

Grzegorz Szewczyk

Identyfikacja czynników stymulujących fototoksyczne działanie  
melaniny z nabłonka upigmentowanego siatkówki

Praca doktorska wykonana  
w Zakładzie Fotobiofizyki  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego  
pod kierunkiem  
Profesora dr hab. Tadeusza Sarny  
Kraków 2009

Chciałbym gorąco podziękować wszystkim osobom, mającym wkład w powstanie tej pracy.

Szczególne podziękowania kieruję do mojego promotora, Pana Profesora Tadeusza Sarny za ciągłą opiekę naukową i pomoc.

Słowa podziękowania za współpracę i wsparcie należą się również doktorowi Mariuszowi Zarębie oraz Pani Profesor Janice Burke z Medical College of Wisconsin.

Dziękuję również całej załodze Zakładu Biofizyki za pomoc i życzliwość.

Część wyników przedstawionych w poniższej pracy została opublikowana w następujących artykułach :

„Effects of photodegradation on the physical and antioxidant properties of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium” Zareba M, Szewczyk G, Sarna T, Hong L, Simon JD, Henry MM, Burke JM. Photochem Photobiol. 2006 Jul-Aug;82(4):1024-9.

„Photobleaching of melanosomes from retinal pigment epithelium: II. Effects on the response of living cells to photic stress” Zareba M, Sarna T, Szewczyk G, Burke JM. Photochem Photobiol. 2007 Jul-Aug;83(4):925-30.

## Spis treści

Wykaz skrótów.....	6
Wstęp.....	8
Występowanie i rodzaje melanin.....	8
Melanina w oku.....	10
Właściwości fizykochemiczne melaniny.....	13
Właściwości optyczne melanin.....	14
Właściwości jonowymienne melanin.....	18
Właściwości redox melanin.....	19
Wpływ światła na melaniny.....	20
Melanina jako antyutleniacz.....	21
Właściwości fotoprotekcyjne i fotouczulające melanin.....	23
Stres oksydacyjny w oku.....	23
Cele pracy.....	26
Materiały i metody.....	27
Odczynniki chemiczne i aparatura.....	27
Izolacja melanosomów z oczu ludzkich.....	29
Izolacja melanosomów z oczu wołich.....	30
Oznaczanie zawartości melaniny.....	30
Fotodegradacja melanosomów.....	31
Przygotowanie ekstraktów melanosomów.....	31
Preparatyka liposomów zawierających ekstrakty melanosomowe.....	32
Identyfikacja produktów utleniania cholesterolu przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC.....	32
Wzbogacanie melanosomów jonami żelaza.....	33
Oznaczanie zawartości żelaza przy użyciu batofenantroliny.....	33
Fotokonsumpcja tlenu.....	33
Pułapkowanie anionorodnika ponadtlenkowego fotogenerowanego w obecności melanosomów.....	34
Pomiary wpływu melanosomów na przeżywalność komórek ARPE-19.....	35
Pomiary wpływu melanosomów na generację rodnika hydroksylowego reakcją Fentona.....	36
Pomiary czasu relaksacji spin-sieciowej melanosomów.....	36
Redukcja znacznika spinowego (TEMPO-Choliny) przez melanosomy natywne oraz	

fotodegradowane.....	37
Wyniki.....	37
Melanosomy ludzkie.....	37
Fotokonsumpcja tlenu.....	37
Fotoprodukcja aninorodnika ponadtlenkowego.....	42
Melanosomy zwierzęce.....	43
Fotodegradacja melanosomów.....	43
Fotoreaktywność melanosomów RPE z oczu krowy o różnym stopniu degradacji.....	45
Wpływ fotodegradacji melanosomów na ilość rodników hydroksylowych generowanych w reakcji Fentona.....	46
Wpływ degradacji melanosomów na przeżywalność komórek APRE-19 .....	48
Wpływ fotodegradacji na zdolność melanosomów do kompleksowania jonów żelaza... ..	50
Relaksacja spinowo-sieciowa melanin.....	52
Oddziaływanie melanosomów ze znacznikiem spinowym.....	57
Wpływ fotodegradacji melanosomów na ich sygnały EPR w paśmie W.....	59
Dyskusja.....	62
Zmiany właściwości melanosomów ludzkich z wiekiem.....	62
Zmiany zachodzące w melanosomach zwierzęcych pod wpływem kontrolowanego fotostarzenia.....	65
Identyfikacji zmian właściwości melanosomów i czynników im sprzyjających .....	69
Wnioski.....	73
Streszczenie.....	74
Literatura.....	76

## Wykaz skrótów

AGEs	ang. <i>advanced-glycation end products</i> zaawansowane produkty glikacji
AMD	ang. <i>Age-related Macular Degeneration</i> zależna od wieku makulopatia
ARPE-19	ustabilizowana linia ludzkich komórek RPE
BHT	butylowany hydroksytoluen
CML	ang. <i>carboxymetyl lysine</i> karboksymetylo-lizyna, jeden z zaawansowanych produktów końcowych glikacji
DMPC	1,2-dimerystylofosfatydylocholina
DMPO	5,5-dimetylo-1-pyrolino-N-tlenek, pułapka spinowa
DMSO	dimetylosulfotlenek
DOPA	3,4- dichydroksyfenyloalanina
EDTA	ang <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i> , sól sodowa kwasu 4-etylenodiaminotetraoctowego
EPR	spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego
HPLC	ang. High Performace Liquid Chromatography - wysokosprawna chromatografia cieczowa.
MEM	ang. <i>minimal essential medium</i>
mHCTPO	znacznik spinowy
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	anionorodnik ponadtlenkowy
PBS	ang. <i>Phosphate buffered saline</i> , buforowany roztwór soli fizjologicznej
POPC	1-palmitoilo-2-oleino-fosfatydylocholina
POS	ang. <i>photoreceptor outer semgments</i> ; zewnętrzne, zrzucane fragmenty fotoreceptorów
ROS	ang. <i>Reactive Oxygen Species</i> , reaktywne formy tlenu lub jego reaktywne związki obecne <i>in vivo</i> .

RPE	ang. <i>Retinal Pigmented Epithelium</i> nabłonek upigmentowany siatkówki
SOD	ang. <i>superoxide dismutase</i> - enzym dysmutaza ponadtlenkowa
TCA	kwask trójchlorooctowy
TEMPO	ang. <i>2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl</i> 2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-tlenek
UVA	promieniowanie nadfioletowe z zakresu 320 -400 nm.
UVB	promieniowanie nadfioletowe z zakresu 290-320 nm.
UVC	promieniowanie nadfioletowe z zakresu 180-290 nm.
VEGF	ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> . nabłonkowy czynnik wzrostu

# Wstęp

## ***Występowanie i rodzaje melanin***

Melaniny są rodziną barwników powszechnie występujących w organizmach żywych. Synteza melaniny jest procesem zachodzącym w melanocytach i komórkach neuronabłonkowych. Proces melanogenezy jest dość dobrze poznany dla melanocytów, ale wydaje się że przebiega on w sposób zbliżony również w komórkach neuronabłonkowych. Ze struktur gładkiego retikulum endoplazmatycznego odrywają się pęcherzyki zawierające strukturalne białka melanosomów (Boulton, 1998). Powstający w retikulum szorstkim enzym tyrozynaza jest następnie glikozylowany w aparacie Golgiego i pakowany w małe pęcherzyki, łączące się w dalszym etapie z premelanosomami. Po połączeniu rozpoczyna się synteza melaniny. Dojrzewające melanosomy przechodzą przez kilka stadiów rozwoju aż do kompletnie czarnych ziarnistości, w których optycznie nie można już wyróżnić żadnej struktury wewnętrznej. Dojrzałe melanosomy, oprócz melaniny zawierają białka, fosfolipidy i ślady metali. Szacuje się, że w zależności od pochodzenia melanosomów, białko może stanowić od 20 do 50% suchej masy (Hach et al., 1977). Przykładowo, w sepia melaninie jest go ok 40% (Ito, 1986). Dojrzałe melanosomy różnią się kształtem w zależności od rodzaju zawartej melaniny (Jimbow et al., 1979). Melanosomy zawierające eumelaninę są najczęściej podłużne o rozmiarach ok 2-3  $\mu\text{m}$  długości przy ok 1  $\mu\text{m}$  grubości. Melanosomy zawierające feomelaninę są zwykle sferyczne i nieco mniejsze niż eumelanosomy. W zależności od prekursora syntezy, melaniny można ogólnie podzielić na dwie grupy: żółte do czerwonych feomelaniny oraz brązowe do czarnych eumelaniny. Eumelaniny są polimerami heterogennymi, zawierającymi podjednostki wywodzące się z 5,6-dihydroksiindolu (DHI) oraz kwasu 5,6-dihydroksynolo-2-karboksyłowego (DHICA). Feomelaniny natomiast składają się głównie z zawierających siarkę pochodnych benzotiazyny. Pierwotnym substratem syntezy melanin jest aminokwas tyrozyna, który przy udziale enzymu tyrozynazy jest hydroksylowany i utleniany do dopachinonu. Dopachinon jest związkiem wysoce reaktywnym i pod nieobecność innych związków mogących z nim reagować, ulega wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, i bierze udział w dalszych przekształceniach oksydacyjno-redukcyjnych i tautomerycznych prowadzących do syntezy eumelaniny. W procesach tych kluczową rolę odgrywa dopachrom, który przy udziale enzymu tautomerazy dopachromu przekształca się w DHICA (Ito et al., 2000). Jeżeli dopachrom spontanicznie ulegnie dekarboksylacji powstaje DHI. W obecności związków tiolowych, takich jak cysteina, powstają addukty takie jak 5-S-cysteinyldopa (5-



S-CD) oraz 2-S-cysteinyldopa (2-S-CD). Dalsze utlenianie obu tych izomerów prowadzi do powstania feomelaniny. U zwierząt prawie nigdy nie spotyka się czystych chemicznie melanin - zawsze feomelanina będzie zawierała podjednostki eumelaniny i na odwrót (Ito i Wakamatsu, 2003; Prota, 1992). Zarówno naturalna eumelanina jak i feomelanina są związkami nierozpuszczalnymi w wodnym środowisku. Feomelanina jako barwnik dominujący występuje tylko w kilku przypadkach : w jasnych i rudych włosach u ssaków oraz w czerwonych ptasich piórach (Ito i Wakamatsu, 2003). Kolor skóry zależy głównie od zawartości eumelaniny. Akceptowanym modelem strukturalnym eumelaniny staje się model 'poukładanych oligomerów' zaproponowany przez Zajęca et al. (Zajac et al., 1994) na podstawie badań dyfrakcji promieni Roentgena. W modelu tym cząsteczka eumelaniny składa się ze stosunkowo niewielkich (5-6 grup indolochinonowych) podjednostek poukładanych na sobie warstwami w odległości ok 0,34 nm. Wyniki wielu późniejszych badań przeprowadzonych metodami rozproszenia promieni Roentgena (Gallas et al., 1999), czy mikroskopii sił atomowych (Clancy i Simon, 2001) wydają się być w zgodzie z tym modelem.

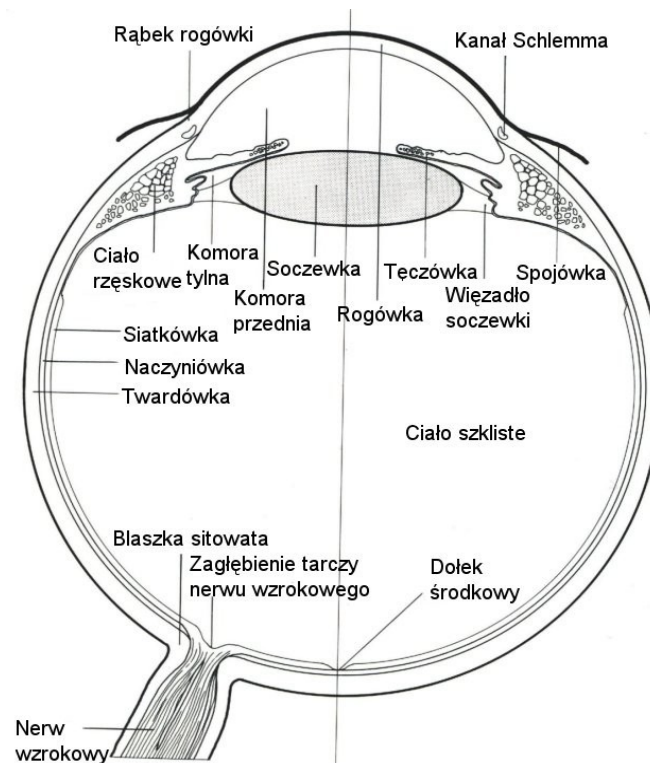
Melaninom u zwierząt przypisuje się wiele różnych funkcji biologicznych. U bezkręgowców nie stwierdzono w ogóle produkcji feomelaniny, natomiast eumelaniny mogą chronić przed szkodliwym promieniowaniem słonecznym, chronić na zasadzie mimikry lub 'zastony dymnej' przed drapieżnikami (np. u kałamarnic), aż do roli czynnika niespecyficznego odpowiedzi immunologicznej. U niektórych grzybów postuluje się nawet rolę eumelaniny przy pozyskiwaniu energii z wysokoenergetycznego promieniowania jonizującego na potrzeby metabolizmu (Dadachova et al., 2007).

U człowieka melanina występuje w wielu różnych narządach : skórze, oczach, włosach, uchu wewnętrznym a nawet w niektórych obszarach mózgu. Występowanie w skórze i oku można ściśle przypisać roli fotoochronnej, natomiast obecność w uchu wewnętrznym i obszarach mózgu nadal nie jest do końca wyjaśniona. Najwięcej melaniny występuje w obszarach istoty czarnej (*substantia nigra*) oraz w miejscu sinawym (*Locus coeruleus*) mózgu naczelnych. Ilości śladowe neuromelaniny występują także u niektórych dłużej żyjących ssaków - np. u psa (DeMattei et al., 1986). Jako źródło neuromelaniny uważa się procesy autooksydacji neuroprzekaźnika dopaminy. Neuromelanina zawiera podjednostki pochodzące od cysteiny. Dokładna rola neuromelaniny nie jest do końca wyjaśniona. Wiadomo, że posiada ona właściwości wiązania różnych potencjalnie szkodliwych substancji, takich jak jony niektórych metali, leków, czy pestycydów (Zucca et al. 2004). Wiązanie przez neuromelaninę jonów żelaza może zmniejszać peroksydację lipidów

(Korytowski et al., 1995). Z drugiej strony wykazano, że w pewnych warunkach neoromelanina może działać neurodegeneracyjnie (Stepień et al., 2007; Zecca et al., 2008). Postuluje się również jej rolę w etiologii choroby Parkinsona (Zecca et al., 2008).

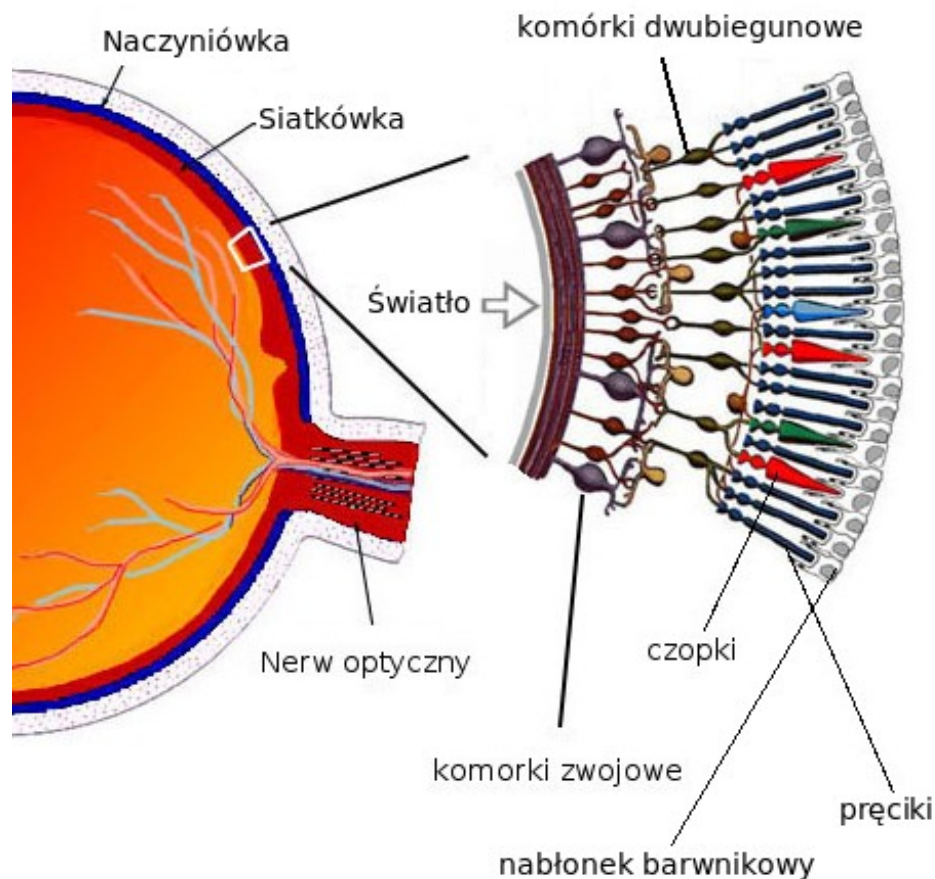
Melanina w skórze podlega ciągłemu metabolizmowi, ponadto jej syntezę reguluje wiele czynników endokrynowych i może być indukowana przez promieniowanie UV.

## **Melanina w oku**



*Rysunek 1: Schemat budowy oka ludzkiego*

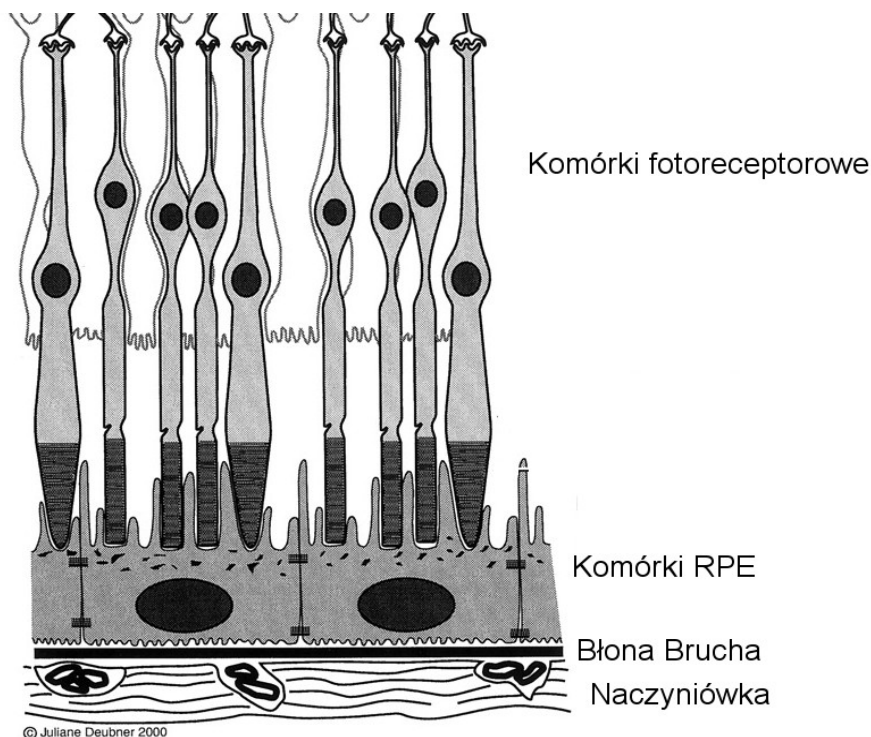
Światło docierając do oka ludzkiego w pierwszej kolejności napotyka na rogówkę. Rogówka jest to przednia, przezroczysta część twardówki, będącej zewnętrzną warstwą oka. Na tym etapie jest odfiltrowywane promieniowanie UVC i część UVB (Lassen et al., 2008). Następnym filtrem na drodze światła w oku jest soczewka, wycinająca pozostałą, długofalową część promieniowania UV - UVA. Światło przechodząc przez ciało szkliste, dociera w końcu do siatkówki. Siatkówka składa się z dwóch części - nerwowej oraz upigmentowanego nabłonka (RPE). Część nerwowa siatkówki, oprócz komórek fotoreceptorowych (czopki i pręciki), odpowiedzialnych za odebranie sygnału świetlnego i przekształcenie go w impuls nerwowy, zawiera również neurony, w których dokonuje się wstępna obróbka sygnału i które przenoszą sygnał do wyspecjalizowanych obszarów mózgu. Światło przed dotarciem do komórek fotoreceptorowych musi przejść przez warstwę neuronów. Okazuje się, że charakterystyka spektralna światła docierającego do siatkówki znacząco zmienia się z wiekiem (Dillon et al., 2004).



Rysunek 2: Droga promieni świetlnych przez warstwy siatkówki.  
Zmodyfikowany rysunek pochodzi ze strony [www.color-project.com](http://www.color-project.com)

Oko zawiera melaninę w kilku tkankach : tęczówce, ciele rzęskowym, naczyniówce i nabłonku upigmentowanym (Hu, 2005). Melanina oczna, szczególnie w nabłonku upigmentowanym siatkówki to prawie wyłącznie eumelanina (Feeney, 1978; Sarna, 1992). Największa ilość melaniny zlokalizowana jest w nabłonku tęczówki. Pomijając stany patologiczne, ilość ta jest stała u ludzi niezależnie od koloru oczu. Kolor tęczówki determinuje zawartość melaniny w jej stromie. U osób o oczach jasnych melaniny jest mało, a kolory takie jak niebieski czy zielony powstają poprzez szczególne rozproszenie światła na ziarnach barwnika. U osób albinotycznych tęczówka jest czerwona, co wynika z prześwitywania naczyń krwionośnych przez pozbawioną melaniny tkankę. Inny jest też metabolizm melanin ocznych : melanina w stromie tęczówki syntetyzowana jest w pierwszych tygodniach życia dziecka, natomiast melanina w nabłonku upigmentowanym syntetyzowana jest tylko w okresie płodowym i prawdopodobnie nie ulega regeneracji w pozostałym okresie życia (Lu et al., 2007). Choć pojawiają się w literaturze odmienne doniesienia, ogólnie uważa się, że w hodowlach *in vitro* komórki RPE nie syntetyzują melaniny (Smith-Thomas et al., 1996). Komórki upigmentowanego nabłonka siatkówki tworzą jednowarstwowy, sześcienny nabłonek o charakterystycznej asymetrycznej morfologii. Od strony bazalnej sąsiadują z komórkami błony Brucha, w sąsiedztwie

podstawy znajduje się też większość mitochondriów. Komórki RPE przylegają ściśle do siebie dzięki połączeniom ścistym, co zapobiega niekontrolowanemu przeciekaniu substancji przez tę tkankę. Powierzchnia apikalna komórek zaopatrzona jest w wypustki, które dotykają lub wręcz wnikają między warstwy zewnętrznych fragmentów fotoreceptorów.



Rysunek 3: Schemat wzajemnego ułożenia komórek RPE i fotoreceptorów (Zmodyfikowany rysunek z pracy Grahn et al., 2001),

Ułatwia to komórkom RPE sprawowanie swojej podstawowej funkcji fizjologicznej, polegającej na fagocytozie błon zewnętrznych segmentów fotoreceptorów. Inną ważną funkcją komórek RPE jest ich udział odżywianiu komórek fotoreceptorowych, oraz w odprowadzaniu produktów metabolizmu. Fotoreceptory nie mają bezpośredniego połączenia z naczyniami krwionośnymi, więc cały transport substancji odżywczych i produktów katabolizmu odbywa się poprzez komórki RPE (Strauss, 2005) Dodatkowo komórki RPE pełnią rolę wydzielniczą, produkując i wydzielając różne czynniki wzrostu, takie jak VEGF czy PEDF, przyczyniając się do zachowania prawidłowej budowy zarówno komórek fotoreceptorowych jak i naczyniówki. RPE wydzielając czynniki o działaniu immunosupresyjnym; biorą ponadto udział w budowie immunologicznego uprzywilejowania tkanek ocznych (Ishida et al., 2003; Streilein et al., 2002). Uważa się także, iż RPE zaangażowane są w regulacji równowagi jonowej, niezbędnej do zachowania prawidłowego poziomu pobudzalności fotoreceptorów (Steinberg, 1985). Zaburzenie funkcjonowania komórek RPE prowadzi do zaburzenia widzenia (Gal et al.,

2000; Edwards i Szamier, 1977; Duncan et al., 2003). Bez prawidłowo fagocytyzujących komórek RPE szczury tracą fotoreceptory i ślepną w ciągu kilku tygodni po urodzeniu. Dotyczy to szczurów RCS (The Royal College of Surgeons) pozbawionych jednego z receptorów kinazy tyrozynowej. Udało się udowodnić, iż podanie prawidłowych kopii genu kinazy tyrozynowej młodym szczurom tej linii chroni je przed degeneracją siatkówki i ślepotą (Vollrath et al., 2001).

Z wiekiem mają miejsce zmiany w morfologii komórek RPE a także w fizykochemicznych właściwościach zawartych w nich melanosomów. Zmniejsza się ilość komórek RPE; a pozostałe komórki rozciągają się aby móc zastąpić obumarłe komórki w fagocytozie POS (Dorey et al., 1989)., czyli zwiększa się ich obciążenie procesami metabolicznymi. Wraz ze zmniejszaniem się ilości komórek RPE w warstwie nabłonka, można zauważyć postępującą z wiekiem redukcję stężenia antyoksydantów, takich jak  $\alpha$ -tokoferol (Friedrichson et al., 1995). Z wiekiem w komórkach RPE pojawiają się nowe rodzaje ziarnistości - melanolizosomy, oraz ziarna melanolipofuscyny. Te ostatnie prawdopodobnie są wynikiem fuzji melanosomów z ziarnami zalegającego barwnika starczego (Feeney, 1978). Bezsporną rolą melaniny w komórkach RPE oraz leżących bezpośrednio pod nią warstwy upigmentowanych komórek naczyńki jest zapobieganie odbiciom światła, które nie zostało zaabsorbowane przez barwniki wzrokowe fotoreceptorów, co miałoby negatywny wpływ na ostrość widzenia. Dyskutuje się potencjalną rolę melaniny w ochronie oka przed niektórymi stanami patologicznymi prowadzącymi do ślepoty, takimi jak melanoma czy związane z wiekiem zwyrodnienie plamki żółtej (AMD)(Hu, 2005; Hu et al., 2008). Dokładny mechanizm działania melaniny nie jest jeszcze do końca znany; zaobserwowano jednak zwiększoną częstotliwość występowania związanego z wiekiem zwyrodnienia plamki żółtej (AMD) u osób z mniejszą ilością melaniny w oczach i skórze (Klein et al., 2006; Nicolas et al., 2003), oraz odwrotną zależność zapadalności na melanomę „uveaolną” a pigmentacją oka (Hu et al., 2008a).

### **Właściwości fizykochemiczne melaniny**

Wszystkie naturalne odmiany melaniny są związkami nierozpuszczalnymi w wodzie, co znacząco utrudnia badanie właściwości. Naturalna melanina zawarta jest w melanosomach, i jak wspomniano wyżej, zawartość melaniny w takim organelum najczęściej nie przekracza 50%. Pozostałe składniki melanosomów to białka, lipidy oraz zawsze pewna ilość skompleksowanych jonów metali. Do większości badań właściwości melanin używano syntetycznych analogów : DHI-melaniny oraz DOPA-melaniny. Oba te analogi można uzyskać na dwa sposoby - poprzez autooksydację substratów oraz przy

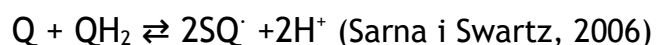
użyciu enzymu tyrozynazy. Strukturalnie bardziej podobne do barwników naturalnych są melaniny uzyskane przy zastosowaniu tyrozynazy. Podobnie jak barwniki naturalne są one nierozpuszczalne w wodzie. Model feomelaniny uzyskuje się tylko na drodze enzymatycznej, gdy w mieszaninie reakcyjnej oprócz DOPA znajduje się też cysteina. Syntetyczną neuromelaninę można uzyskać przez autooksydację dopaminy.

### **Właściwości optyczne melanin**

Właściwości optyczne melanin zależą, oprócz rodzaju samej melaniny, również od szeregu czynników zewnętrznych. Dla DOPA-melaniny autooksydowanej gęstość optyczna maleje monotonicznie wraz z wzrostem długości fali (Crippa et al., 1978). Warunki syntezy, pH, temperatura i siła jonowa roztworu modyfikują wypadkowe właściwości optyczne melanin (Sarna, 1992). Czynnikiem mającym szczególnie istotny wpływ na widmo gęstości optycznej melanin jest stopień agregacji cząsteczek. Melaniny wykazują bardzo słabą fluorescencję. Emisja promieniowania melaniny zachodzi w szerokim paśmie, przy maksimum w okolicy 540 nm (Kozikowski et al., 1984). Wydajność fluorescencji melaniny znacznie rośnie wraz z jej solubilizacją, którą można uzyskać przy pomocy nadtlenu wodoru w wysokim pH. Udało się też zaobserwować fluorescencje melaniny *in situ* przy wzbudzeniu promieniowaniem UV (Elleder i Borovanský, 2001). Intensywność emisji wyraźnie nasilała się po fotoutlenieniu lub chemicznym utlenieniu melaniny w preparacie tkanki. Używając syntetycznej DOPA melaniny jako modelu, Meredith i Riesz określili wydajność kwantową fluorescencji melaniny na poziomie  $5-7 \cdot 10^{-4}$  (Meredith i Riesz, 2004). Biorąc pod uwagę kształt i selektywność widma, autorzy ci wysnuli wniosek, iż za fluorescencję melanin odpowiadają niewielkie oligomeryczne podjednostki. Badano widma wzbudzenia i emisji melanosomów pochodzących z RPE. Analizując próbki pochodzące od pacjentów w różnym wieku, wykazano zależność widma fluorescencji od wieku dawcy (Boulton et al., 1990; Docchio et al., 1991). Część z tych zmian może być tłumaczona narastaniem z wiekiem ziarnistości wtórnych, takich jak melanolipofuscyna (Rózanowska et al., 1995). Syntetyczna melanina wystawiona na działanie silnego światła stopniowo blaknie. Dzieje się tak zarówno przy naświetlaniu światłem widzialnym, jak i ultrafioletowym (Korytowski i Sarna, 1990). Procesowi temu towarzyszy spadek absorpcji w części długofalowej i wzrost w obszarze UV.

