

Agnieszka Stasińska

WPLÝW LIPIDOWYCH POCHODNYCH DOPAMINY  
NA CHEMICZNĄ REGULACJĘ ODDYCHANIA U  
CZUWAJĄCYCH SZCZURÓW

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Mieczysław Pokorski

Zakład Neurobiologii Oddychania

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej *im.* M. Mossakowskiego

Polska Akademia Nauk

Warszawa 2014

## Streszczenie

Przedmiotem moich badań są związki chemiczne należące do niedawno odkrytej klasy lipidowych, zacylowanych pochodnych dopaminy, tj. N-oleinoilo-dopamina (OLDA) i N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopamina (Me-OLDA). N-acylo-dopaminy są amidami dopaminy oraz wyższych kwasów tłuszczowych, endogennie syntetyzowanymi w mózgu ssaków. N-acylo-dopaminy występują przede wszystkim w prążkowie oraz w istocie czarnej mózgu, zatem w regionach o wysokiej aktywności dopaminergicznej. Szlak związany z metabolizmem dopamidów nie jest do tej pory poznany, jednak przypuszcza się, że może być związany ze szlakiem metabolicznym dopaminy, tj. z ich metylacją przy pomocy enzymu katecholo-O-metylo-transferazy (COMT).

Lipofilna budowa OLDA i Me-OLDA umożliwia im penetrację bariery krew-mózg, co dodatkowo w połączeniu z ich stosunkowo wysoką stabilnością stwarza możliwość zastosowania tych związków w stanach neurodegeneracyjnych związanych z niedoborem dopaminy w mózgu, takich jak np. choroba Parkinsona, gdzie uzupełnienie poziomu dopaminy staje się wielkim wyzwaniem. Dopamina jest neuroprzekaźnikiem spełniającym wiele różnorodnych funkcji, Jedną z ważniejszych funkcji dopaminy jest regulacja motoryki. Brak stymulacji dopaminowej w przypadku ssaków oznacza akinezję, czyli unieruchomienie. Drastyczne, bo o ponad 80%, obniżenie poziomu dopaminy w jądrach podstawy mózgu, na skutek postępującej degeneracji neuronów dopaminergicznych szlaku nigrostriatalnego występuje w chorobie Parkinsona. Sama dopamina jako związek hydrofilowy i w dodatku ulegający natychmiastowej degradacji obwodowej (w buforze Krebsa-Henseleita, o składzie zbliżonym do płynu wewnątrzkomórkowego trzygodzinna inkubacja powodowała rozkład 98% dopaminy) nie znajduje zastosowania w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

Ponadto dopamina jest głównym neurotransmiterem kłębków szyjnych, jednakże jej rola w mechanizmie chemorecepcji wciąż wzbudza wiele kontrowersji. Kłębki szyjne są organem znajdującym się na rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej na zewnętrzną i wewnętrzną, odpowiadającym za około 95% stymulacji oddychania pod wpływem hipoksji, jak również za około 20% odpowiedzi oddechowej na CO<sub>2</sub> i H<sup>+</sup>. Rola kłębków w

normalnym oddychaniu pozostaje wciąż niewyjaśniona, prawdopodobnie ich udział w normalnym oddychaniu wynosi 10-20%. Wiadomo jednak, że rola dopaminy w chemicznej regulacji oddychania jest dwójaka: działając ośrodkowo pobudza, a obwodowo, tj. przez kłębki szyjne, hamuje odpowiedź oddechową.

Celem mojej pracy było określenie wpływu OLDA i Me-OLDA na oddychanie i odpowiedzi oddechowe na bodźce chemiczne u nieuśpionych zwierząt oraz określenie po przez jakie układy receptorowe związki te oddziałują na regulację oddychania. Rozróżnienie pomiędzy działaniem obwodowym i ośrodkowym oraz udziałem komponenty dopaminergicznej i wanilloidowej w kształtowaniu odpowiedzi oddechowej wywołanej podaniem badanych związków stanowiło podstawowy element mojej pracy.

