAL lub DOM, zaś OLDA – po podaniu OLDA bez względu na obecność i charakter związku w tle. Pod pojęciem „wartości wyjściowe” rozumiem wartości uzyskane przed wystąpieniem bodźca hipoksyjnego opisywane wartością 100%. Ponadto określenie „przebieg” odnosi się do rejestrowanej podczas pojedynczego doświadczenia odpowiedzi w czasie. Punkty pomiarowe opisujące dany przebieg były wyznaczane co 20 sek. od wystąpienia bodźca hipoksyjnego.

4.2.1. WPLYW OLDA NA ODPOWIEDŹ ODDECHOWĄ NA HIPOKSJĘ

Podczas rejestracji odpowiedzi oddechowej po podaniu OLDA, pomiary kończyłam po 60 lub 40 sek. (odpowiednio dla 14 i 11% hipoksji) od podania bodźca. Ten raczej krótki czas podawania bodźca hipoksyjnego wynikał z pogarszającej się kondycji

(głównie polegającej na gwałtownym spadku ciśnienia tętniczego) zwierząt przy kombinacji związek-bodziec.

Zastosowane bodźce hipoksyjne przed i po podaniu OLDA spowodowały porównywalne spadki poziomu tlenu we krwi tętniczej. Poziomy te przedstawione są w tabeli 4.2.2. Badania gazometryczne krwi tętniczej wykazały także względną stabilność drugiego bodźca chemicznego – dwutlenku węgla, a także pH w trakcie wykonywanych testów hipoksyjnych. Przed podaniem OLDA, odpowiedzi hipoksyjne były wykonywane przy poziomie dwutlenku węgla wynoszącym $\text{PaCO}_2 = 47,7 \pm 1,6$ mmHg dla 14% hipoksji oraz $45,3 \pm 0,7$ mmHg dla 11% hipoksji. Po podaniu OLDA wartości PaCO_2 wynosiły odpowiednio $40,3 \pm 3,2$ mmHg i $44,4 \pm 1,2$ mmHg dla 14% i 11% hipoksji. Poziom pH utrzymywał się przed podaniem OLDA na poziomie $7,33 \pm 0,01$ (14% hipoksja) i $7,34 \pm 0,01$ (11% hipoksja), zaś po podaniu OLDA jego wartość wynosiła odpowiednio $7,33 \pm 0,01$ oraz $7,30 \pm 0,01$ dla 14% i 11% hipoksji.

Podczas doświadczeń z OLDA zaobserwowałam spadek ciśnienia tętniczego średnio z $58,47 \pm 6,02$ mmHg (przed podaniem OLDA) do $51,83 \pm 9,35$ mmHg (po podaniu OLDA), który nie osiągnął znamienności statystycznej. W celu stwierdzenia czy spadek ciśnienia wywołany był substancją badaną czy też vehiculum, w którym była ona rozpuszczana, oceniano wpływ samego DMSO na ciśnienie. Stwierdzono, że DMSO powoduje znamienny ($p < 0,05$, $n=4$) spadek średniego ciśnienia tętniczego krwi (z $63,07 \pm 4,46$ mmHg przed podaniem do $52,07 \pm 2,74$ mmHg po podaniu DMSO). W związku z tym, OLDA *per se* nie wpływa istotnie obniżająco na ciśnienie krwi. Spadek ciśnienia krwi ma wpływ pobudzający na oddychanie (42). Można więc założyć, że depresja odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny po podaniu OLDA rozpuszczonej w DMSO zależała od specyficznego działania OLDA, a nie od efektów krążeniowych wywołanych rozpuszczalnikiem.

Tab. 4.2.2. Poziom tlenu we krwi tętniczej, oceniany gazometrycznie, w poszczególnych etapach doświadczalnych przed i po podaniu OLDA.

Przed podaniem OLDA				
	Kontrola	14% hipoksja	Kontrola	11% hipoksja
PaO ₂ (mmHg)	90,7 ±4,6	43,6 ±1,9	92,5 ±4,7	37,6 ±1,8
Po podaniu OLDA				
PaO ₂ (mmHg)	94,3 ±4,9	49,7 ±3,3	89,5 ±4,0	38,4 ±1,3

Przebieg odpowiedzi oddechowej na hipoksję

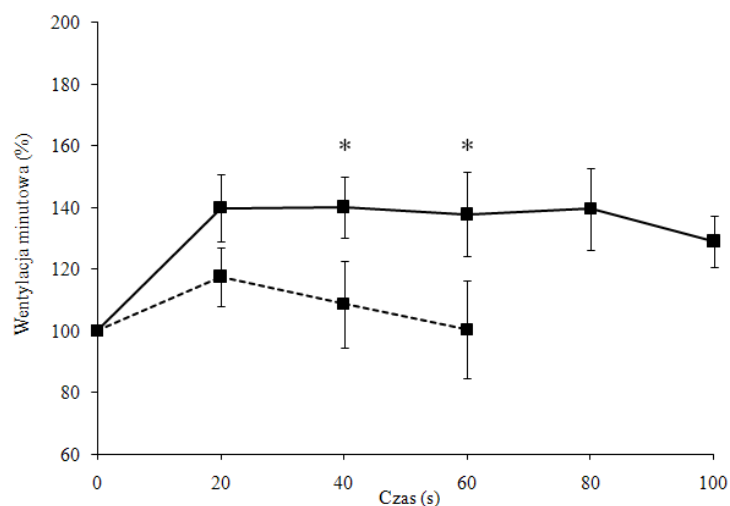
Podczas całego doświadczenia, zarówno w kontroli, jak i po podaniu OLDA zaobserwowałam klasyczny dwufazowy profil odpowiedzi na hipoksję dla obu poziomów bodźca z wyraźnym szczytem w 20 sek. i następującym po nim obniżeniem odpowiedzi oddechowej. W kontroli, szczytowa wentylacja minutowa, oszacowana z jej ekwiwalentu nerwowego, wzrosła znacząco w stosunku do wartości wyjściowych w pierwszej, pobudzeniowej fazie, średnio o 40 ±11% i 56 ±9% odpowiednio dla 14 i 11% hipoksji ($p < 0,05$; $n=8$). Po podaniu OLDA, szczytowe wzrosty wynosiły, odpowiednio, 18 ±10% i 38 ±9%. W przypadku silniejszej 11% hipoksji, wzrost ten był znamieny ($p < 0,05$; $n=8$). Odpowiedzi oddechowe po podaniu OLDA były jednak istotnie stłumione przy obu poziomach bodźca hipoksyjnego ($p < 0,05$; $n=8$) w porównaniu do odpowiedzi kontrolnych. Profile odpowiedzi oddechowej na poziomie ekwiwalentu wentylacji minutowej przedstawiłam na Rys. 4.2.1. (14% bodziec) i 4.2.2. (11% bodziec).

Podobną zależność zaobserwowałam również dla częstości oddychania. Również tu występowała dwufazowa odpowiedź ze spadkiem częstości oddychania poniżej wartości wyjściowych. Jedynie dla odpowiedzi kontrolnych na 14% hipoksję, częstotliwość oddychania nie spadała poniżej wartości wyjściowych. Nie zaobserwowałam takiej zależności dla komponenty objętościowej, której wartości rosły w czasie bez względu na poziom bodźca czy obecność OLDA. Wartości komponenty częstotliwościowej i

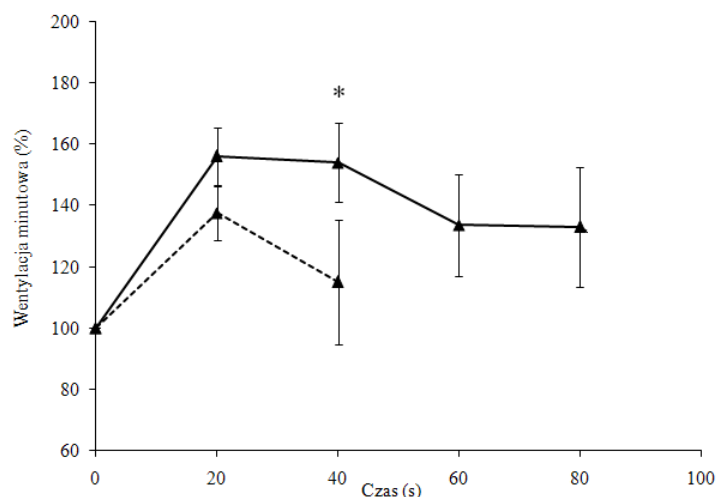
objętościowej przedstawiłam w Tabeli 4.2.2.

Tabela 4.2.2. Wartości częstości i amplitudy uzyskane w poszczególnych punktach pomiarowych dla obu poziomów hipoksji. Za poziom wyjściowy przyjęto 100%.

Czas	Hipoksja 14%		Hipoksja 11%	
	Kontrola	OLDA	Kontrola	OLDA
Częstość oddychania (%)				
0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0
20	123 ±6	99 ±7	122 ±6	108 ±4
40	116 ±8	86 ±11	110 ±7	83 ±12
60	111 ±11	84 ±18	90 ±10	---
80	112 ±13	---	93 ±10	---
100	110 ±12	---	---	---
Amplituda (%)				
0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0
20	113 ±4	118 ±4	128 ±4	127 ±5
40	120 ±2	127 ±5	139 ±3	137 ±7
60	124 ±3	121 ±6	147 ±6	---
80	125 ±5	---	142 ±6	---
100	120 ±7	---	---	---



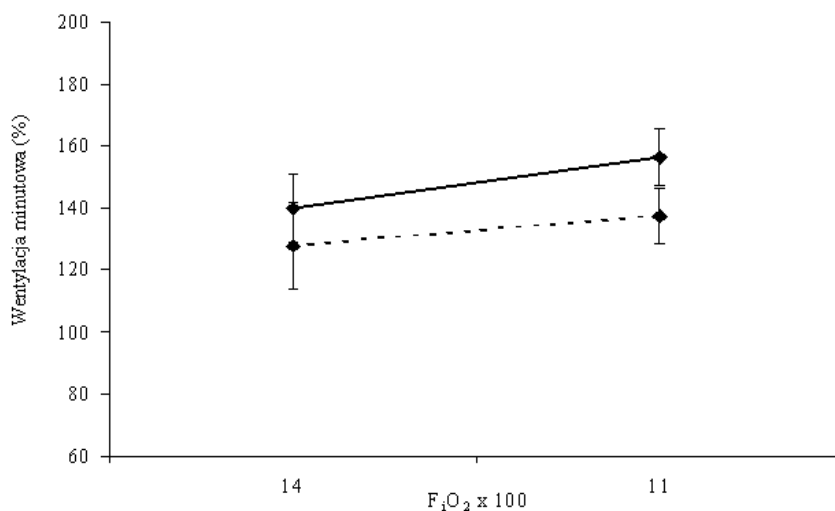
Rys. 4.2.1. Odpowiedź oddechowa szczura na 14% hipoksję; linia ciągła – kontrola, linia kropkowana – OLDA. * $p < 0,05$ (test Wilcoxona dla sparowanych punktów czasowych) (n=8).



Rys. 4.2.2. Odpowiedź oddechowa szczura na 11% hipoksję; linia ciągła – kontrola, linia kropkowana – OLDA. * $p < 0.05$ (test Wilcoxona dla sparowanych punktów czasowych) ($n=8$).

Czułość hipoksyjna

Czułość hipoksyjna jest definiowana jako nasilenie szczytowej wentylacji wraz ze wzrostem poziomu siły bodźca, czyli w moim układzie doświadczalnym jest to różnica pomiędzy szczytowymi odpowiedziami dla dwóch badanych poziomów hipoksji. Podczas porównań nie zaobserwowałam znamienych różnic pomiędzy tymi parametrami dla kontroli oraz OLDA. Nie zaobserwowałam zmian w nachyleniu linii regresji liniowej łączącej szczytowy wzrost ekwiwalentu wentylacji płucnej przed i po podaniu OLDA: linie opisujące regresję są niemal równoległe. Nie obserwowałam więc zmiany czułości hipoksyjnej po podaniu OLDA. Wykres 4.2.3. przedstawia czułość hipoksyjną dla pomiarów kontrolnych oraz pomiarów po podaniu OLDA.



Rys. 4.2.3. Czulość hipoksyjna przed i po podaniu OLDA; linia ciągła – kontrola, linia kropkowana – OLDA. Istotność różnic pomiędzy punktami szczytowej wentylacji dla obu poziomów hipoksji została podana na Rys. 4.2.1. i 4.2.2. Różnice nachyleń linii regresji pomiędzy odpowiedziami nie były znamienne statystycznie w porównaniach testem Wilcoxon (n=8).