Melanina jest jedynym znanym biopolimerem zawierającym stosunkowo wysokie stężenie wolnych rodników, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Pozwala to na zastosowanie spektroskopii EPR do stosunkowo specyficznej detekcji melaniny w materiale biologicznym (Blois et al., 1964; Mason et al., 1960; Sarna i Lukiewicz, 1971). Rodniki

melaninowe mają duży wkład w badanie właściwości i funkcji melanin. Sygnały EPR wyraźnie zależą od typu melaniny (Sealy et al., 1982). W paśmie X sygnał eumelanin jest pojedynczą, minimalnie asymetryczną linią o szerokości 4-6 G przy  $g$  zbliżonym do 2,004. Widmo EPR feomelanin posiada trzy składowe o całkowitej szerokości ok 30 G i  $g$ -2,005. Sygnał rodnicowy melanin jest bardzo trwały, dotychczas nie udało się opracować procedur permanentnego wygaszenia go bez jednoczesnego rozkładu cząsteczki melaniny. Należy jednak podkreślić że intensywność i wypadkowy kształt sygnału EPR melaniny zależą od czynników zewnętrznych. Wśród zidentyfikowanych czynników wpływających na sygnał EPR melanin znajdują się : światło UV i widzialne (Sarna et al., 1984, 1985), pH (Chio et al., 1982), temperatura (Chio et al., 1980; Arnaud et al., 1983), kompleksowanie wielowartościowych jonów diamagnetycznych (Felix et al., 1978), reakcje redoks melaniny (Korytowski et al., 1986; Sarna i Swartz, 1993) oraz stopień uwodnienia polimeru melaniny (Sealy et al., 1980). Uważa się, że większość z tych czynników wpływa na sygnał melaniny poprzez modyfikację równowagi komproporcjonacji. Równowaga ta dotyczy całkowicie utlenionej (orto-chinonu) i całkowicie zredukowanej (orto-hydrochinon) oraz formy pośredniej. Formy pośrednie są formami rodnicowymi (orto-semichinony) (Felix et al., 1978; Sealy et al., 1984). W przypadku feomelaniny będą to odpowiednio orto-chinoiminy, orto-aminofenole i orto-semichinoniminy.



W warunkach temperatury pokojowej i neutralnego pH, bez oświetlania i dodawania jonów metali, przy pełnym uwodnieniu próbki, równowaga jest silnie przesunięta w stronę form diamagnetycznych. Zawartość wolnych rodniców dla syntetycznej DOPA melaniny w tych warunkach szacowana jest na około  $2 \cdot 10^{18}$  spinów/g suchej masy melaniny, co daje mniej więcej jeden wolny rodnic na ok 1500 cząsteczek podjednostki melaniny (przy założeniu masy molowej monomeru melaniny na poziomie 200). Zawartość wolnych rodniców w oczyszczonej melaniny z naczyńówki oczu wołowych wynosi mniej więcej połowę ilości znalezionych w DOPA melaninie (Chio et al., 1982). Z powodu przesunięcia równowagi komproporcjonacji w stronę diamagnetycznych form podjednostek melaniny, wykrywalna w typowych warunkach ilość centrów rodnicowych jest raczej niska, natomiast całkowita liczba aktywnych podjednostek melaniny jest znacznie wyższa (Sealy et al., 1980; Sarna et al., 1981). Oprócz zmian intensywności sygnału, zauważalne są zmiany innych parametrów spektralnych. Dla DOPA melaniny współczynnik  $g$  wynosi 2,0034 przy pH=1, 2,0036 w pH=7 i osiąga wartość 2,0042 dla pH=12 (Chio et al., 1982). Wraz z podnoszeniem pH rośnie też stężenie spinów, do

wartości  $1,2 \cdot 10^{19}$  spinów/g. Przy wysokich wartościach pH sygnał eumelanin, szczególnie DOPA melaniny, sygnał staje się bardziej asymetryczny niż w niskim pH. W przypadku feomelaniny zmiany przebiegu sygnału są bardziej nasilone. Spowodowane jest to inną budową centrum rodnikowego feomelaniny. Radniki ortosemichinoiminowe posiadają niesparowany elektron zlokalizowany na atomach tlenu i azotu. W widmie wyraźnie widać sprzężenie nadsubtelne, ze składową równoległą wynoszącą 15 G. Po dodaniu jonów diamagnetycznych następują zmiany w obrazie widma EPR. Pojawianie się tych zmian jest zbieżne z procesem formowania się kompleksu między jednostkami melaniny a jonami metali (Felix et al., 1978). Struktura melaniny ma wpływ na wielkość rozszczepienia super-nadsubtelnego, które jest efektem oddziaływania spinu jądra skompleksowanego z melaniną jonu metalu ze spinem elektronowym melaniny (Felix i Sealy, 1981). Można nawet użyć tej właściwości do identyfikacji typu melaniny (Jimbow et al., 1984). Jony diamagnetyczne powodują wzrost sygnału EPR melaniny poprzez stabilizację wolnych rodników, przesuując tym samym równowagę komproporcjonacji w stronę formy semichinonowej. W podobny sposób działa podniesienie pH - indukowana deprotonizacja rodników skutkuje większą ich stabilizacją. Oba te oddziaływania prowadzą do wzrostu stężenia wolnych rodników w polimerze melaniny. Melanina prawdopodobnie zawiera więcej niż jeden rodzaj centrów rodnikowych (Sealy et al., 1980; Sarna, 1992). Pośrednio wynika to z faktu, iż bez rozłożenia cząsteczki melaniny nie da się całkowicie wygasić jej sygnału EPR. Prawdopodobnie istnieje pula rodników, powstałych w trakcie syntezy melaniny, sterycznie chronionych wewnątrz cząsteczki polimeru. Z powodu dobrej izolacji od czynników zewnętrznych oraz niskiej reaktywności otoczenia, radniki te są stosunkowo stabilne. Używając niskiego pH można wygasić pulę rodników indukowalnych, zostawiając tylko pulę rodników samoistnych. Można użyć tego sygnału do oceny ilości melaniny, lub też do oszacowania stopnia jej degradacji (Sarna et al., 2003).

Intensywność sygnału EPR melaniny mocno spada przy podaniu jonów paramagnetycznych, takich jak żelazo(III) czy miedź(II). Początkowo sądzono, iż efekt ten jest wywoływany przez chemiczną reakcję między jonami miedzi i wolnymi rodnikami (Blois et al., 1964), lecz późniejsze badania udowodniły całkowicie magnetyczną naturę tego oddziaływania (Sarna et al., 1976). Radniki melaniny oddziałują z paramagnetycznymi jonami metali, które są unieruchomione w sieci polimeru. Nieruchomy jon może być traktowany jako dipol magnetyczny, który nie zmienia orientacji w stosunku do centrum paramagnetycznego melaniny. Efektem takiego oddziaływania jest dipolowe poszerzenie sygnału melaniny. Stopień poszerzenia sygnału melaniny odwrotnie zależy od kwadratu odległości między rodnikiem melaniny a jonami metali. Statyczne oddziaływanie



dipolarne jest modyfikowane przez relaksację spinowo-sieciową jonów metali. Opis tego procesu dla widma proszkowego zaproponował Leigh (Leigh, 1970).

$$L(H) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \frac{\delta H}{[(H - H_0)^2 + \delta H^2]} \sin\theta d\theta d\varphi$$

gdzie :

$$\delta H = \gamma_f \mu_m^2 T_{1m} r^{-6} (1 - 3\cos^2 \theta')^2 + \delta H_0$$

Kąt  $\theta'$  jest to kąt pomiędzy wektorem wodzącym i polem magnetycznym  $H_0$  i może być powiązany poprzez geometrię ułożenia rodniczków z kątami  $\theta$  i  $\varphi$ , opisujących kątową zależność wolnorodnikowego rezonansu.  $T_{1m}$  jest czasem relaksacji spinowo-sieciowej metalu,  $\mu_m$  jest efektywnym momentem dipolowym metalu,  $\delta H_0$  jest naturalną szerokością linii a  $\gamma_f$  współczynnikiem żyromagnetycznym wolnego rodnika.

W cytowanej powyżej pracy użyto jonów metali ziem rzadkich, które są bardzo zbliżone do siebie pod względem właściwości chemicznych, natomiast różnią się właściwościami magnetycznymi. Dzięki tym własnościom, możliwe było obserwowanie ich wpływu na amplitudę sygnału oraz nasycalność sygnału EPR. Dla jonów dysprozu, dzięki wyjątkowo szybkiemu procesowi ich relaksacji, wpływ na dipolowe poszerzenie sygnału melaniny jest znikomy. Wtedy proces relaksacyjny można opisać równaniem Bloembergen'a :

$$T_{1f}^{-1} = \frac{3\gamma_f^2 \mu_m^2 \sin^2 \theta' \cos^2 \theta' r^{-6} T_{1m}}{1 + 4\pi^2 \nu^2 T_{1m}^2}$$

Maksimum efektu skracającego czas relaksacji spinowo-sieciowej rodniczków melaniny występuje dla warunku :

$$T_{1m}^{-1} = 2\pi\nu \quad \text{gdzie } \nu \text{ jest częstotliwością rezonansową mikrofal}$$

W paśmie X ten warunek jest spełniony dla niektórych szybko relaksujących lantanowców, np. dla dysprozu.

Ponieważ wszystkie naturalne melaniny zawierają pewne ilości skompleksowanych jonów metali przejściowych, ich bezpośrednie ilościowe porównanie może być utrudnione. Aby móc zmierzyć sygnał melaniny pozbawiony wpływów od jonów metali, inkubuje się melanosomy przez kilka godzin w obecności silnych chelatorów , takich jak EDTA czy desferal. Można również uwolnić jony metali przez silne zakwaszenie kwasami solnym lub siarkowym, lecz wtedy może dojść do modyfikacji chemicznej samej melaniny (Liu et al., 2003).

### ***Właściwości jonowymiennie melanin***

Zdolność melanin do wiązania jonów metali jest jedną z własności melaniny, które może determinować poziom wolnych jonów w organizmie. Jest to zagadnienie szeroko omawiane w literaturze (Sarna, 1992; Swartz et al., 1992; Enochs et al., 1994). Wiadomo, iż melaniny zarówno *in vivo* jak i *in vitro* potrafią zgromadzić duże ilości wielowartościowych jonów metali (Okazaki et al., 1985; Zecca i Swartz, 1993). Ilość miejsc mogących wiązać metale w eumelaninie oszacowano na ok 20% liczby podjednostek w polimerze (Potts i Au, 1976). Podobne wyniki osiągnięto, miareczkując sygnał EPR melaniny jonami paramagnetycznymi. Oszacowano, że na gram suchej melaniny przypada ok.  $6 \cdot 10^{20}$  miejsc wiążących jony metali (Sarna et al., 1976). Ilość związanych jonów zależy od pH, w przedziale 1-7 pH ilość związanych jonów rośnie wraz ze wzrostem pH. Lydén i współpracownicy, posługując się radioaktywnym izotopem  $^{54}\text{Mn(II)}$ , oszacowali ilość jonów metali przez różne typy melanin (Lydén et al., 1984). Spośród badanych melanin, największą pojemnością wykazały się melanosomy z oczu wolic (1,33  $\mu\text{mol/mg}$  melaniny), podczas gdy melanina z włosów ludzkich była w stanie związać tylko 0,23  $\mu\text{mol/mg}$ , a syntetyczna dopamino-melanina zaledwie 0,15  $\mu\text{mol/mg}$ . Charakter oddziaływania między różnymi melaninami a jonami był też badany przy użyciu spektroskopii EPR oraz izotopu  $^{63}\text{Cu(II)}$  (Froncisz et al., 1980; Sarna et al., 1980b). W zależności od pH, jony miedzi(II) mogą tworzyć kilka rodzajów związków kompleksowych o różnej stabilności, w zależności jakie grupy funkcyjne melanin biorą udział. Większość kompleksów używa tylko jednego lub dwóch ligandów melaninowych, reszta prawdopodobnie wchodzi w interakcję z wodą lub grupami  $\text{OH}^-$ . W zakresie pH poniżej 7 najczęściej pojawia się kompleks z grupą karboksylową melaniny. W eumelaninie występuje także kompleks dwukleszczowy azotowo-karboksylowy. Przy pH powyżej 7 kompleksy tworzą się przy użyciu grup hydroksylowych fenoli, lecz ilość takich grup w melaninach naturalnych jest znacznie mniejsza niż w syntetycznej DOPA melaninie. Blokowanie grup karboksylowych lub fenolowych w syntetycznej DOPA melaninie poprzez metylacje, etylacje lub acetylacje prowadzi do redukcji ilości związanych jonów miedzi(II) (Sarna et al., 1981). Ponieważ widma EPR kompleksów melanin z jonami miedzi(II) są praktycznie identyczne zarówno dla melanin natywnych, jak i dla melanin pozbawionych białek, wysnuto wniosek że komponenta białkowa w melaninie nie bierze czynnego udziału w procesie kompleksowania jonów. Proces kompleksowania jonów metali przez melaninę przebiega etapowo. W lekko kwaśnym środowisku po dodaniu jonów miedzi(II) tworzy się kompleks przejściowy, który w ciągu kilku godzin przekształca się w bardziej stabilne, klasyczne jedno- lub dwukleszczowe kompleksy. Bardzo podobny

przebieg procesu kompleksowania został zaobserwowany dla jonów żelaza(III) i syntetycznej neuromelaniny (Shima et al., 1997). Zdolności do oddziaływań jonowych melanin nie dotyczą wyłącznie wielowartościowych jonów metali. Opisano wiele interakcji melanin z kationami organicznymi, takimi jak kationowe pochodne porfiryn oraz niektórych leków (Bielec et al., 1986; Link et al., 1989).

### ***Właściwości redox melanin***

Zdolność melanin do utleniania/redukcji jest determinowana przez właściwości podjednostek melanin (Sarna i Swartz, 1993). Grupami, które najprawdopodobniej biorą udział w takich reakcjach są 5,6-dihydroksyindolowe, 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksyłowe oraz ich częściowo i w pełni utlenione formy (semi-chinony i chinony). W przypadku feomelanin będą to najprawdopodobniej o-aminofenole, częściowo utlenione o-semichinoniminy oraz całkowicie utlenione o-chinonoiminy. Najważniejszą różnicą przy porównywaniu podjednostek melaniny oraz ich form niezwiązanych ze szkieletem melaniny, jest chemiczna reaktywność. Wolne o-chinony są niezwykle reaktywne, ich czas życia w roztworze jest bardzo krótki (Thompson et al., 1985). W cząsteczce melaniny grupy te są dość stabilne. Jest to prawdopodobnie spowodowane zmianą ich potencjału redoks i ograniczonej dostępności tych grup funkcyjnych dla reagentów. Używając radiolizy impulsowej, Rózanowska i wsp. oszacowali potencjał jednoelektronowej redukcji dla syntetycznych eu- i feomelanin. Feomelanina oddziałuje z łagodniejszym reduktorem, charakteryzującym się potencjałem jednoelektronowej redukcji bardziej dodatnim niż -350mV. Ten sam potencjał dla syntetycznej DOPA melaniny mieści się w granicach -450 -550mV (Rózanowska et al., 1999). Do pomiaru jednoelektronowych reakcji syntetycznej DOPA melaniny używano technik EPR w połączeniu ze znacznikami nitroksylowymi (Sarna et al., 1985). Oddziaływanie pomiędzy melaniną a rodnikami nitroksylowymi okazuje się być silnie zależne od pH. Tempo redukcji znaczników nitroksylowych jest do 20-tu razy większe w pH 10 niż w pH 5. Takie zachowanie sugeruje zaangażowanie w reakcję grup hydrochinonowych. Obserwowana redukcja znaczników nitroksylowych jest odwracalna, co sugeruje powstawanie w czasie reakcji równowagi redoks. Oszacowano, iż w autooksydowanej DOPA melaninie ilość grup będących donorami elektronów jest około 20-30 razy większa niż grup akceptujących elektrony. Całkowitą ilość grup aktywnych redoksowo w polimerze melaniny ocenia się na ok. 25% wszystkich podjednostek. Wynika z tego, że melanina znajduje się w większości w formie zredukowanej. Należy zwrócić uwagę, że zewnętrzne czynniki, takie jak choćby warunki przechowywania czy czas przechowywania melaniny mogą znacząco zmodyfikować ich

właściwości w tym zakresie. W układach biologicznych najważniejszym akceptorem elektronów jest tlen cząsteczkowy. Rekcje zachodzące między tlenem a melaniną można wygodnie mierzyć przy pomocy oksymetrii EPR (Sarna et al., 1980a). Efektywność oddziaływania melanin z tlenem zależy silnie od warunków zewnętrznych. Konsumpcja tlenu przez syntetyczną DOPA melaninę w pH 11 jest kilka tysięcy razy wyższa niż w pH 5,5. Odpowiada za to prawdopodobnie występująca w wysokim pH jonizacja grup hydroksyfenolowych. Produktem finalnym oddziaływania melaniny z tlenem jest nadtlenek wodoru, na co wskazuje hamowanie konsumpcji tlenu poprzez dodanie katalazy.  $H_2O_2$  powstaje w reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, będącego pierwotnym produktem jednoelektronowej redukcji tlenu przez melaninę. Potwierdzono to poprzez dodanie dysmutazy ponadtlenkowej, co dodatkowo przyspieszyło powstawanie nadtlenu wodoru. Przy pomocy elektrody oksydazowej udało się wykryć nadtlenek wodoru podczas auto-oksydacji melaniny (Korytowski et al., 1985). Ilość wyprodukowanego nadtlenu wodoru zależy od typu melaniny. Melanina otrzymana w reakcji autooksydacji jest pięciokrotnie wydajniejsza niż syntetyzowana przy użyciu tyrozynazy i dziesięciokrotnie wydajniejsza od oczyszczonej melaniny o naczyniówki oka wołu. Dane doświadczalne wskazują, że DOPA melanina wykazuje aktywność dysmutazową, mogąc zarówno utleniać, jak i redukować anionorodnik ponadtlenkowy odpowiednio do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru. W przypadku DOPA-melaniny procesem wydajniejszym (ok 70% całości) jest reakcja utlenienia do  $O_2$  (Korytowski et al., 1986).

### ***Wpływ światła na melaniny***

Najbardziej podstawową rolą melanin jest ochrona przed szkodliwym promieniowaniem, poprzez bardzo szybką i wydajną konwersję energii wzbudzenia elektronowego do ciepła (Meng i Kaxiras, 2008; Meredith i Riesz, 2004). Światło, zarówno widzialne jak i UV, modyfikuje niektóre własności melanin. Zmieniają się właściwości redoks oraz stymulowana jest produkcja rodników. Jak wspomniano wyżej, światło powoduje odwracalne zmiany w sygnale EPR melanin. W warunkach stacjonarnych po czasie kilku sekund od rozpoczęcia naświetlania, sygnał EPR melaniny stabilizuje się na wyższym poziomie. Po wyłączeniu światła, sygnał zanika do wartości pierwotnej z kinetyką drugorzędową, charakterystyczną dla rekombinacji wolnych rodników w roztworze (Felix et al., 1979). Sugeruje to dużą mobilność rodników w cząsteczce melaniny. Pod wpływem światła zachodzi w melaninie generacja wolnych rodników, wydajność ich powstawania jest zależna od długości fali (Sarna i Sealy, 1984b). Dla fal

najkrótszych wydajność kwantowa jest największa, lecz i tak niewielka, sięgająca wartości 0,01. Dla światła widzialnego wartość ta spada już poniżej 0,001. Wydajność dla eumelanin naturalnych jest około trzykrotnie większa niż melanin syntetycznych. Widmo czynnościowe fotogenerowania rodników melaniny różni się od jej widma absorpcji, co sugeruje, że różne chromofory zaangażowane są w obydwu procesach. Nofsinger i współpracownicy zaobserwowali, iż duże znaczenie dla wydajności generowania rodników ma masa molekularna cząsteczek melaniny (Nofsinger et al., 1999a). Dla frakcji molekularnych o najniższych masach widmo absorpcji było bardzo zbliżone do widma generowania rodników. Wywnioskowano, że najbardziej fotoreaktywnymi składnikami melaniny są frakcje o najniższej masie cząsteczkowej. Naświetlanie melanin w obecności tlenu prowadzi do jego wzmożonej konsumpcji, z wytworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego oraz wtórnie nadtlenu wodoru (Korytowski et al., 1987; Sarna et al., 1980a). Zarówno wydajności, jak i widma czynnościowe fotokonsumpcji tlenu są bardzo zbliżone do widma czynnościowego fotoindukcji wolnych rodników w melaninie. Badano fotokonsumpcję melanosomów pochodzących z ludzkich komórek RPE. Wydajność fotokonsumpcji tlenu rośnie wraz wiekiem donorów (Rózanowska et al., 2002; Zareba et al., 2006b). Rodzi to pytania na temat przyczyn wzrostu fotoreaktywności. Używając *Sepia* melaniny jako modelu, Nofsinger i inni wykazali różnice w fotoprodukcji anionorodnika ponadtlenkowego przez różne frakcje wagowe melaniny (Nofsinger et al., 1999b). Reaktywność najmniejszych składowych przekraczała o rząd wielkości wydajność niefrakcjonowanej *Sepia* melaniny. Prawdopodobną przyczyną jest zmniejszanie ilości aktywnych redokso grup hydrochinonowych eksponowanych do środowiska w miarę wzrostu cząsteczki melaniny. Przy dłuższym naświetlaniu melanin w obecności tlenu dochodzi do ich fotodegradacji. Tempo degradacji zależy od wielu czynników, w tym pH czy obecności jonów metali przejściowych (Korytowski i Sarna, 1990). Sugeruje się udział zawartych w melaninie jonów metali przejściowych w proces degradacji melaniny poprzez reakcje typu Fentona (Korytowski et al., 1987). Proces fotobłaknięcia melanin zawiera dwa etapy : odwracalne utlenienie grup hydrochinonowych i następujące później nieodwracalne reakcje prowadzące do zniszczenia struktury polimeru.

### ***Melanina jako antyutleniacz***

Z opisanych powyżej właściwości melaniny wyłania się obraz barwnika będącego potencjalnym antyutleniaczem (Sarna, 1992). Rzeczywiście, jak wykazano w układach modelowych, melanina może wygaszać stany elektronowo wzbudzone cząsteczek niektórych fotosensybilizatorów. Melanina jest zdolna do przychwytywania powstałych

wolnych rodników, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy czy rodniki peroksyłowe lub alkoksyłowe (Rózanowska et al., 1999). Może przechwytywać jony metali aktywnych redkosowo, takich jak miedź czy żelazo. Wykazano oddziaływanie melaniny z fotouczulaczami naładowanymi dodatkowo, takimi jak niektóre pochodne porfiryn (Bielec et al., 1986). W obecności melaniny zauważono gaszenie stanów elektronowo wzbudzonych fotouczulacza, i mniejszą fotokonsumpcję tlenu. Badania przeprowadzone przy użyciu spektroskopii femtosekundowej absorpcji i pikosekundowej emisji, pokazują że jonowe wiązanie między melaniną a fotouczulaczem prowadzi do bardzo szybkiego transferu energii z cząsteczki wzbudzonej porfiryryny na melaninę (Ye et al., 2003). Melaniny mogą być wydajnymi zmiataczami tlenu singletowego (Sealy et al., 1984; Sarna et al., 1985). Stała oddziaływania między syntetyczną DOPA melaniną a generowanym przez róż bengalski tlenem singletowym osiąga wartość ok  $1,3 \cdot 10^5$  (mg/ml)<sup>-1</sup>/s, natomiast w przypadku cysteinylidopa melaniny jest około czterokrotnie większa. Dla naturalnych melanin stała oddziaływania jest znacznie mniejsza, z powodu jej nierozpuszczalności w wodzie. Wartość stałej oddziaływania DOPA melaniny z anionorodnikiem ponadtlenkowym została wyznaczona metodą radiolizy impulsowej i wynosi  $6,5 \cdot 10^5$ /M/s (Sarna et al., 1986), przy założeniu masy cząsteczkowej monomeru melaniny na 200. Podobne wyniki ( $4 \cdot 10^5$ /M/s) uzyskano wcześniej badając tempo powstawania adduktu DMPO-OOH w obecności melaniny lub dysmutazy ponadtlenkowej. Syntetyczne melaniny charakteryzują się dużą szybkością reakcji z rodnikami węglcentrowymi ( $10^7$ - $10^8$  M/s) oraz nieco wolniejszą z rodnikami peroksyłowymi ( $2,6 \cdot 10^6$  dla cysteinylidopa melaniny oraz  $3,5 \cdot 10^4$  dla DOPA melaniny), co pozwala przypuszczać, iż mogą odgrywać rolę przy przerywaniu łańcuchowej reakcji peroksydacji lipidów błonowych (Dunford et al., 1995). W układach biologicznych właściwości te mają nieco mniejsze znaczenie, z powodu lokalizacji melaniny. Zamknięta w objętościowo niewielkiej części komórki, oraz odgródzona błoną od cytoplazmy melanina nie ma zbyt wielu okazji do wykazania się swoimi właściwościami. Najbardziej widoczny efekt antyoksydacyjny melaniny związany jest z jej zdolnością do kompleksowania jonów metali aktywnych w procesach redoks, takich jak żelazo, miedź czy mangan. Kompleksy tych jonów z melaniną nie są całkowicie nieaktywne redkosowo, lecz powstające lokalnie reaktywne formy tlenu, szczególnie rodnik hydroksyłowy, są od razu przechwytywane przez grupy znajdujące się w najbliższym sąsiedztwie melaniny. Udowodniono, że przechwytywanie jonów żelaza jest głównym mechanizmem hamowania peroksydacji lipidów przez melaninę (Korytowski et al., 1995; Zadło et al., 2007) Podobny mechanizm działania antyoksydacyjnego przypisywany jest także neuromelaninie (Zecca et al., 2008). Z drugiej strony, melanina

przeładowana jonami żelaza zmienia swoje właściwości z ochronnych na proutleniające (Sotomatsu et al., 1994). Podobne zjawisko obserwuje się w wypadku, gdy w środowisku reakcji znajdzie się silny chelator, taki jak EDTA. Melanina jest w stanie zredukować żelazo związane z EDTA, umożliwiając mu tym samym udział w reakcji Fentona (Pilas et al., 1988; Zareba et al., 1995).

## **Właściwości fotoprotekcyjne i fotouczulające melanin**

### ***Stres oksydacyjny w oku***

Warstwa komórek RPE jest szczególnie narażona na indukowane światłem utlenianie, jako że znajduje się w tkance o dużym stopniu natlenowania oraz jest ekspozycja na światło. Światło z zakresu widzialnego nie uszkadza bezpośrednio DNA czy większości białek, lecz może prowadzić do oksydacyjnego uszkodzenia ważnych organelli komórkowych przy udziale endogennych fotosensybilizatorów, takich jak porfiryny, flawiny, a w szczególności dla RPE - lipofuscyny (Rózanowska i Sarna, 2005). Wykazano dość znaczną fotoreaktywność lipofuscyny (Rózanowska et al., 1995, 1998; Sundelin et al., 1998). Ponadto z wiekiem coraz więcej melanosomów w komórkach RPE zmienia swoją morfologię, łącząc się z ziarnami lipofuscyny, tworząc tzw. melanolipofuscynę. Lipofuscyna jest endogennym fotouczulaczem, powstającym z resztek zewnętrznych fragmentów fotoreceptorów, które nie uległy kompletnej degradacji po sfagocytowaniu przez RPE. Lipofuscyna zaczyna się odkładać od początku fagocytarnej aktywności RPE, zwiększając zajmowaną przez siebie objętość w komórkach upigmentowanego nabłonka, osiągając znaczny procent objętości komórek w wieku ok 90 lat (Rózanowska et al., 1995). Takie nagromadzenie lipofuscyny upośledza zdolność komórek do fagocytowania POS (Sundelin et al., 1998) i może prowadzić nawet do ich śmierci (Dorey et al., 1989). Jednym ze zidentyfikowanych niskocząsteczkowych składników lipofuscyny jest bisretinoid pirymidynowy (A2E), syntetyzowany lokalnie poprzez enzymy lizosomalne (Sparrow et al., 2008). Chociaż początkowo postulowano istotną rolę A2E w fotoreaktywności lipofuscyny, dokładne badania fizykochemiczne wykazały, że związek ten jest mało reaktywny chemicznie (Cantrell et al., 2001; Lamb et al., 2001). Dodatkowy stres oksydacyjny występuje podczas fagocytozy zewnętrznych segmentów fotoreceptorów, które zawierają duże ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, bardzo podatnych na utlenianie. Ponieważ komórki upigmentowanego nabłonka są tkanką postmitotyczną, uszkodzenia oksydacyjne mają tendencję do akumulowania się z wiekiem. Sądzi się, że to może prowadzić do rozwoju stanów patologicznych, związanych z chorobami takimi jak AMD (Beatty et al., 2000). Zdrowe komórki RPE dysponują całym

wachlarzem antyoksydantów, wśród których można wymienić katalazę, dysmutazę ponadtlenkową, peroksydazę glutationu, witaminy C i E oraz karotenoidy zeaksantynę i luteinę (Beatty et al., 1999). Kolejnym ogniwem mechanizmu ochronnego może być zawarta w komórkach melanina. Jak wspomniano wyżej, melanina oprócz wydajnej absorpcji światła widzialnego, może zmiatać wolne rodniki, wygaszać tlen singletowy i stany wzbudzone fotouczulaczy, oraz hamować peroksydację lipidów. Ponadto zdolność melaniny do przechwytywania jonów metali przejściowych może także chronić komórkę przez następstwami możliwej wówczas reakcji katalitycznego rozkładu nadtlenu wodoru przez jony metali (reakcja Fentona). Większość z omówionych powyżej właściwości melaniny badana była *in vitro* na układach modelowych, używając melanin syntetycznych. Wyniki z badań na układach modelowych nie mogą być bezpośrednio ekstrapolowane na układy komórkowe, w których melanina jest obecna w postaci melanosomów. Prowadzono badania na układach komórkowych, wykazując możliwą ochronną rolę melaniny przed uszkodzeniami generowanymi naświetlanym A2E (Wang et al., 2006). Z badań prowadzonych na tkankach pochodzących z osób starszych widać wyraźnie, że ilość melaniny w komórkach RPE maleje z wiekiem (Sarna et al., 2003).