Badania przeprowadziłam przy użyciu zestawu pletyzmograficznego dla zwierząt nieuśpionych (Buxco Electronics Wilmington NC). Pomiary wentylacji płucnej i jej składowych: częstości i objętości oddechowej przeprowadziłam w warunkach normoksji (szczury oddychały powietrzem atmosferycznym), w warunkach ostrej dwustopniowej hipoksji (12% O<sub>2</sub> i 8% O<sub>2</sub> w N<sub>2</sub>) oraz hiperkapnii (5% CO<sub>2</sub> i 10% CO<sub>2</sub> w O<sub>2</sub>).

Obydwa badane związki chemiczne tj. OLDA oraz Me-OLDA wpływają na oddychanie obniżając odpowiedź oddechową, zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji, jednak wpływ samej OLDA na oddychanie jest dwukrotnie silniejszy. Na przykład, szczytowa hiperwentylacja hipoksyjna rejestrowana w 30 sek po podaniu 12% bodźca hipoksyjnego zmniejszała się z 1335,8 ±99,2 w kontroli do 856,6 ±73,7 ml/min/kg (p<0.001) w hipoksji po OLDA i z 1347,9 ±108,9 w kontroli do 1072,1 ±76,8 ml/min/kg (p<0.002) w hipoksji po Me-OLDA. Działanie zarówno OLDA jak i Me-OLDA na oddychanie zachodzi głównie przez dopaminergiczny układ receptorowy D2. Jednak w przypadku Me-OLDA działanie to odbywa się przede wszystkim przez układ dopaminergiczny obwodowy D2, zaś w przypadku OLDA istnieje również udział komponenty ośrodkowej. Za potwierdzeniem tego wniosku przemawiają wykonane przeze mnie doświadczenia z użyciem antagonistów receptorów dopamniowych D2, tj.: domperidonu (działającego tylko obwodowo) i haloperidolu (działającego ośrodkowo i obwodowo). Co więcej, przeprowadzone przeze mnie badania potwierdziły możliwe działanie Me-OLDA na oddychanie przez receptory wanilloidowe TRPV1, a jednocześnie wykluczyły taką możliwość w przypadku samej OLDA. Postawienie niniejszej tezy badawczej umożliwiły badania z zastosowaniem antagonisty receptorów wanilloidowych TRPV1 - 5'-jodoresinoferotoksyny. Ponadto brak wpływu Me-OLDA na odpowiedź

oddechową na hiperkapnię potwierdza swoistość działania tego związku i sugeruje, że ścieżka działania tego związku na oddychanie prowadzi głównie przez kłębki szyjne. Z kolei uzyskany efekt obniżenia odpowiedzi oddechowej na silny bodziec hiperkapniczny po podaniu OLDA pozwala przypuszczać, że charakter działania tego związku na oddychanie jest zarówno obwodowy jak i ośrodkowy.

Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań można wnioskować, że zarówno OLDA jak i Me-OLDA są nowymi, lipidowymi pochodnymi dopaminy, które mają potencjalną możliwość zwiększania dostępności dopaminy w układzie nerwowym, a więc mogą odgrywać korygującą rolę w neurodegeneracyjnych stanach jej niedoboru. Oddziaływanie Me-OLDA wydawałoby się korzystniejsze, gdyż nie pogłębiałaby ona depresji oddechowej, będącej częstym zaburzeniem towarzyszącym tym stanom, np. chorobie Parkinsona.

## Abstract

The subject of my research are compounds which belong to recently discovered lipid acyl derivatives of dopamine: N-oleoyl-dopamine (OLDA) and N-oleoyl-3'-O-methyl-dopamine (Me-OLDA). These compounds belong to a novel class of bioactive amides of fatty acids, which are endogenously synthesized in mammalian brain. N-acyl-dopamines are present mainly in the substantia nigra and striatum, the brain regions characterized by high dopaminergic activity. The metabolic pathway of N-acyl-dopamines is still unknown, but it is supposed that it can be similar to that of dopamine proper, i.e., involving methylation by catechol-O-methyltransferase (COMT).