Podsumowanie

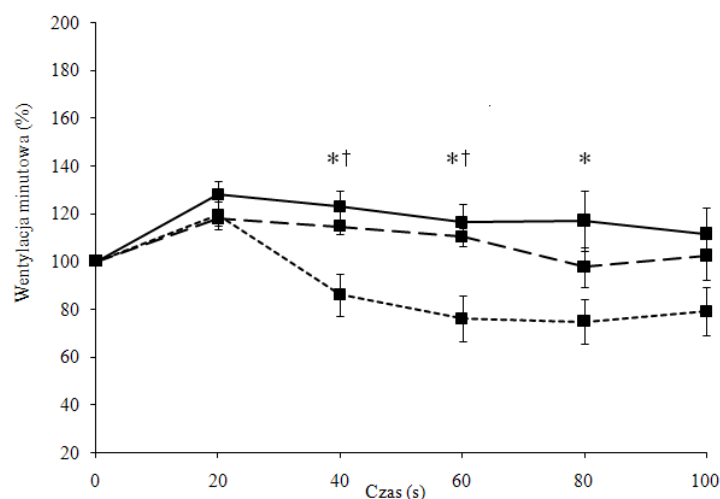
Na podstawie powyższych obserwacji stwierdzam, że OLDA obniża odpowiedź oddechową na hipoksję. Zmiany te zachodzą na poziomie częstości, która maleje. Mimo, że komponenta objętościowa wzrasta, nie jest w stanie skompensować spadku częstości. W wyniku tego ekwiwalent wentylacji minutowej ulega obniżeniu. OLDA nie zmienia jednak czulości hipoksyjnej, zatem nie upośledza zdolności kłębków do generowania odpowiedzi na hipoksję.

4.2.2. WPLYW OLDA NA ODPOWIEDŹ ODDECHOWĄ NA HIPOKSJĘ PO PODANIU HALOPERIDOLU (HAL)

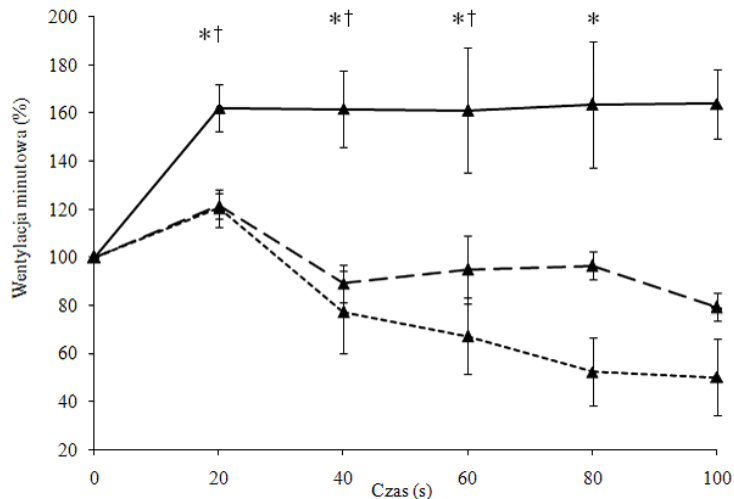
Przebieg odpowiedzi oddechowej na hipoksję

Odpowiedzi oddechowe na hipoksję miały w tej części eksperymentu także, generalnie, przebieg dwufazowy. W kontroli szczytowa wentylacja minutowa odpowiedzi oddechowej na hipoksję wzrosła w stosunku do wartości wyjściowych o 28 ± 6 i $62 \pm 10\%$, odpowiednio dla 14 i 11% hipoksji ($p < 0,05$; n=10). Po podaniu HAL, który jest

niespecyficznym blokerem receptorów dopaminowych przenikającym przez barierę krew-mózg, wzrost odpowiedzi oddechowej był mniejszy, aczkolwiek pozostał istotny, o 18 ± 3 i $22 \pm 5\%$, dla 14 i 11% hipoksji ($p < 0,005$; $n=10$). Podanie OLDA po HAL spowodowało maksymalny wzrost odpowiedzi oddechowej o 20 ± 6 i $20 \pm 8\%$, dla 14 i 11% hipoksji ($p < 0,05$; $n=10$). Wzrost ten odpowiadał więc temu, który był po samym HAL. Nie obserwowałam już obniżania szczytowej odpowiedzi oddechowej po podaniu OLDA na tle haloperidolu, które było obecne bez użycia antagonisty. OLDA obniżała jednak odpowiedzi oddechowe w drugiej, depresyjnej fazie działania hipoksji. Zmiany oddechowe, podobnie do poprzednio opisanych bez użycia antagonisty dopaminowego, zachodziły głównie w wyniku zmian częstości oddychania, przy mniejszym udziale komponenty objętościowej. Profile odpowiedzi oddechowej na poziomie ekwiwalentu wentylacji minutowej przedstawiłam na Rys. 4.2.4. (14% bodziec hipoksyjny) i 4.2.5. (11% bodziec hipoksyjny).



Rys. 4.2.4. Odpowiedź oddechowa szczura na 14% hipoksję; linia ciągła – kontrola, linia przerywana – HAL; linia kropkowana – OLDA. * $p < 0,05$ (różnica między 3 badanymi punktami odpowiadającymi różnym środkom farmakologicznym, w poszczególnych kolejnych punktach czasowych - test nieparametrycznej analizy wariancji Friedmana); † $p < 0,05$ (różnica między kontrolą a HAL oraz kontrolą a OLDA dla sparowanych punktów - test Wilcoxon) ($n=10$).



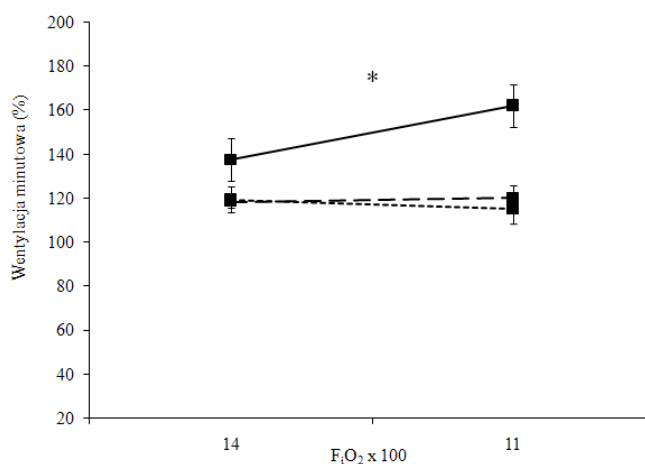
Rys. 4.2.5. Odpowiedź oddechowa szczura na 11% hipoksję; linia ciągła – kontrola, linia przerywana – HAL; linia kropkowana – OLDA. * $p < 0,05$ (różnica między 3 badanymi punktami odpowiadającymi różnym środkom farmakologicznym, w poszczególnych kolejnych punktach czasowych - test nieparametrycznej analizy wariancji Friedmana); † $p < 0,05$ (różnica między kontrolą a HAL oraz kontrolą a OLDA dla sparowanych punktów - test Wilcoxon) (n=10).

Różnice w oddychaniu po zastosowanych środkach farmakologicznych zachodziły ponownie w wyniku zmian częstości przy stosunkowo nieznacznych, ok. 10% wahaniach kompensacyjnych w komponentcie objętościowej. Częstość oddechów na minutę, kolejno w kontroli i dalej po podaniu HAL i OLDA, wzrastała o 14 ± 5 , 4 ± 2 i $7 \pm 3\%$ oraz o 33 ± 7 , 6 ± 2 i 0% w punkcie szczytowej stymulacji oddychania w odpowiedzi, odpowiednio, na 14 i 11% hipoksję. Wzrosty częstości w kontrolnych odpowiedziach na oba poziomy hipoksji były istotne ($p < 0,05$; n=10). Istotność ta uległa zatarciu przy zmniejszonej odpowiedzi częstotliwościowej po podaniu HAL. OLDA nie spowodowała dalszych istotnych zmian w szczytowej odpowiedzi częstości oddychania.

Czułość hipoksyjna

Na podstawie porównań różnic maksymalnych odpowiedzi oddechowych pomiędzy oboma poziomami bodźca pomiędzy poszczególnymi układami farmakologicznymi (kontrola, HAL i OLDA) określiłam zmiany czułości hipoksyjnej. Nachylenia linii regresji liniowej łączącej szczytowe odpowiedzi oddechowe na poziomie

ekwiwalentu wentylacji minutowej różniły się w znaczący ($p < 0,05$; $n = 10$) sposób pomiędzy odpowiedziami kontrolnymi, z jednej strony i po podaniu HAL i OLDA, z drugiej. Nie zaobserwowałam różnic w nachyleniach tych linii pomiędzy HAL i OLDA. Podanie HAL zaburzyło zatem czułość hipoksyjną, niezmienną dalej po podaniu OLDA. Wykres 4.2.6. przedstawia ilustrację czułości hipoksyjnej pomiarów kontroli, po podaniu HAL oraz po podaniu OLDA.



Rys. 4.2.6. Czułość hipoksyjna przed i po podaniu OLDA na tle HAL; linia ciągła – kontrola, linia przerywana – HAL; linia kropkowana – OLDA. Istotność różnic pomiędzy punktami szczytowej wentylacji dla obu poziomów hipoksji została podana na Rys. 4.2.4. i 4.2.5. Nachylenia linii regresji opisujących odpowiedzi na obu poziomach bodźca różniły się znamienne między kontrolą, z jednej strony a HAL i OLDA, z drugiej ($*p < 0,05$). Nie stwierdzono różnic między HAL i OLDA – test Wilcozona dla sparowanych punktów ($n = 10$).

Podsumowanie

HAL znosi hamujące działanie OLDA na szczytową wentylację minutową, obserwowane w warunkach bez podania tego antagonisty dopaminowego. Hamujące działanie OLDA utrzymuje się w drugiej depresyjnej fazie odpowiedzi na hipoksję.

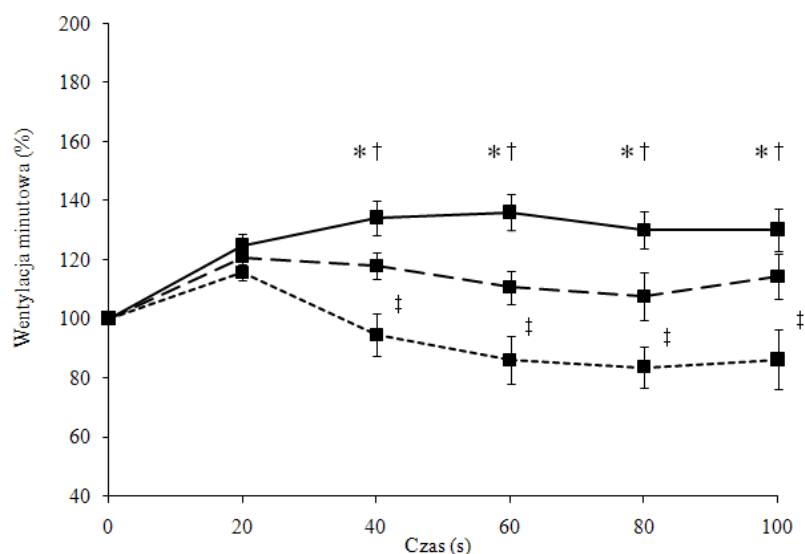
Sam HAL obniża odpowiedź oddechową na hipoksję. Zjawisko to zachodzi na poziomie częstości, która maleje. Podanie HAL także osłabia czułość hipoksyjną, czyli upośledza zdolności kłębków szyjnych do generowania pobudzającej odpowiedzi na bodziec. Dalsze podanie OLDA nie zmienia ani nie przywraca profilu czułości hipoksyjnej.