W wyniku długotrwałego stresu oksydacyjnego, powodowanego przez intensywne promieniowanie widzialne i wysokie stężenie tlenu, właściwości fizykochemiczne melanin w RPE mogą ulegać istotnym przemianom. Wyraźnym zmianom ulega morfologia melanosomów w RPE u osobników w starszym wieku (Boulton, 1998; Simon et al., 2008). Pojawiły się teorie sugerujące udział oligomerów melaniny pochodzących z procesów degradacji melaniny w procesach powstawania zaburzeń fagozytozy komórek RPE (Sarangerajan i Apte, 2005). Oprócz lipofuscyny gromadzą się w błonie Brucha inne produkty procesów oksydacyjnych - zaawansowane produkty glikacji (AGEs) (Handa et al., 1999). Mogą one grać istotną rolę przy indukowaniu neowaskularyzacji naczyńówki. Komórki RPE posiadają receptor dla AGEs, pod wpływem pobudzenia którego wydzielają VEGF, podnosząc prawdopodobieństwo patologicznego rozrostu naczyń krwionośnych (Lu et al., 1998). Jednym z widocznych objawów postępującej degradacji makularnej jest pojawienie się między warstwą komórek RPE a błoną Brucha tzw. druzów (Hageman et al., 2001). Druzy są to metaboliczne pozostałości po fagocytozie POS, głównie lipoproteiny i inne związki hydrofobowe, w tym zaawansowane produkty glikacji, takie jak karboksymetylolizyna (CML) (Hageman i Mullins, 1999). Jest to jeden z pierwszych symptomów pojawiającej się niewydolności komórek RPE w procesie fagocytozy. Pojawiają się teorie alternatywne, sugerujące powstawanie druzów jako resztek po martwych komórkach RPE (Crabb et al., 2002). Pojawiające się złogi niestrawionego



materiału powodują dalsze zakłócenie funkcjonowania komórek RPE, przyspieszając rozwój patologii prowadzących do nieodwracalnych ubytków widzenia, np. poprzez atrofię geograficzną.

Najnowsze badania sugerują, że z wiekiem melanina traci większość ze swoich właściwości protekcyjnych, a nawet staje się fotouczulaczem (Rózanowski et al., 2008b; Zadło et al., 2007; Sarna et al., 2003). To, wraz z akumulacją fotoreaktywnego barwnika lipofuscyny może być przyczyną powstawania różnych patologii oka, prowadzących do ślepoty. Głównym procesem zmieniającym właściwości melaniny ocznej wydaje się być powolne, zachodzące z wiekiem fotoutlenianie tego pigmentu. W związku z tym pojawia się pytanie, jak zmienia się zdolność starczej melaniny RPE do sekwestracji jonów metali przejściowych, czy taka melanina, charakteryzuje się zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu, w jakim stopniu modyfikowane są jej właściwości fotochronne i przeciwutleniające.

## Cele pracy

Właściwości fotoochronne melanin zostały udokumentowane wielokrotnie w układach o różnym stopniu złożoności. Od pewnego czasu pojawiają się w literaturze naukowej intrygujące doniesienia wskazujące na fototoksyczne działanie melaniny, mogące mieć udział w powstawaniu takich patologii jak AMD. Niestety, mechanizm molekularny fototoksycznego działania melaniny, jak na razie, pozostaje nieznany.

Badanie opisane w niniejszej rozprawie miały więc na celu:

1. Identyfikację natury zmian właściwości fizykochemicznych melanosomów RPE z oczu ludzi, zachodzących z wiekiem, które odpowiedzialne są za zwiększoną fototoksyczność tych ziarnistości.
2. Ustalenie, czy melanosomy RPE z oczu zwierząt, poddane procesowi fotostarzenia *in vitro*, zwiększają swój fototoksyczny potencjał.
3. Identyfikację czynników sprzyjających takim zmianom fizykochemicznych właściwości melanosomów RPE, które skutkują ich zwiększoną fototoksycznością.

## **Materiały i metody**

### ***Odczynniki chemiczne i aparatura***

#### **Spektrometry :**

Spektrofotometr wyposażony w linijkę diodową o zakresie 190 - 820nm i rozdzielczości spektralnej 2nm model 8452A seria 2610A 00774, Hewlett Packard, USA

Spektrofotometr HP

Spektrometr EPR Bruker typ EMX - AA, seria nr 1579, Bruker, Niemcy - stosowany do wszystkich pomiarów EPR fali ciągłej.

Spektrometr impulsowy SR EPR w paśmie X, skonstruowany w Zakładzie Biofizyki

Spektrometr EPR pracujący w paśmie W, skonstruowany na Wydziale Biofizyki Medical College of Wisconsin, USA.

#### **HPLC**

Zestaw do wysokosprawnej chromatografii ciekowej składał się z następujących elementów :

Pompy Varian 9002, USA

Kolumny Ultrasphere™XL ze złożem hydrofobowym ODS, działająca w systemie odwróconej fazy, średnica ziaren 3µm, Beckman, USA.

Detektora absorpcyjometryczny 1050 Hewlett Packard, USA

Detektora elektrochemicznego z wiszącą kroplą rtęciową model 420 wraz z potencjostatem model 400 firmy EG&G Princeton Applied Research, NJ, USA

#### **Wagi :**

Waga analityczna Mettler typ AE240S, Mettler Toledo, USA.

Waga techniczna typ WPS 360C, Radwag, Radom, Polska.

#### **Wirówki :**

Sigma 3K15, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Niemcy

Beckman L7 - 65, Beckman Coulter, USA - używana do ultrawierwienia w gradiencie sacharozy.

Eppendorf 5417C, Eppendorf, Hamburg, Niemcy

Eppendorf, model 5415C

**Mikroskop** Nikon Eclipse TS100, Nikon Instruments Inc, Melville, USA

Nikon Eclipse TE2000U, Nikon Instruments Inc, Melville, USA

Komora środowiskowa Live Cell 3, Pathology Devices, Westminster, USA

pH - metr pH/ion analyzer 350, Corning, NY, USA wraz z elektrodą kombinowaną typu OSH 10 - 10, Metron, Czekanów, Polska

### **Źródła światła :**

Wysokociśnieniowa lampa ksenonowa o mocy 1000W Cermax PE1000DF w obudowie chłodzonej powietrzem Cermax model 22 - 1K, Perkin Elmer, USA wraz z zasilaczem model 500 - 1K - Cermax - Xe, Sciencetech, Kanada

Wysokociśnieniowa lampa ksenonowa o mocy 300W Cermax PE300CE - 13FM / Module 300W w obudowie chłodzonej powietrzem HX1, Perkin Elmer, USA wraz z zasilaczem PS300 - 12/300W, Perkin Elmer, USA - używana jako źródło światła w pomiarach EPR.

ThermoOriel Solar Simulator (Stratford, CT, USA) wyposażony w 1000 W lampę ksenonową, 420-630 nm lustro dichroiczne, i dodatkowy filtr UV, odcinający wszystko poniżej 380 nm (Eye Institute, Department of Ophthalmology, Medical College of Wisconsin, USA).

Filtr dichroiczny odbijający podczerwień do 740nm SIR Dielectric Heat Reflecting Hot Mirror, Präzisions Glas & Optik GmbH, Iserlohn, Niemcy - używany zarówno do fotodegradacji melanosomów jak i przy pomiarach EPR.

Filtry interferencyjne mikroskopowe 400-410 nm, Chroma Technology, Rockingham, USA

Filtr dichroiczny niebieski charakteryzujący się transmitancją powyżej 50% w zakresie spektralnym 370 - 512nm Blue additive dichroic filter 505FD64-25, Andover Corporation, Salem, USA - nakładany bezpośrednio na wnękę EPR przy pomiarach konsumpcji tlenu oraz akumulacji adduktu DMPO-OOH

### **Odczynniki**

1,2-dimerystylofosfatydylocholina (DMPC) oraz 1-palmitoilo-2-oleino-fosfatydylocholina (POPC) (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, US) Transportowane na suchym lodzie.

Soluene 350 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA)

Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, Polska: chlorek potasu (KCl), chlorek sodu (NaCl), dwuwodorofosforan (V) potasu ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sacharoza, wodorofosforan (V) sodu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), wodorotlenek sodu (NaOH).

Czarne kuleczki lateksowe o średnicy 1  $\mu\text{m}$  (Interfacial Microspheres & Nanospheres,

Eugene, OR, USA)

Przedsiębiorstwo przemysłowo-handlowe „Standard”, Lublin, Polska: kwas solny (35-38% HCl), nadtlenek wodoru ( 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ), chloroform, metanol.

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, chlorek żelaza (III) (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O), Cholesterol.

Merck, Darmstadt, Niemcy: metanol do HPLC, acetonitryl do HPLC, izopropanol do HPLC

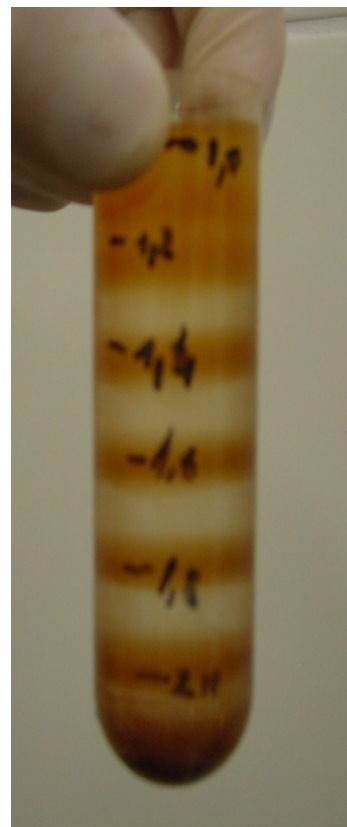
British Drug House Poole Ltd., Anglia: sól sodowa kwasu 4-etylenodiaminotetraoctowego (Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, skrót: EDTA).

Wszystkie odczynniki o czystości co najmniej cz. d. a.

Znacznik spinowy mHCTPO otrzymano dzięki uprzejmości Prof. H.J. Halperna (University of Chicago, Chicago, IL, USA)

### ***Izolacja melanosomów z oczu ludzkich***

Melanosomy ludzkie izolowano zmodyfikowaną metodą wg Boultona (Boulton et al., 2004). Ludzkie oczy pozbawione rogówek, tęczówek oraz ciała szklanego płukano buforem PBS. Przy pomocy pincety ostrożnie usuwano siatkówkę. Następnie przy pomocy pędzla z krótkim włosiem delikatnie zbierano komórki RPE zawieszając je w buforze PBS. W części przypadków komórki z oczu ludzkich otrzymywano już w formie zawiesiny w buforze. Komórki od dawców łączono w pule w zależności od wieku dawców. Otrzymane w ten sposób zawiesiny komórek zwirowano (5500 g, 5 minut) i zawieszono w buforze homogenizacyjnym (PBS + 0,25 M sacharoza). Komórki poddano homogenizacji ręcznej metodą teflon-szkło. Homogenizację prowadzono na lodzie - aby zminimalizować utlenianie się materiału. Po kilkunastu cyklach homogenizacji, całość delikatnie zwirowano (60g, 5 min). Nadsącz zachowano do dalszej procedury, natomiast osad poddano ponownej



*Fot 1: Melanosomy ludzkie po ultrawiirowaniu*

homogenizacji. Cykl ten powtórzono trzykrotnie. Otrzymane nadsącze połączone, zwirowano (5500 g, 5 min) i zawieszono w małej objętości buforu homogenizacyjnego. W probówkach do ultrawierowania przygotowano gradientowy roztwór sacharozy - o stężeniach od 2 M do 1 M co 0,2 M. Na tak przygotowany gradient delikatnie nałożono homogenizat z komórek RPE. Ultrawierowanie przeprowadzano w wirówce Beckmann L7-65 przy 100,000g przez godzinę w temperaturze 4°C.

Melanosomy jako organella o największej gęstości zbierano z samego dna probówki. Frakcje lipofuscyny i melanolipofuscyny osiadły na granicy faz między niższymi stężeniami sacharozy. Jako lipofuscynę zbierano materiał z granic fazowych 1 -1,2M oraz 1,2-1,4M sacharozy. Melanolipofuscynę zbierano z granic fazowych 1,4-1,6 oraz 1,6-1,8 M sacharozy. Frakcję melanosomalną po zebraniu umieszczano jeszcze raz na gradiencie sacharozowym i ultrawierowano drugi raz. Miało to na celu możliwie dokładne oddzielenie melanosomów od innych ziarnistości, szczególnie zawierających lipofuscynę. Celem oczyszczenia zebrane frakcje przepłukano kilkakrotnie buforem PBS oraz finalnie zawieszono w PBS. Ilość melanosomów ustalano licząc je w komorze Bürkera po 5000-krotnym rozcieńczeniu. Otrzymane w ten sposób ziarnistości przechowywano szczelnie zamknięte w temperaturze 4°C.

### ***Izolacja melanosomów z oczu wolic***

Procedura izolacji i oczyszczania melanosomów z oczu wolic różni się tylko kilkoma etapami od procedury dla oczu ludzkich. Oczy wołowe są dostarczane w całości, więc pierwszym etapem jest oczyszczenie gałki ocznej z nadmiaru tkanki. Następnie przy pomocy skalpela i nożyczek usuwana jest górna, zawierająca tęczę część gałki ocznej. Gałkę oczną pozbawia się soczewki i ciała szklistego. Tak przygotowane gałki odwraca się na lewą stronę, aby ułatwić zdjęcie siatkówki oraz komórek RPE. Pozostała część procedury jest analogiczna jak dla melanosomów ludzkich - z różnicą tylko przy gradiencie sacharozy. W tym przypadku stosowany jest gradient uproszczony, składający się tylko ze stężeń 1M i 2M. Oko wole jest zbyt młode by zawierać lipofuscynę lub melanolipofuscynę w obserwowalnych ilościach.

### ***Oznaczanie zawartości melaniny***

Ilościowych pomiarów melaniny dokonywano za pomocą dwóch metod : absorpcyjometrycznej oraz spektroskopii EPR. Do pomiarów absorpcji 10 µl zawiesiny melanosomów o gęstości ok 10<sup>9</sup> ziaren/ml dodawano do 190 µl Soluenu 350 i wytrząsano

do rozpuszczenia ziarnistości. Odczytywano absorbancję w zakresie 400-650 nm przy pomocy spektrometru diodowego Helwet-Packard HP8453. Aby uniknąć wpływu rozpraszania, normalizowano widmo odejmując wartość absorbancji przy długości fali 800nm. Przy tej długości fali melanina nie pochłania już promieniowania. Pomiarów zawartości melaniny przeprowadzono w temperaturze 77 K w obszarze  $g=2,00$ . Moc mikrofal wynosiła  $35\mu\text{W}$ , szerokość przemiatania 80 G a amplituda modulacji 3G. Do pomiarów próbkę zakwaszono do  $\text{pH}=1,5$  celem uwolnienia przez melaninę związanych jonów metali, które mają duży wpływ na sygnał EPR melanin (Sealy et al., 1982). Dla pomiarów EPR mierzono całkowitą amplitudę sygnału, normalizując wynik w związku z parametrami pomiaru - uwzględniając wzmocnienie. W obu tych przypadkach stwierdzono zanikanie charakterystycznych sygnałów.

### ***Fotodegradacja melanosomów***

Melanosomy zawieszano w buforze fosforanowym o  $\text{pH}$  5 lub 7, w zależności od wersji eksperymentu. Końcowa gęstość ziarnistości ustalana była na  $1 \cdot 10^9$  lub  $5 \cdot 10^8$  ziarnistości na mililitr. Próbki umieszczano w termostatowanym naczyniu, z temperaturą ustaloną na  $4^\circ\text{C}$ . Wewnątrz naczyń, w których prowadzona była degradacja znajdowały się mieszadła magnetyczne. Przez cały czas degradacji zawiesina była mieszana, aby uniknąć sedymentacji melanosomów. Tak przygotowane próbki degradowano światłem ciągłym, używając dwóch rodzajów oświetlaczy, w zależności od tego gdzie przeprowadzano degradację. Co pewien czas uzupełniano ilość wody odparowanej w trakcie naświetlania. W laboratorium MCW, gdzie degradowano melanosomy pochodzące od świń, używano oświetlacza ThermoOriel Solar Simulator. Do badań prowadzonych lokalnie do degradacji melanosomów wołowych używano lampy 1000W Cermax PE1000DF, wyposażonej w lustro dichroiczne 390-740nm i filtr krawędziowy  $> 400\text{nm}$ . Postępy degradacji monitorowano pobierając małą próbkę do oznaczenia gęstości optycznej i sygnału EPR. Gęstość optyczną zawiesiny melanosomów badano metodą pomiaru absorbancji w zakresie 350-600nm, po uprzednim rozpuszczeniu melanosomów za pomocą Soluenu 350. Próbki pobierano w odpowiednich interwałach czasowych, aby poznać kinetykę degradacji.

### ***Przygotowanie ekstraktów melanosomów.***

Ekstrakcję rozpuszczalnych w chloroformie składników melanosomów przeprowadzono wg zmodyfikowanej metody Folcha (Folch et al., 1957). Do 0,5 ml zawiesiny melanosomów w PBS dodano 0,8 ml mieszaniny chloroform/metanol (2:1, v/v), a następnie energicznie

wytrząsano przez ok 3 min. Po odwirowaniu na mikrowirówce (Eppendorf, model 5415C) pobierano frakcję chloroformową. Ekstrakt suszono strumieniem argonu i wysuszony przechowywano w -20°C. Zachowywano do dalszych doświadczeń melanosomy pozbawione rozpuszczalnej w chloroformie frakcji. Po zebraniu takie melanosomy trzykrotnie płukano PBS-em, następnie przechowywano w temperaturze 4°C

### ***Preparatyka liposomów zawierających ekstrakty melanosomowe***

Ekstrakty z melanosomów zamykano w liposomach o składzie 2mM 1-palmitoilo-2-oleino-fosfatydylocholiny (POPC), 2 mM cholesterolu, 2mM estru metyloвого kwasu linolenowego oraz 5mM 1,2-dimerystylofosfatydylocholiny (DMPC). Obecność nienasyconych reszt kwasów tłuszczowych służyła jako dodatkowy substrat do utleniania przez powstające w trakcie naświetlania reaktywne formy tlenu. Aby zminimalizować utlenianie wrażliwych grup, sporządzanie liposomów odbywało się w środowisku beztlenowym. Odważone ilości składników liposomów rozpuszczano w przeargonowanym chloroformie. Pod ciągłym strumieniem argonu roztwory wytrząsano na łaźni wodnej o temperaturze 37°C aż do odparowania chloroformu i powstania cienkiego filmu lipidowego na ściankach naczynia. Tak otrzymane preparat suszono pod próżnią przez przynajmniej 2 godziny. Następnie w warunkach atmosfery argonu, przy ciągłym mieszaniu w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, dodawano małymi porcjami PBSA. Otrzymane w ten sposób liposomy wielowarstwowe służyły do pomiarów EPR.

### ***Identyfikacja produktów utleniania cholesterolu przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC.***

Metoda rozdziału i detekcji nadtlenków cholesterolu przy pomocy HPLC i detektora elektrochemicznego z wiszącą kroplą rtęci daje możliwości rozróżnienia między powstałymi produktami (Korytowski et al., 1993). Posługując się tą metodą można dokonać ilościowej analizy powstających produktów utleniania cholesterolu. Ma to istotne znaczenie dla określenia reakcji, w której powstały wodoronadtlenki. Ekstraktem z ludzkich melanosomów wzbogacano liposomy wielowarstwowe, utworzone z mieszaniny DMPC:cholesterol w stosunku molowym 1:1. Tak przygotowane liposomy, zawieszony w buforze PBS naświetlano przez określone okresy czasu. Następnie pobraną próbkę dodawano do mieszaniny chloroform:metanol w stosunku 2:1, zawierającą dodatkowo 0,4mM BHT jako antyutleniacza, przerywającego dalsze utlenianie. Próbkę wytrząsano przez minutę, zwirowywano i oddzielano frakcję chloroformową. Odparowywano



chloroform przez suszenie strumieniem azotu. Wyszuszone próbki przenoszono do -20°C. Do pomiarów wysuszoną próbkę zawieszano w izopropanolu i w takiej postaci nakładano na kolumnę. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina o składzie : 72% metanol, 11% acetonitryl, 9% woda zawierająca 1mM NaClO<sub>4</sub>, 8% izopropanol. Mieszaninę filtrowano przez sącdek o średnicy porów 0,45µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) i pozbawiano tlenu przez godzinne przedmuchiwanie argonem. Stosowano kolumnę ze złożem hydrofobowym C18, z szybkością przepływu 1ml/min.

### ***Wzbogacanie melanosomów jonami żelaza.***

Do wprowadzania jonów żelaza używano jako soli cytrynianu żelaza. Roztwory soli żelaza sporządzano w pH =2, stosując 0,02M HCl. Melanosomy również zawieszano w pH =2, dodawano odpowiednią ilość roztworu jonów, następnie powoli podnoszono pH do ok 5,5-6 jednostki, umożliwiając melanie kompleksowanie jonów.

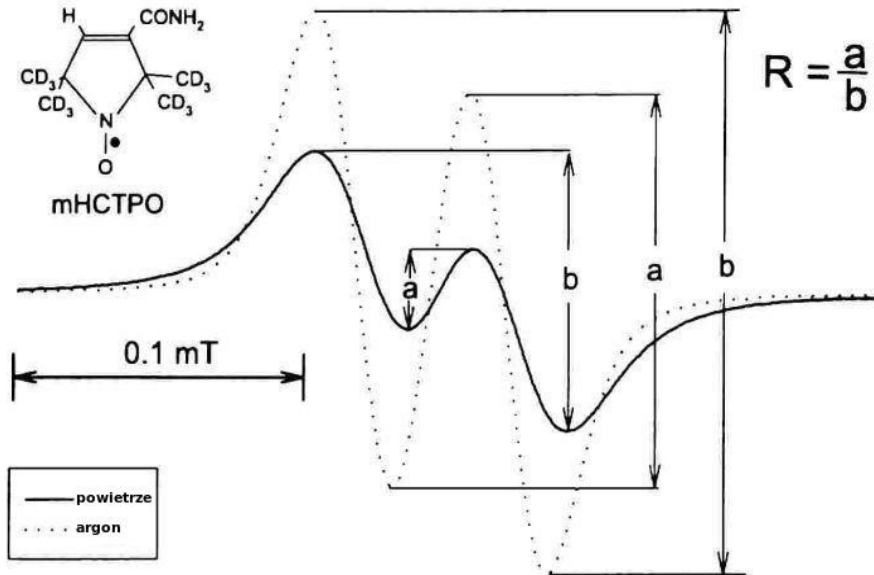
### ***Oznaczanie zawartości żelaza przy użyciu batofenantroliny***

Melanosomy w ilości ok 10<sup>9</sup> na próbkę zwirowywano, i zawieszano w 200 µl 2M HCl na 12 godzin. Po tym czasie melanosomy ponownie zwirowywano, a nadsącz poddawano zmodyfikowanej procedurze Hubermann'a i Perez'a (Huberman i Pérez, 2002). Do 50µl nadsącza dodawano 25 µl 9M HCl i inkubowano w 85°C przez 30 minut. Następnie do próbki dodawano 50 µl 33% kwasu trójchlorooctowego i inkubowano kolejne 10 minut. Próbki zwirowywano, 100 µl nadsącza mieszano z 50 µl 25% hydroksylaminy i inkubowano 10 minut. Po dodaniu 50 µl 50% octanu amonu oraz 50 µl 0,5% batofenantroliny próbki pozostawiano na 30 minut celem zakończenia reakcji barwnej. Po upływie tego czasu po 200 µl próbki było przenoszone do 96-dołkowej płytki celem zmierzenia absorbancji przy 540 nm. Jako krzywej wzorcowej zamiast melanosomów użyto roztworu chlorku żelaza poddanego identycznej procedurze.

### ***Fotokonsumpcja tlenu***

Indukowaną światłem konsumpcję tlenu mierzono stosując oksymetrię EPR. W tej metodzie pomiar stężenia tlenu wykonuje się wykorzystując wpływ oddziaływania spin-wymennego między cząsteczkami tlenu i rodnika nitroksylowego na kształt widma znacznika. Jako znacznik spinowy stosowano mHCTPO (Rózanowska et al., 1998; Halpern et al., 1990) w stężeniu 0,1mM. Pomiaru zmian stężenia tlenu były prowadzone w płaskiej kuwecie kwarcowej (0,3mm, Wilmad Glass, Co., NY, USA) umieszczonej w rezonatorze.

Kuwetę naświetlano lampą z palnikiem ksenonowym o mocy 300 W, stosując filtr wodny (celem usunięcia podczerwieni), filtr odcinający promieniowanie poniżej 390 nm oraz dodatkowy niebieski dichroiczny ( $420 \pm 25 \text{ nm}$ ).



Rysunek 4: Zmiany w widmie EPR sondy mHCTPO w zależności od obecności tlenu. Zmodyfikowany rysunek pochodzi z „Advanced course in Photobiology and Photomedicine” pod redakcją prof. Tadeusza Sarny

Parametr R wyznaczony z widma znacznika w sposób określony na rysunku powyżej przeliczano na stężenie tlenu wg równania  $[\text{O}_2][\text{mM}] = 0,463 - 0,707 \cdot R$ . Parametry zostały wyznaczone dla środowiska wodnego w pomiarach kalibracyjnych wykonanych przez Rózanowską (Rózanowska, 1998)

### **Pułapkowanie anionorodnika ponadtlenkowego fotogenerowanego w obecności melanosomów**

Pomiary pułapkowania anionorodnika ponadtlenkowego przez melanosomy przeprowadzono zarówno dla melanosomów ludzkich jak i zwierzęcych w identyczny sposób. Zawiesinę melanosomów o finalnej gęstości  $5 \times 10^8$  ziaren/ml, wraz z pułapką spinową DMPO o finalnym stężeniu 100 mM, zawieszano w 75% dimetylosulfotlenku (DMSO). Spowodowane to było bardzo krótkim czasem życia adduktu DMPO-OOH w wodzie. Addukt DMPO-OOH jest w środowisku wodnym wysoce niestabilny, przechodząc w addukt DMPO-OH, co komplikowałby pomiary ilościowe. Tak przygotowaną próbkę umieszczano w rezonatorze spektrometru EPR. W ciemności mierzono początkowy sygnał, i na tej podstawie wybierano wartość pola magnetycznego do pomiarów kinetyki. Kinetykę mierzono na sygnale w najniższej wartości pola, aby uniknąć wpływu sygnału

melaniny. Parametry użyte do zebrania widm adduktu DMPO-OOH były następujące : szerokość przemiatań 80G, amplituda modulacji 0,5G, stała czasowa 41msek czas pomiaru 84 sek, a moc mikrofal 10mW. Zebrano po dwa uśrednienia. Po zarejestrowaniu widma w ciemności prowadzono pomiar kinetyki przy stałej wartości pola. Przed każdym pomiarem ustalano wartość pola na maksimum pierwszego piksu adduktu, w większości przypadków była to wartość 3369,2 G. Kinetyki mierzono najczęściej przez 670 sekund, natomiast używając amplitudy modulacji wynoszącej 2 G przemodulowywano sygnał tak, iż tracił część struktury nadsubtelnej, za to zyskiwał na szerokości, co umożliwiło pewniejszy jego pomiar.

### ***Pomiary wpływu melanosomów na przeżywalność komórek ARPE-19***

Komórki ARPE-19 hodowano w MEM zawierającym dodatkowo 10% surowicy cielęcej. Do karmienia ziarnistościami wysiewano komórki w małej gęstości, tak iż nie tworzyły konfluentnej warstwy. Ziarnistości podawano wg protokołu opisanego przez Zarębę (Zareba et al., 2006a). Po 24 godzinach od wysiania komórki karmiono melanosomami (natywnymi oraz fotodegradowanymi) lub czarnymi kuleczkami lateksowymi. Ziarnistości podawano w ilości  $2,5 \cdot 10^7$  na  $\text{cm}^2$  podłoża. Komórki pozostawiano w cieplarni na okres 24 godzin, umożliwiając im zwiążanie i internalizację ziaren. Po tym czasie komórki wysiewano w małej gęstości na specjalne szklane płytki o ośmiu komorach. Doświadczenia z naświetlaniem i badaniem przeżywalności prowadzono trzy-cztery dni później. Płytki z komórkami umieszczano w mikroskopie Nikon Eclipse TE2000U, zintegrowanym z komorą Live Cell 3, umożliwiającą kontrolowanie temperatury, wilgotności i zawartości dwutlenku węgla. Komórki naświetlano w tych warunkach stosując 100 W lampę rtęciową wraz z zestawem filtrów dichroicznych. Światło docierające do komórek miało długość fali 400-410 nm, o gęstości mocy  $4\text{mW}/\text{mm}^2$ . Po 30 sekundach naświetlania następowały 4 minuty przerwy, w tym czasie automatycznie robione były zdjęcia preparatów. Procedura była powtarzana do osiągnięcia całkowitego czasu 180 minut. Zebrane dane analizowano przy pomocy oprogramowania Premier MetaMorph, łącząc zebrane zdjęcia w filmy ukazujące zmiany w czasie. Markerem apoptozy było tworzenie pęcherzyków apoptotycznych na powierzchni komórek (Wyllie et al., 1980). Wykresy tworzą ukazując odsetek komórek z wcześniej wybranej populacji (ok 150 komórek w każdej z grup), które podjęły tworzenie pęcherzyków. Każdy eksperyment powtórzono co najmniej trzykrotnie.

