

Mgr inż. Justyna Krych-Madej  
Politechnika Łódzka  
Wydział Chemiczny  
Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej  
Promotor: prof. dr hab. inż. Lidia Gębicka

## **Reakcje katalazy z wybranymi związkami egzo- i endogennymi**

Katalaza to jeden z najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych. Jego główną funkcją jest rozkład nadtlenu wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego. W warunkach *in vivo* nawet niewielkie zmniejszenie aktywności enzymu może prowadzić do nadprodukcji nadtlenu wodoru (i innych reaktywnych form tlenu), a tym samym do tzw. stresu oksydacyjnego. Stąd znajomość mechanizmów reakcji katalazy z egzo- i endogennymi cząsteczkami, które mogą wpływać na cykl katalityczny enzymu, wydaje się niezmiernie istotna. Z puli związków potencjalnie reaktywnych względem katalazy wybrałam flawonoidy (polifenole pochodzenia roślinnego, dostarczane są do organizmu wraz z pożywieniem), kwas chlorowy(I) (związek o silnych właściwościach chlorujących i utleniających, produkowany w organizmie w wyniku odpowiedzi obronnej na działanie drobnoustrojów chorobotwórczych) oraz azotyn (popularny konserwant, dostarczany do organizmu wraz z pożywieniem, jak i produkowany *in vivo*). Wszystkie badania przeprowadziłam w układach modelowych.

W pierwszej części pracy przeanalizowałam wpływ 19 flawonoidów (z grupy flawonów, flawonoli i flawanoli) oraz modelowych polifenoli na aktywność katalazy. Wykazałam, że wszystkie badane związki, a w szczególności mirycetyna, galusan epikatechiny, galusan epigalokatechiny i kwercetyna, przyczyniają się do inhibicji katalazy. Na podstawie analizy zależności pomiędzy strukturą, a aktywnością inhibicyjną flawonoidów względem katalazy wskazałam kluczowe dla efektywnej inhibicji enzymu elementy strukturalne flawonoidów. Badania reakcji katalazy z flawonoidami, przeprowadzone w układzie generującym nadtlenek wodoru z niewielką szybkością, wykazały, iż flawonoidy zdolne są do jednoelektronowej redukcji Związku I katalazy do nieaktywnego Związku II. W przypadku nieobecności zewnętrznego źródła nadtlenu wodoru, czynnikiem determinującym szybkość, indukowanej przez flawonoidy, konwersji katalazy w Związek II jest szybkość generowania nadtlenu wodoru podczas autoutleniania flawonoidu. Na podstawie przeprowadzonych badań wywnioskowałam, iż przed redukcją Związku I, flawonoid wiąże się z katalazą w kieszeni

wiążącej cząsteczkę NADPH. Konkurencja pomiędzy flawonoidem i NADPH o to samo miejsce wiążące tłumaczy częściową ochronę katalazy przed, indukowaną przez flawonoidy, inhibicją enzymu w obecności NADPH.

Kolejna część badań dotyczyła reakcji katalazy z kwasem chlorowym(I). Otrzymane wyniki wskazują, że kwas chlorowy(I) jest inhibitorem katalazy, a stopień inhibicji enzymu jest niezależny od pH w zakresie 6,0-7,4. Wykazałam, że mechanizm reakcji katalazy z kwasem chlorowym(I) zależy od zastosowanego molowego nadmiaru kwasu względem enzymu. Kwas chlorowy(I) w pierwszej kolejności reaguje z aminokwasami znajdującymi się na powierzchni enzymu. Gdy molowy nadmiar kwasu jest większy od 50, jego niewielka część reaguje bezpośrednio z centrum hemowym. Zastosowanie ponad 1000-krotnego molowego nadmiaru kwasu chlorowego(I) skutkuje nieodwracalną degradacją hemu. W pracy zbadałam ponadto wpływ flawonoidów na aktywność i przebieg reakcji katalazy z kwasem chlorowym(I) oraz porównałam aktywność antyoksydacyjną zmodyfikowanych działaniem kwasu chlorowego(I) flawonoli z aktywnością związków wyjściowych.

Badania reakcji katalazy z azotynem potwierdziły, iż związek ten przyczynia się do inhibicji katalazy, szczególnie w obecności jonów chlorkowych. W pracy przedstawiłam możliwe mechanizmy reakcji inhibicji katalazy przez azotyn. Zbadałam kinetykę reakcji azotynu z katalazą i z jej utlenionymi pochodnymi w różnych pH i wyznaczyłam stałe szybkości tych reakcji. Wykazałam eksperymentalnie, iż azotyn redukuje zarówno Związek I, jak i Związek II katalazy bezpośrednio do natywnego enzymu.

W ostatniej części dysertacji przedstawiłam analizę otrzymanych wyników w kontekście ich biologicznego znaczenia w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Mając na uwadze, iż w pewnych specyficznych warunkach, takich jak choroba nowotworowa, bądź infekcja bakteryjna, inhibicja katalazy może być korzystna, znajomość mechanizmów reakcji katalazy z flawonoidami, kwasem chlorowym(I) i azotynem może być pomocna np. w projektowaniu nowych terapii antynowotworowych.

Zddi, 16.08 2017r.

Justyna Kuzel-Madej