4.2.3. WPLYW OLDA NA ODPOWIEDŹ ODDECHOWĄ NA HIPOKSJĘ PO PODANIU DOMPERIDONU (DOM)

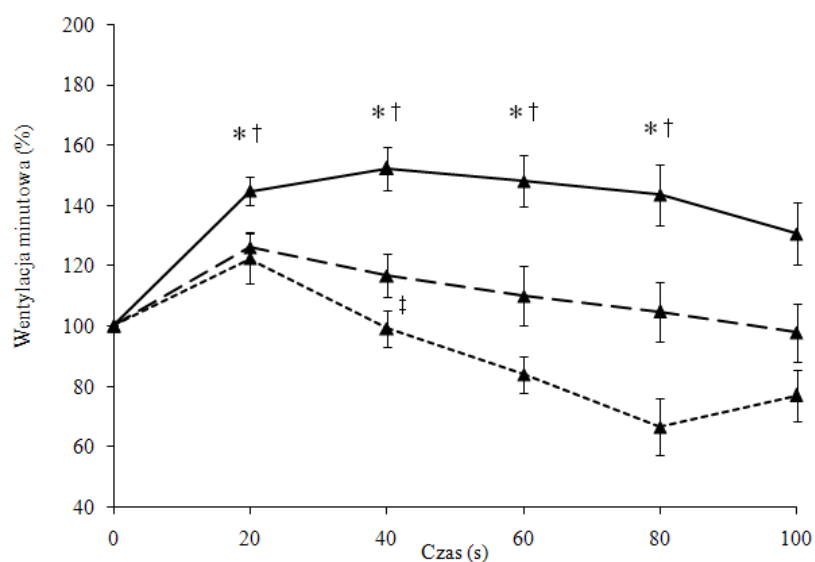
Przebieg odpowiedzi oddechowej na hipoksję

W pomiarach kontrolnych szczytowa odpowiedź oddechowa na poziomie ekwiwalentu wentylacji minutowej wzrosła znacząco w stosunku do wartości wyjściowych o (odpowiednio dla 14 i 11% hipoksji) o 25 ± 4 i $45 \pm 5\%$ ($p < 0,05$; $n=18$). Podanie DOM, który jest specyficznym blokerem receptorów dopaminowych, nieprzechodzącym przez barierę krew-mózg, spowodowało osłabienie odpowiedzi oddechowej na hipoksję. Nastąpiło też zmniejszenie szczytowego hipoksyjnego wzrostu oddychania, w porównaniu z kontrolą bez domperidonu, choć wzrost ten pozostał nadal istotny statystycznie o $21 \pm 5\%$ dla 14% hipoksji i $26 \pm 5\%$ dla 11% hipoksji ($p < 0,05$; $n=18$). Po podaniu OLDA na tle DOM, szczytowa hipoksyjna odpowiedź oddechowa była nieznamiennie niższa, w porównaniu do odpowiedzi na sam DOM, pozostając ciągle znamiennej statystycznie w stosunku do wartości wyjściowej – obserwowaliśmy wzrosty o $16 \pm 3\%$ dla 14% hipoksji i o $22 \pm 8\%$ dla 11% hipoksji ($p < 0,01$; $n=18$). DOM nie znosił jednak hamującego działania OLDA w drugiej, depresyjnej fazie odpowiedzi. Profile hipoksyjnych odpowiedzi oddechowych przedstawiłam na Rys. 4.2.7. i Rys. 4.2.8.

Zmiany oddechowe zachodziły ponownie głównie za pośrednictwem zmian częstości, przy mniejszym udziale komponenty objętościowej. Liczba oddechów na minutę wzrastała o (odpowiednio dla kontroli, podania DOM i podania OLDA) o 14 ± 4 , 10 ± 5 i $5 \pm 3\%$ dla 14% hipoksji oraz 24 ± 6 , 9 ± 4 i $7 \pm 2\%$ dla 11% hipoksji. Wzrosty częstości były znamienne dla obu poziomów bodźca zarówno w odpowiedziach kontrolnych ($p < 0,005$; $n=18$) jak i po podaniu DOM ($p < 0,05$; $n=18$). Po podaniu OLDA znamienność wystąpiła jedynie przy 14% hipoksji.



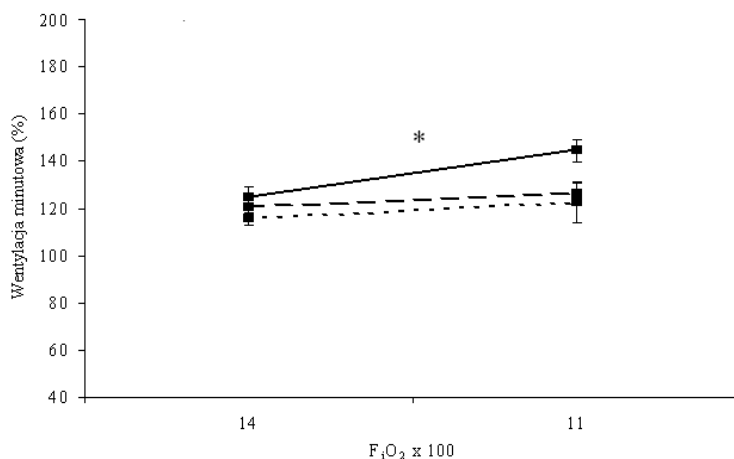
Rys. 4.2.7. Odpowiedź oddechowa szczura na 14% hipoksję; linia ciągła – kontrola, linia przerywana – DOM; linia kropkowana – OLDA. * $p < 0,001$ (różnica między 3 badanymi punktami odpowiadającymi różnym środkom farmakologicznym w poszczególnych kolejnych punktach czasowych - test nieparametrycznej analizy wariancji Friedmana); † $p < 0,05$ (różnica między kontrolą a DOM oraz kontrolą a OLDA dla sparowanych punktów – test Wilcoxona); ‡ $p < 0,05$ (różnica między DOM a OLDA dla sparowanych punktów – test Wilcoxona) (n=18).



Rys. 4.2.8. Odpowiedź oddechowa szczura na 11% hipoksję; linia ciągła – kontrola, linia przerywana – DOM; linia kropkowana – OLDA. * $p < 0,005$ (różnica między 3 badanymi punktami odpowiadającymi różnym środkom farmakologicznym, w poszczególnych kolejnych punktach czasowych - test nieparametrycznej analizy wariancji Friedmana); † $p < 0,05$ (różnica między kontrolą a DOM oraz kontrolą a OLDA dla sparowanych punktów – test Wilcoxona); ‡ $p < 0,05$ (różnica między DOM a OLDA dla sparowanych punktów – test Wilcoxona) (n=18).

Czułość hipoksyjna

Podobnie jak w pozostałych grupach, również i tu określiłam zmiany czułości hipoksyjnej. Porównałam nachylenia linii regresji liniowej łączącej szczytowe minutowe odpowiedzi oddechowe. Nachylenie różniły się znacząco pomiędzy kontrolą a DOM ($p < 0,05$; $n = 18$). Nie różniły się natomiast po podaniu OLDA na tle DOM. Jednocześnie nie zaobserwowałam znamienych statystycznie w nachyleniach prostych pomiędzy kontrolą, a OLDA. Podanie DOM zmniejszyło czułość hipoksyjną, przywróconą następnie podaniem OLDA. Wykres 4.2.9. ilustruje czułość hipoksyjną pomiarów kontroli, po podaniu DOM oraz po podaniu OLDA.



Rys. 4.2.9. Czułość hipoksyjna przed i po podaniu OLDA na tle DOM; linia ciągła – kontrola, linia przerywana – DOM; linia kropkowana – OLDA. * $p < 0,05$ pomiędzy nachyleniami dla kontroli i DOM (test Wilcoxon) ($n = 18$).

Podsumowanie

DOM znosi hamujące działanie OLDA na szczytową hipoksyjną wentylację minutową; jednak nie ma wpływu na jej hamujące działanie w drugiej, depresyjnej fazie odpowiedzi. Podanie DOM znosi różnice pomiędzy szczytowymi odpowiedziami na hipoksję wraz ze wzrostem siły bodźca – upośledza zatem zdolność kłębków szyjnych do generowania pobudzającej odpowiedzi na hipoksje. Dalsze podanie OLDA nie ma wpływu na czułość hipoksyjną.

Podsumowanie części fizjologicznej

Z przeprowadzonych w niniejszej części badań, wynika, że OLDA obniża obie fazy, pobudzeniową i depresyjną, odpowiedzi oddechowych na hipoksję. Użycie antagonistów dopaminowych, przechodzącego do mózgu, czy działającego specyficznie na obwodzie, znosi hamowanie szczytowego osłabienia oddychania przez OLDA, ale nie wpływa na jej hamujące działanie na oddychanie w fazie depresyjnej. Ponieważ kłębki szyjne, leżące na obwodzie, generują pobudzeniową odpowiedź oddechową na hipoksję, wyniki wskazują na oddziaływanie OLDA głównie na mechanizmy kłębkowe zachodzące za pośrednictwem zablokowanych receptorów dopaminowych.

OLDA oddziałuje także na fazę depresyjną odpowiedzi oddechowej na hipoksję, bez względu na rodzaj blokady układu dopaminergicznego. Implikuje to rolę kłębków szyjnych w przebiegu tej fazy, którą większość badaczy, ale nie wszyscy, podporządkowuje hipoksyjnej depresji ośrodkowego układu nerwowego. Alternatywą jest oddziaływanie OLDA na hipoksyjną fazę depresyjną poprzez układy neuroprzekaźnikowe inne niż dopaminergiczne.

5. DYSKUSJA

Dopamina należy do podstawowych neuroprzekaźników w tkance nerwowej. Jednak wiedza na temat mechanizmów jej działania w wytwarzaniu odpowiedzi na bodźce jest z reguły ograniczona. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy jest jej hydrofilowość i w związku z tym niemożność przenikania przez bariery biologiczne. Ostatnio odkryto nową klasę związków lipidowych, zwanych dopamidami, będących produktami kondensacji dopaminy i kwasów tłuszczowych poprzez wiązanie amidowe. Możliwość ich istnienia została przewidziana kilka lat temu przez Pokorskiego i Matysiaka (1). W ostatnich latach wykryto ich endogenną obecność w mózgach ssaków (4,5). Wiedza na temat właściwości oraz fizjologicznej roli tych związków jest ograniczona i stopniowo odkrywana. N-oleinoilo-dopamina (OLDA), przedmiot badań niniejszej pracy, jest jednym z bardziej aktywnych biologicznie związków tej klasy.

Wykonane przeze mnie badania nad właściwościami i możliwą fizjologiczną rolą OLDA składają się z części biochemicznej wykonanej *in vitro* i części fizjologicznej, wykonanej *in vivo*. W badaniach *in vitro* starałam się określić podstawowe właściwości biochemiczne OLDA, takie jak zdolność do przenikania przez błony i bariery biologiczne, stabilność w roztworach nieorganicznych i organicznych będących modelami układów fizjologicznych, podatność na utlenianie oraz możliwość ulegania reakcji O-metylacji, będącej częścią szlaku metabolicznego dopaminy. Ponadto, starałam się umiejscowić te właściwości w kontekście możliwej fizjologicznej roli tego związku, w szczególności związanej z regulacyjnymi i sygnałowymi właściwościami dopaminy, której struktura stanowi część związku. Do badań fizjologicznych wybrałam układ oddechowy, w którego czynności dopamina odgrywa zasadniczą rolę. Jest ona bowiem podstawowym neuroprzekaźnikiem w czynności chemorecepcyjnej kłębków szyjnych, czuciowych organów odpowiedzialnych za generowanie odpowiedzi oddechowej na bodziec

hipoksyjny, a także bierze zasadniczy udział w oddziaływaniach receptorowych na poziomie pnia mózgu, w którym umiejscowiona jest neuronalna sieć oddechowa.

5.1. Badania *in vitro*

Badania *in vitro* wykazały, że OLDA przenika do tkanki nerwowej szczura po podaniu dootrzewnowym. Stwierdziłam, że OLDA występowała we frakcji lipidowej oraz błonowej homogenatu mózgu szczura po 1, 2, 3 i 24 godz. od podania. Wskazuje to na jej znaczną stabilność w warunkach *in vivo*. Ponadto stwierdziłam, że OLDA wykazuje w warunkach nieorganicznego buforu Krebsa stabilność zbliżoną do stabilności dopaminy. Jednocześnie pozostaje niezmienną w układzie błonowym homogenatu mózgu szczura przez 17 godzin. Usunięcie z układu jonów wapnia bądź zastąpienie układu błonowego układem cytozolowym zwiększa stabilność OLDA do ponad 24 godz., czyli do wartości uzyskanych *in vivo*. Utlenianie OLDA zachodzi wolniej niż dopaminy. Proces ten dodatkowo spowalnia brak jonów Ca^{2+} . Poza tym, układ błonowy chroni OLDA przed utlenianiem – jej stabilność w warunkach utleniających jest porównywalna do stabilności w warunkach nieutleniających. Badania wykazały również, że OLDA ulega *in vitro* reakcji O-metylacji za pośrednictwem katecholo-O-metylotransferazy do O-Me-OLDA.

Pierwszą, zasadniczą częścią badań było stwierdzenie przenikania OLDA do tkanki nerwowej szczura po podaniu dootrzewnowym. Wykazałam, że wiąże się ona z tkanką nerwową mózgu na poziomie błon komórkowych, w których pozostaje stabilna przez przynajmniej 24 godz. Obserwacje te są w zgodzie z doniesieniami Pokorskiego i wsp. (6, 57), który pokazał, że OLDA przenika po podaniu dożylnym i dotętnicznym do kłębków szyjnych oraz do mózgu. Oszacowana przez niego wydajność przenikania wynosiła ok. 6%; uzyskana przeze mnie wydajność była wystarczająca do przeprowadzenia analiz chromatograficznych.