## ***Pomiary wpływu melanosomów na generację rodnika hydroksylowego reakcją Fentona.***

Rodniki hydroksylowe generowano za pomocą reakcji Fentona, czyli katalizowanego rozkładu nadtlenu wodoru poprzez zredukowane jony metali przejściowych. Na mieszaninę reakcyjną składało się : 1mM nadtlenek wodoru, 50  $\mu$ M roztwór cytrynianu żelaza (II), 100  $\mu$ M pułapki spinowej DMPO. Roztwór soli żelaza po sporządzeniu aż do momentu użycia przedmuchiwano azotem, aby zapobiec samoczynnemu utlenianiu się jonów. Wszystko zawieszono w 10 mM buforze fosforanowym o pH=7,4. Do takiej mieszaniny dodawano melanosomów, odpowiednio kontrolnych lub fotodegradowanych przez różne okresy czasu. Finalnym stężeniem melanosomów w próbce było  $3 \times 10^8$  ziarnistości/ml. Ostatnim dodawanym odczynnikiem był nadtlenek wodoru, inicjujący całą reakcję. Próbkę w płaskiej kuwecie kwarcowej jak najszybciej umieszczano w rezonatorze spektrometru EPR i rozpoczynano pomiar widma adduktu spinowego. Szerokość przemiatania wynosiła 100 G, amplituda modulacji 1 G, moc mikrofal 10 mW, stała czasowa 0,128s a całkowity czas skanowania wynosił 4 minuty.

## ***Pomiary czasu relaksacji spin-sieciowej melanosomów***

Melanosomy mierzono na spektrofotometrze EPR umożliwiającym pomiary odzysku nasycalności, skonstruowanym w Zakładzie Biofizyki. Mierzono melanosomy natywne, oraz po skompleksowaniu różnych ilości jonów dysprozu. Kompleksy melanosomów z jonami dysprozu przygotowywano w sposób analogiczny jak innymi jonami, lecz dodawano roztworu chlorku dysprozu(III), zawieszzonego w wodzie o ~1,5pH. Stopniowo podnoszono pH próbki, aż do osiągnięcia neutralnego pH . Używano dwóch czasów inkubacji melanosomów z jonami - godzinnego i 20-to godzinnego. Po inkubacji próbki kilkakrotnie przepłukiwano buforem. Próbki silnie zwirowywano, następnie osad ubijano do kapilar kwarcowych (śr. wew. 0,6 mm, Vitro Dynamics, Rockaway, NJ, U.S.A.). Tak przygotowane próbki umieszczano w rezonatorze typu loop-gap (Froncisz i Hyde, 1982). Pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej, przy modulacji amplitudy wynoszącej 3,2 G, tłumieniu mocy impulsów wzbudzających 10 dB, tłumienie mocy obserwacyjnej 25 dB. Impuls pompujący trwał 0,45 ns, obserwację zaczynało 1,3  $\mu$ s po impulsie pompującym. Zbierano po 10 000 uśrednień, gdzie każda krzywa obserwacyjna składała się z 1024 punktów.

### ***Redukcja znacznika spinowego (TEMPO-Choliny) przez melanosomy natywne oraz fotodegradowane.***

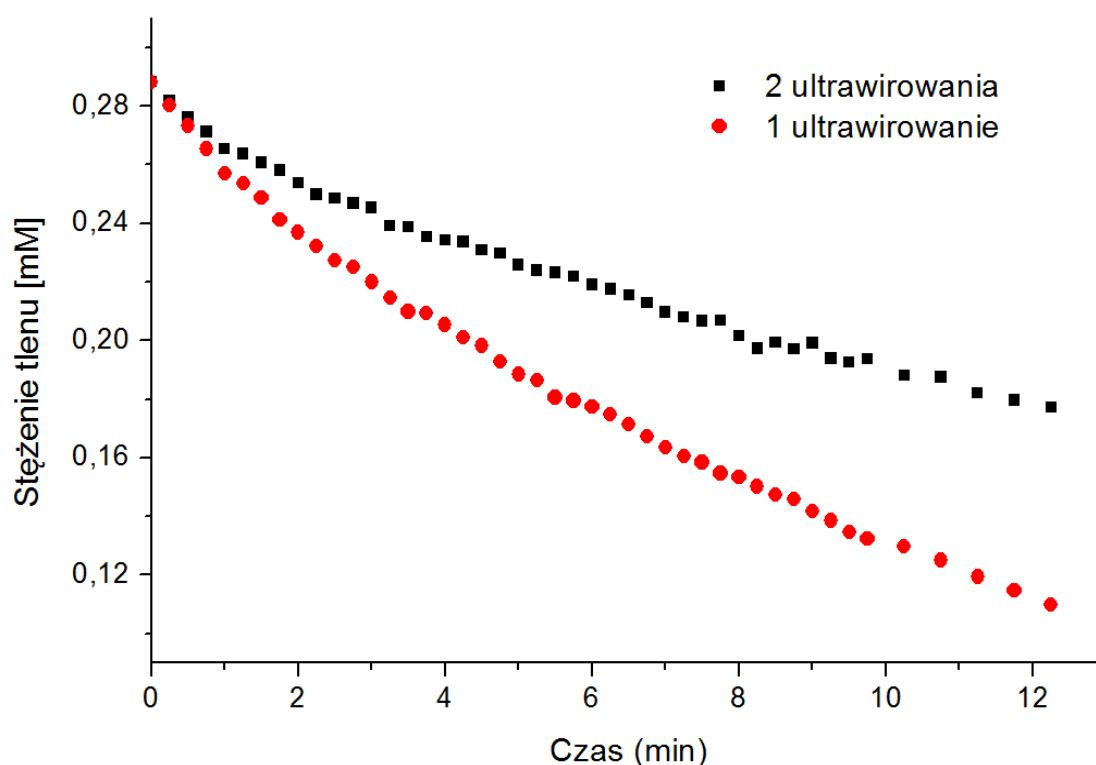
Do pomiarów użyto dodatnio naładowanego znacznika TEMPO-cholina, ponieważ jako dodatnio naładowany będzie miał największą szansę reakcji z ujemnie naładowaną melaniną. Pomiarów prowadzono w płaskiej kwarcowej kuwecie o pojemności 200  $\mu$ l. W próbce znajdowało się 25  $\mu$ M znacznika oraz ok 0,5 mg/ml melanosomów w PBS. Przed pomiarami, próbki przedmuchiwano argonem przez co najmniej 20 minut, celem usunięcia tlenu, ponieważ obecność tlenu hamuje redukcję znacznika (Sarna et al., 1985). Zmierzono sygnał w ciemności przy parametrach : szerokość przemiatania : 60G, moc mikrofal 1mW, amplituda modulacji 1G, czas przemiatania 40 sekund, stała czasowa 20 ms. Do pomiarów kinetyki wykonywano 11 minutowy pomiar sygnału przy stałej wartości pola magnetycznego wynoszącej 3371G. Po rozpoczęciu pomiaru kinetyki próbkę przez 40 sekund pozostawiano w ciemności, aby sprawdzić stabilność sygnału/ po upływie tego czasu rozpoczynano naświetlanie światłem niebieskim (400-490 nm). Po zakończeniu pomiaru kinetyki, zbierano ponownie sygnał znacznika, aby sprawdzić czy widmo zachowało kształt.

## Wyniki

### *Melanosomy ludzkie*

#### Fotokonsumpcja tlenu.

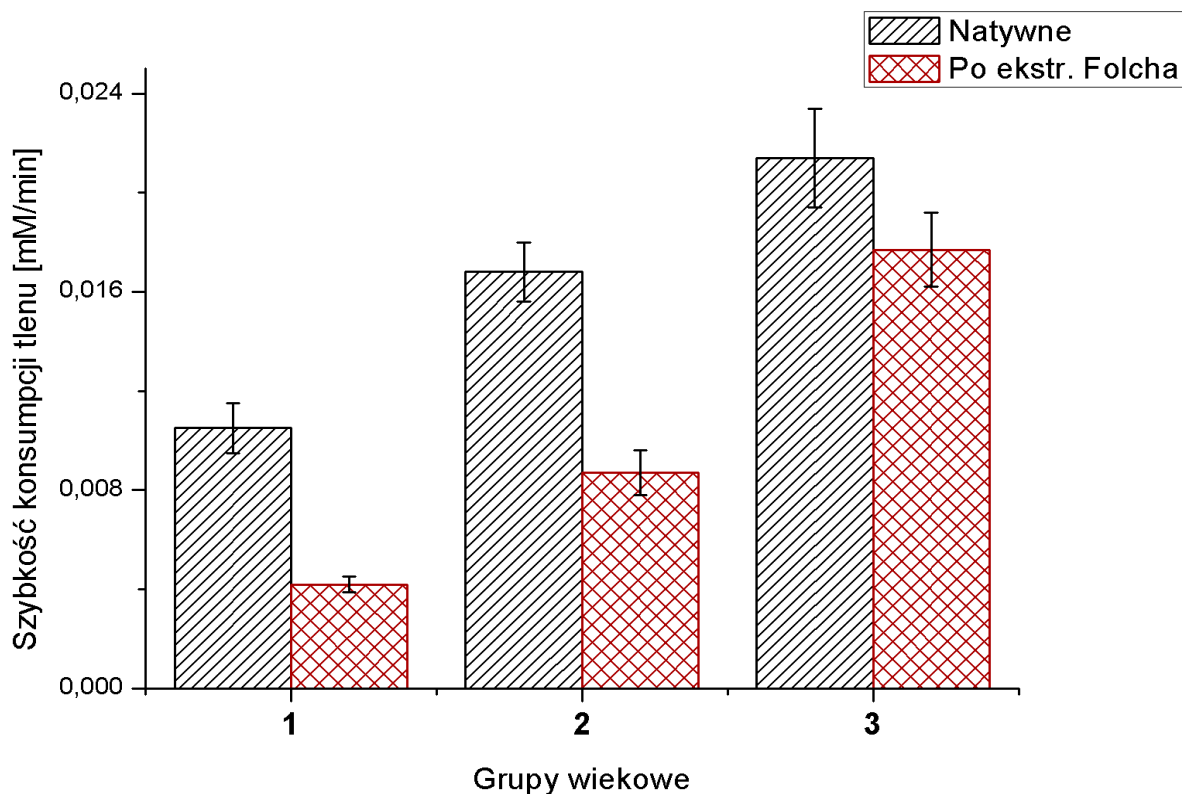
Badania właściwości melanosomów ludzkich rozpoczęto od pomiarów fotoindukowanej konsumpcji tlenu. Dwadzieścia jeden próbek pozyskanych z Wisconsin Lions Eye Bank podzielono na 3 grupy wiekowe : grupa 1 10-20 lat, grupa 2 45-55 lat oraz w grupie 3 powyżej 80 lat. Do części doświadczeń użyto próbek pochodzących z oczu ludzkich otrzymanych dzięki uprzejmości Prof. Michaela Boultona z Cardiff University. Aby zminimalizować efekt rozrzutu osobniczego, próbki od różnych dawców w odpowiednich kategoriach wiekowych połączono. Konsumpcję tlenu indukowano światłem niebieskim, ze względu na postulowaną toksyczność takiego promieniowania. Różnice w konsumpcji tlenu z udziałem melanosomów oczyszczanych raz i dwa razy ukazuje rys 5.



*Rysunek 5: Różnice w tempie konsumpcji tlenu z udziałem melanosomów ludzkich. Konsumpcja tlenu mierzona za pomocą oksymetrii EPR używając znacznika spinowego mHCTPO.*

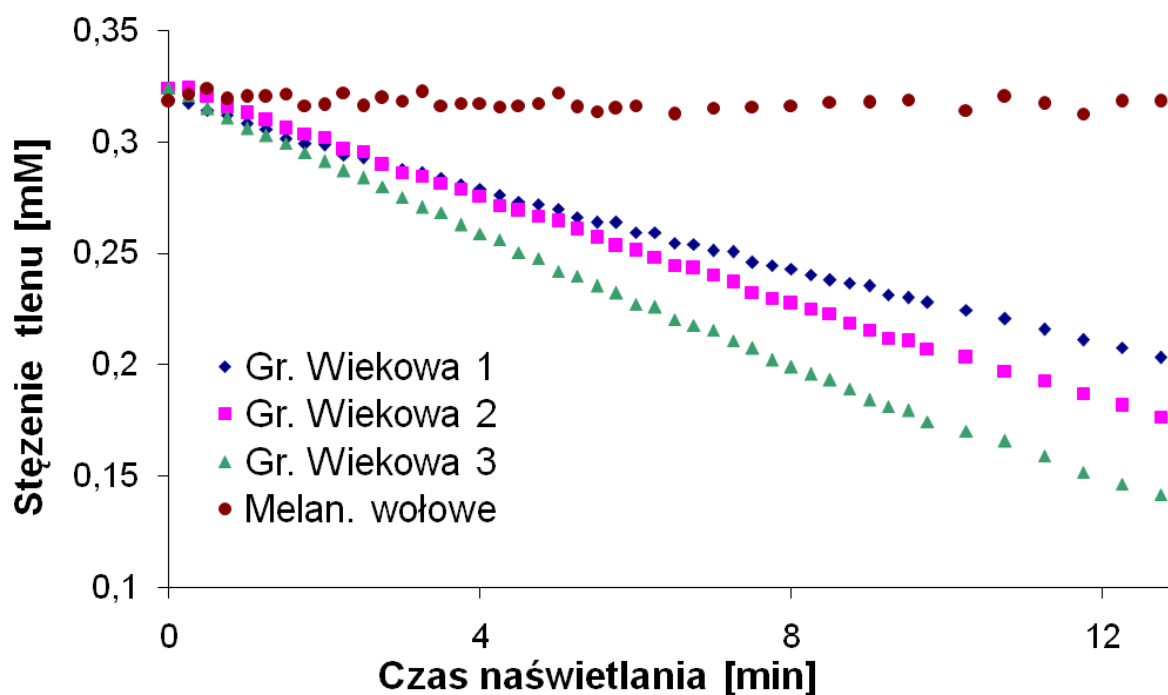
Oprócz pomiarów fotoreaktywności całych melanosomów, sprawdzano jaki udział w fotoindukowanej konsumpcji tlenu ma składowa melanosomów rozpuszczalna w chloroformie. Pomiar przeprowadzono więc z użyciem melanosomów „natywnych”, oraz

poddane ekstrakcji Folcha. Ekstrakty uzyskane z melanosomów wprowadzono do błon liposomów zawierających peroksydowalne fosfolipidy i mierzono tempo fotokonsumpcji tlenu w próbkach zawierających porównywalne ilości lipidów. Reprezentacyjne wyniki takich pomiarów przedstawione są na Rys. 6.



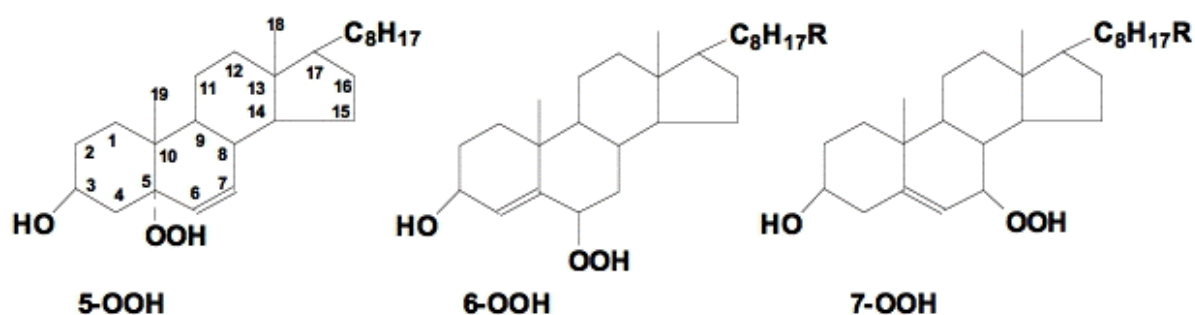
Rysunek 6: Szybkość konsumpcji tlenu przez melanosomy ludzkie, pochodzące od dawców z różnych grup wiekowych. Czarne - melanosomy natywne, czerwone – melanosomy pozbawione składnika rozpuszczalnego w chloroformie.

Jak widać z wiekiem dawców melanosomów, rośnie fotoindukowana szybkość konsumpcji tlenu. Chociaż melanosomy po ekstrakcji Folcha wykazują mniejszą fotoreaktywność w porównaniu do melanosomów natywnych, zależność tempa fotokonsumpcji tlenu od wieku dawców takich melanosomów jest nawet silniejsza aniżeli melanosomów nie traktowanych Folchem. Melanosomy pozbawione składników rozpuszczalnych w chloroformie wykazują znacznie większą tendencję do agregacji jak i zdolność do adhezji, do większości powierzchni, z którymi się stykają (ściany próbek, końcówki pipet).



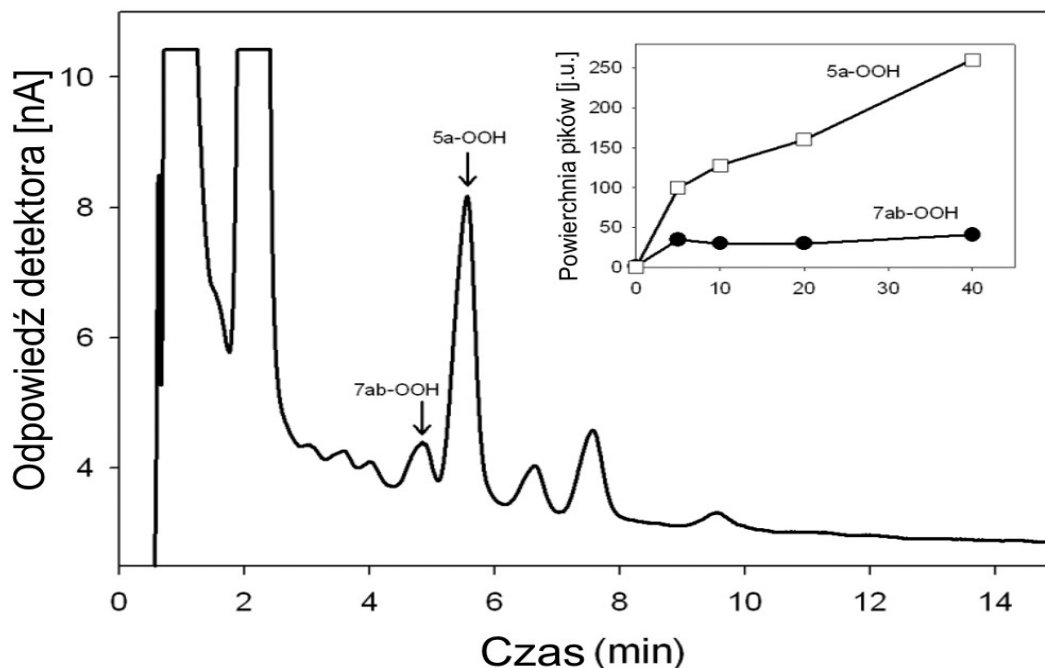
Rysunek 7: Tempo konsumpcji tlenu przez liposomy zawierające chloroformowe ekstrakty z oczu ludzkich z różnych grup wiekowych

Naświetlanie światłem niebieskim liposomów zawierających nienasycone lipidy oraz ekstrakty chloroformowe melanosomów izolowanych z oczów dawców indukowało mierzalną konsumpcję tlenu (Rys. 7); przy czym z wiekiem dawców zwiększa się tempo konsumpcji tlenu. W przypadku ekstraktu z melanosomów zwierzęcych, nie stwierdzono mierzalnej fotokonsumpcji tlenu. Po rozdziale przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i detekcji elektrochemicznej charakterystycznych wodoronadtlenków cholesterolu, analizowano jakie reaktywne formy tlenu fotogenerowane są przez ekstrakty chloroformowe z ludzkich melanosomów.



Rysunek 8: Hydronadtlenki cholesterolu powstające w obecności reaktywnych form tlenu.

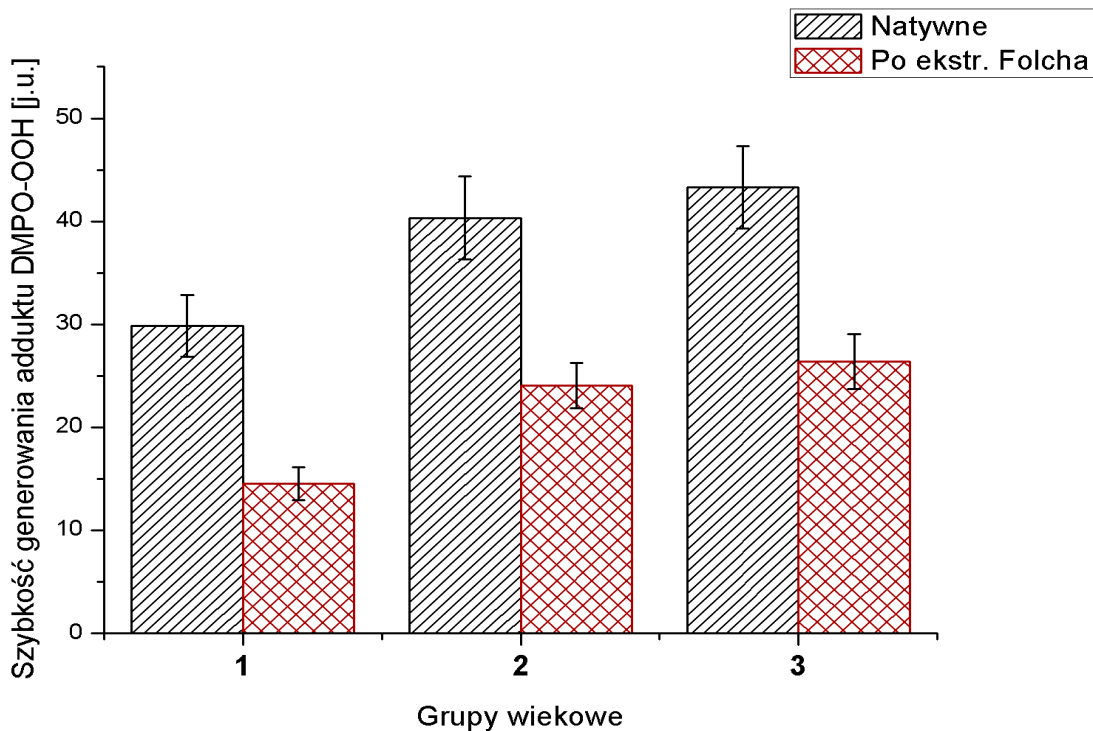




Rysunek 9: Chromatogram liposomów DMPC-cholesterol zawierających chloroformowy ekstrakt z oczu ludzkich. Na wstawce pokazane powierzchnie pików hydronadtlenków cholesterolu w zależności od czasu naświetlania liposomów.

Wodoronadtlenki cholesterolu podstawione w pozycjach piątej i szóstej cholesterolu pochodzą z reakcji z tlenem singletowym (Korytowski et al., 1993). Podstawione w pozycji siódmej pochodzą z reakcji z rodnikowymi formami tlenu. Choć formy 5 oraz 6 $\alpha$  i 6 $\beta$  są raczej nietrwałe i mogą ulegać izomeryzacji do form 7 $\alpha$  i 7 $\beta$ , wyniki pomiarów pokazują, że w trakcie naświetlania liposomów ma miejsce akumulacja właśnie tych stosunkowo nietrwałych produktów utlenienia cholesterolu. Sugeruje to jednoznacznie, iż w warunkach doświadczenia tlen singletowy jest główną „reaktywną formą tlenu” fotogenerowaną przez rozpuszczalne w chloroformie składniki liposomów.

## Fotoprodukcja anionorodnika ponadtlenkowego



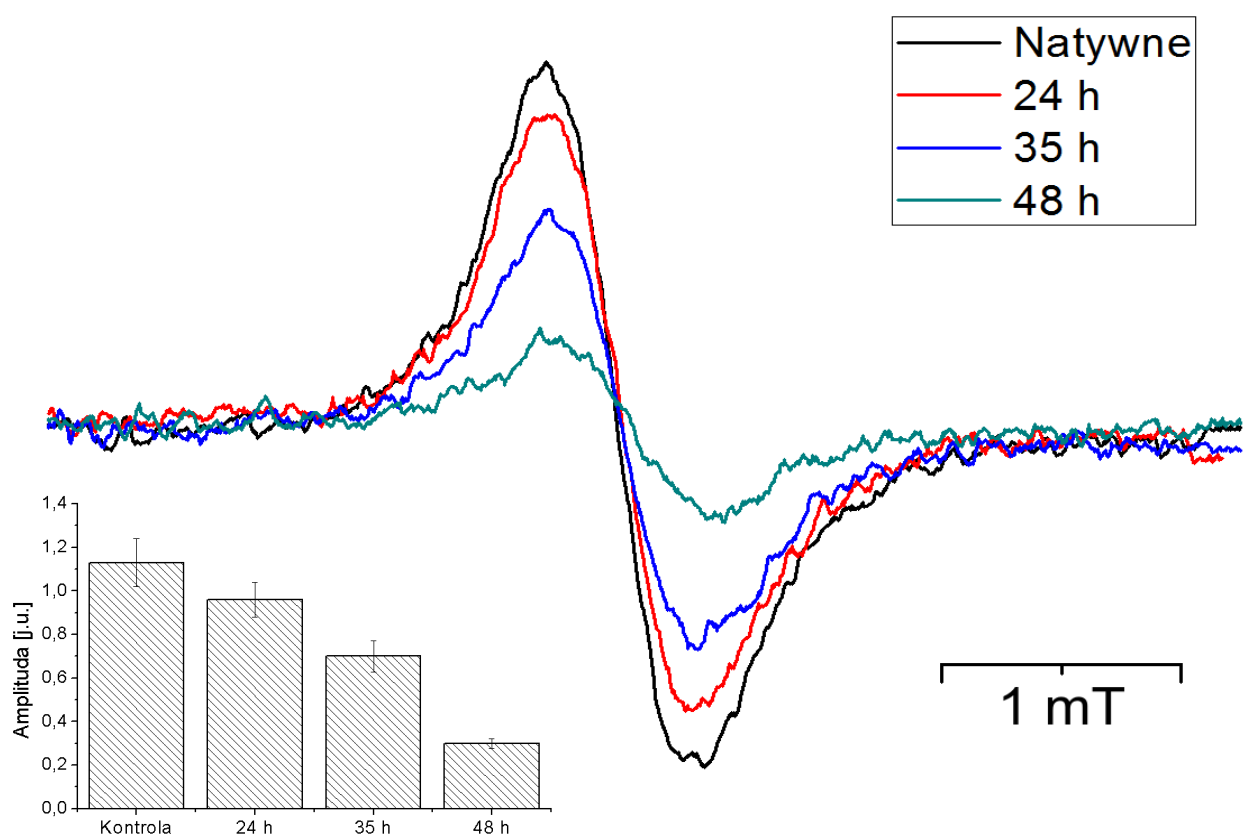
Rysunek 10: Porównanie kinetyk generowania adduktu DMPO-OOH przez melanosomy ludzkie natywne i poddane ekstrakcji Folcha

Badania nad indukowaną światłem generacją anionorodnika ponadtlenkowego przez melaniny przeprowadzono w środowisku zawierającym 75% DMSO, z uwagi na nietrwałość adduktu DMPO-OOH w środowisku wodnym. Użycie DMSO wydłuża zarówno okres półtrwania anionorodnika ponadtlenkowego, jak i stabilność adduktu spinowego. Wraz z wzrostem wieku dawców melanosomów zwiększa się tempo akumulacji adduktu pułapki spinowej i anionorodnika. Ten sam efekt można zaobserwować dla melanosomów pozbawionych frakcji rozpuszczalnej w chloroformie. W oparciu o przedstawione powyżej wyniki można stwierdzić, że melanosomy ludzkie pochodzące od starszych dawców generują zarówno anionorodnik ponadtlenkowy jak i tlen singletowy.

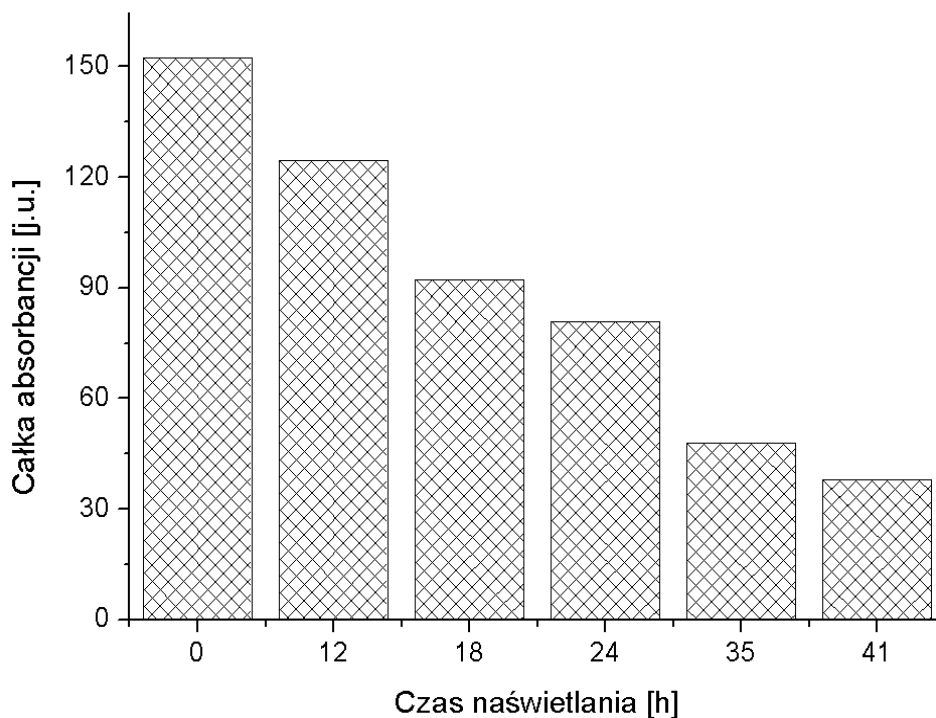
## Melanosomy zwierzęce

### Fotodegradacja melanosomów

Degradacja melaniny w melanosomach wołowych (lub pochodzących z oczu świń) w trakcie naświetlania była monitorowana na dwa sposoby : przy pomocy spektroskopii EPR oraz przy wykorzystaniu spektroskopii absorpcyjnej w zakresie 400-650 nm. W przypadku pomiarów spektrofotometrycznych porównywano scałkowaną wartość absorpcji w podanym wyżej przedziale długości fal.