The lipophilic structure of OLDA and Me-OLDA enables penetration of the compounds into the brain, which, in connection with a high stability of these compounds, makes them good candidates for a potential use in neurodegenerative states, especially in those underlain by dopamine insufficiency, for instance, Parkinson's disease, where the supplementation of dopamine still constitutes a great challenge. Dopamine is a neurotransmitter which controls variety of functions. One of the most important function of dopamine is the regulation of locomotor activity. Lack of dopamine stimulation, in case of mammals, leads to akinesia – immobilization. A drastic, about 80%, decrease of dopamine in the brain nuclei, as a result of progressive degeneration of dopamine neurons the nigrostriatal pathway, is observed in Parkinson's disease. Dopamine itself as a hydrophilic compound, undergoing immediate peripheral degradation (in Krebs-Hanseleit buffer, with composition similar to that of intracellular fluid, 3-hour incubation results in degradation of 98% of dopamine), is not applicable in the treatment of neurodegenerative diseases.

Dopamine also is the main neurotransmitter in the carotid bodies. The carotid bodies are sensory organs placed at the bifurcation of the common carotid artery in the neck region, which are responsible for about 95% of the hypoxic hyperventilation and about 20% of the hypercapnic hyperventilation. The organs also respond to increased concentration of H<sup>+</sup> ions. The role of carotid bodies in normoxic ventilation remains still unexplained, probably their contribution of to normoxic ventilation amounts to 10-20%. The role of dopamine in the regulation of ventilatory chemoreception is still subject of much controversy. It is known, however, that this role is double: acting centrally, dopamine stimulates ventilation and peripherally, i.e., via the carotid bodies, dopamine inhibits ventilation and its responses to hypoxia.

The main aim of my research was to determine the influence of OLDA and Me-OLDA on respiration and on the ventilatory responses to the chemical stimuli hypoxia and hypercapnia in conscious rats and to investigate through which receptor systems these compounds might regulate ventilation. The essential element of the research was to differentiate between the peripheral and central mechanisms of action and between the contribution of dopaminergic and vanilloid components in shaping the ventilatory responses after administration of both compounds. The differentiation between the peripheral and central components of action of both compounds was achieved by using dopaminergic antagonists: domperidone, a specifically peripheral antagonist, and haloperidol, acting both peripherally and centrally. The effects mediated through the vanilloid TRPV1 receptors were assessed by using the specific antagonist of this receptor system - 5'-iodoresiniferotoxine.

The study was conducted with the use of a plethysmographic rodent chamber (Buxco Electronics Wilmington NC). The measurements of minute ventilation and its components: tidal volume and breathing frequency were carried out in normoxic conditions (rats breathed atmospheric air), and two sequential hypoxic (12% O<sub>2</sub> and 8% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>) and hypercapnic (5% CO<sub>2</sub> and 10% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>) conditions.

The investigated chemical compounds OLDA and Me-OLDA decreased resting ventilation and its responses to hypoxia; the influence of OLDA was about doubly stronger than that of Me-OLDA. For instance, peak hypoxic hyperventilation recorded 30 s after the onset of the 12% hypoxic stimulus decreased from 1335,8 ±99,2 (control) to 856,6 ±73,7 ml/min/kg (hypoxia; p<0.001) after OLDA and from 1347,9 ±108,9 (control) to 1072,1 ±76,8 ml/min/kg (hypoxia; p<0.002) after Me-OLDA. The ventilatory effects of both OLDA and Me-OLDA were exerted through the dopaminergic D2 receptor pathway. However, in case of Me-OLDA this action ran mainly through the peripheral D2 receptor pathway, whereas in case of OLDA the participation of the central dopaminergic component also was evident. Furthermore, the experiments confirmed the possible action of Me-OLDA on ventilation through vanilloid TRPV1 receptors and eliminated this possibility for OLDA. Also, lack of the influence of Me-OLDA on the hypercapnic ventilatory responses points to the specificity of the action of this compound regarding the generation of hypoxic ventilation taking place in the carotid body. On the other hand, some inhibitory effect of OLDA on the ventilatory response to 10% hypercapnia suggests that this compound has both peripheral and central influence on ventilation.

On the basis of the research conducted, it can be concluded that OLDA and Me-OLDA are novel compounds with the potential to increase the availability of dopamine molecule in the neural system and therefore may have a role in correcting neurodegenerative states. Of the two, Me-OLDA seems more advantageous since it would have a smaller inhibitory effect on lung ventilation, which is usually dampened in such states to start with, for instance in Parkinson's disease.