Pojawia się pytanie, czy uzyskane przeze mnie wyniki są związane ze sposobem podania (stosowane przeze mnie podanie dootrzewnowe nie „prowadzi” związku bezpośrednio do mózgu, jak to ma miejsce przy podaniu dotętnicznym), czy też z samą naturą związków. Dotychczas stwierdzono jedynie obecność N-acylo-dopamin, w tym OLDA, w ustroju (4, 5). Oznacza to, że N-acylo-dopaminy są trwale przynajmniej przez czas wykonania oznaczenia. Może to wynikać albo z ich wysokiej stabilności albo z ciągłej ich syntezy i rozkładu. Huang i wsp. (5) wspomina o rozkładzie N-arachidonylo-dopaminy, innej przedstawicielki tej klasy związków, na dopaminę i kwas arachidonowy *in vitro*. Nie zostało to potwierdzone przeze mnie dla OLDA, która nie rozpada się ani w układzie nieorganicznego buforu ani w układzie homogenatu mózgu szczura *in vitro*. Jedyną różnicą pomiędzy tymi dwoma związkami jest reszta kwasu tłuszczowego.

Znaczna (24-godz.) stabilność OLDA *in vivo* może być związana z faktem, że, w przeciwieństwie do lipidowych pochodnych innych amin biogennych, nie jest ona rozkładana za pośrednictwem hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych (FAAH) (4). Epps i Cardin (58) wskazują na oddziaływanie oleinowej pochodnej innej aminy bioaktywnej, etanoloaminy, z błonami. Etanoloamina wiąże się z dwuwarstwą lipidową tworząc trwałe kompleksy; jednocześnie wbudowywanie się tych układów nie zaburza ciągłości błony. Zatem być może znaczna trwałość OLDA w układzie błonowym jest związana z obecnością reszty kwasu oleinowego.

Jednak jaka jest przyczyna tak znacznej trwałości OLDA? Jakie czynniki mogą na nią wpływać? Aby to stwierdzić wyznaczyłam stabilność OLDA *in vitro* w układach imitujących warunki fizjologiczne. Były to: bufor Krebsa (jako imitacja płynu zewnątrzkomórkowego), zawiesina błon homogenatu mózgu szczura (jako imitacja układu błonowego *in vivo*) oraz zawiesina cytozolu homogenatu mózgu szczura (jako imitacja układu wewnątrzkomórkowego). Zaobserwowałam zmniejszoną, w stosunku do układu *in*

vivo, stabilność OLDA w badanych modelach. W nieorganicznym buforze Krebsa stabilność OLDA była porównywalna ze stabilnością dopaminy i wynosiła ok. 4 godzin. Wyniki dla dopaminy są zgodne z wynikami przedstawionymi przez Marien i wsp. (29). Wyznaczona przez niego stabilność DA w buforze Krebsa-Henselheita wynosi ok. 3 godzin. Rozbieżności są najprawdopodobniej spowodowane niewielkimi różnicami w składzie buforu oraz zastosowaniem różnych technik analitycznych. W związku z podobną stabilnością zarówno OLDA jak i dopaminy, należy przypuszczać, że za rozkład OLDA w buforze Krebsa jest odpowiedzialna reszta dopaminy. Ponadto reszta kwasu oleinowego, jako grupa praktycznie bierna, nie jest w stanie ani oddziaływać z żadnym ze składników buforu, ani ulec utlenieniu w tak krótkim czasie.

W kolejnych, błonowych i cytozolowych modelach, stabilność OLDA była już bliższa stabilności *in vivo*. W zawiesinie błon homogenatu mózgu szczura wzbogaconej jonami wapnia w stężeniach fizjologicznych OLDA wykazywała stabilność na poziomie 17 godzin. W pozostałych badanych układach (zawiesina błon pozbawiona jonów wapnia, frakcja cytozolowa homogenatu mózgu szczura pozbawiona i wzbogacona o jony wapnia w stężeniu fizjologicznym) stabilność wzrosła do (przynajmniej) 24 godzin, tj. do wartości obserwowanej dla układu *in vivo*. Jest kilka możliwych przyczyn tych różnic:

- (a) nieobecność w układzie błonowym *in vivo* jonów wapnia;
- (b) przenikanie przez i/lub wbudowywanie się OLDA w błony komórkowe w ten sposób, że główna, najaktywniejsza chemicznie grupa funkcyjna związku (reszta dopaminy), jest skierowana w stronę cytozolu, układu o mniejszym stężeniu wapnia;
- (c) obecności zarówno w układach *in vitro* (błonowym bez wapnia, cytozolowych), jak i w układzie *in vivo* dodatkowych czynników stabilizujących OLDA.

Przyczyna podana w podpunkcie (a) wydaje się mało prawdopodobna. W literaturze (42, 59) przyjmuje się praktycznie stały skład płynu zewnątrzkomórkowego (w tym płynu mózgowo-rdzeniowego i osocza krwi) w całym ustroju ze stężeniem wolnych jonów wapnia równym 2,5 mmol/l. Oznacza to, że poza wnętrzem komórki nie spotyka się układów pozbawionych jonów wapnia. Nie ma również struktur wiążących zewnątrzkomórkowo wapń – wolne jony wapnia są potrzebne do prawidłowego funkcjonowania m.in. tkanki nerwowej.

Wydaje się, że możliwe wytłumaczenia obserwowanego efektu są podane w punkcie (b). OLDA mogłaby być „absorbowana” przez komórki na zasadzie endocytozy. W tym przypadku OLDA musiałyby być „wylapywana” przez pęcherzyk znajdujący się w przestrzeni międzykomórkowej, a który następnie wbudowywałby się w błonę komórkową. W takim przypadku dopaminowa główka OLDA znajdowałaby się w wnętrzu komórki, w środowisku o znikomym stężeniu wapnia, zaś jej lipidowy ogon – w błonie komórkowej. Taki sposób wbudowywania się pęcherzyka w błonę komórkową jest możliwy z teoretycznego punktu widzenia (13). Jednocześnie opisany powyżej model oddziaływania OLDA z błonami nie wyklucza jej dopamino-podobnego działania – OLDA nadal byłaby obecna w przestrzeni międzykomórkowej, gdzie mogłaby oddziaływać z receptorami dopaminowymi.

Innym możliwym wyjaśnieniem obserwowanych różnic w stabilności OLDA w opisanych tu układach wydaje się przyczyna podana w podpunkcie (c). W układzie *in vitro* stabilność w błonach mogła być zależna tylko i wyłącznie od obecności jonów wapnia w roztworze. We frakcji cytozolowej nie zaobserwowałam znaczących zmian w stabilności (niezależnie od obecności jonów wapnia) wynoszącej powyżej 24 godzin. Warto jednak zauważyć, że siła jonowa buforu Krebsa jest ponad dziesięciokrotnie większa niż buforu izolacyjnego, który był głównym składnikiem frakcji cytozolowej. Ponadto, taki roztwór

charakteryzuje się innym składem białek, co też może wpływać na stabilność OLDA. Być może właśnie obecność białek jest czynnikiem stabilizującym OLDA. Zgodnie z pracą Marien i wsp. (29), dopamina jest stabilniejsza w medium wykorzystywanym w hodowlach tkankowych i zawierającym między innymi białka. Jednocześnie ten sam autor wskazuje na możliwość zachodzenia reakcji utleniania w układzie – dodanie do mieszaniny reakcyjnej przeciwutleniaczy zwiększało stabilność dopaminy.

Dlatego kolejnym etapem badań było określenie zachowania się OLDA w obecności warunków utleniających, występujących niekiedy w warunkach fizjologicznych. W nieorganicznym zmodyfikowanym buforze Krebsa, stabilność OLDA w warunkach utleniających jest nieznacznie większa niż dopaminy (2 i 3 godziny dla OLDA odpowiednio w obecności i pod nieobecność jonów wapnia oraz 1 i 2 godziny dla DA odpowiednio w obecności i pod nieobecność jonów wapnia). Oznacza to, że w reakcji utleniania, jakiej niewątpliwie ulega również OLDA, główną rolę odgrywa reszta dopaminowa cząsteczki. Pojawia się pytanie, czy różnice w trwałości w roztworze wzbogaconym i pozbawionym jonów wapnia są różnicami znaczącymi, czy raczej wynikającymi ze sposobu przeprowadzenia doświadczenia.

OLDA inkubowana zarówno w błonach uprzednio utlenionych, jak i poddana utlenianiu po wbudowaniu się w błony, ma zbliżoną (z dokładnością do 1-2 godzin) stabilność bez względu na obecność jonów wapnia. Ta wartość jest zbliżona do wartości uzyskanej w warunkach nieutleniających. Obserwacje te wskazują na ochronne działanie błon. W związku z tym, że reakcja utleniania zachodzi głównie na fragmencie dopaminowym, ochronne działanie błon (utlenionych lub nie) powinno polegać na zablokowaniu dostępu reszty dopaminy do utleniacza. Byłoby to możliwe tylko w przypadku, gdyby główka dopaminy znajdowała się we wnętrzu micelli tworzących się zarówno z utlenionych, jak i nieutlenionych błon.

Zatem czynnikiem stabilizującym OLDA w układach *in vitro* może być nieobecność jonów wapnia oraz skład chemiczny otoczenia, ze szczególnym uwzględnieniem jego siły jonowej oraz obecności białek, a także układów micelarnych. W związku z tym, że w każdym z układów (błonowym i cytozolowym) były obecne jony magnezu (w stężeniu odpowiednio 1, 2 i 2,5 mmol/l) należy przyjąć, że zaobserwowane tu różnice nie są związane ze stężeniem tych jonów.

Skoro czynniki wpływające na stabilność OLDA zostały wstępnie określone, nasunęło się pytanie o możliwości metabolizmu badanego przez mnie związku. OLDA, jak każda inna molekula w ustroju, musi zostać wytworzona i, po wypełnieniu swojej roli, przekształcona w nieaktywną formę. Czy OLDA może uczestniczyć w szlakach metabolicznych dopaminy, będącej jedną z jej składowych? Dopamina jako taka ulega rozkładowi za pośrednictwem dwóch enzymów: katecholo-O-metylotransferazy (COMT) i monoaminooksydazy (MAO). W ustroju występują dwa szlaki: pierwszy aktywuje wpierw COMT, potem zaś MAO, drugi zaś wpierw MAO, a następnie COMT. Oba prowadzą do tego samego produktu: kwasu homowanilinowego. W przypadku OLDA, szlak wymagający MAO nie jest możliwy ze względu na zablokowaną grupę aminową (MAO utlenia grupę aminową). O ile szlak metaboliczny OLDA jest związany ze szlakiem dopaminy, jedynym możliwym enzymem przekształcającym OLDA, byłby COMT. Dlatego celem moich badań była również możliwość O-metylacji OLDA za pośrednictwem COMT. Kolejną podstawą podjęcia przez mnie tych badań były doniesienia Huang i wsp. (5) na temat O-metylacji NADA do O-metylopochoďnej za pośrednictwem COMT *in vitro* na układach komórkowych. Chu i wsp. (4) postulują jednocześnie podobny mechanizm inaktywacji dla OLDA. W niniejszej pracy wykazałam, że O-metylacja OLDA *in vitro* jest możliwa. Nasuwa się pytanie, czy taka O-metylacja zachodzi *in vivo*. Z jednej strony COMT szeroko występuje w ustroju, zaś OLDA zawiera

w swojej strukturze aminę katecholową, która jest substratem dla COMT. Nic nie stoi zatem na drodze O-metylacji OLDA. Z drugiej strony zaś nie wykryto obecności O-metylo pochodnych ani w doświadczeniach Huang i wsp. (5) ani Chu i wsp. (4). Na widmach masowych nie pokazano pików o masie większej o 14 jednostek od związków wyjściowych.

Jest kilka możliwości:

- (a) O-metylo-pochodne zostały zatrzymane na kolumnie podczas oczyszczania;
- (b) O-metylo-pochodne dopaminy ulegają fragmentacji w identyczny sposób, co niezmetylowane pochodne;
- (c) O-metylo-pochodne nie występują w badanych strukturach mózgu.