Rysunek 11: Wpływ fotolizy melanosomów na ich sygnały EPR. Pomiary wykonano w temperaturze 77K. Na wstawce sumaryczne amplitudy sygnałów. Zmodyfikowany rysunek z opublikowanej pracy Zaręba et al. 2006b

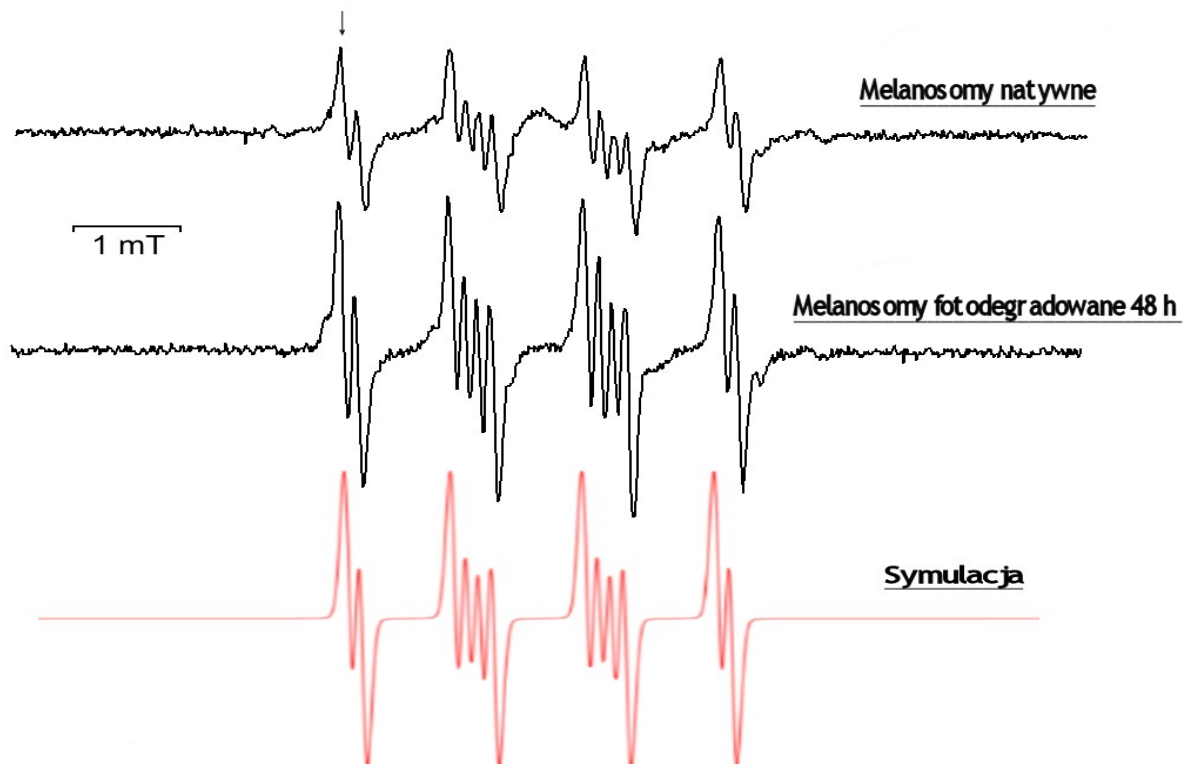


*Rysunek 12: Wpływ fotolizy melanosomów na ich scałkowaną absorbcję w zakresie 400-650 nm. Zmodyfikowany rysunek z opublikowanej pracy Zaręba et al. 2006b*

Z upływem czasu fotodegradacji ma miejsce spadek intensywności wolnorodnikowego sygnału melaniny. Zależność ta przedstawiona jest na wstawce rys 11. Fotodegradacja melaniny równolegle wywołuje spadek scałkowanej absorpcji solubilizowanych melanosomów w zakresie 400-650 nm (rys 12). Naświetlanie melanosomów intensywnym promieniowaniem widzialnym powoduje zmianę ich koloru - melanosomy z czarnych stają się wyraźnie brązowe. W pewnym sensie zmiany optyczne melanosomów zwierzęcych wywołane fotodegradacją zbliżone są do tych, jakie towarzyszą starzeniu nabłonka upigmentowanego siatkówki oczu ludzi. Po dwóch dobach fotolizy zmiany właściwości optycznych i paramagnetycznych melanosomów są już dość znaczne. Z porównania obydwu rysunków widać iż obydwa fizyczne parametry ogólnie zachowują się podobnie. Tak więc jeśli sygnał EPR melaniny zmniejsza się 3,7 raza po 48 h fotodegradacji melanosomów, to ich scałkowana absorpcja zmienia się 3,6 razy po 41 h.

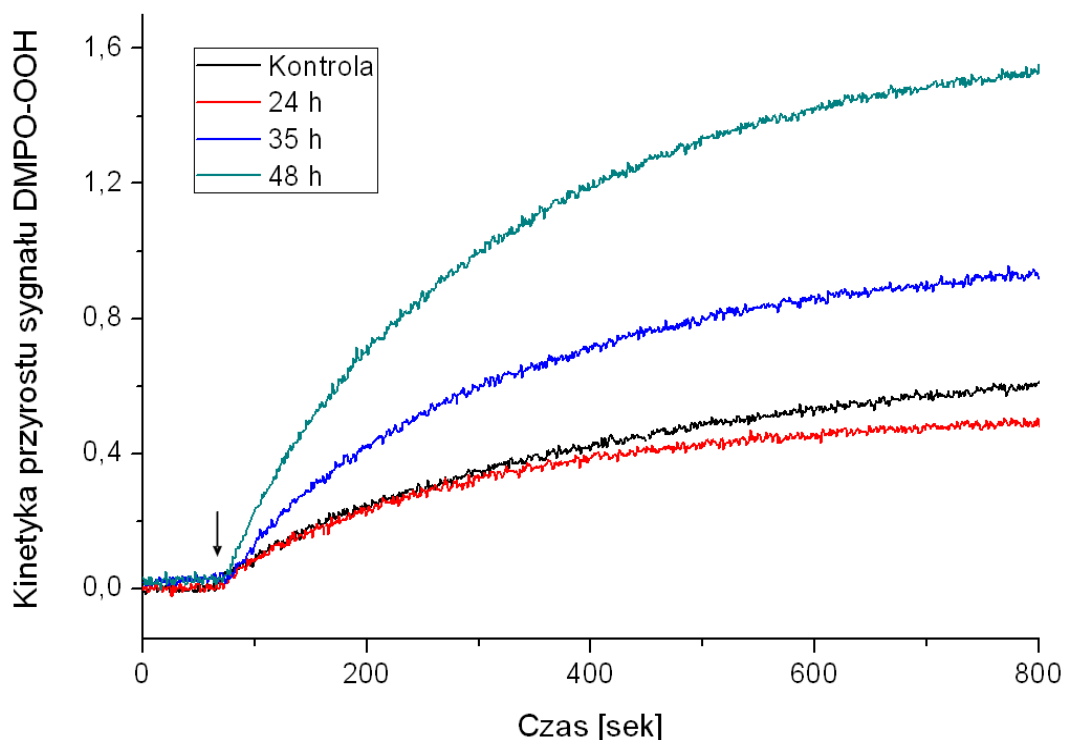
## Fotoreaktywność melanosomów RPE z oczu krowy o różnym stopniu degradacji

W celu oceny zmian w fotoreaktywności melanosomów wołowych, zbadano ich zdolność do fotokonsumpcji tlenu oraz do indukowanej światłem produkcji anionorodnika ponadtlenkowego.



Rysunek 13: Sygnał EPR adduktu DMPO-OOH generowanego przez melanosomy. Melanosomy wraz z pułapką spinową zawieszono w buforowanym DMSO (75%). Zmodyfikowany rysunek z opublikowanej pracy Zaręba et al. 2006b

Dla identyfikacji adduktu spinowego przeprowadzono symulację rejestrowanego widma programem winsim2002 (Duling, 1994). Użyte w symulacji parametry rozszczepienia nadsubtelnego wynosily :  $a_N=12,63$  G,  $a_{H1}=10,14$  G oraz  $a_{H2}= 1,28$  G. Są one zbliżone do danych literaturowych dla adduktu anionorodnika ponadtlenkowego w DMSO (Roberts et al., 2000). Również parametr NoH ( $a_N/a_H$ ), wynoszący 1,24 potwierdza, iż otrzymane widmo można przypisać adduktowi DMPO-OOH (Li i Chignell, 1991)

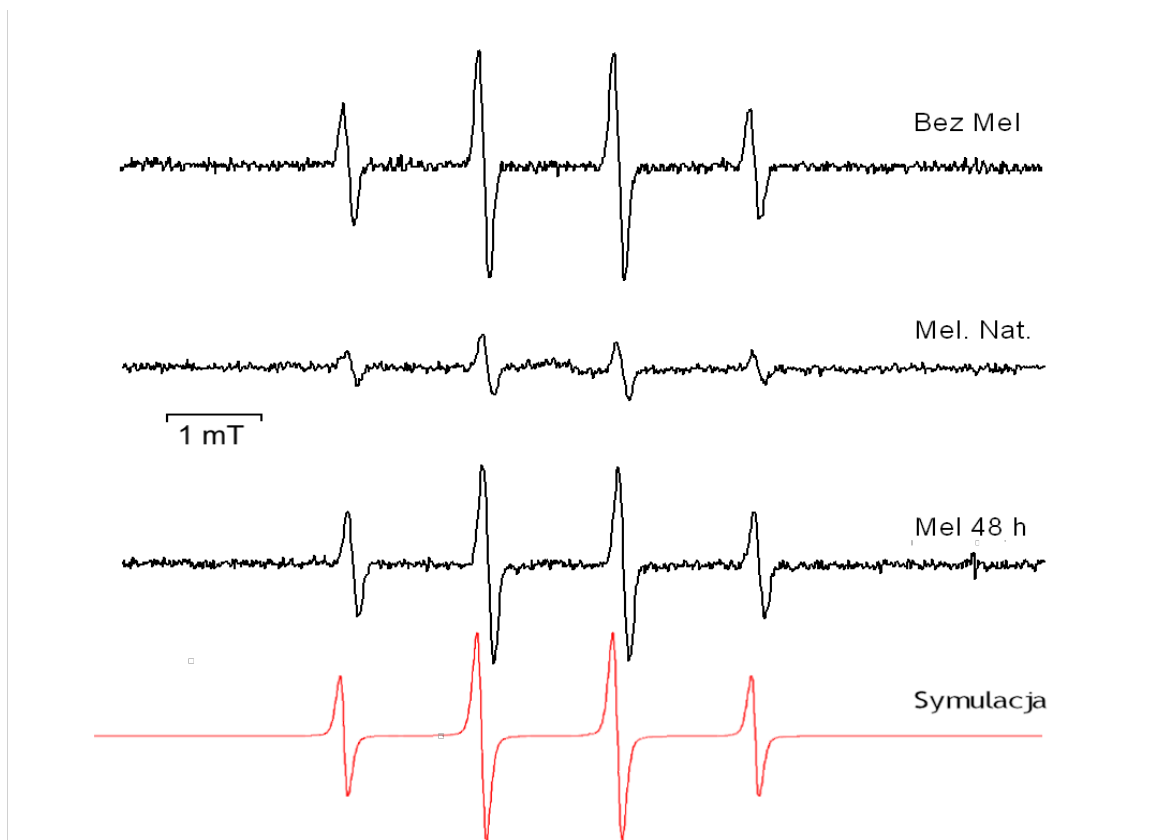


Rysunek 15: Kinetyki generowania adduktu DMPO-OOH przez melanosomy o różnym stopniu degradacji. Strzałka wskazuje początek naświetlania. Zmodyfikowany rysunek z opublikowanej pracy Zaręba et al. 2006b

Można zauważyć, że z wzrostem czasu fotodegradacji melanosomów praktycznie nie zmienia się szybkość fotokonsumpcji tlenu, natomiast wzrasta szybkość akumulacji fotogenerowanego adduktu spinowego DMPO-OOH.

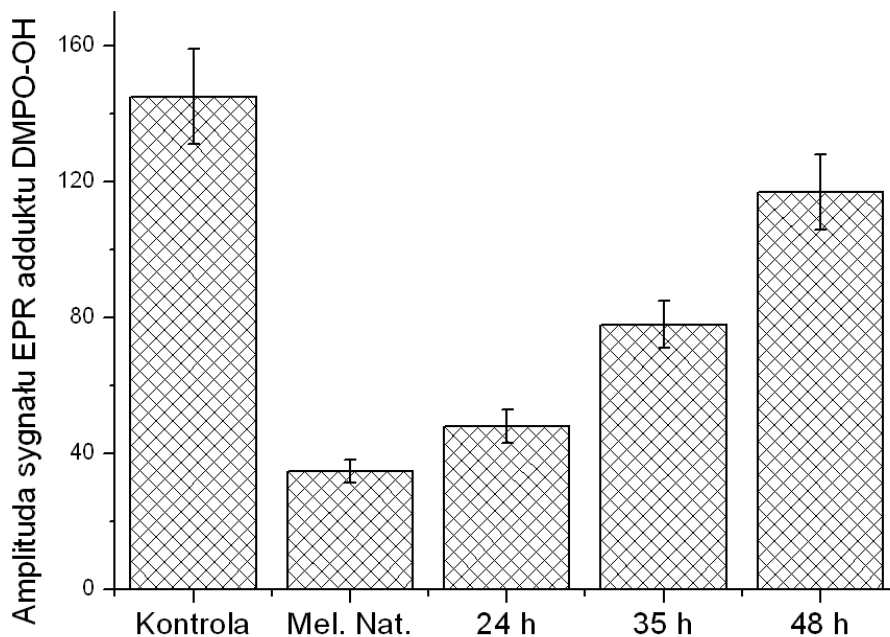
### Wpływ fotodegradacji melanosomów na ilość rodników hydroksylowych generowanych w reakcji Fentona

Do przygotowanych próbek zawierających jony żelaza (II) oraz nadtlenuk wodoru dodawano melanosomów o różnym czasie fotodegradacji, mierząc kinetykę pojawiania się adduktu spinowego DMPO-OH. Widma adduktu spinowego zaobserwowanego po dodaniu melanosomów posiadały identyczne parametry magnetyczne przy wyraźnie mniejszej amplitudzie sygnału. Wyniki te pokazują, że dodatek melanosomów powoduje spadek ilości generowanego rodnika hydroksylowego, przy czym efekt ten zależy od stopnia degradacji melanosomów (rys 16,17).



Rysunek 16: Sygnały EPR adduktu DMPO-OH generowanego w reakcji Fentona. Zmodyfikowany rysunek z opublikowanej pracy Zaręba et al. 2006b

Do uzyskanych w trakcie eksperymentów widm adduktów spinowych dopasowano parametry stosując symulację. Parametry rozszczepienia nadsubtelnego wyniosły :  $a_N=14,26$  G oraz  $a_H=14,66$  G. Parametry te są zgodne z parametrami adduktu DMPO-OH opisanymi we wcześniejszych publikacjach (Lai et al., 1979; Noda i Mankura, 2009).

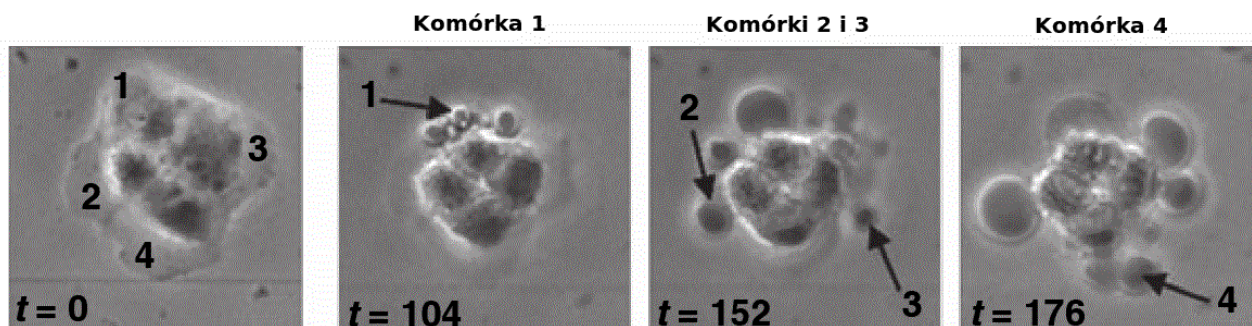


Rysunek 17: Amplitudy sygnałów EPR adduktu DMPO-OH w obecności naświetlanych melanin. Kontrola przedstawia amplitudę sygnału pod nieobecność melaniny. Zmodyfikowany rysunek z opublikowanej pracy Zaręba et al. 2006b

Można zaobserwować wyraźny, prawie pięciokrotny spadek amplitudy sygnału rodnika hydroksylowego po dodaniu natywnych melanosomów. Efekt ten zmniejsza się wraz z rosnącym czasem fotodegradacji melanosomów.

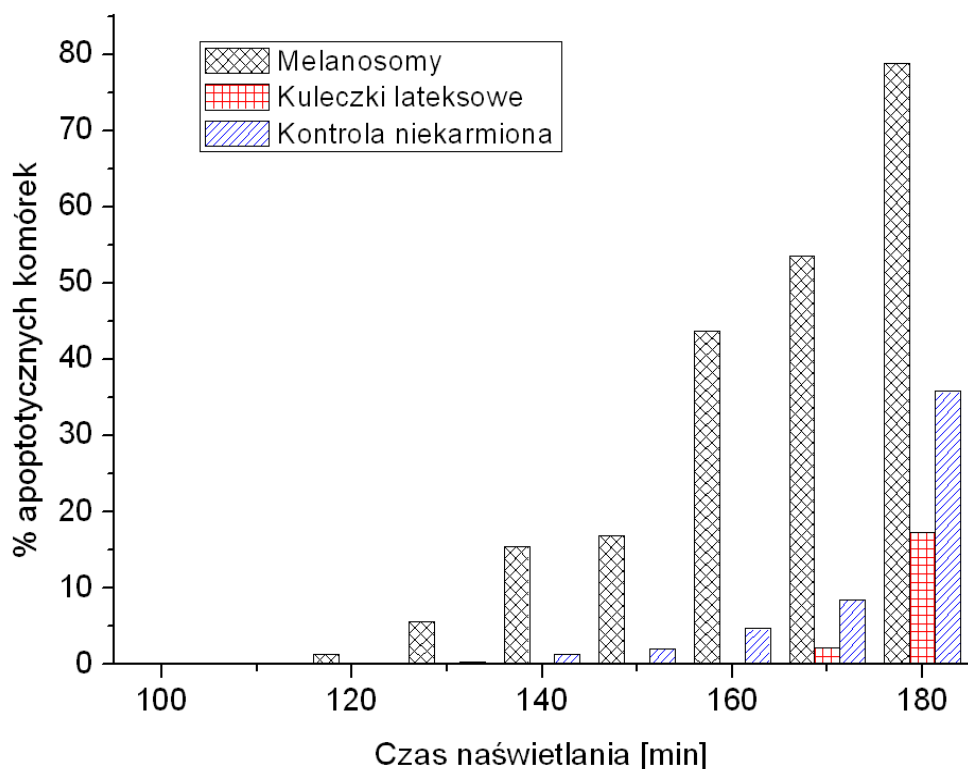
### Wpływ degradacji melanosomów na przeżywalność komórek APRE-19

Komórki karmione melanosomami lub czarnymi kuleczkami lateksowymi oraz komórki niekarmione poddawano naświetlaniu w kontrolowanych warunkach. Przeżywalność komórek sprawdzano obserwując pojawianie się pęcherzyków apoptotycznych (fot. 2).



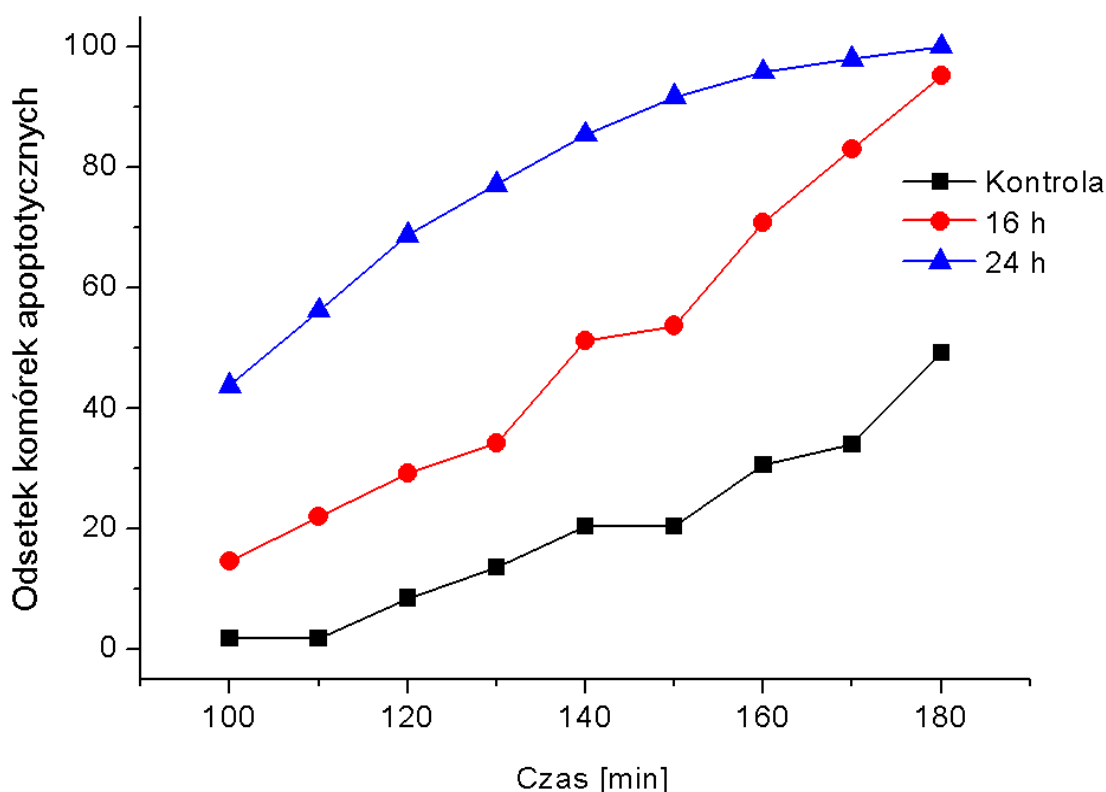
Fot 2: Pojawianie się pęcherzyków apoptotycznych w komórkach ARPE-19. W dolnym lewym rogu podany czas naświetlania w minutach. Zdjęcia z opublikowanej pracy Zaręba et al. 2007.





*Rysunek 18: Porównanie wpływu różnych ziarnistości na ilość komórek ARPE-19 podejmujących apoptozę podczas naświetlania. Zmodyfikowany rysunek z opublikowanej pracy Zareba et al. 2007*

Czarnych kuleczek lateksowych użyto jako kontroli ekranującej promieniowanie, gdyż nie wykazywały one żadnej fotokonsumpcji tlenu. Po podaniu ziarnistości można było zauważyć znaczące różnice w przeżywalności. Podanie samych melanosomów natywnych prowadzi do zwiększenia ilości komórek tworzących pęcherzyki apoptotyczne. Podanie czarnych kuleczek lateksowych wydaje się mieć minimalny efekt ochronny.

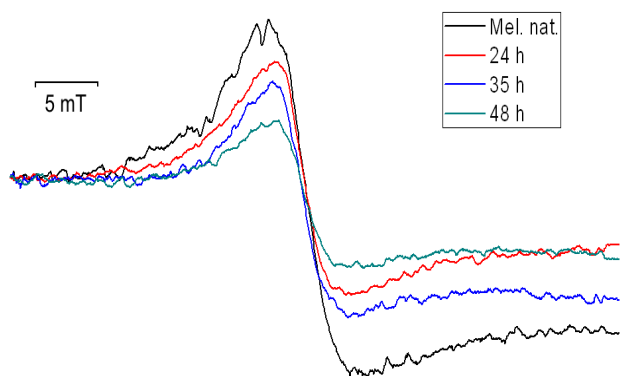


Rysunek 19: Porównanie wpływu melanosomów natywnych (czarne) oraz degradowanych przez określony czas (czerwone i niebieskie) na apoptozę komórek ARPE-19. Zmodyfikowany rysunek opublikowany w pracy Zaręba et al. 2007

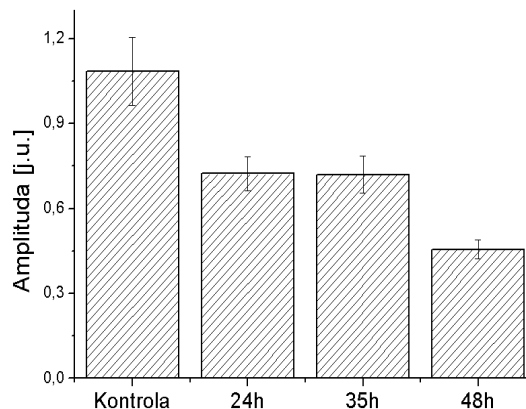
Przy porównaniu wpływu melanosomów degradowanych, wyraźnie widać ich zwiększoną fototoksyczność w badanym układzie.

### **Wpływ fotodegradacji na zdolność melanosomów do kompleksowania jonów żelaza**

Wiązanie jonów żelaza jest jednym z postulowanych działań ochronnych melaniny. Niedawno ukazały się doniesienia ukazujące ochronny wpływ egzogennych chelatorów jonów żelaza na przeżywalność komórek RPE in vitro (Lukinova et al., 2009), jak również doniesienia o ochronnym wpływie melanosomów komórek RPE na stres oksydacyjny wywołany podaniem do zawiesiny komórek żelaza i askorbinianu (Rózanowski et al., 2008a). Melanosomy zawsze zawierają pewną ilość jonów żelaza, zwiększającą się z wiekiem (Sarna, 1992; Zecca et al., 2001, 2004), aczkolwiek nie są to ilości wysycające. Melanosomy wołowe i świńskie, jako pochodzące z młodych zwierząt rzeźnych, mają niską endogenną zawartość żelaza.

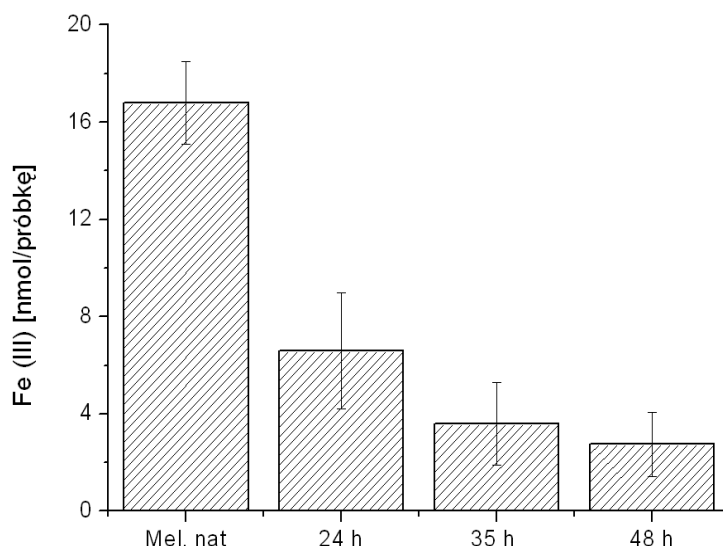


Rysunek 20: Sygnały EPR żelaza związanego przez melanosomy o różnym stopniu degradacji. Pomiar wykonano w 77°K.



Rysunek 21: Amplituda sygnałów EPR żelaza związanego przez melanosomy. Temp 77 K. Zmodyfikowany rysunek z opublikowanej pracy Zareba et al. 2006b

W opublikowanej pracy (Zareba et al., 2006b) analizowaliśmy zdolność melanosomów degradowanych do wiązania jonów żelaza w warunkach wysycenia tymi jonami. Ilość jonów związanych przez melanosomy oznaczana była dwiema metodami - bezpośrednim pomiarem sygnału EPR żelaza w temperaturze ciekłego azotu, oraz metodą kolorymetryczną z użyciem batofenantroliny. Aby zmierzyć zawartość żelaza zmagazynowanego przez melanosomy za pomocą batofenantroliny, przeprowadzano procedurę uwalniającą jony żelaza za pomocą niskiego pH.

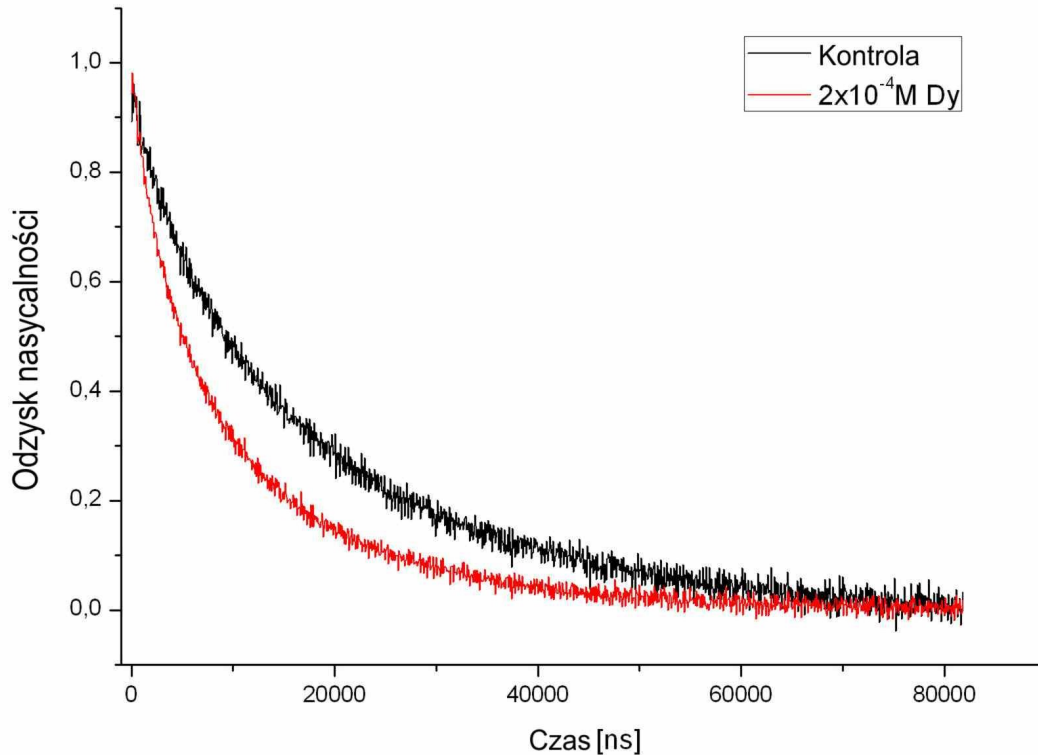


*Rysunek 22: Ilość żelaza uwolnionego przez melanosomy w kwaśnym pH. Pomiar kolorymetryczny za pomocą reakcji barwnej z batofenantroliną. Zmodyfikowany rysunek z opublikowanej pracy Zaręba et al. 2006b*

Można zauważyć wyraźną tendencję: melanosomy wraz z wydłużeniem czasu fotodegradacji tracą zdolność wiązania jonów żelaza.

### **Relaksacja spinowo-sieciowa melanin**

Oddziaływanie syntetycznej melaniny z lantanowcami badano już w przeszłości (Sarna et al., 1976). Celem moich doświadczeń było sprawdzenie wpływu fotodegradacji melaniny na jej oddziaływanie z jonami metali przejściowych. Wolne rodniki melaniny charakteryzują się stosunkowo wolną relaksacją spinowo-sieciową. Proces ten może zostać znacznie przyspieszony w obecności paramagnetycznych jonów metali, które działają jak efektywny czynnik relaksujący centra paramagnetyczne melaniny. Zróżnicowany efekt skrócenia czasu relaksacji centrów paramagnetycznych melaniny, jaki zakładam w przypadku melanosomów kontrolnych i fotodegradowanych powinien dostarczyć informacji o odległości centrów rodnikowych melaniny w stosunku do magnetycznie oddziałujących z nimi jonami metali, związanymi przez grupy jonowymienne pigmentu. Odzysk nasycalności zwykle charakteryzuje się kinetyką eksponencjalną, z czasem zależnym od właściwości relaksacyjnych badanych centrów wolnorodnikowych oraz od wpływu innych cząsteczek paramagnetycznych, które mogą znajdować się w najbliższym sąsiedztwie.



Rysunek 23: Wpływ jonów Dy(III) na czas odzysku nasycalności przez melaninę

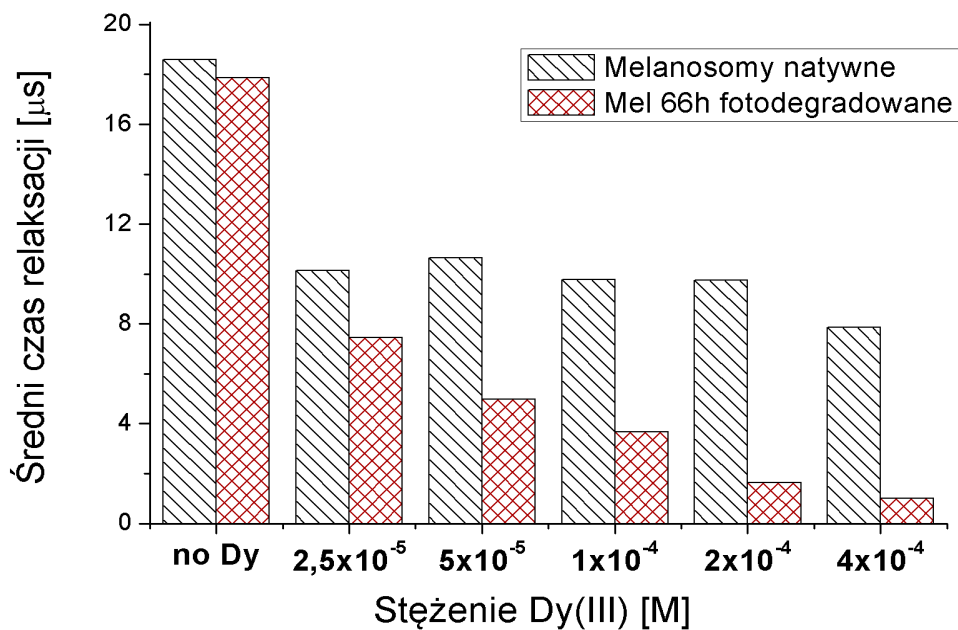
W przeprowadzonych pomiarach zaobserwowano, iż odzysk nasycalności był monoeksponencjalny tylko dla melanosomów natywnych, bez dodatku jonów dysprozu. Zarówno dodatek jonów jak i fotodegradacja powodowała, że model z jedną eksponentą przestawał być adekwatny. Chociaż dopasowanie dwóch eksponent dało nieco lepsze rezultaty, wypadkowe dopasowanie ciągle nie było zbyt zadowalające ze względu na rezydua. Trudno a priori założyć, że w melaninie występują tylko 2 populacje centrów rodnikowych, charakteryzujących się dwoma różnymi czasami relaksacji spinowo-sieciowej. Bardziej prawdopodobną wydaje się sytuacja, w której centra rodnikowe melanosomów będą zmieniać swoje właściwości, w tym wzajemną odległość od wiązanych przez melaninę jonów dysprozu stopniowo a nie skokowo. Modelem użytym przeze mnie do dopasowań jest model eksponenty rozciągniętej (ang stretched exponent) (Sarewicz, 2008).

$$y = a * \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau_{ww}}\right)^\beta\right] + b$$

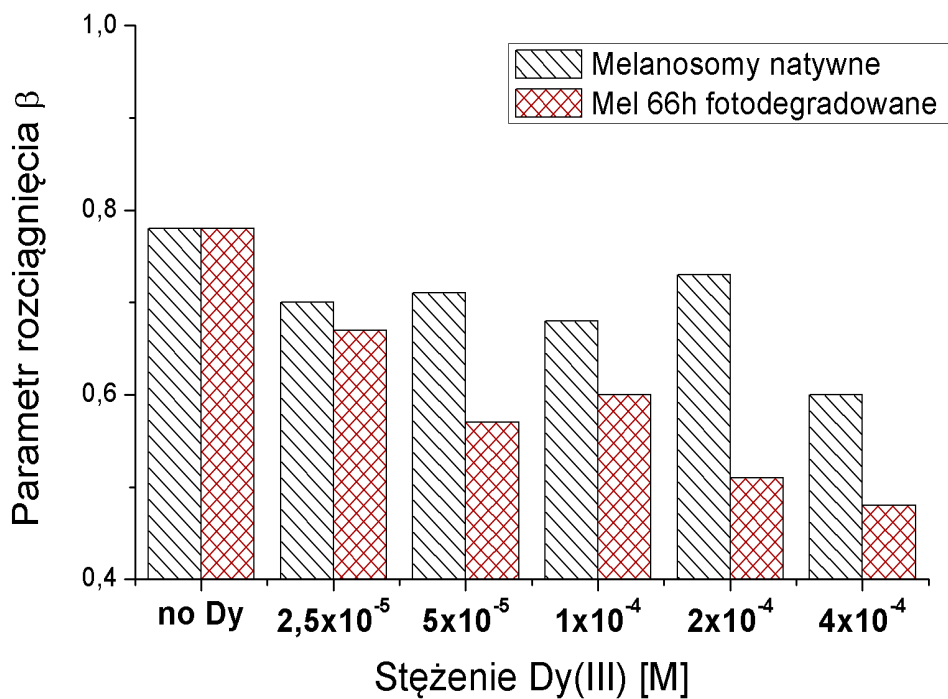
Czas średni wylicza się z następującej funkcji :

$$\tau = \frac{\tau_{ww}}{\beta} * \Gamma\left(\frac{1}{\beta}\right)$$

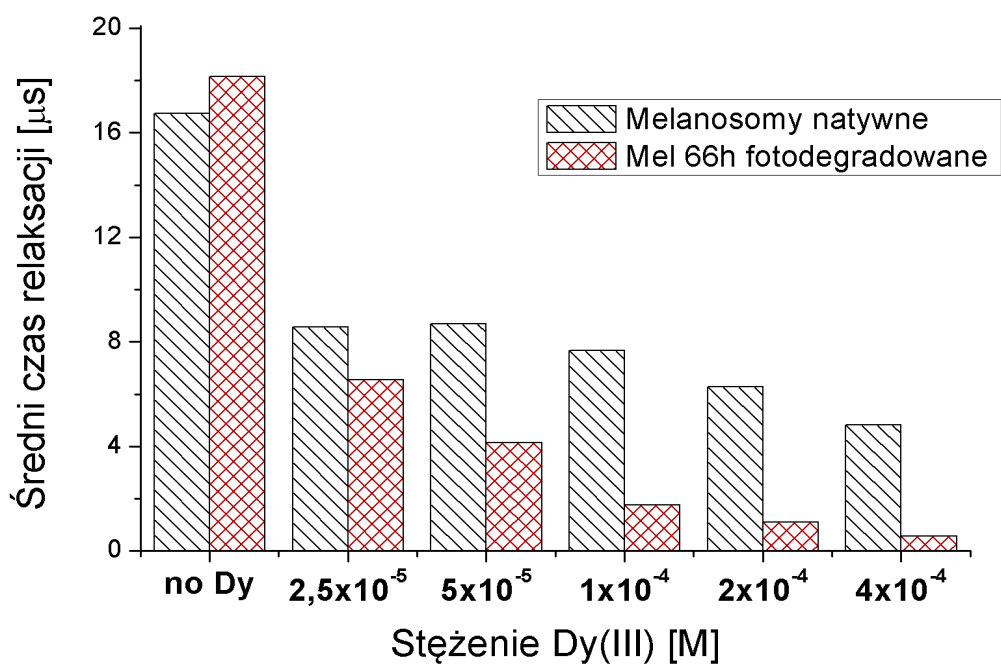
Model ten zakłada istnienie całej puli eksponent. Do oceny wyników dopasowania oprócz samego czasu średniego zalicza się także parametr  $\beta$ , informujący o stopniu rozciągnięcia puli eksponent. Jeżeli  $\beta=1$  model jest monoeksponencjalny. Im ten parametr mniejszy, tym większe jest rozciągnięcie populacji eksponent, tzn. jest większa różnica między największym a najmniejszym czasem. Czas średni wyliczony z takiego dopasowania dostarcza informacji o odzysku nasycalności, natomiast parametr  $\beta$  informuje jak bardzo różnią się czasy relaksacji spinowo-sieciowej centrów wolnorodnikowych melaniny w całej puli.



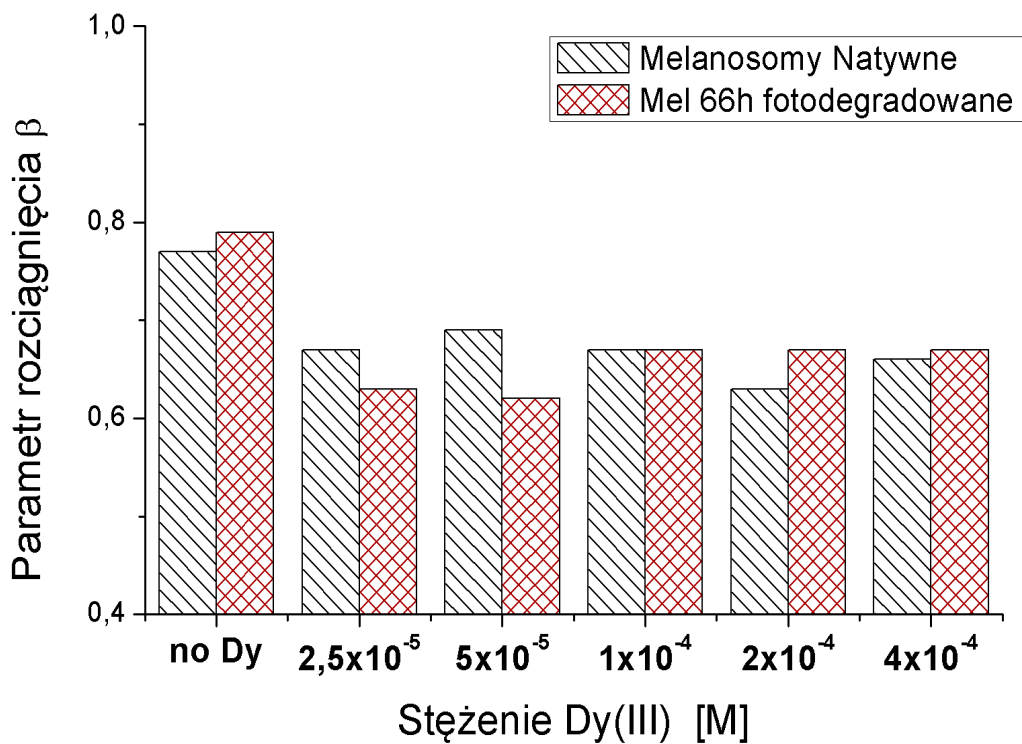
Rysunek 24 Średnie czasy relaksacji dla melanosomów natywnych oraz fotodegradowanych po godzinnej inkubacji z jonami Dy(III)



Rysunek 25: Parametr rozciągnięcia puli eksponent dla godzinnej inkubacji melanosomów natywnych oraz poddanych fotodegradacji z jonami Dy(III).



Rysunek 26: Średnie czasy relaksacji melanosomów natywnych i fotodegradowanych po 20-to godzinnej inkubacji z jonami Dy(III)



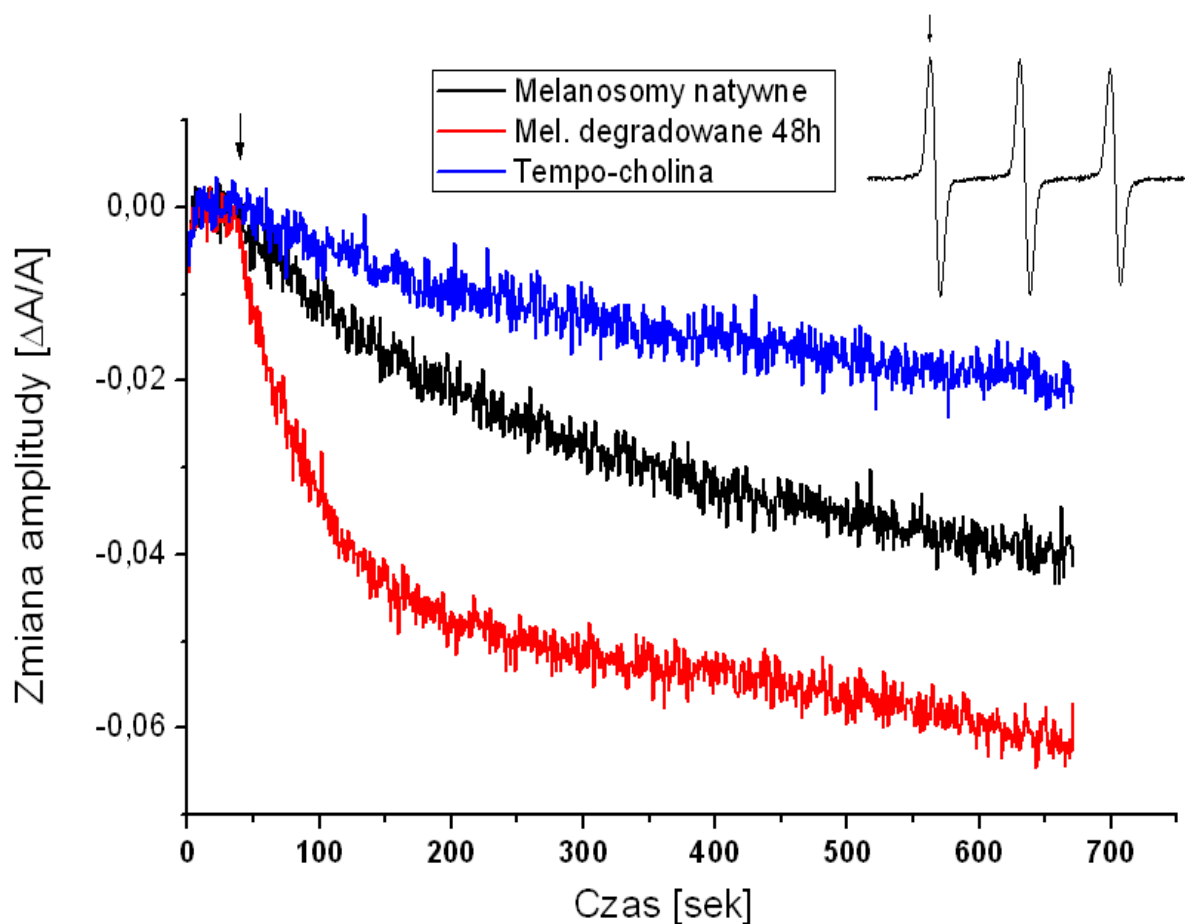
Rysunek 27: Paramter rozciągnięcia puli eksponent dla melanosomów natywnych oraz fotodegradowanych po 20-to godzinnej inkubacji z jonami Dy(III)



Sama fotodegradacja melanosomów nie ma wpływu na czas relaksacji, ani na stopień rozciągnięcia puli eksponent. Natomiast wraz ze wzrostem stężenia jonów dysprozu czas odzysku nasycalności znacznie spada - procesy relaksacyjne są coraz szybsze. Efekt przyspieszenia relaksacji przez jony jest bardziej widoczny dla melanosomów poddanych fotodegradacji. Centra rodnikowe melaniny fotodegradowanej efektywniej oddziałują ze związanymi przez melaninę jonami dysprozu niż centra rodnikowe melaniny natywnej. Po godzinnej inkubacji z jonami Dy(III) widać duże różnice w zachowaniu parametru  $\beta$  dla melanosomów natiwnych i degradowanych. W przypadku melanosomów natiwnych tylko dla najwyższego stężenia jonów można zauważyć pewne rozszerzenie rozciągnięcia puli eksponent. W przypadku melanosomów poddanych fotodegradacji widać znaczne zwiększenie rozciągnięcia puli eksponent (rys 25). Świadczy to o dużych różnicach w czasach relaksacji różnych wolnorodnikowych centrów melaniny. W przypadku inkubacji dwudziestogodzinnej średnie czas relaksacji ulegają dalszemu obniżeniu, natomiast rozciągnięcie puli eksponent spada (rys 26 i 27).

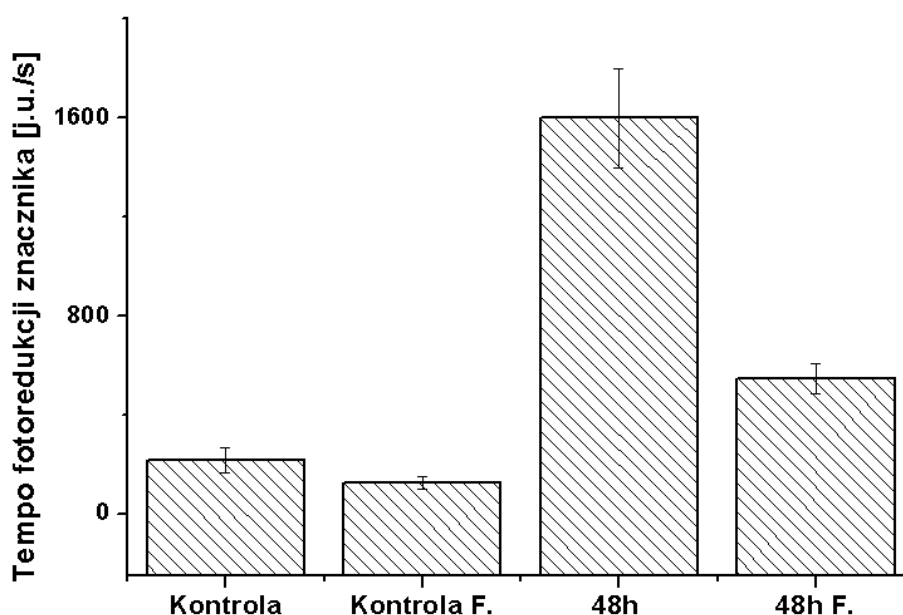
### ***Oddziaływanie melanosomów ze znacznikiem spinowym***

Oddziaływanie nitrozylowych znaczników spinowych z melaninami syntetycznymi było już badane wcześniej (Sarna et al., 1985). W niniejszych badaniach chciałem ocenić fotoreaktywność melanosomów mierząc ich zdolność do fotoredukcji dodatnio naładowanego znacznika TEMPO-choliny. Do pomiarów użyto czterech rodzajów melanosomów: natiwnych wołowych (jako kontrolę), degradowanych światłem przez 48 h oraz tych samych próbek podanych wcześniej ekstrakcji części rozpuszczalnej w chloroformie za pomocą zmodyfikowanej procedury Folcha (Folch et al., 1957).



Rysunek 28: Kinetyki spadku amplitudy sygnału znacznika spinowego Tempo-choliny. Strzałką zaznaczono moment rozpoczęcia naświetlania. Strzałka na wstawce wskazuje miejsce obserwacji kinetyki.

Wybrane pomiary przedstawia rys 28. Do wszystkich kinetyk dopasowano początkowy fragment krzywej opisującej obserwowane zmiany w czasie, czyli obszar liniowej zależności. Zmierzone kinetykę zmian amplitudy samego znacznika, ponieważ Tempo-cholina absorbuje jednak promieniowanie w zakresie długości fal naświetlania próbki. Zebrane wyniki zilustrowane są w postaci diagramu przedstawiającego współczynniki kierunkowe dopasowanych prostych (Rys. 29).



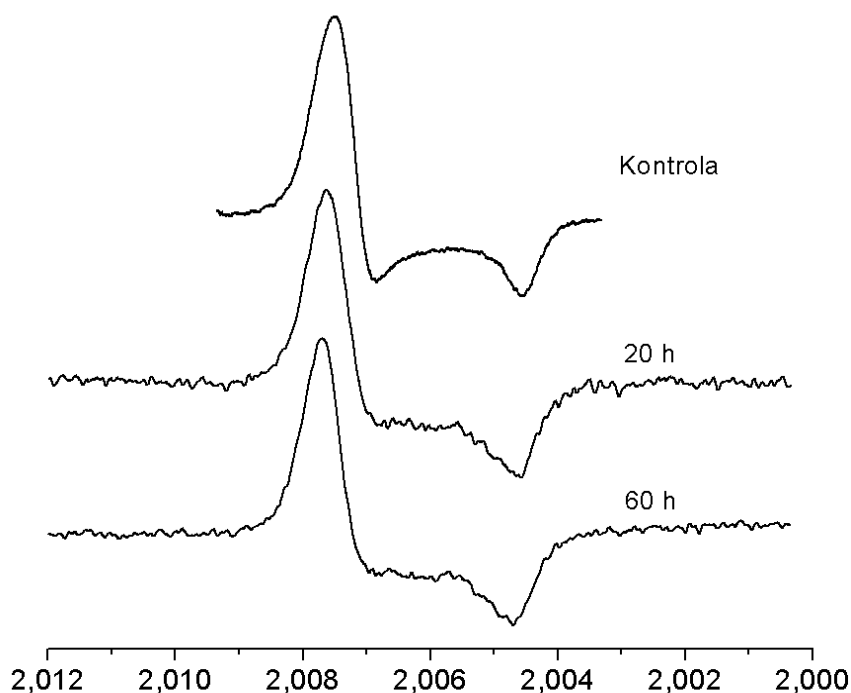
Rysunek 29: Szybkość fotoredukcji znacznika spinowego przez melanosomy o różnym stopniu degradacji. Literą F oznaczono próbki poddane ekstrakcji Folcha.

Od wszystkich punktów pomiarowych odjęto wartość uzyskaną z dopasowania kinetyki w przypadku próbki kontrolnej, zawierającej sam znacznik spinowy. Wyniki pokazują, że największe tempo fotoredukcji znacznika ma miejsce w przypadku melanosomów fotodegradowanych. Chociaż szybkość tego procesu jest dość mała, jest jednak ośmiokrotnie wyższa niż w próbkach zawierających melanosomy niedegradowane. Po ekstrakcji Folcha melanosomy wykazują niższą szybkość fotoredukcji tempo-choliny. Dotyczy to zarówno melanosomów kontrolnych jak i fotodegradowanych. Należy podkreślić, że procedura ekstrakcji Folcha związana jest ze znacznymi stratami materiału, co może modyfikować rzeczywiste stężenie takich melanosomów w badanych próbkach. Ponadto melanosomy poddane ekstrakcji Folcha zmieniają swoje właściwości fizyczne - wykazują zwiększoną adhezję do powierzchni naczyń, w których się znajdują i silnie agregują, co pogarsza właściwości optyczne zawierających ich próbek. Efekt ten jest wyraźniejszy dla melanosomów fotodegradowanych.

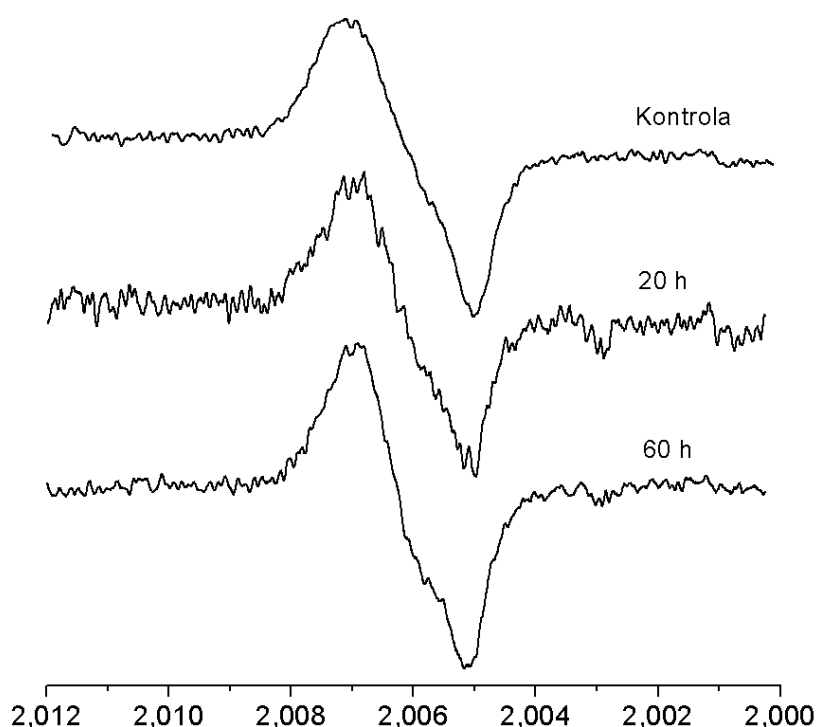
### **Wpływ fotodegradacji melanosomów na ich sygnały EPR w paśmie W**

Parametry sygnałów EPR melanosomów, poddanych fotodegradacji, rejestrowanych w paśmie X, praktycznie nie zmieniają się; jedynie spada ich amplituda. Nawet w paśmie Q nie zaobserwowano znaczących różnic w widmie EPR fotodegradowanych melanosomów (wyniki te nie zostały zamieszczone w rozprawie). Postanowiono więc sprawdzić, czy doświadczalne fotostarzenie melanosomów modyfikuje parametry ich

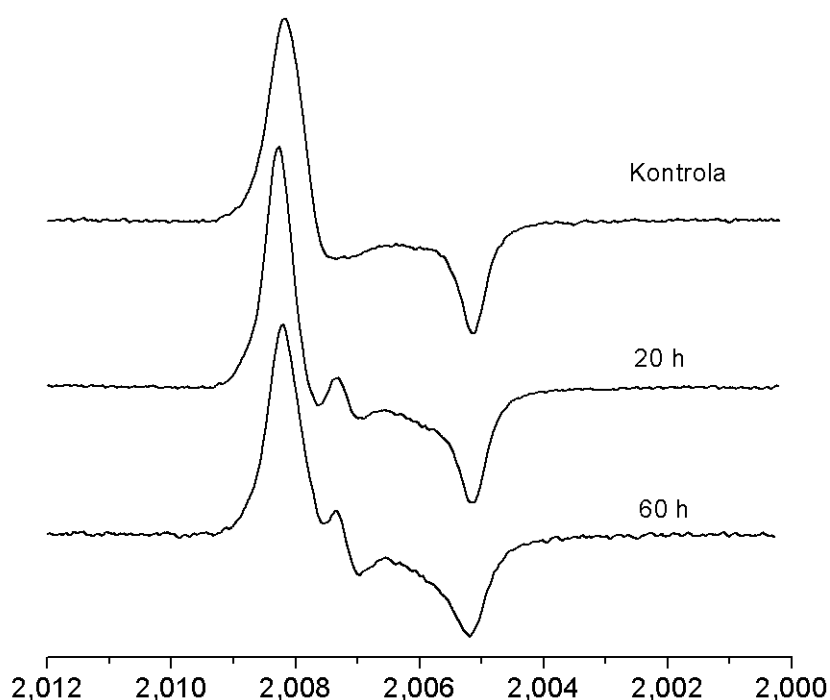
widm EPR jakie można zarejestrować paśmie W, czyli przy częstotliwości mikrofalowej 10-krotnie wyższej niż w częstotliwość używaną w konwencjonalnej spektroskopii EPR (pasmo X). Wyniki pomiarów w paśmie W zebrane na rysunkach 30, 31 i 32 pokazują, że fotodegradacji melanosomów z oczy wolicz towarzyszą niewielkie ale charakterystyczne zmiany sygnałów EPR, które są szczególnie dobrze widoczne w próbkach, zawierających ziarna pigmentu po ich wysyceniu jonami cynku albo w środowisku silnie alkalicznym.



Rysunek 30: Sygnały EPR melanosomów mierzone w obecności jonów cynku. Na osi rzędnych wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g$ . Kolejne sygnały dotyczą melanosomów kontrolnych oraz melanosomów poddanych fotodegradacji przez 20 i 60 godzin.



Rysunek 31: Sygnały EPR melanosomów mierzone w pH 1. Pozostałe parametry jak na rysunku powyżej.



*Rysunek 32: Sygnały EPR melanosomów mierzone w pH 13. Pozostałe parametry jak na rysunkach powyżej*

W porównaniu do melanosomomów kontrolnych w przypadku melanosomów fotodegradowanych można zaobserwować zmiany w kształcie sygnałów EPR w próbkach zawierających nasycające stężenie jonów cynku (Rys. 30), które polegają na względnej redukcji intensywności składowej przy  $g \sim 2,007$ . Zależne od czasu fotodegradacji melanosomów zmiany sygnałów EPR są mniej wyraźne środowisku o kwaśnym pH (rys. 31). Natomiast wyraźne różnice sygnałów melanosomów fotodegradowanych, w porównaniu do kontrolnych obserwuje się w próbkach o silnie alkalicznym odczynie. Ma miejsce poszerzenie składowej przy  $g \sim 2,005$  oraz pojawienie się dodatkowego sygnału, przy wartości  $g$  około 2,0072. Warto dodać, iż z pomiarów w paśmie X (wyniki nie zamieszczone w niniejszej pracy) wynika, iż wzrost intensywności sygnału melanosomów fotodegradowanych po ich wysyceniu jonami cynku jest mniejszy aniżeli w przypadku melanosomów niedegradowanych.