Najmniej prawdopodobna wydaje się możliwość (b) – grupa katecholowa nie ulega fragmentacji (4), bądź odszczepia grupę hydroksylową w pozycji 4 (5). Obecność grupy metoksy w pozycji 4 nie jest możliwa w wyniku O-metylacji za pośrednictwem COMT – enzym ten metyluje układy katecholowe praktycznie tylko w pozycji 3 (60). Możliwość pierwsza nie podlega dyskusji ze względu na brak dostępu do dokładnych procedur doświadczalnych wykorzystanych przez zespoły. Najciekawsza jest ostatnia z możliwości – nieobecność O-metylo-pochodnych dopamidów w układzie. Wydaje się to poniekąd sprzeczne z naturą. Każdy związek obecny w ustroju ulega zarówno syntezie jak i rozkładowi. O ile istnieją doniesienia odnośnie biosyntezy N-arachidonilo-dopaminę (NADA) (5), sugestie odnośnie biosyntezy OLDA (4), o tyle na temat rozkładu dopamidów niewiele wiadomo. Hydrolaza amidów wyższych kwasów tłuszczowych (FAAH) wprawdzie rozkłada NADA do kwasu arachidonowego i dopaminy (jednak znaczenie wolniej niż rozkłada np. anandamid), jednak nie rozkłada OLDA (4). Oznacza to, że NADA może być metabolizowana zgodnie z metabolizmem dopaminy (przy czym kwas arachidonowy wracałby do układu). W OLDA grupa aminowa jest nadal

zablokowana, zatem reakcje szlaku związanego z monoaminooksydazą (MAO) nie mogą zachodzić. Jediną możliwością metabolizmu OLDA jest zatem O-metylacja w pozycji 3 pierścienia katecholowego. Teoretycznie jest to możliwe – reakcja zachodzi *in vitro*, co wykazałam w niniejszej pracy. Jednak nie ma doniesień na temat obecności O-metylo-pochodnych dopamidów w ustroju, mimo, że ich struktura jest bardzo podobna do struktury wanilloidów, a one same, szczególnie zaś OLDA, oddziałują za pośrednictwem receptorów wanilloidowych. Czy jest możliwe, by dany związek istniał w tkance nie będąc jednocześnie metabolizowanym? A może istnieje inny szlak rozpadu? Patrząc na strukturę OLDA wydaje się to mało prawdopodobne. Jedynymi grupami mogącymi brać udział w ewentualnych przekształceniach są: grupa amidowa, która, jak dowiedziono *in vitro* w przypadku OLDA, nie ulega rozpadowi, a także grupy hydroksylowe dopaminy. O-metylacja w pozycji 4 za pośrednictwem COMT jest niemożliwa (25, 60), zaś nie stwierdza się produktu „dozwolonej” O-metylacji. Jedną z możliwości wydaje się utlenienie pierścienia dopaminowego do pochodnej chinonu dopaminy, zaproponowane przez Smithies i Galzigna (28). Autorzy ci wskazują za Costa i wsp. (61) na obecność chinonu dopaminy (układu, w którym grupy hydroksylowe dopaminy zostały utlenione do grup ketonowych) w mózgu. Jednocześnie też zaznacza, że w mózgach szczurów nie występuje neuromelanina (końcowy produkt utleniania i kondensacji dopaminy). Czy zatem układ chinonu był ostatecznym produktem przemiany (na drodze utlenienia) dopaminy u szczura, a co za tym idzie również N-acylo-pochodnych? Nie rozważam w tym miejscu reszty kwasu oleinowego, jako że sam kwas jest stosunkowo bierny w ustroju. Ale jak wtedy wytłumaczyć tak znaczną trwałość OLDA, skoro reakcje tworzenia chinonów zachodzą stosunkowo szybko? Inną możliwością wytłumaczenia nieobecności O-Me-OLDA w tkance nerwowej jest jej rozkład w wątrobie. Wehmeyer i wsp. (62) podaje, że olvanil (N-(3-metoksy-4-hydroksybenzylo)oleamid, oleinowa pochodna aminy

mającej o jeden atom węgla mniej pomiędzy grupą aminową i pierścieniem) ulega rozkładowi w wątrobie na drodze hydrolizy wiązania amidowego. Taka droga byłaby możliwa, o ile związek przechodziłby z tkanki nerwowej do krwi.

Nasuwa się pytanie, czy taka droga metabolizmu byłaby też możliwa w przypadku OLDA. W tym miejscu rozważam jednak nie egzogenną OLDA (dla której stabilność określałam w przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach), ale endogenną, wyprodukowaną przez sam organizm. Cały proces syntezy OLDA powinien zachodzić w tym samym miejscu, co synteza dopaminy i przebiegać zgodnie z sugestiami Chu i wsp. (4). Następnie, OLDA mogłaby ulegać usunięciu z komórki do przestrzeni międzysynaptycznej za pośrednictwem egzocytozy. Dalsze jej losy mogłyby polegać na oddziaływaniu z zadaniem układem receptorowym, a następnie przeniknięciu do układu krwionośnego. Jej rozkład następowałby wtedy, zgodnie z (62), w wątrobie. Oczywiście, są to tylko przypuszczenia czysto teoretyczne. Ich potwierdzenie bądź odrzucenie wymagałoby zastosowania związków znakowanych izotopowo. Przekraczało to jednak zakres niniejszej pracy.

Reasumując, OLDA wykazuje znaczną stabilność, wielokrotnie przekraczającą stabilność dopaminy. Powszechnie znane jest jej działanie dopamino- (7) i wanilloido-(4) podobne. Jednocześnie oba te typy receptorów, zarówno dopaminowe (33, 34), jak i wanilloidowe (63), są zaangażowane w czynność układu oddechowego. Z tych powodów, podjęłam badania nad fizjologiczną rolą OLDA *in vivo* na chemiczną regulację oddychania, na przykładzie jej oddziaływania na odpowiedź oddechową na bodziec hipoksyjny.

6.2. Badania *in vivo*

Odpowiedź oddechowa na bodziec hipoksyjny zachodzi zazwyczaj dwufazowo (44, 45). Pierwsza, pobudzeniowa, faza charakteryzuje się wzrostem wentylacji minutowej głównie za sprawą jej komponenty częstotliwościowej (45, 64). Jej powstawanie jest przypisywane aktywacji struktur chemoczułych na poziomie kłębków szyjnych (46, 65), w których głównym neuroprzekaźnikiem jest dopamina (52). Druga, depresyjna faza odpowiedzi (zwana też „roll-off”), charakteryzuje się spadkiem wentylacji minutowej. Przypuszcza się, że jej powstawanie ma ośrodkowy charakter (66, 67). Jednocześnie nie ma zgodności, co do układu receptorowego zaangażowanego w tę fazę.

Przeprowadzone przeze mnie badania *in vivo* wykazały, że podanie OLDA obniżyło odpowiedzi oddechowe na hipoksję w obu jej fazach. Zmiany zachodziły głównie na poziomie komponenty częstotliwościowej. Ponadto OLDA nie zmieniła chemoczułości kłębków szyjnych – wzrost szczytowej odpowiedzi oddechowej wraz ze wzrostem siły bodźca miał podobny przebieg jak w doświadczeniach kontrolnych. Podanie antagonistów receptorów dopaminowych D₂, zarówno obwodowo-ośrodkowych (HAL), jak i selektywnie obwodowych (DOM) zniosło hamowanie odpowiedzi oddechowej przez OLDA w pierwszej jej fazie, jednak nie wpłynęło na przebieg drugiej fazy. Jednocześnie zaobserwowałam znaczny udział komponenty częstotliwościowej w odpowiedzi oddechowej zarówno po podaniu HAL czy DOM, jak i po następującym po nim podaniu OLDA. Podanie antagonistów spowodowało zmniejszenie aktywności chemosensorycznej kłębków szyjnych, które nie została przywrócone podaniem OLDA.

Jako pierwsze nasuwa się pytanie, czy działanie OLDA w tym układzie doświadczalnym ma związek z obecnością w jej cząsteczce fragmentu dopaminowego. Dopamina sama w sobie hamuje odpowiedź na hipoksję poprzez oddziaływanie na czynność kłębka szyjnego (34, 68, 69), zarówno na poziomie wentylacji minutowej (39),

jak i częstości oddychania (70). Pomimo tego hamowania odpowiedź na hipoksję pozostaje nadal typowo dwufazowa (71), a szczytowe pobudzenie następuje w ciągu sekund od zadziałania bodźca. Identyczny efekt jest obserwowany po podaniu apomorfiny, przenikającego przez barierę krew-mózg agonisty receptorów dopaminowych (31). Podobny wynik uzyskałam w przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach. Wydaje się, że działania obu związków, dopamina i OLDA, są podobne, choć są między nimi różnice. Dopamina jest jednak kontrowersyjnym neuroprzebieżnikiem. Jej działanie na poziomie kłębka szyjnego zależy od dawki: w mniejszych dawkach dopamina hamuje, zaś w większych pobudza jego aktywność (72, 73). Wyznaczona przez Loos i wsp. (40) dawka „graniczna”, poniżej której przeważa hamujące działanie dopaminy wynosi ok. 10 mg/kg. Odpowiada ona ok. 65,5 $\mu\text{mol/kg}$. Przyjęta w moich badaniach dawka OLDA wynosiła 20 mg/kg, co odpowiada wartości 48 $\mu\text{mol/kg}$ i mieszcząc się poniżej wartości granicznej zgadzałoby się z hamującym działaniem OLDA stwierdzonym w moich badaniach. Ponadto, działanie dopaminy jest dość krótkie – po podaniu jest szybko metabolizowana (54), zaś OLDA wykazuje znaczną stabilność w ustroju po podaniu dootrzewnowym (niniejsza praca). Dopamina ma ogólnie rzecz biorąc dwojaką naturę: odwodowo hamuje, a ośrodkowo pobudza odpowiedź na hipoksję (39). Takie rozgraniczenie jej działania jest możliwe dzięki niemożności penetrowania przez nią barier biologicznych. Jednak w przeciwieństwie do dopaminy, OLDA przenika do tkanki nerwowej (6, badania własne), obserwowany przeze mnie dopamino-podobny efekt mógłby być pewnego rodzaju „wypadkową” obwodowego i ośrodkowego działania. Aby przybliżyć się do odpowiedzi na to pytanie, wykonałam serię doświadczeń, w których badałam wpływ OLDA na odpowiedź oddechową na hipoksję przy jednoczesnej blokadzie zarówno obwodowych i ośrodkowych, jak i tylko obwodowych receptorów dopaminowych.

Pierwszym wykorzystanym przeze mnie antagonistą receptorów dopaminowych był haloperidol (HAL), przenikający przez barierę krew-mózg selektywny antagonistą receptorów rodziny D₂ (30), działający zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym. Przyjmuje się, że HAL działa na poziomie ośrodkowego układu nerwowego głównie w strukturach związanych z oddychaniem (74). Zaobserwowałam, że podanie tego związku obniżyło odpowiedź oddechową na hipoksję w obu jej fazach; hamowanie to było wyraźniej zaznaczone w przypadku mocniejszego bodźca. Podobnie jak w przypadku OLDA, zachodziło ono na poziomie wentylacji minutowej i jej komponenty częstotliwościowej. Podanie OLDA nie obniżyło już odpowiedzi oddechowej w pierwszej, pobudzeniowej, fazie, jednak OLDA nadal hamowała ją w drugiej, depresyjnej, fazie. Wyniki te są częściowo zgodne z danymi literaturowymi. Autorzy publikacji nie są zgodni, co do działania HAL. Z jednej strony sugerują podwyższenie odpowiedzi oddechowej na hipoksję poprzez zablokowanie hamującego działania dopaminy (39, 74), z drugiej zaś wskazują na możliwe jej obniżenie, w tym na poziomie częstości (31, 70). Nie ma również zgodności, co do jego wpływu na dwufazowość odpowiedzi oddechowej – spotyka się sprzeczne opinie. I tak Tatsumi i wsp. (75) donoszą na temat całkowitego zniesienia obecności dwóch faz odpowiedzi oddechowej poprzez zablokowanie wszystkich szlaków dopaminergicznych. Jednocześnie Barros i Branco (70) wspominają jedynie o obniżeniu fazy depresyjnej po podaniu HAL. Jednak wszyscy autorzy są zgodni, co do blokowania obwodowych i ośrodkowych receptorów dopaminowych przez HAL. Jak umiejscowić wśród opisanych wyników te uzyskane przeze mnie? Wyniki są zgodne z obserwacjami Hednera i wsp. (31) oraz Barrosa i Branco (70), wskazując na obniżenie, ale nie wyrównanie, obu faz odpowiedzi oddechowej na hipoksję. Jednocześnie zahamowanie odpowiedzi było wyraźniej zarysowane w przypadku mocniejszego bodźca. Podobne reakcje opisali Long i Anthonisen (76). HAL w

stosowanych przez mnie dawkach zazwyczaj obniża odpowiedź na hipoksję (69). Jednak tematem moich badań nie był HAL, lecz OLDA, a podanie HAL było tylko narzędziem do zbadania właściwości OLDA. OLDA nie obniżyła już odpowiedzi w pierwszej pobudzającej fazie, co wskazuje na zaangażowanie w jej działanie receptorów dopaminowych na poziomie kłębków szyjnych, które te odpowiedzi generują. Podobny efekt opisali Okijama i Nishi (73) – podanie HAL zablokowało hamującą odpowiedź na egzogenną dopaminę. Problematiczne pozostaje jednak dalsze hamowanie odpowiedzi przez OLDA w drugiej, depresyjnej fazie odpowiedzi. Odpowiedź oddechowa na hipoksję po podaniu apomorfiny, przenikającego przez barierę krew-mózg agonisty receptorów dopaminowych, przy jednoczesnej blokadzie tych receptorów przez HAL nie miała typowego, dwufazowego przebiegu – obie fazy zostały praktycznie zniesione (31), czego nie zaobserwowałam w prowadzonych przez mnie badaniach. Nasuwa się więc przypuszczenie, że w działanie OLDA na chemiczną regulację oddychania jest zaangażowany również inny, pozadopaminowy układ receptorowy.