## Dyskusja

### *Zmiany właściwości melanosomów ludzkich z wiekiem*

Ochronna rola melaniny w oku wydaje się być dość dobrze udokumentowana (Hu, 2005; Seagle et al., 2005; Zadlo et al., 2009). Efekt ochronny tłumaczy się za pomocą mechanizmów fizycznych i biochemicznych : absorpcją potencjalnie szkodliwego światła krótkofalowego, które dociera do zewnętrznej siatkówki oka człowieka, czyli ekranowaniem oraz działaniem antyutleniającymi, w wyniku czego zredukowane jest prawdopodobieństwo stresu oksydacyjnego (Meredith i Sarna, 2006). Jak dotychczas nie ma przekonujących dowodów, które wskazywałyby na znacznie większą syntezę melaniny w RPE po płodowym okresie rozwoju organizmu. Za to nie brakuje danych, które sugerują, że z wiekiem dramatycznie zmienia się morfologia melanosomów RPE (Boulton, 1998) oraz, że procesowi temu towarzyszy spadek zawartości melaniny w komórkach RPE (Sarna et al., 2003; Boulton i Dayhaw-Barker, 2001; Schmidt i Peisch, 1986). W dotychczasowych badaniach wykazano, że zmiany fizykochemicznych właściwości melanosomów RPE, jakie towarzyszą procesowi starzenia, mogą modyfikować ich fotoreaktywność (Boulton et al., 1990; Boulton i Dayhaw-Barker, 2001; Docchio et al., 1991; Rózanowska et al., 2002; Rózanowski et al., 2008b). Zasadnym jest więc pytanie czy melanosomy RPE w oku starszym są równie efektywne w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu jak melanosomy u oku młodym. Jest to o tyle istotne, iż oko starcze wydaje się być narażone na dodatkowe czynniki stresogenne, do których zaliczyć należy akumulujący się w RPE barwnik starczy tzw. lipofuscynę. Barwnik ten charakteryzuje się dość wysoką aktywnością fotochemiczną i wykazuje działanie fototoksyczne (Rózanowska et al., 1995, 1998; Sparrow i Boulton, 2005; Sundelin et al., 1998). Chociaż starcze zwyrodnienie plamki żółtej (AMD) jest schorzeniem, w patogenezie którego zaangażowanych jest wiele czynników zarówno genetycznych jak środowiskowych, uważa się, że stres oksydacyjny odgrywa ważną rolę w rozwoju tej choroby (Totan et al., 2009; Jin et al., 2010). Oznacza to, że zawartość melaniny w RPE i innych tkankach oka oraz jej właściwości fizykochemiczne mogą mieć pewne znaczenie w predyspozycji do AMD. Rzeczywiście, są doniesienia pokazujące związek między zawartością melaniny, a częstotliwością występowania AMD (Klein et al., 2006). Z wiekiem rośnie częstotliwość fuzji między melanosomami a innymi ziarnistościami komórkowymi, takimi jak lizosomy czy lipofuscyna. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają wzrost fotoreaktywności melanosomów ludzkich z wiekiem, i są zgodne z wcześniejszymi danymi literaturowymi (Rózanowska et al., 2002).

Wypadkowa zmiana fotoreaktywności melanosomów pochodzących z oczu dawców starszych najpewniej jest wynikiem co najmniej dwóch procesów : zmian w komponentie melaninowej, które będą omówione w dalszym rozdziale i zmian w komponentie rozpuszczalnej w rozpuszczalnikach organicznych. Nie wyczerpuje to wszystkich czynników, ponieważ modyfikowane białka i cukry, jakich można spodziewać się w trakcie starzenia organizmu, również mogą wpływać na fotoreaktywność melanosomów. W niniejszej pracy podjęto próbę zbadania udziału jedynie dwu pierwszych komponent w wypadkowej fotoreaktywności melanosomów RPE. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują na zależną od wieku akumulację komponenty rozpuszczalnej w chloroformie. Liposomy zawierające ten wyizolowany składnik, nieperoksydowalny fosfolipid i cholesterol, naświetlane światłem niebieskim generują tlen singletowy, o czym świadczy akumulacja specyficznych w stosunku do tlenu singletowego wodoronadtlenków cholesterolu (rys 9). Podobne właściwości stwierdzono w lipofuscynie z oczu ludzkich (Rózanowska et al., 1995, 1998). Wskazywałoby to na akumulację podobnego do lipofuscyny składnika melanosomów. Rzeczywiście, już dawno temu postulowana była fuzja między melanosomami a ziarnami lipofuscyny, której częstotliwość w RPE człowieka miała się zwiększać z wiekiem (Feeney, 1978). Ze względu na bardzo dokładną procedurę oczyszczania, zastosowaną w niniejszej pracy, raczej można wykluczyć zwykłe zanieczyszczenie melanosomów użytych w doświadczeniach ziarnami lipofuscyny. Należy podkreślić, że ekstrakty z melanosomów zwierzęcych nie indukowały zauważalnej fotokonsumpcji tlenu (rys 7). Pochodzą one ze zwierząt nie starszych niż dwa lata. Sugeruje to, iż ekstrahowalny chloroformem składnik melanosomów, który wykazuje aktywność fotochemiczną, nie jest obecny w „młodych” melanosomach RPE ale pojawia się z wiekiem. Fotoreaktywność związana z ekstrahowalną chloroformem frakcją melanosomów nasila się z wiekiem (Rys. 7). Nie wiadomo, czy jest to wynikiem rosnącej z wiekiem aktywności fotochemicznej tej frakcji, czy jej zawartości w melanosomach. W badaniach nad zależną od wieku fotoreaktywnością lipofuscyny z RPE oczu ludzi stwierdzono, że wzrost tej fotoreaktywności można tłumaczyć wzrostem zawartości nierozpuszczalnej w chloroformie komponenty barwnika starczego (Rózanowska et al., 2004). Jest to dodatkowy, chociaż pośredni argument, przeciwko trywialnemu zanieczyszczeniu melanosomów z RPE oczu starszych dawców ziarnami lipofuscyny. Zbadane właściwości wskazują ponadto na rosnącą z wiekiem zdolność do produkcji anionorodnika ponadtlenkowego (rys 10). Poddanie melanosomów ekstrakcji Folcha powoduje spadek fotokonsumpcji tlenu, jak i mniejszą wydajność generowania  $O_2^{\cdot-}$ . Sugeruje to redukcję zawartości jednej z fotoreaktywnych frakcji melanosomów, która

jest rozpuszczalna w chloroformie. Zmniejszona fotoreaktywność traktowanych Folchem melanosomów może mieć związek z ich zwiększoną zdolnością do adhezji i agregacji. Melanosomy takie zbijają się w większe agregaty, które trudniej jest równomiernie zawiesić w wodzie a ponadto szybciej sedimentują. W przypadku konsumpcji tlenu ważny jest również fakt usunięcia z układu lipidów błonowych, jednego z możliwych substratów dla reaktywnych form tlenu. Ekstrakty z ludzkich melanosomów, wprowadzone do błon liposomów zbudowanych z peroksydowalnych lipidów, wykazują fotoreaktywność i pod wpływem światła niebieskiego indukują mierzalną fotokonsumpcję tlenu. Dzięki metodzie wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z elektrochemiczną detekcją, możliwa stała się identyfikacja mechanizmów produkcji reaktywnych form tlenu przez ekstrakty z melanosomów ludzkich (rys 9). Wyniki te dowodzą, że pod wpływem naświetlania produkowany jest głównie tlen singletowy. Lipofuscyna pochodząca z ludzkich komórek RPE pod wpływem światła niebieskiego generuje zarówno tlen singletowy, anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru (Rózanowska et al., 1995; Reszka et al., 1995; Rozanowska et al., 2004). Zwiększona fotoreaktywność melanosomów pochodzących od starszych dawców jest więc najpewniej następstwem nasilonego fotogenerowania wszystkich tych reaktywnych form tlenu.

Uzyskane wyniki dowodzą, że melaninowy składnik melanosomu ulega zmianom z wiekiem, ponieważ zwiększa się jego fotoreaktywność. W dotychczasowych badaniach nie udało się jednoznacznie ustalić jaki jest molekularny mechanizm zwiększonej fotoreaktywności melaniny w starczych melanosomach. Wydaje się, że zależne od wieku modyfikacje melaniny mają związek z jej fotodegradacją. Chociaż proces ten prowadzi do utlenienia podjednostek melaniny, częściowa fotodegradacja barwnika generuje nowe centra oksydacyjno-redukcyjne, które mogą brać udział w fotoindukowanej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru. Proces fotodegradacji jest procesem złożonym. Pierwsze etapy najpewniej prowadzą do odwracalnego utlenienia hydrochinonów. Za takim wnioskiem przemawiają dane spektrofotometrycznych badań melaniny syntetycznej (Korytowski i Sarna, 1990), gdzie udało się zaobserwować odwracalny wzrost absorpcji melaniny, towarzyszący wstępnym etapom fotodegradacji polimeru oraz wyniki fotodegradacji melanosomów otrzymane przy pomocy spektroskopii EPR (Zadło et al., 2007). Jednak wzrostu fotoreaktywności i fototoksyczności nie można wyłącznie tłumaczyć fotoutlenianiem hydrochinonów. W niezależnych badaniach stwierdzono, iż utlenianie melanosomów przy pomocy żelazicyjanku potasu prowadzi do znacznego spadku fotoreaktywności takich melanosomów, który stwierdzono w pomiarach fotokonsumpcji tlenu i fotogenerowania anionorodnika ponadtlenkowego (Żądło,



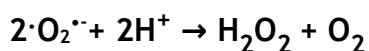
Szewczyk, nie opublikowane). Wydaje się więc, że indukowane zmiany w fizykochemicznych właściwościach fotodegradowanych melanosomów to wynik procesów w których ma miejsce poważna modyfikacja polimeru melaniny, prowadzących do pęknięcia pierścieni głównych podjednostek melaniny i generowania nowych grup obdarzonych fotoreaktywnością (Korytowski i Sarna, 1990). Nofsinger i inni zaobserwowali silną fotoreaktywność niskocząsteczkowej frakcji *Sepia* melaniny (Nofsinger et al., 1999a) Wydaje się jednak, że w diskutowanych w tej pracy wynikach czynnik ten odgrywa znikomą rolę, należy bowiem pamiętać, że silnie zwiększoną fotoreaktywność obserwowano w rozpuszczalnej frakcji o masie cząsteczkowej ok 1,5 kDa. Można więc oczekiwać, iż ta frakcja uległa odrzuceniu przy procedurze przygotowania fotodegradowanych melanosomów do pomiarów.

### ***Zmiany zachodzące w melanosomach zwierzęcych pod wpływem kontrolowanego fotostarzenia***

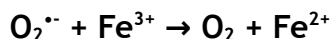
Ze względu na znaczne ograniczenia i trudności związane z uzyskiwaniem materiału ludzkiego do badań, istotnym stało się opracowanie modelu doświadczalnego, który umożliwiłby analizę zmian fizykochemicznych melanosomów RPE jakie towarzyszą starzeniu. W badaniach zdecydowano się na wykorzystanie oczu zwierząt rzeźnych - krów i prosiąt, ponieważ zwierzęta te żyją stosunkowo krótko, bo ok 2 lat. Oznacza to, że ich melanosomy RPE nie były poddane długotrwałemu działaniu czynników stresogennych i można je traktować jako model młodych melanosomów ludzkich. Obrazowanie przy pomocy mikroskopii elektronowej oraz sił atomowych potwierdziło, że morfologia takich melanosomów przypomina morfologię melanosomów RPE z oczu dzieci (Zareba et al., 2006b). Z czynników środowiskowych, które mogą modyfikować właściwości fizykochemiczne melanosomów *in situ* wybrano intensywne promieniowanie widzialne, które dociera do komórek RPE w oku człowieka. Należy podkreślić, że fotoreaktywność melanin rośnie odwrotnie proporcjonalnie do długości fali (Sarna et al., 1985). Chociaż w promieniowaniu słonecznym składowa ultrafioletowa charakteryzuje się największym potencjałem cytotoksycznym, w warunkach *in vivo* promieniowanie UV nie dociera do komórek RPE, więc do degradacji melanosomów zwierzęcych użyto światła o długości fali powyżej 400 nm. Do monitorowania postępów degradacji posłużono się spektroskopią EPR, mierząc intensywność sygnału melaniny oraz absorpcyjną spektroskopią optyczną mierząc absorpcję solubilizowanych melanosomów w wybranym zakresie spektralnym. Metody te uzupełniają się wzajemnie, ponieważ zarówno sygnał EPR melaniny, jak i jej widmo absorpcji zależą od wielu czynników fizykochemicznych, takich jak temperatura,

pH, obecność jonów oraz stan oksydacyjno-redukcyjny melaniny. Melanosomy degradowano w pH 5, ponieważ zmniejsza to solubilizację w porównaniu do degradacji prowadzonej w pH 7. Są doniesienia o wartości pH wewnątrz melanosomów wynoszącej poniżej 5 (Bhatnagar et al., 1993). Jest to zgodne z poglądem że melanosomy wywodzą się z lizosomów, które charakteryzują się stosunkowo niskim wewnętrznym pH (Orlow, 1995; Raposo i Marks, 2002). Melanosomy degradowane w pH zbliżonym do neutralnego wykazywały nieco inny początkowy przebieg zmian sygnałów EPR (Żądło, 2009), natomiast zmiany w ilości światła pochłanianego przez melanosomy solubilizowane były bardzo podobne.

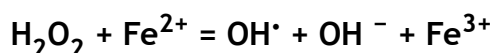
Po uzyskaniu melanosomów doświadczalnie postarżanych sprawdzano ich fotoreaktywność. Nie zmienia się prędkość konsumpcji tlenu (rys 13) przez degradowane melanosomy. Prawdopodobnie podczas procesu fotodegradacji melanosomów, prowadzonego przy swobodnym dostępie powietrza, utlenieniu ulegają składniki melanosomów podatne na utlenianie, co zmniejsza efektywne stężenie potencjalnych akceptorów ROS. Ze wzrostem stopnia degradacji melanosomów można zauważyć zwiększenie tempa akumulacji adduktu spinowego DMPO-OOH, podczas fotoaktywacji próbek, zawierających zawiesinę melanosomów i pułapkę spinową (rys. 14 i 15). Zaobserwowany efekt może być spowodowany dwoma czynnikami - zwiększoną wydajnością produkcji  $O_2^{\cdot -}$  lub zmniejszoną efektywnością oddziaływania anionorodnika ponadtlenkowego z melanim. Wiadomo bowiem, iż eumelanina syntetyczna zarówno redukuje jak i utlenia anionorodnik ponadtlenkowy, działając jak swego rodzaju pseudodysmutaza (Sarna et al., 1986; Korytowski et al., 1986). Badania kontrolne, w których usiłowaliśmy zmierzyć przy pomocy radiolizy impulsowej oraz monitorowaniem redukcji ferricytochromu C efektywność oddziaływania anionorodnika ponadtlenkowego z melanim o różnym stopniu degradacji, niestety, nie dostarczyły jednoznacznych wyników. Porównując tempo fotoindukowanej konsumpcji tlenu przez melanosomy niedegradowane i degradowane, można wnioskować, że to właśnie różna efektywność zmiatania przez melanim anionorodnika ponadtlenkowego, jest główną przyczyną zaobserwowanych różnic. Powstający w wyniku fotoaktywacji melaniny anionorodnik ponadtlenkowy, który nie jest efektywnie zmiatany przez samą melanimę, może być szkodliwy dla komórki na wiele sposobów. Chociaż reaktywność anionorodnika ponadtlenkowego jest zbyt mała aby samodzielnie zapoczątkować reakcję peroksydacji lipidów, jego forma uprotonowana (rodnik wodoronadtlenkowy) jest już do tego zdolna (Bartosz, 2003). Natomiast w wyniku dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego powstaje nadtlenek wodoru.



Anionorodnik ponadtlenkowy, chociaż stosunkowo mało reaktywnych chemicznie, poprzez jedno-elektronową redukcję jonów żelazowych i miedziowych może aktywować te jony do formy, w której stanowią potencjalne zagrożenie dla komórki:



Powstający w wyniku dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego nadtlenuk wodoru, będąc mało reaktywny chemicznie i pozbawiony ładunku, może dyfundować na stosunkowo duże odległości i przenikać przez błonę cytoplazmatyczną i błony organelli komórkowych. W obecności zredukowanych jonów metali przejściowych nadtlenuk wodoru może być źródłem rodnika hydroksylowego, dzięki procesowi, który nazywa się reakcją Fentona:



Rodniki hydroksylowe są najbardziej utleniającą „reaktywną formą tlenu”, która reaguje z prawie każdym składnikiem komórki z dużą szybkością (Bartosz, 2003). W badaniach, w których wykorzystano metodę radiolizy impulsowej wyznaczono stałe szybkości oddziaływania syntetycznych melanin z rodnikiem hydroksylowym (Sarna et al., 1986). Dla syntetycznej DOPA-melaniny stała szybkości wyniosła  $1,5 \cdot 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . W niniejszej pracy zanalizowano wpływ degradacji melanosomów na ich zdolność modyfikowania reakcji Fentona. Układ doświadczalny zawierał jony żelaza (II) skompleksowane z cytrynianem oraz nadtlenuk wodoru. Układ taki generuje duże ilości rodnika hydroksylowego (rys 17). Identyfikację produkowanego rodnika potwierdzono symulując sygnał EPR obserwowanego adduktu spinowego (rys. 16). Do tak przygotowanego układu doświadczalnego dodawano melanosomy o różnym stopniu degradacji. Melanosomy natywne wykazały się największą zdolnością do hamowania przebiegu tej reakcji (rys 17). Wraz z rosnącym stopniem degradacji, wpływ melanosomów na przebieg reakcji wyraźnie się zmniejszał. Wyniki te można zinterpretować zakładając, iż:

- 1) z poziomem degradacji zmniejsza się zdolność melanosomów do kompleksowania, czyli sekwestracji jonów żelaza
- 2) postępująca dezintegracja ziaren melanosomów prawdopodobnie zmniejsza zdolność melaniny do przechwytywania rodnika hydroksylowego, powstającego w obrębie ziarna.

Komórki RPE posiadają wiele mechanizmów obronnych, których skuteczność zależy od rodzaju wywołwanego stresu (Lu et al., 2006). Ochronna rola melanosomów w

komórkach RPE była badana przy zastosowaniu różnych metod stosując różne czynniki stresogenne. I tak, udało się wykazać fotoochronne właściwości melaniny w ludzkich płodowych komórkach RPE, przy czym wydajność tego procesu zależała od stopnia agregacji cząsteczek melaniny (Seagle et al., 2005). Wprowadzenie do tych komórek Sepia melaniny powodowało zwiększenie efektu ochronnego (Seagle et al., 2006). Efekt ochronny był też widoczny w przypadku jednoczesnego podania melaniny i lipofuscyny (Wang et al., 2006). Natomiast w innych badaniach, w których komórki ARPE-19 „karmione” były melanosomami RPE z oczu prosiąt, nie zaobserwowano ochronnego działania ani przy naświetlaniu komórek intensywnym promieniowaniem widzialnym ani po podaniu nadtlenu wodoru (Zareba et al., 2006a). W badaniach opisanych w opublikowanej wcześniej pracy, której wyniki wykorzystano w niniejszej rozprawie porównano wpływ sfagocytowanych melanosomów zarówno niedegradowanych jak i fotodegradowanych oraz kuleczek lateksowych na tempo apoptozy indukowanej pod mikroskopem intensywnym promieniowaniem fioletowym. Jak widać z rysunku 19, chociaż melanosomy niezdegradowane nie zmniejszały obserwowanego efektu fototoksycznego, obecność w komórkach melanosomów fotodegradowanych wyraźnie nasilała szybkość i zakres apoptozy przy czym efekt ten zależał od stopnia fotodegradacji melanosomów. Brak wyraźnego efektu fotoochronnego w przypadku melanosomów niedegradowanych może oznaczać, że sfagocytowane melanosomy nie są zdolne do przeciwdziałania cytotoksycznym procesom jakie indukowane są w komórce promieniowaniem fioletowym. Nie można ponadto wykluczyć swoistej kompensacji antyutleniającego działania takich melanosomów i ich fotoreaktywności, której następstwem w warunkach przeprowadzonego doświadczenia było generowanie znacznych strumieni anionorodnika nadadtlenkowego i nadtlenu wodoru. Natomiast wyraźnie większa fototoksyczność degradowanych melanosomów prawdopodobnie wynika z ich zwiększonej efektywności generowania anionorodnika nadadtlenkowego (bądź ze zmniejszonej efektywności zmiatania tej reaktywnej formy tlenu) i ze zmniejszonej wydajności przeciwdziałania reakcji Fentona. Wygląda na to, że zwiększona fototoksyczność doświadczalnie „fotostarzonych” melanosomów RPE ma miejsce również wtedy, kiedy monitoruje się wczesne efekty indukowane mniejszymi dawkami promieniowania fioletowego, które nie prowadzą do śmierci komórek. Burke i Zareba badali ostatnio wpływ fotodegradowanych melanosomów na ich ruchliwość w komórce. W badaniach tych stwierdzono wyraźne zmniejszenie ruchliwości fagosomów ze zwiększającym się stopniem degradacji sfagocytowanych melanosomów (Burke i Zareba, 2009).

## ***Identyfikacji zmian właściwości melanosomów i czynników im sprzyjających***

W dotychczasowych badaniach wykazano, że fotodegradacja melanosomów powoduje zmiany ich właściwości fizykochemicznych (Sarna et al., 2003) i morfologicznych (Zareba et al., 2006b). Zmiany te zwiększają efektywną fotoreaktywność melanosomów i ich fototoksyczność w komórkach RPE *in vitro* (Hu et al., 2008; Rózanowska et al., 2002; Rózanowski et al., 2008b; Zareba et al., 2006b). Jedną z postulowanych, najważniejszych właściwości ochronnych melanosomów, która mogłaby ulegać modyfikacji z wiekiem, jest ich zdolność do przechwytywania i magazynowania jonów żelaza (Hong et al., 2004; Hong i Simon, 2007). Sekwestracja jonów metali jest najważniejszym z postulowanych działań ochronnych w przypadku neuromelaniny (Zecca i Swartz, 1993). Zaburzenie tej zdolności może mieć udział w powstawaniu patologii układu nerwowego, jak na przykład w chorobie Parkinsona (Zecca et al., 2008). Naświetlanie syntetycznej DOPA-melaniny w warunkach swobodnego dostępu powietrza początkowo prowadzi do odwracalnego utlenienia podjednostek hydrochinonowych. Przesuwa to równowagę w kierunku form chinonowych. Dalsze naświetlanie powoduje jednak nieodwracalną degradację podjednostek melaniny poprzez reakcję otwierania pierścieni (Korytowski i Sarna, 1990). W wyniku tego procesu spada liczba grup hydroksylowych fenoli, które jak wykazano we wcześniejszych pracach, koordynują jony żelaza. Przeprowadzone doświadczenia ukazują zmniejszanie się ilości jonów żelaza kompleksowanego przez melanosomy, inkubowane w roztworze Fe(III)-cytrynian ze wzrastającym poziomem ich degradacji (rys. 20 i 21). Zgodnie z tym trendem, zmniejsza się ilość żelaza uwalnianego w kwaśnym pH przez melaninę, która inkubowana była w roztworze cytrynianu żelaza (rys. 22). Wydaje się, że najbardziej prawdopodobnym mechanizmem obserwowanych zmian w zdolności melanosomów do wiązania jonów żelaza jest opisany powyżej mechanizm jaki proponowano w przypadku melaniny syntetycznej.

Aby dokładniej prześledzić zmiany towarzyszące melaninie, podczas fotodegradacji zanalizowano wpływ jonów dysprozu na zdolność do relaksacji spin-sieciowej centrów paramagnetycznych melaniny. W tych badaniach jony dysprozu, kompleksujące z grupami jonowymiennymi melaniny, wykorzystano jako swoiste egzogenne sondy molekularne. Melaniny charakteryzują się długim czasem relaksacji spinowo-sieciowej, który w temperaturze 77°K wynosi nawet 4,3 ms (Okazaki et al., 1985). W niniejszej pracy pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej, uzyskując średni czas relaksacji około 20  $\mu$ s. Z uwagi na to, iż efektywność tego oddziaływania zależy silnie od odległości między wolnorodnikowymi dipolami melaniny i dipolami związanymi z melaniną jonów,

ewentualne zmiany wpływu jonów dysprozu na czasy relaksacji melaniny mogą sugerować istotną modyfikację topografii wiązania jonów w stosunku do centrów wolnorodnikowych melaniny. Sama degradacja melanosomów nie wpływa na czas relaksacji rodników melaniny. Widać natomiast wyraźny efekt fotodegradacji melanosomów na relaksującą efektywność skompleksowanych z melaniną jonów dysprozu. Dane z rys 24 i 26, sugerują że wraz ze stopniem fotodegradacji melanosomów zmniejsza się efektywna odległość związanych z melaniną jonów dysprozu w stosunku do wolnorodnikowych centrów melaniny. Pośrednio świadczy to o zwiększonej dostępności centrów wolnorodnikowych melaniny fotodegradowanych melanosomów w stosunku do egzogennych reagentów. Umożliwia to zwiększoną dostępność do rodników melaniny i ułatwia dyfuzję reaktywnych form tlenu które mogą być fotogenerowane w obrębie melanosomu, szczególnie takich jak anionorodnik ponadtlenny. Analiza wyników w oparciu o jeden uśredniony czas relaksacji oraz parametr rozciągnięcia puli eksponent prowadzi do wniosku, że w ziarnie melanosomu występują wolnorodnikowe centra melaniny o zróżnicowanej dostępności dla zewnętrznych reagentów. Dla melanosomów degradowanych była widoczna zależność średniego czasu relaksacji od stężenia jonów Dy(III). Prawdopodobnym mechanizmem może być powodowane degradacją częściowe otwarcie struktur melaniny, ułatwiające jonom penetrację do wnętrza cząsteczki. Przemawiać za tym może fakt, że w przypadku melaniny degradowanej i krótkim czasie inkubacji z jonami szerokość rozkładu czasów relaksacji jest bardzo duża (rys. 25); (parametr  $\beta$  osiąga niskie wartości dla wysokich stężeń jonów dysprozu). Prawdopodobnie tworzy się rodzaj gradientu stężenia jonów dysprozu od powierzchni do wewnątrz cząsteczki melaniny. Oznacza to, że po godzinnym czasie inkubacji jony dysprozu są w stanie wydajnie oddziaływać tylko z częścią populacji centrów rodnikowych. Skutkuje to pojawieniem się w puli krótkich czasów relaksacji. Centra rodnikowe melaniny zlokalizowane najgłębiej w strukturze ziarna melnanosomu pozostają poza zasięgiem oddziaływania z jonami i dla nich czas relaksacji nadal jest bardzo długi, stąd znaczne rozciągnięcie parametru  $\beta$ . Natomiast po upływie dwudziestu godzin w obecności jonów dysprozu zachodzi dalsze skrócenie czasu relaksacji, zarówno dla melanosomów natywnych, jak i dla degradowanych (rys. 26). Szerokość rozkładu czasów relaksacji maleje (rys. 27), co sugeruje iż jony spenetrowały cząsteczkę melaniny, zwiększając ogólną skuteczność procesów relaksacyjnych. Ustala się pewien stan równowagi, zmniejsza się średnia odległość między rodnikiem melaniny i najbliższym jonem Dy(III). Zmiana właściwości melanosomów degradowanych sugeruje rozluźnienie struktur polimeru melaniny podczas degradacji. Za takimi zmianami indukowanymi fotodegradacją melanosomów, wydają się również świadczyć pomiary wykonane przy

pomocy mikroskopii sił atomowych (Zareba et al., 2006b) . To częściowe otworzenie struktur melaniny może odpowiadać za zwiększona ilość anionorodnika ponadtlenkowego, wydostającego się z wewnątrz cząsteczki melaniny. Nofsinger i inni wykazali wpływ stopnia agregacji Sepia melaniny na fotogenerację reaktywnych form tlenu (Nofsinger et al., 2002).

Zbadano zmianę zdolności melanosomów do bezpośredniego przekazywania elektronów pod wpływem światła. Akceptorem elektronu był dodatkowo naładowany znacznik spinowy TEMPO-cholina. Dodatni ładunek znacznika znacznie ułatwia oddziaływanie z ujemnie naładowaną melaniną (Sarna et al., 1985). Ponieważ tlen został usunięty z układu, jedynym zewnętrznym akceptorem elektronów w układzie jest nitroksylowy znacznik spinowy. TEMPO-cholina jest znacznikiem spinowym stabilnym w roztworach wodnych. W roztworze może ulegać zarówno jednoelektronowemu utlenieniu (do związków oksoamonowych) jak i redukcji (stając się hydroksylaminą). W oby tych przypadkach przestaje być związkiem paramagnetycznym i traci swój sygnał EPR. Pod wpływem światła sygnał znacznika ulega zmniejszeniu (rys. 28). W obecności melanosomów przebieg kinetyki redukcji jest szybszy, szczególnie przy udziale melanosomów zdegradowanych. Doświadczenia powtórzono dla melanosomów pozbawionych frakcji lipidowej przez ekstrakcję Folcha. W tym przypadku kinetyka zaniku sygnału znacznika była jednak znacznie wolniejsza (rys. 29). Z zebranych danych wynika, iż melanosomy fotodegradowane posiadają większą fotoreaktywność niż natywne melanosomy wołowe.

Zwiększona zdolność do przekazywania elektronu dobrze koreluje z danymi o zwiększonej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego. Pilas i inni wykazali iż melanina może redukować jony żelaza skompleksowane np. z EDTA (Pilas et al., 1988). Nie wykluczone, że i również ten proces mógłby ulec wzmocnieniu przy zastosowaniu melaniny poddanej fotodegradacji. Zastanawiający jest wpływ usunięcia frakcji rozpuszczalnej w chloroformie. Takie przygotowanie melanosomów powinno ułatwiać oddziaływanie ujemnie naładowanej melaniny z dodatnio naładowanym znacznikiem, natomiast wpływ tego zabiegu jest odwrotny od oczekiwanego. Wydaje się więc, że większą rolę odgrywa tu silna agregacja tak preparowanych melanosomów, zmniejszając całkowitą powierzchnię dostępną do reakcji ze znacznikiem. Jest to efekt podobny do zaobserwowanego wcześniej na melanosomach ludzkich zmniejszenia fotokonsumpcji tlenu po ekstrakcji Folcha (rys 6).