Aby rozróżnić czy obserwowane hamujące działanie OLDA ma ośrodkową czy obwodową naturę, wykonałam cykl doświadczeń z wykorzystaniem domperidonu (DOM), nieprzenikającego przez barierę krew-mózg selektywnego antagonisty receptorów dopaminowych D₂ (32, 77). Uzyskane przez mnie wyniki są bardzo zbliżone do poprzednich otrzymanych po HAL. Podanie DOM zmniejszyło odpowiedzi w obu fazach; hamowanie to zachodziło głównie na poziomie wentylacji minutowej oraz częstości. Podanie OLDA na tle DOM nie zmieniło odpowiedzi fazy pobudzeniowej, lecz nadal ją obniżało w drugiej, depresyjnej, fazie. Podobnie jak w cyklu doświadczeń z HAL, również i tu wyniki pozostają w pewnej sprzeczności z danymi literaturowymi. Wielu autorów (69, 74, 77) wspomina o wzroście odpowiedzi oddechowej na hipoksję po podaniu DOM poprzez blokowanie hamującego działania dopaminy, zaś Nakano i wsp. (69)

zaobserwowali wręcz brak zmian w odpowiedzi na hipoksję. Żadna z tych obserwacji nie została przez mnie potwierdzona. Podanie DOM, choć zmniejszyło szczytowe odpowiedzi (szczególnie w przypadku silniejszego bodźca), nie zniosło dwufazowości, co jest w zgodzie z obserwacjami Tatsumi i wsp. (75). Dalsze podanie OLDA nie zmieniło odpowiedzi w fazie pobudzeniowej, nadal ją obniżając w fazie depresyjnej.

OLDA hamowała odpowiedź oddechową na hipoksję na całym jej przebiegu. O ile jej działanie w pierwszej, pobudzeniowej, fazie było antagonizowane podaniem blokerów receptorów dopaminowych, o tyle nie miały one wpływu na drugą, depresyjną, fazę odpowiedzi. Przyjmuje się (46, 65), że za pierwszą fazę odpowiedzialne są kłębki szyjne, których upośledzenie przejawia się m.in. zanikiem wzrostu odpowiedzi wraz ze wzrostem siły bodźca. OLDA nie miała wpływu na stan kłębków – mimo jej hamującego działania odpowiedź uzyskana dla silniejszego bodźca była wyższa niż dla słabszego – nie miała zatem wpływu na czułość hipoksyjną układu. Zablokowanie receptorów dopaminowych (podaniem HAL bądź DOM) zniosło ten parametr: bez względu na siłę bodźca, odpowiedzi pobudzające były zmniejszone. Podanie OLDA na tym tle pozostawało bez efektu na fazę pobudzeniową. Wskazuje to na zaangażowanie w pierwszą fazę odpowiedzi receptorów dopaminowych, zaangażowanie w hamującą odpowiedź oddechową na hipoksję działanie OLDA szlaków związanych z kłębkami szyjnymi, a także na oddziaływanie OLDA z receptorami dopaminowymi. Powyższe wnioski mają odzwierciedlenie w literaturze: znaczenie receptorów dopaminowych w odpowiedzi na hipoksję opisał m.in. Itturiaga i wsp. (52), zaś dopamino-podobne działanie Przegaliński i wsp. (7). Jednocześnie istnieją przesłanki na temat możliwości zaangażowania OLDA w odpowiedź na hipoksję: w pracy (57) pokazano łatwość przenikania OLDA do tkanki kłębka szyjnego.

Jednak dlaczego, mimo blokady receptorów dopaminowych HAL, obserwowałam dalsze obniżenie odpowiedzi oddechowej w jej drugiej fazie? Co prawda ma ona swoje źródło na poziomie ośrodków oddechowych mózgu (67, 70, 78), w jej regulacji bierze udział dopamina (31, 75), a blokowanie ośrodkowych receptorów tego neuroprzekaźnika powinno ją znosić (69, 75), to pomimo tego OLDA nadal obniża odpowiedź fazy depresyjnej. Jedyną w zasadzie możliwością wytłumaczenia tego zjawiska jest pozadopaminowe działanie OLDA. Niedawno pokazano, że OLDA jest ligandem receptorów wanilloidowych TRPV1 (4, 8). Receptory te są w istocie kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla m.in. jonów wapnia. Pobudzenie tych układów prowadzi do zmian na poziomie potencjału błonowego, napływu jonów wapnia do komórki, a następnie do uruchomienia kaskad reakcji prowadzących do, zależnego od Ca^{2+} , wyrzutu neuroprzekaźników, w tym tych hamujących. Oddziaływanie OLDA z TRPV1 mogłoby prowadzić zatem do obniżenia odpowiedzi na hipoksję. Sama odpowiedź na hipoksję na poziomie komórkowym ma podobny charakter: bez względu na przyjęty model chemowrażliwości (błonowy czy mitochondrialny) prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej z następującym zależnym od jonów wapnia wyrzutem neuroprzekaźników (47, 48, 79). Ma ona podobny mechanizm zarówno w obwodowym, jak i ośrodkowym układzie nerwowym (80). Warto jeszcze dodać, że podanie kapsaicyny (agonisty receptorów TRPV1) obniża częstość oddychania (63), a także reaktywność nerwu przeponowego (81). Oddziaływanie OLDA z receptorami TRPV1 mogłoby zatem wyjaśniać hamowanie przez nią drugiej fazy odpowiedzi oddechowej na hipoksję.

Uzyskane przeze mnie wyniki różnią się od wyników innych autorów. Jednym ze źródeł możliwych różnic jest narkoza. I choć wykorzystana przeze mnie mieszanina jest szeroko stosowana w badaniach fizjologicznych, w tym oddechowych, nie jest pozbawiona wad. Może bowiem, zarówno ona sama (31, 82), jak i jej głębokość (68), wpływać na

odpowieź oddechową na bodziec hipoksyjny. Z tego powodu, a także z powodu możliwych różnic osobniczych, w każdym doświadczeniu przeprowadzałam pomiary kontrolne, a same doświadczenia były tak krótkie, jak tylko było to możliwe przy przyjętym układzie doświadczalnym. Dlatego też uzyskane przeze mnie wyniki, podobnie jak wyniki wszystkich doświadczeń fizjologicznych, należy ostrożnie interpretować mając na uwadze powyższe ograniczenia.

Podsumowując, OLDA jest nową, oleinową pochodną dopaminy. Dotychczas określono możliwość jej przenikania do układu nerwowego (6, 57, niniejsza praca), a także oddziaływania przez nią na receptory wanilloidowe (4), dopaminowe, zarówno w kontekście motoryki (7), jak i chemicznej regulacji oddychania (niniejsza praca). Wyznaczono również jej stabilność biologiczną oraz możliwy szlak metaboliczny (niniejsza praca). Ponadto, wykryto jej możliwe działanie przeciw-nowotworowe objawiające się zahamowaniem cyklu komórkowego bez działania cytotoksycznego (11), także jej działanie kardioprotekcyjne (10). Ostatnio pojawiły się doniesienia pogłębiające wiedzę na temat jej oddziaływania z receptorami wanilloidowymi, hamowania przez nią sztywności mięśni (83), czy też możliwości jej stosowania w terapii chorób zakaźnych. OLDA wykazuje ciekawe właściwości biologiczne, wzbudza zainteresowanie naukowe.

6. KONKLUZJE

Z opisanych powyżej doświadczeń wynika, że:

- 1) N-oleinoilo-dopamina (OLDA) przenika do tkanki nerwowej szczura, w której wiąże się z błonami komórkowymi, w obecności których, wykazuje znaczną trwałość.
- 2) OLDA wykazuje zwiększoną w stosunku do dopaminy stabilność *in vitro*. Nieobecność jonów wapnia oraz obecność frakcji cytozolowej homogenatu mózgu szczura stabilizuje OLDA. Obecność błon homogenatu mózgu szczura wykazuje działanie ochronne w stosunku do warunków utleniających.
- 3) OLDA podlega *in vitro* O-metylacji za pośrednictwem COMT, wchodzi zatem w szlak metaboliczny dopaminy.
- 4) OLDA obniża odpowiedź oddechową na bodziec hipoksyjny działając za pośrednictwem układu dopaminowego.
- 5) OLDA nie wpływa na czułość hipoksyjną, a więc nie upośledza działania kłębków szyjnych, jako głównych struktur chemoczułych.

7. STRESZCZENIE

N-oleinoilo-dopamina (OLDA) jest oleinową pochodną dopaminy o słabo poznanych do tej pory właściwościach. Jest przedstawicielem N-acylo-dopamin, będących amidami dopaminy i kwasów tłuszczowych. Dopamina jest jednym z ważniejszych neuroprzekaźników zarówno ośrodkowego, jak i obwodowego układu nerwowego, zaś kwasy tłuszczowe pełnią w ustroju liczne funkcje, w tym funkcje budulcowe. Wysoka biodostępność obu „składowych” i ich fizjologiczne znaczenie stały się tym bardziej interesujące, gdy stwierdzono endogenne występowania produktów ich kondensacji, N-acylo-dopamin, w mózgu ssaków i określono możliwe szlaki ich syntezy *in vivo*. Rola N-acylo-dopamin w ustroju nadal pozostaje jednak niewyjaśniona.

OLDA wykazuje najwyższą aktywność biologiczną spośród wszystkich przedstawicieli tej klasy związków. Dotychczas określono jedynie nieliczne jej właściwości biologiczne. Wiadomo, że OLDA przenika do tkanki nerwowej mózgu. Egzogenna OLDA wykazuje dopamino-podobne działanie na aktywność lokomotoryczną szczura, a także hamuje sztywność mięśniową w szczurzym modelu choroby Parkinsona. Ponadto, OLDA oddziałuje z receptorami wanilloidowymi TRPV1 będącymi kanałami jonowymi. Aktywacja tej klasy receptorów skutkuje m.in. napływem jonów wapnia do wnętrza komórki, wyzwalając kaskady reakcji następczych prowadzących do uwolnienia neuroprzekaźników z wewnątrzkomórkowych magazynów. Poprzez interakcje z receptorami TRPV1, OLDA wykazuje działanie neuroprotekcjne w sytuacji uszkodzeń wynikających z reperfuzji po niedotlenieniu.

Jedną ze składowych OLDA jest dopamina, jeden z ważniejszych neuroprzekaźników układu nerwowego. Dopamina bierze czynny udział w chemicznej regulacji oddychania działając w dwojaki sposób: ośrodkowo pobudzając, zaś obwodowo hamując odpowiedzi oddechowe. Ze względu na niemożność przenikania dopaminy przez

bariery biologiczne, działania te są od siebie niezależne. Ze względu na jej hydrofilowość, a także jej krótki czas działania, dokładne mechanizmy działania dopaminy na odpowiedź oddechową na bodziec hipoksyjny nie są znane, a same badania znacznie utrudnione. Wydaje się, że nadanie dopaminie cech związku lipofilnego, pozwoliłoby na pokonanie tych trudności. Lipidowa pochodna dopaminy, jaką jest OLDA, powinna skutecznie penetrować bariery biologiczne, a także ze względu na obecność wiązania amidowego, wykazywać zwiększoną w stosunku do związku-matki trwałość.

Przeprowadzone przeze mnie badania zostały podzielone na dwie części: biochemiczną i fizjologiczną. Celem części biochemicznej badań było określenie wybranych cech OLDA, takich jak: przenikanie do tkanki nerwowej szczura po podaniu dootrzewnowym; jej stabilności *in vitro* zarówno w obecności jak i pod nieobecność warunków utleniających w nieorganicznym buforze Krebsa, jako imitacji płynu zewnątrzkomórkowego, oraz w układzie błonowym i cytozolowym homogenatu mózgu szczura, a także określenie możliwości O-metylacji OLDA za pośrednictwem katecholo-O-metylotransferazy (COMT). W tej części korzystano z technik chromatografii cienkowarstwowej TLC oraz spektrofotometrii UV/VIS.

W badaniach nad przenikaniem OLDA do tkanki nerwowej szczura wykazałam, że po podaniu dootrzewnowym w dawce 20 mg/kg występuje ona we frakcji lipidowej i błonowej homogenatu mózgu szczura już po godzinie od podania. Jej obecność w niezmienionym stanie utrzymuje się przez przynajmniej 24 godziny. Wskazuje to na jej znaczną stabilność w ustroju i możliwość jej długotrwałego oddziaływania z układami efektorowymi.

W celu stwierdzenia trwałości OLDA, wyznaczyłam jej stabilność w układach *in vitro* imitujących warunki fizjologiczne. Przyjętymi przeze mnie modelami były: bufor Krebsa, jako imitacja płynu zewnątrzkomórkowego, układ błonowy, jako imitacja układów

błonowych oraz układ cytozolowy imitujący środowisko wewnątrzkomórkowe. W układzie nieorganicznego buforu Krebsa, OLDA wykazywała zbliżoną do dopaminy stabilność. Była ponadto mniej od niej podatna na utlenianie. Szybkość utleniania zależała od jonów wapnia – ich obecność zwiększała ją. W układzie błonowym homogenatu mózgu szczura stabilność OLDA wzrastała do 17 godzin; nieobecność jonów wapnia zwiększała tę stabilność do 24 godzin, co było porównywalne z wynikami uzyskanymi *in vivo*. OLDA pozostawała stabilna w układzie cytozolemym bez względu na obecność jonów wapnia przez 24 godziny. Inkubowana w utlenionych błonach OLDA wykazywała zbliżoną stabilność bez względu na obecność jonów wapnia; wynosiła ona ok. 17 godzin. Utlenianie uprzednio inkubowanej w zawieszynie błon OLDA nie wpłynęło na jej stabilność; bez względu na obecność jonów wapnia OLDA pozostawała stabilna przez ok. 17 godzin. Wskazuje to na ochronne w stosunku do warunków utleniających działanie zawiesziny błon homogenatu mózgu szczura.

Kolejnym etapem badań było określenie możliwości O-metylacji OLDA za pośrednictwem katecholo-O-metylotransferazy (COMT), wykorzystując S-adenozyl-L-metioninę, jako donora grupy metylowej. O-metylacja poprzez COMT jest pierwszym etapem na szlaku metabolicznym dopaminy. Stwierdziłam, że OLDA ulega *in vitro* O-metylacji. Reakcja jest równowagowa i prowadzi do powstania zmetylowanej pochodnej OLDA – O-Me-OLDA (N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopaminy). Wskazuje to, że OLDA może podlegać identycznemu szlakowi metabolicznemu jak dopamina.

Celem badań części fizjologicznej było określenie wpływu OLDA na odpowiedź oddechową na hipoksję w obecności i pod nieobecność obwodowych jak i ośrodkowych antagonistów receptorów dopaminowych D₂. W tej części analizowano neurogram nerwu przeponowego wyznaczając ekwiwalent wentylacji minutowej z iloczynu częstości i

amplitudy zintegrowanej aktywności tego nerwu. Zwierzęta były uśpione, wagoatomizowane, porażone i sztucznie wentylowane. Po ustabilizowaniu się stanu zwierzęcia wykonywano pomiar odpowiedzi oddechowej na dwustopniowy bodziec hipoksyjny (14 oraz 11% O₂ w N₂). Bodźce rozdzielał 20-min okres oddychania powietrzem atmosferycznym. Następnie podawano blokery receptorów dopaminowych D₂: haloperidol (0,3 mg/kg, iv), przenikający przez barierę krew-mózg bądź domperidon (3 mg/kg, ip), nieprzenikający przez barierę. Po 20 min od podania powtarzano pomiary dla obu poziomów bodźca hipoksyjnego. Kolejnym etapem było podanie OLDA w dawce 20 mg/kg ip. Po kolejnych 20 min powtarzano pomiary dla obu poziomów bodźca. W doświadczeniach mających na celu określenie wpływu OLDA na odpowiedź oddechową na hipoksję bez blokady receptorów dopaminowych pomijano cykl obejmujący podanie antagonisty. Podczas całego doświadczenia kontrolowano ciśnienie krwi, a przed i po każdym epizodzie hipoksyjnym ciśnienie parcjalne tlenu i dwutlenku węgla oraz pH krwi tętniczej.

OLDA obniżała odpowiedź oddechową na hipoksję, zarówno jej fazę pobudzeniową jak i depresyjną. Szczytowy wzrost oddychania, w stosunku do wartości wyjściowych, zmniejszał się z $40 \pm 11\%$ (kontrola) do $18 \pm 10\%$ (OLDA) i z $56 \pm 9\%$ (kontrola) do $38 \pm 9\%$ (OLDA), odpowiednio dla 14 i 11% hipoksji. Obniżanie to zachodziło głównie za pośrednictwem komponenty częstotliwościowej oddychania. Jednocześnie OLDA nie zmieniała czułości hipoksyjnej – wzrost maksymalnej odpowiedzi wraz ze wzrostem siły bodźca miał ten sam profil jak w przypadku kontroli. Haloperidol (HAL), obwodowy i ośrodkowy antagonist receptorów dopaminowych D₂, osłabiał hipoksyjne odpowiedzi oddechowe. Po podaniu HAL, szczytowy wzrost oddychania zmniejszał się z $28 \pm 6\%$ (kontrola) do $18 \pm 3\%$ (HAL) i z $62 \pm 10\%$ (kontrola) do $22 \pm 5\%$, odpowiednio dla 14 i 11% hipoksji. Podobnie jak w przypadku samej OLDA, również tu

hamowanie odpowiedzi oddechowej zachodziło na poziomie komponenty częstotliwościowej. Dalsze podanie OLDA nie zmieniało już znacząco szczytowych odpowiedzi hipoksyjnych. OLDA na tle HAL jednak nadal obniżała odpowiedź oddechową w jej drugiej, depresyjnej fazie hipoksji. Efekt domperidonu (DOM), selektywnie obwodowego antagonisty receptorów dopaminowych D₂, w kolejnym cyklu doświadczeń, był podobny do efektu HAL. DOM osłabiał hipoksyjne odpowiedzi oddechowe. Po podaniu DOM, szczytowy wzrost oddychania zmniejszał się z 25 ±4% (kontrola) do 21 ±5% (DOM) i z 45 ±5% (kontrola) do 26 ±5% (DOM), odpowiednio dla 14 i 11% hipoksji. Dalsze podanie OLDA nie zmieniało już znacząco szczytowych odpowiedzi hipoksyjnych. Ponadto, OLDA na tle DOM nadal obniżała odpowiedź w drugiej, depresyjnej fazie hipoksji. Obydwa użyte blokery dopaminergiczne zmniejszały czułość odpowiedzi oddechowych na hipoksję i następowe podanie OLDA nie przywracało tego parametru. Z powyższych obserwacji wynika, że OLDA obniża odpowiedź oddechową na hipoksję nie wpływając jednocześnie na czułość hipoksyjną. Jej działanie zachodzi głównie za pośrednictwem receptorów dopaminowych, co w szczególności dotyczy pobudzającej fazy odpowiedzi na hipoksję. Utrzymujące się działanie hamujące OLDA na fazę depresyjną odpowiedzi hipoksyjnych po blokadzie receptorów dopaminowych sugeruje udział w mechanizmach tej fazy także innych niż dopaminergiczny układów neuroprzekaźnikowych.

Z badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wynika, że OLDA przenika do tkanki nerwowej szczura, wiążąc się trwale z układem błonowym. Ponadto OLDA wykazuje zwiększoną w stosunku do dopaminy stabilność *in vitro*. Stabilność ta jest zależna od składu chemicznego środowiska, w szczególności zaś od obecności jonów wapnia, które destabilizują cząsteczkę OLDA. Układ błonowy tkanki nerwowej wykazuje ochronne działanie w stosunku do warunków utleniających. OLDA

ulega *in vitro* O-metylacji za pośrednictwem katecholo-O-metylotransferazy (COMT), co wskazuje na możliwość zaangażowania w jej metabolizm szlaku metabolicznego dopaminy. OLDA obniża odpowiedź oddechową na ostry bodziec hipoksyjny działając za pośrednictwem układu dopaminowego. OLDA nie wpływa na czułość hipoksyjną, nie upośledza zatem czynności kłębków szyjnych jako struktur chemoczułych.

Poprzednie prace na temat OLDA wskazywały na możliwość przenikania OLDA do tkanki nerwowej, jednak dane dotyczące kinetyki przenikania tego związku do mózgu oraz czynników stabilizujących go nie były dotychczas znane. Podobnie sytuacja przedstawia się w przypadku O-metylacji OLDA za pośrednictwem COMT – w literaturze spotyka się jedynie sugestie odnośnie możliwości zachodzenia takiej reakcji. O ile nie ma wątpliwości odnośnie dróg syntezy OLDA (N-acylacja tyrozyny w połączeniu z następującymi po niej reakcjami typowymi dla biosyntezy dopaminy), to drogi jej rozpadu pozostają zagadką. W pracy wykazałam, że *in vitro* OLDA ulega O-metylacji za pośrednictwem COMT, wchodzi zatem w cykl metaboliczny dopaminy. Nie wiadomo jednak czy w warunkach *in vivo* OLDA byłaby także metabolizowana do O-Me-OLDA i dalej ulega kolejnym przekształceniom, czy też ulega znanej dla dopaminy reakcji utleniania do chinonu. Może też przenikać z mózgu do układu krwionośnego, by zostać w jakiś sposób zmetabolizowaną w wątrobie.

Zastanawiająca jest tak znaczna trwałość OLDA w ustroju, szczególnie w porównaniu z jej stabilnością *in vitro* oraz czasem życia dopaminy w ustroju. Jednym z czynników stabilizujących ten związek jest układ cytozolowy oraz brak jonów wapnia. Być może cząsteczka OLDA wiążąc się do układu błonowego jest skierowana aktywniejszą chemicznie, dopaminową częścią w kierunku wnętrza komórki, które charakteryzuje się zarówno niskim stężeniem Ca^{2+} i składem identycznym ze składem układu cytozolowego.

Oдноśnie badań *in vivo*, nie było dotąd prac na temat oddziaływania OLDA na odpowiedź oddechową na hipoksję, która jest przykładem czynnościowego współdziałania ośrodkowych i obwodowych systemów nerwowych. OLDA działa hamująco na oddychanie hipoksyjne, co jest zbliżone do działania samej dopaminy. Jednocześnie nie zmienia ona istotnie czułości hipoksyjnej. Hamujące działanie OLDA na szczytowe pobudzenie oddychania hipoksyjnego znika po podaniu antagonistów receptorów dopaminowych, zarówno ośrodkowo-obwodowych jak i obwodowych, co wskazuje na obwodowe działanie OLDA na poziomie kłębków szyjnych i udział układu dopaminergicznego w mechanizmach działania OLDA. Brak blokady odpowiedzi w drugiej, depresyjnej fazie działania hipoksji po OLDA sugeruje udział w mechanizmach tej fazy innych układów receptorowych, np. receptorów wanilloidowych TRPV1, dla których OLDA jest agonistą.

W konkluzji, N-oleinoilo-dopamina jest nowym, mało poznanym związkiem o ciekawej charakterystyce biologicznej. Jej dopamino-podobne działanie, a także znaczna stabilność oraz lipofilność, może nie tylko nadać nowe kierunki badaniom nad mechanizmami działania dopaminy, ale i umożliwić zastosowanie tego związku tam, gdzie niezbędna jest cząsteczka dopaminy bądź informacja przez nią przenoszona.

8. SPIS PIŚMIENICTWA

Piśmiennictwo jest ponumerowane w kolejności pojawiania się w tekście.

1. Pokorski M, Matysiak Z. Fatty acid acylation of dopamine in the carotid body. *Med Hypotheses* 1998; 50: 131-133.
2. Bezuglov V, Bobrov M, Gretskaya N, et al. Synthesis and biological evaluation of novel amides of polyunsaturated fatty acids with dopamine. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 447-449.
3. Czarnocki Z, Matuszewska I, Matuszewska M. Highly efficient synthesis of fatty acids dopamides. *Org Prep Proced Int* 1998; 30: 699-702.
4. Chu C, Huang S, De Petrocellis L, et al. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem* 2003; 278: 13633-13639.
5. Huang S, Bisogno T, Trevisani M, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *PNAS* 2002; 99: 8400-8404.
6. Pokorski M, Matysiak Z, Marczak M, et al. Brain uptake of radiolabelled N-oleoyl-dopamine in the rat. *Drug Dev Res* 2003; 60: 217-224.
7. Przegaliński E, Filip M, Zajac D, Pokorski M. N-oleoyl-dopamine increases locomotor activity in the rat. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19: 897-904.
8. Szolcsanyi J, Sandor Z, Retho G, et al. Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N-oleoyldopamine on TRPV1-transfected cell line in gene deleted mice and in the rat. *Neurosci Lett* 2004; 361: 155-158.

9. Szallasi A, Blumberg P. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 159-211.
10. Zhong B, Wang D. N-oleoyl-dopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid, protects the heart against ischemia-reperfusion injury via activation of TRPV1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295: H728-H735.
11. Sancho R, Macho A, de la Vega L, et al. Immunosuppressive activity of endovanilloids: N-arachidonoyl-dopamine inhibits activation of the NF-kB, NFAT, and activator Protein 1 signaling pathways. *J Immun* 2004; 172: 2341-2351.
12. Kawiak J (red.). Podstawy cytofizjologii. Warszawa, Wydawnictwa Naukowe PWN, 1995.
13. Dołowy K, Szewczyk A, Pikuła S: Błony biologiczne. Wyd. Śląsk, Katowice-Warszawa, 2003.
14. Farooqui A, Horrocks L. Lipid peroxides in free radical pathophysiology of brain diseases. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18: 599-608.
15. Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R. Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma consideration. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 569-596.
16. Scherrmann J-M. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vasc Pharmacol* 2002; 38: 349-354.
17. de Boer A, van der Sandt I, Gaillard P. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annul Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 629-656.
18. Demeule M, Regina A, Jodoin J, et al. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vasc Pharmacol* 2002; 38: 339-348.

19. Habgood M, Begley G, Abbot N. Determinants of passive drug entry into the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 2000; 20: 231-253.
20. Reichel A, Begley D. Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *Pharm Res* 1998; 15: 1270-1274.
21. Gonzalez M, Robinson M. Neurotransmitter transporters: why dance with so many partners? *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 30-35.
22. Patrick G. *Chemia medyczna*. Warszawa, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 2003.
23. Goldstein D, Eisenhofer G, Kopin I. Clinical catecholamine neurochemistry: a legacy of Julius Axelrod. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26: 695-702.
24. Ellingson T, Duddempudi S, Greenberg B, Hooper D, Eisenhofer G. Determination of differential activities of soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferase in tissue and erythrocytes. *J Chromatogr B* 1999; 729: 347-353.
25. Pihlavisto P, Reenila I. Separation methods for catechol-O-methyltransferase activity assay: physiological and pathophysiological relevance. *J Chromatogr B* 2002; 781: 359-372.
26. Nissinen E, Nissinen H, Larjonmaa H, et al. The COMT inhibitor, entacapone, reduces levodopa-induced elevations in plasma homocysteine in healthy adult rats. *J Neural Transm* 2005; 112: 1213-1221.
27. Graumann R, Paris I, Martinez-Alvarado P, et al. Oxidation of dopamine to aminochrome as a mechanism for neurodegeneration of dopaminergic system in Parkinson's disease. Possible neuroprotective role of DT-diaphorase. *Pol J Pharmacol* 2002; 54: 573-579.
28. Smythies J, Galzigna L. The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1380: 159-162.

29. Marien M, Shin S, Cooper G, Jhamandas K. Stability of dopamine in an in vitro system using Medium 199. *Can J Physiol Pharmacol* 1984; 62: 600-603.
30. Missale C, Nash S, Robinson S, Jaber M, Caron M. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998; 78: 189-225.
31. Hedner J, Hedner T, Jonason J, Lundberg D. Evidence for a dopamine interaction with the central respiratory control system in the rat. *Eur J Pharmacol* 1982; 81: 603-615.
32. Laduron P, Leysen J. Domperidone, a specific in vitro dopamine antagonist devoid of in vivo central dopaminergic activity. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 2161-2165.
33. Li A, Nattie E. Catecholamine neurones in rat modulate Steep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *J Physiol* 2006; 570: 385-396.
34. Pokorski M. Chemiczna regulacja oddychania. W: Kliniczne aspekty regulacji oddychania. Alfa-medica Press 2001, Bielsko Biała, pp. 31-46.
35. Sawaguchi T. The role of D1-dopamine receptors in working memory-guided movements mediated by frontal cortical areas. *Park Rel Dis* 2001; 7: 9-19.
36. Calabresi P, Cenzone D, Bernardi G. Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. *Trends Neurosci* 2000; 23, S57-S63.
37. Narkiewicz O, Moryś J. Neuroanatomia czynnościowa i kliniczna. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2001.
38. Alheid G, McCrimmon D. The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 164: 3-11.
39. Smatresk N, Pokorski M, Lahiri S. Opposing effects of dopamine receptor blockade on ventilation and chemoreceptor activity. *J Appl Physiol Respirat Envir Exercises Physiol* 1983; 54: 1567-1573.

40. Loos N, Haouzi P, Marchal F. Mechanisms of ventilator inhibition by exogenous dopamine in cats. *J Appl Physiol* 1998; 84: 1131-1137.
41. O'Halloran K, Janssen P, Bisgard G. Dopaminergic modulation of respiratory motor output in peripherally chemodenervated goats. *J Appl Physiol* 1998; 85: 946-954.
42. Ganong W. Fizjologia. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2007.
43. Budzińska K. Nerwowa regulacja oddychania. W: Kliniczne aspekty regulacji oddychania, pod redakcją M. Pokorskiego, Alfa-Medica Press, Bielsko Biała 2001, pp.9-31.
44. Burbon M, Kazemi H. Neurotransmitters in central respiratory control. *Respir Physiol* 2000; 122: 111-121.
45. Coles S, Miller R, Huela J, Wolken P, Schlenker E. Frequency responses to hypoxia and hypercapnia in carotid body-denervated conscious rats. *Resp Physiol Neurobiol* 2002; 130: 113-120.
46. Lundberg D, Breese G, Mueller R. Dopaminergic interpretation with the respiratory control system in the rat. *Eur J Pharmacol* 1979; 54: 153-159.
47. Lahiri S, Roy A, Baby S, Hoshi T, Semenza G, Prabhakar N. Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biochem* 2006; 91: 249-286.
48. Prabhakar N, Peng Y-J. Peripheral chemoreceptors in health and disease. *J Appl Physiol* 2004; 96: 356-366.
49. Lopez-Barneo J. Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13: 493-499.
50. Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: From natural stimuli to sensory discharges. *Pharmacol Rev* 1994; 74: 829-898.

51. Kumar P, Bin-Jaliah I. Adequate stimuli of the carotid body: more than an oxygen sensor? *Resp Physiol Neurobiol* 2007; 57: 12-21.
52. Itturiaga R, Alcayaga J, Zapata P. Dissociation of hypoxia-induced chemosensory responses and catecholamine efflux in rat carotid body superfused in vitro. *J Physiol* 1996; 497: 551-564.
53. Hanbauer I, Hellstrom S. The regulation of dopamine and noradrenaline in the rat carotid body and its modification by denervation and by hypoxia. *J Physiol* 1978; 282: 21-34.
54. Brokaw J, Hansen J, Chistie D. The effects of hypoxia on catecholamine dynamics in the rat carotid body. *J Auton Nerv Sys* 1985; 13: 35-47.
55. Xu X, de Pergola G, Eriksson P, et al. Postreceptor events involved in the up-regulation of beta-adrenergic receptor mediated lipolysis by testosterone in rat white adipocytes. *Endocrinology* 1993; 132: 1651-1657.
56. Sewerynek E, Poeggeler B, Melchiorri D, Reiter R. H₂O₂-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates is greatly reduced by melatonin. *Neurosci Lett* 1995; 195: 203-205.
57. Pokorski M, Zajac D, Kapuscinski A, Matysiak Z, Czarnocki M. Accumulation of Radiolabeled N-oleoyl-dopamine in the rat carotid body. *Adv Exp Med Biol* 2006; 580: 173-178.
58. Epps D, Cardin A. The interaction of N-oleoyletanolamine with phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1987; 903: 533-541.
59. Murray R, Granner D, Rodwell V. *Biochemia Harpera*. Warszawa, Wydawnictwa Lekarskie PZWL, 2002.

60. Mannisto P, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 593-628.
61. Costa C, Bertazzo A, Allegri G et al. Melanin biosynthesis from dopamine. II. A mass spectrometric and collisional spectroscopic investigation. *Pigment Cell Res* 1992; 5: 122-131.
62. Wehmeyer K, Kasting G, Powell J, et al. Application of liquid chromatography with on-line radiochemical detection to metabolism studies on a novel class of analgesics. *J Pharm Biomed Anal* 1990; 8: 177-183.
63. Geraghty D, Mazzone S. Respiratory actions of vanilloid receptor agonists in the nucleus of the solitary tract: comparison of resiniferatoxin with non-pungent agents and anandamide. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 919-927.
64. Eyzaguirre C, Abudara V. Carotid body glomus cells: chemical secretion and transmission (modulation?) across cell-nerve ending junctions. *Respir Physiol* 1999; 115: 135-149.
65. Roux J, Peyronnet J, Pascual O, et al. Ventilatory and central neurochemical reorganization of O₂ chemoreflex after carotid sinus nerve transection in rat. *J Physiol* 2000; 552: 493-501.
66. Robbins P. Hypoxic ventilatory decline: site of action. *J Appl Physiol* 1995; 79: 373-374.
67. Vizek M, Pickett C, Weil J. Biphasic ventilatory response of adult to sustained hypoxia has central origin. *J Appl Physiol* 1987; 63: 1658-1664.
68. Ide T, Shirahata M, Chou Ch-L, Fitzgerald R. Effects of a continuous infusion of dopamine on the ventilatory and carotid body responses to hypoxia in cat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22: 658-664.

69. Nakano H, Lee S-D, Farkas G. Dopaminergic modulation of ventilation in obese Zucker rats. *J Appl Physiol* 2002; 92: 25-32.
70. Barros R, Branco L. Central dopamine modulates anaphyrexia but not hyperventilation induced by hypoxia. *J Appl Physiol* 2002; 92: 975-981.
71. Lahiri S, Nishino T, Mokashi A, Mulligan E. Interaction of dopamine and haloperidol with O₂ and CO₂ chemoreception in carotid body. *J Appl Physiol* 1980; 49: 45-51.
72. Buerk D, Osanai S, Mokashi A, Lahiri S. Dopamine, sensory discharge, and stimulus interaction with CO₂ and O₂ in cat carotid body. *J Appl Physiol* 1998; 85: 1719-1726.
73. Okijama Y, Nishi K. Analysis of inhibitory and excitatory actions of dopamine on chemoreceptor discharges of carotid body of cat in vivo. *Jpn J Physiol* 1981; 31: 695-704.
74. Hsiao C, Lahiri S, Mokashi A. Peripheral and central dopamine receptors in respiratory control. *Respir Physiol* 1989; 76: 327-336.
75. Tatsumi K, Pickett C, Weil J. Effects of haloperidol and domperidone on ventilatory roll-off during sustained hypoxia in cats. *J Appl Physiol* 1992; 72: 1945-1952.
76. Long W, Anthonisen NR. Dopaminergic influence on the ventilatory response to sustained hypoxia in the cat. *J Appl Physiol* 1995; 78: 1250-1255.
77. Kressin N, Nielsen A, Laravuso R, Bisgard G. Domperidone-induced potentiation of ventilatory responses in awake goats. *Respir Physiol* 1986; 65: 169-180.
78. Neubauer J, Melton J, Edelman N. Modulation of respiration during brain hypoxia. *J Appl Physiol* 1990; 68: 441-451.

79. Fitzgerald R, Shirahata M, Balbir A, Grossman C. Oxygen sensing in the carotid body and its relation to heart failure. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 745-749.
80. Roy A, Rozanov C, Mokashi A, Lahiri S. PO₂-PCO₂ stimulus interaction in [Ca²⁺]_i and CNS activity in the adult rat carotid body. *Respir Physiol* 2000; 122: 15-26.
81. Kinding A, Heller T, Kaufman M. VR-1 receptor blockade attenuates the pressor response to capsaicin but has no effect on the pressor response to contraction in cats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1867-1873.
82. Zapata P, Larrain C. How the carotid body works: different strategies and preparations to solve the problem. *Biol Res* 2005; 38: 315-328.
83. Konieczny J, Przegaliński E, Pokorski M. N-oleoyl-dopamine decreases muscle rigidity induced by reserpine in rats. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009; 22: 21-28.