Paramagnetyczny charakter melaniny umożliwia jej pomiary przy pomocy spektrometrii EPR. Możliwie są pomiary ilościowe oraz identyfikacja rodzaju melaniny

(Sarna i Lukiewicz, 1971; Sarna i Swartz, 1978; Sealy et al., 1982). Jednak w przypadku fotodegradacji melanin pochodzących z RPE udawało się zaobserwować jedynie spadek amplitudy sygnału, natomiast nie było widać zmian jego innych parametrów magnetycznych. Prawdopodobnie powstające formy pośrednie tak niewiele różnią się współczynnikiem rozszczepienia spektroskopowego, że nie udaje się ich oddzielić od sygnału melaniny stosując do pomiaru pasmo X (~9 GHz) ani Q (~34 GHz). Dopiero zastosowanie spektrometru EPR pracującego w paśmie W (~93 GHz) pozwala zaobserwować subtelne zmiany w charakterystyce sygnału (rys. 30-32). To, iż stosunkowo najmniejsze zmiany sygnałów EPR towarzyszące fotodegradacji melanosomów obserwuje się w niskim pH może wynikać z faktu iż w tych warunkach rejestruje się przede wszystkim sygnał samoistnych rodników melaniny, które w najmniejszym stopniu ulegają modyfikacją w trakcie fizykochemicznych zmian melaniny. Zarówno w warunkach nasycenia jonami cynku jak i w silnie alkalicznym pH obserwuje się głównie indukowalne rodniki melaniny, które są wynikiem przesunięcia równowagi komproporcjonacji chinonowych i hydrochinonowych podjednostek polimeru. Z uwagi na to iż nie przeprowadzono jeszcze zadowalającej symulacji widm melanosomów w paśmie W, trudno jednoznacznie zinterpretować zaobserwowane zmiany tych sygnału, jakie towarzyszą ich doświadczalnemu fotostarzeniu. Mogą one sugerować, że w trakcie doświadczalnego fotostarzenia ma miejsce modyfikacja podjednostek melaniny uczestniczących w równowadze komproporcjonacji, a także najbliższego otoczenia centrów indukowanych. Bardziej jednoznaczne wnioski na temat obserwowanych zmian będzie można wysunąć po przeprowadzeniu szczegółowej symulacji tych widm. Tym niemniej opisane w pracy wyniki wstępnych badań wskazują na duży potencjał spektroskopii EPR w zakresie wysokiej częstotliwości mikrofal do monitorowania i ewentualnego diagnozowania zmian melaniny towarzyszących starzeniu.



## Wnioski

Wyniki doświadczeń opisanych w niniejszej pracy pozwalają na sformułowanie następujących wniosków :

1. Z wiekiem następuje akumulacja zmian w melanosomach nabłonka upigmentowanego siatkówki oka ludzkiego. Zmiany te dotyczą zarówno komponenty melaninowej jak i lipidowej ziaren pigmentu, w wyniku których melanosomy stają się bardziej proutleniające. Jest to następstwem zależnego od wieku wzrostu fotoreaktywności melanosomów, które pod wpływem krótkofalowego promieniowania widzialnego indukują szybszą konsumpcję tlenu oraz bardziej wydajną produkcję anionordnika ponadtlenkowego i tlenu singletowego.
2. Melanosomy zwierzęce poddane kontrolowanemu fotostarzeniu wykazują podobne zmiany właściwości co melanosomy pochodzące od ludzi w starszym wieku. Stają się potencjalnym czynnikiem fotosensybilizującym, zwiększając produkcję reaktywnych form tlenu. W hodowli komórkowej in vitro wykazują zwiększoną fototoksyczność w porównaniu z melanosomami natywnymi.
3. Długotrwała fotoliza melanosomów wywołuje zmiany w morfologii ziaren pigmentu i najprawdopodobniej w strukturze molekularnej samej melaniny. Zmniejsza się zdolność do kompleksowania jonów metali przejściowych, co w komórkach nabłonka upigmentowanego siatkówki może prowadzić do redukcji efektywności przeciwutleniającej i zwiększonego prawdopodobieństwa stresu oksydacyjnego.

Molekularna natura zmian fizykochemicznych melanosomów towarzyszących starzeniu oraz doświadczalnemu fotostarzeniu nie jest do końca poznana. Konieczne są dalsze badania na melanosomach ludzkich od dawców z różnych grup wiekowych oraz drobiazgową analizę właściwości fizykochemicznych melanosomów doświadczalnie starzonych w celu jednoznacznej identyfikacji najważniejszych procesów prowadzących do obserwowanych zmian zależnych od wieku oraz ustalenia ich konsekwencji biologicznych.

## Streszczenie

Główną funkcją komórek nabłonka upigmentowanego siatkówki jest utrzymanie w dobrym stanie komórek fotoreceptorowych, co umożliwia prawidłowy proces widzenia. Warunki fizykochemiczne panujące w siatkówce, a mianowicie duże stężenia tlenu i substancji światłoczułych przy jednoczesnej ekspozycji na światło, sprzyjają zaistnieniu reakcji fotouczulanych z udziałem reaktywnych form tlenu. Komórki RPE wyposażone są w szereg czynników obrony przed stresem oksydacyjnym, wśród których występuje melanina zawarta w melanosomach. Warstwa komórek RPE jest tkanką postmitotyczną, więc nie ma możliwości regeneracji poprzez wymianę komórek. Melanina w komórkach RPE syntetyzowana jest w dużych ilościach jedynie w życiu płodowym, pojawiające się z wiekiem zmiany w melaninie kumulują się.

W pracy badano wpływ wieku na właściwości przeciw- i proutleniające melanosomów ludzkich. Zaobserwowano wyraźny wzrost fotoreaktywności melanosomów z wiekiem dawców, objawiający się zwiększoną konsumpcją tlenu oraz produkcją anionorodnika ponadtlenkowego, obserwowanych odpowiednio za pomocą tlenometrii EPR oraz pułapkowania spinowego. Oprócz pomiaru całych ziarnistości, badano właściwości różnych części składowych melanosomu. Detekcję reaktywnych form tlenu generowanych przez rozpuszczalną w chloroformie składową melanosomów prowadzono przy użyciu HPLC z detektorem elektrochemicznym. Chloroformowe ekstrakty z melanosomów, umieszczone w peroksydowalnych liposomach wykazywały zwiększoną generację reaktywnych form tlenu, głównie tlenu singletowego.

Celem przeprowadzenia dokładniejszych badań zmian właściwości melaniny posłużono się układem modelowym : postarzanymi światłem melanosomami zwierzęcymi. Badano sam proces fotodegradacji melanosomów zwierzęcych światłem niebieskim oraz zmiany właściwości melaniny temu towarzyszące. Posługując się spektroskopią EPR obserwowano zwiększenie produkcji anionorodnika ponadtlenkowego przez naświetlane melanosomy. Badano w jaki sposób degradacja melanosomów wpływa na zdolność hamowania reakcji Fentona. Stwierdzono znacznie mniejszą zdolność kompleksowania jonów metali przejściowych, co może mieć wpływ na ogólną homeostazę oksydoredukcyjną w komórce. Aby potwierdzić zmiany właściwości przeprowadzono doświadczenia na hodowlach komórkowych, podając komórkom ARPE-19 melanosomy natywne i degradowane. Zaobserwowano znaczący wzrost fototoksyczności melanosomów poddanych fotostarzeniu w porównaniu z melanosomami natywnymi. W doświadczeniach nad molekularnym mechanizmem zaobserwowanych zjawisk badano zmiany struktur

wewnętrznych melanosomów posługując się wpływem jonów  $Dy(III)$  na szybkość relaksacji spinowo-siecowej centrów paramagnetycznych melaniny. Stosując impulsową spektroskopię EPR udało się zaobserwować zwiększony wpływ jonów na czas relaksacji dla melanosomów degradowanych, co może wskazywać na rozluźnienie struktur polimeru melaniny. Stwierdzono też zwiększony potencjał fotoredukcyjny melanosomów fotodegradowanych w nieobecności tlenu. Melanosomy degradowane znacznie szybciej redukowały znacznik spinowy pod wpływem światła. Zaobserwowano także zmiany charakterystycznego sygnału EPR melaniny, mierzonego w zaawansowanym technicznie paśmie W, pod wpływem fotodegradacji. Może to sugerować zmianę geometrii wokół centrów paramagnetycznych melaniny.

Uzyskane obserwacje potwierdzają znaczący wzrost fotoreaktywności melanosomów ludzkich wraz z wiekiem. Doświadczenia na postarzanych światłem melanosomach zwierzęcych potwierdzają tę hipotezę, jak również pozwalają wyciągnąć wnioski na temat zmian właściwości melaniny. Najprawdopodobniej struktura wewnętrzna w cząsteczce melaniny ulega rozluźnieniu, co skutkuje łatwiejszym dostępem zewnętrznych reagentów do wolnorodnikowych centrów melaniny i mniejszą zdolnością do przechwytywania jonów metali przejściowych. Natywne melanosomy w zależności od warunków doświadczalnych mogą wykazywać właściwości zarówno pro- jak i antyutleniające. Wraz z postępującym procesem fotodegradacji zaczyna dominować aktywność proutleniająca przy jednoczesnym spadku wydajności procesów przeciwutleniających. Efekty te mogą sprzyjać występowaniu zaburzeń procesu widzenia, prowadząc do patologii siatkówki takich jak starcze zwyrodnienie plamki żółtej (AMD).

## Literatura

- Arnaud R, Perbet G, Deflandre A, Lang G. Electron spin resonance of melanin from hair. Effects of temperature, pH and light irradiation. *Photochem. Photobiol* 38: 161-168, 1983.
- Bartosz G. *Druga twarz tlenu*. wydanie drugie, zmienione. Warszawa, Polska: Wydawnictwo naukowe PWN, 2003.
- Beatty S, Boulton M, Henson D, Koh HH, Murray IJ. Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 83: 867-877, 1999.
- Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 45: 115-134, 2000.
- Bhatnagar V, Anjaiah S, Puri N, Darshanam BN, Ramaiah A. pH of melanosomes of B 16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys* 307: 183-192, 1993.
- Bielec J, Pilas B, Sarna T, Truscott TG. Photochemical studies of porphyrin-melanin interactions. *J. Chem. Soc. Farad. Trans. :* 1469-1474, 1986.
- Blois MS, Zahlan AB, Mailng JE. Electron Spin Resonance Studies on melanin. *Biophys. J* 4: 471-490, 1964.
- Boulton M, Dayhaw-Barker P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye* 15: 384-389, 2001.
- Boulton M, Docchio F, Dayhaw-Barker P, Ramponi R, Cubeddu R. Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanosomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium. *Vision Res* 30: 1291-1303, 1990.
- Boulton ME. Melanin and the retinal pigment epithelium. W: *The retinal pigment epithelium*. Oxford University Press, 1998, p. 68-85.
- Boulton M, Róanowska M, Wess T. Ageing of the retinal pigment epithelium: implications for transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242: 76-84, 2004.
- Burke JM, Zareba M. Sublethal photic stress and the motility of RPE phagosomes and melanosomes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 50: 1940-1947, 2009.
- Cantrell A, McGarvey DJ, Roberts J, Sarna T, Truscott TG. Photochemical studies of A2-E. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol* 64: 162-165, 2001.
- Chio SS, Hyde JS, Sealy RC. Temperature-dependent paramagnetism in melanin polymers. *Arch. Biochem. Biophys* 199: 133-139, 1980.
- Chio SS, Hyde JS, Sealy RC. Paramagnetism in melanins: pH dependence. *Arch. Biochem. Biophys* 215: 100-106, 1982.
- Clancy CM, Simon JD. Ultrastructural organization of eumelanin from *Sepia officinalis* measured by atomic force microscopy. *Biochemistry* 40: 13353-13360, 2001.

- Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, Kamei M, Hasan A, Yan L, Rayborn ME, Salomon RG, Hollyfield JG. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 14682-14687, 2002.
- Crippa PR, Cristofolletti V, Romeo N. A band model for melanin deduced from optical absorption and photoconductivity experiments. *Biochim. Biophys. Acta* 538: 164-170, 1978.
- Dadachova E, Bryan RA, Huang X, Moadel T, Schweitzer AD, Aisen P, Nosanchuk JD, Casadevall A. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS ONE* 2: e457, 2007.
- DeMattei M, Levi AC, Fariello RG. Neuromelanin pigment in substantia nigra neurons of rats and dogs. *Neurosci. Lett* 72: 37-42, 1986.
- Dillon J, Zheng L, Merriam JC, Gaillard ER. Transmission of light to the aging human retina: possible implications for age related macular degeneration. *Experimental Eye Research* 79: 753-759, 2004.
- Docchio F, Boulton M, Cubeddu R, Ramponi R, Barker PD. Age-related changes in the fluorescence of melanin and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium: a time-resolved fluorescence spectroscopy study. *Photochem. Photobiol* 54: 247-253, 1991.
- Dorey CK, Wu G, Ebenstein D, Garsd A, Weiter JJ. Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 30: 1691-1699, 1989.
- Duling DR. Simulation of multiple isotropic spin-trap EPR spectra. *J Magn Reson B* 104: 105-110, 1994.
- Duncan JL, LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Yang H, Trautmann N, Chappelow AV, Feng W, Earp HS, Matsushima GK, Vollrath D. An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 44: 826-838, 2003.
- Dunford R, Land EJ, Rozanowska M, Sarna T, Truscott TG. Interaction of melanin with carbon- and oxygen-centered radicals from methanol and ethanol. *Free Radic. Biol. Med* 19: 735-740, 1995.
- Edwards RB, Szamier RB. Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture. *Science* 197: 1001-1003, 1977.
- Elleder M, Borovanský J. Autofluorescence of melanins induced by ultraviolet radiation and near ultraviolet light. A histochemical and biochemical study. *Histochem. J* 33: 273-281, 2001.
- Enochs WS, Sarna T, Zecca L, Riley PA, Swartz HM. The roles of neuromelanin, binding of metal ions, and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 7: 83-100, 1994.
- Feeney L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence,

enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 17: 583-600, 1978.

**Felix CC, Hyde JS, Sarna T, Sealy RC.** Interactions of melanin with metal ions. Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metal ions with free radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 100: 3922-3926, 1978.

**Felix CC, Hyde JS, Sealy RC.** Photoreactions of melanin: a new transient species and evidence for triplet state involvement. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 88: 456-461, 1979.

**Felix CC, Sealy RC.** Electron spin resonance characterization of radicals from 3,6-dihydroxyphenylalanine: semiquinone anions and their metal chelates. *J. Am. Chem. Soc.* : 2831-2836, 1981.

**Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957.

**Friedrichson T, Kalbach HL, Buck P, van Kuijk FJ.** Vitamin E in macular and peripheral tissues of the human eye. *Curr. Eye Res* 14: 693-701, 1995.

**Froncisz W, Sarna T, Hyde JS.** Cu<sup>2+</sup> probe of metal-ion binding sites in melanin using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* : 289-303, 1980.

**Froncisz W, Hyde JS.** The Loop-Gap Resonator: A New Microwave Lumped Circuit ESR Sample Structure. *Journal of Magnetic Resonance* 47: 515-521, 1982.

**Gallas JM, Littrell KC, Seifert S, Zajac GW, Thiyagarajan P.** Solution structure of copper ion-induced molecular aggregates of tyrosine melanin. *Biophys. J* 77: 1135-1142, 1999.

**Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D.** Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet* 26: 270-271, 2000.

**Grahn BH, Paterson PG, Gottschall-Pass KT, Zhang Z.** Zinc and the eye. *J Am Coll Nutr* 20: 106-118, 2001.

**Hach P, Duchoń J, Borovanský J.** Ultrastructural and biochemical characteristics of isolated melanosomes. *Folia Morphol (Praha)* 25: 407-410, 1977.

**Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF.** An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 20: 705-732, 2001.

**Hageman GS, Mullins RF.** Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. *Mol. Vis* 5: 28, 1999.

**Halpern H, Peric M, Nguyen T, Spencer D, Tercher B, Lin Y, Bowman M.** Selective isotopic labelling of a nitroxide spin label to enhance sensitivity for T2 oximetry. : 40-51, 1990.

Handa JT, Verzijl N, Matsunaga H, Aotaki-Keen A, Luty GA, te Koppele JM, Miyata T, Hjelmeland LM. Increase in the advanced glycation end product pentosidine in Bruch's membrane with age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 40: 775-779, 1999.

Hong L, Liu Y, Simon JD. Binding of metal ions to melanin and their effects on the aerobic reactivity. *Photochem. Photobiol* 80: 477-481, 2004.

Hong L, Simon JD. Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in melanin. *J Phys Chem B* 111: 7938-7947, 2007.

Huberman A, Pérez C. Nonheme iron determination. *Anal Biochem* 307: 375-8, 2002.

Hu D. Photobiology of ocular melanocytes and melanoma. *Photochem. Photobiol* 81: 506-509, 2005.

Hu D, Simon JD, Sarna T. Role of ocular melanin in ophthalmic physiology and pathology. *Photochem. Photobiol* 84: 639-644, 2008.

Ishida K, Panjwani N, Cao Z, Streilein JW. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul. Immunol. Inflamm* 11: 91-105, 2003.

Ito S. Reexamination of the structure of eumelanin. *Biochim. Biophys. Acta* 883: 155-161, 1986.

Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res* 13 Suppl 8: 103-109, 2000.

Ito S, Wakamatsu K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res* 16: 523-531, 2003.

Jimbow K, Miyake Y, Homma K, Yasuda K, Izumi Y, Tsutsumi A, Ito S. Characterization of melanogenesis and morphogenesis of melanosomes by physicochemical properties of melanin and melanosomes in malignant melanoma. *Cancer Res* 44: 1128-1134, 1984.

Jimbow K, Oikawa O, Sugiyama S, Takeuchi T. Comparison of eumelanogenesis and pheomelanogenesis in retinal and follicular melanocytes; role of vesiculo-globular bodies in melanosome differentiation. *J. Invest. Dermatol* 73: 278-284, 1979.

Jin H, Randazzo J, Zhang P, Kador PF. Multifunctional antioxidants for the treatment of age-related diseases. *J. Med. Chem* 53: 1117-1127, 2010.

Klein R, Klein BEK, Knudtson MD, Wong TY, Cotch MF, Liu K, Burke G, Saad MF, Jacobs DR. Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic groups in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Ophthalmology* 113: 373-380, 2006.

Korytowski W, Bachowski GJ, Girotti AW. Analysis of cholesterol and phospholipid hydroperoxides by high-performance liquid chromatography with mercury drop electrochemical detection. *Anal. Biochem* 213: 111-119, 1993.

Korytowski W, Hintz P, Sealy RC, Kalyanaraman B. Mechanism of dismutation of

superoxide produced during autoxidation of melanin pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 131: 659-665, 1985.

Korytowski W, Kalyanaraman B, Menon IA, Sarna T, Sealy RC. Reaction of superoxide anions with melanins: electron spin resonance and spin trapping studies. *Biochim. Biophys. Acta* 882: 145-153, 1986.

Korytowski W, Pilas B, Sarna T, Kalyanaraman B. Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. *Photochem. Photobiol* 45: 185-190, 1987.

Korytowski W, Sarna T. Bleaching of melanin pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of synthetic dopa-melanin. *J. Biol. Chem* 265: 12410-12416, 1990.

Korytowski W, Sarna T, Zar ba M. Antioxidant action of neuromelanin: the mechanism of inhibitory effect on lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys* 319: 142-148, 1995.

Kozikowski SD, Wolfram LJ, Alfano RR. Fluorescence spectroscopy of eumelanins. *J. Quantum Electronics QE*: 1379-1382, 1984.

Lai CS, Grover TA, Piette LH. Hydroxyl radical production in a purified NADPH--cytochrome c (P-450) reductase system. *Arch. Biochem. Biophys* 193: 373-378, 1979.

Lamb LE, Zareba M, Plakoudas SN, Sarna T, Simon JD. Retinyl palmitate and the blue-light-induced phototoxicity of human ocular lipofuscin. *Arch. Biochem. Biophys* 393: 316-320, 2001.

Lassen N, Black WJ, Estey T, Vasiliou V. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Semin. Cell Dev. Biol* 19: 100-112, 2008.

Leigh JJ. ESR rigid-lattice line shape in a system with two interacting spins. *J. Chem. Phys.* : 2608-2612, 1970.

Link EM, Brown I, Carpenter RN, Mitchell JS. Uptake and therapeutic effectiveness of 125I- and 211At-methylene blue for pigmented melanoma in an animal model system. *Cancer Res* 49: 4332-4337, 1989.

Liu Y, Kempf VR, Nofsinger JB, Weinert EE, Rudnicki M, Wakamatsu K, Ito S, Simon JD. Comparison of the structural and physical properties of human hair eumelanin following enzymatic or acid/base extraction. *Pigment Cell Res* 16: 355-365, 2003.

Li AS, Chignell CF. The NoH value in EPR spin trapping: a new parameter for the identification of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide spin adducts. *J. Biochem. Biophys. Methods* 22: 83-87, 1991.

Lukinova N, Iacovelli J, Dentchev T, Wolkow N, Hunter A, Amado D, Ying G, Sparrow JR, Dunaief JL. Iron chelation protects the retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 against cell death triggered by diverse stimuli. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 50: 1440-1447, 2009.

Lu F, Yan D, Zhou X, Hu D, Qu J. Expression of melanin-related genes in cultured adult human retinal pigment epithelium and uveal melanoma cells. *Mol. Vis* 13: 2066-2072,



2007.

**Lu L, Hackett SF, Mincey A, Lai H, Campochiaro PA.** Effects of different types of oxidative stress in RPE cells. *J. Cell. Physiol* 206: 119-125, 2006.

**Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R, Adamis AP.** Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J. Clin. Invest* 101: 1219-1224, 1998.

**Lydén A, Larsson BS, Lindquist NG.** Melanin affinity of manganese. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 55: 133-138, 1984.

**Mason HS, Ingram DJ, Allen B.** The free radical property of melanins. *Arch. Biochem. Biophys* 86: 225-230, 1960.

**Meng S, Kaxiras E.** Mechanisms for ultrafast nonradiative relaxation in electronically excited eumelanin constituents. *Biophys. J* 95: 4396-4402, 2008.

**Meredith P, Riesz J.** Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem. Photobiol* 79: 211-216, 2004.

**Meredith P, Sarna T.** The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment Cell Res* 19: 572-594, 2006.

**Nicolas CM, Robman LD, Tikellis G, Dimitrov PN, Dowrick A, Guymer RH, McCarty CA.** Iris colour, ethnic origin and progression of age-related macular degeneration. *Clin. Experiment. Ophthalmol* 31: 465-469, 2003.

**Noda Y, Mankura M.** Inhibitory effect of antioxidants on hydroxyl radical generation from methylguanidine: an ESR study. *Neurochem. Res* 34: 734-738, 2009.

**Nofsinger JB, Forest SE, Simon JD.** Explanation for the Disparity among Absorption and Action Spectra of Eumelanin. *The Journal of Physical Chemistry B* 103: 11428-11432, 1999a.

**Nofsinger JB, Forest SE, Simon JD.** Explanation for the Disparity among Absorption and Action Spectra of Eumelanin. *The Journal of Physical Chemistry B* 103: 11428-11432, 1999b.

**Nofsinger JB, Liu Y, Simon JD.** Aggregation of eumelanin mitigates photogeneration of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med* 32: 720-730, 2002.

**Okazaki M, Kuwata K, Miki Y, Shiga S, Shiga T.** Electron spin relaxation of synthetic melanin and melanin-containing human tissues as studied by electron spin echo and electron spin resonance. *Arch. Biochem. Biophys* 242: 197-205, 1985.

**Orlow SJ.** Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J. Invest. Dermatol* 105: 3-7, 1995.

**Pilas B, Sarna T, Kalyanaraman B, Swartz HM.** The effect of melanin on iron associated decomposition of hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med* 4: 285-293, 1988.

Potts AM, Au PC. The affinity of melanin for inorganic ions. *Exp. Eye Res* 22: 487-491, 1976.

Prota G. *Melanins and Melanogenesis*. New York: Academic Press, 1992.

Raposo G, Marks MS. The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic* 3: 237-248, 2002.

Reszka K, Eldred GE, Wang R, Chignell C, Dillon J. THE PHOTOCHEMISTRY OF HUMAN RETINAL LIPOFUSCIN AS STUDIED BY EPR. *Photochemistry and Photobiology* 62: 1005-1008, 1995.

Roberts JE, Wishart JF, Martinez L, Chignell CF. Photochemical studies on xanthurenic acid. *Photochem. Photobiol* 72: 467-471, 2000.

Rozanowska M, Pawlak A, Rozanowski B, Skumatz C, Zareba M, Boulton ME, Burke JM, Sarna T, Simon JD. Age-Related Changes in the Photoreactivity of Retinal Lipofuscin Granules: Role of Chloroform-Insoluble Components. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 1052-1060, 2004.

Rózanowska M, Jarvis-Evans J, Korytowski W, Boulton ME, Burke JM, Sarna T. Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species. *J Biol Chem* 270: 18825-30, 1995.

Rózanowska M, Sarna T, Land EJ, Truscott TG. Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radic. Biol. Med* 26: 518-525, 1999.

Rózanowska M, Wessels J, Boulton M, Burke JM, Rodgers MA, Truscott TG, Sarna T. Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media. *Free Radic Biol Med* 24: 1107-12, 1998.

Rózanowska M. Badania fotoreaktywności in vitro komórek nabłonka upigmentowanego siatkówki. UJ. 1998.

Rózanowska M, Korytowski W, Rózanowski B, Skumatz C, Boulton ME, Burke JM, Sarna T. Photoreactivity of aged human RPE melanosomes: a comparison with lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2088-96, 2002.

Rózanowska M, Sarna T. Light-induced damage to the retina: role of rhodopsin chromophore revisited. *Photochem. Photobiol* 81: 1305-1330, 2005.

Rózanowski B, Burke JM, Boulton ME, Sarna T, Rózanowska M. Human RPE melanosomes protect from photosensitized and iron-mediated oxidation but become pro-oxidant in the presence of iron upon photodegradation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 49: 2838-2847, 2008a.

Rózanowski B, Cuenco J, Davies S, Shamsi FA, Zadło A, Dayhaw-Barker P, Rózanowska M, Sarna T, Boulton ME. The phototoxicity of aged human retinal melanosomes. *Photochem. Photobiol* 84: 650-657, 2008b.

Sarangarajan R, Apte SP. Melanin aggregation and polymerization: possible implications

in age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res* 37: 136-141, 2005.

Sarewicz M. *Badanie oddziaływania cytochromu c z kompleksem cytochromu bc1 metodą elektronowego paramagnetycznego paramagnetycznego*. praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 2008.

Sarna T. Properties and function of the ocular melanin--a photobiophysical view. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol* 12: 215-258, 1992.

Sarna T, Duleba A, Korytowski W, Swartz HM. Interaction of melanin with oxygen. *Arch Biochem Biophys*. 200: 140-8, 1980a.

Sarna T, Froncisz W, Hyde JS. Cu<sup>2+</sup> probe of metal-ion binding sites in melanin using electron paramagnetic resonance spectroscopy. II. Natural melanin. *Arch. Biochem. Biophys.* : 304-313, 1980b.

Sarna T, Hyde JS, Swartz HM. Ion-exchange in melanin: an electron spin resonance study with lanthanide probes. *Science* 192: 1132-1134, 1976.

Sarna T, Korytowski W, Pasienkiewicz-Gierula M, Gudowska E. Ion-exchange studies in melanins. W: *Proceedings of the 11th International Pigment Cell Conference, Sendai, 1980*. Tokyo: University of Tokyo Press, 1981, p. 23-29.

Sarna T, Korytowski W, Sealy RC. Nitroxides as redox probes of melanins: dark-induced and photoinduced changes in redox equilibria. *Arch. Biochem. Biophys* 239: 226-233, 1985.

Sarna T, Lukiewicz S. Electron spin resonance (ESR) studies on living cells. II. Normal development of amphibians. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)* 9: 193-202, 1971.

Sarna T, Menon IA, Sealy RC. Photoinduced oxygen consumption in melanin systems--II. Action spectra and quantum yields for pheomelanins. *Photochem. Photobiol* 39: 805-809, 1984.

Sarna T, Menon IA, Sealy RC. Photosensitization of melanins: a comparative study. *Photochem. Photobiol* 42: 529-532, 1985.

Sarna T, Pilas B, Land EJ, Truscott TG. Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochim. Biophys. Acta* 883: 162-167, 1986.

Sarna T, Sealy RC. Free radicals from eumelanins: quantum yields and wavelength dependence. *Arch. Biochem. Biophys* 232: 574-578, 1984.

Sarna T, Swartz HM. Identification and characterization of melanin in tissues and body fluids. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)* 16: 275-286, 1978.

Sarna T, Swartz HM. Interaction of melanin with oxygen (and related species). W: *Atmospheric Oxidation and Antioxidants*. Amsterdam: Elsevier, 1993, p. 129-169.

Sarna T, Swartz HM. W: *The pigmentary system*. Wiley-Blackwell, 2006, p. 311-341.

Sarna T, Burke JM, Korytowski W, Rózanowska M, Skumatz CMB, Zareba A, Zareba M.

Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. *Exp Eye Res* 76: 89-98, 2003.

Schmidt SY, Peisch RD. Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. Regional variation and age-related reduction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 27: 1063-1067, 1986.

Seagle BL, Gasyna EM, Mieler WF, Norris JR. Photoprotection of human retinal pigment epithelium cells against blue light-induced apoptosis by melanin free radicals from *Sepia officinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103: 16644-16648, 2006.

Seagle BL, Rezai KA, Kobori Y, Gasyna EM, Rezaei KA, Norris JR. Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 8978-8983, 2005.

Sealy RC, Felix CC, Hyde JS, Swartz HM. Structure and reactivity of melanins: influence of free radicals and metal ions. W: *Free Radicals in Biology*. New York: Academic Press, 1980, p. 209-259.

Sealy RC, Hyde JS, Felix CC, Menon IA, Protá G. Eumelanins and pheomelanins: characterization by electron spin resonance spectroscopy. *Science* 217: 545-7, 1982.

Sealy RC, Sarna T, Wanner EJ, Reszka K. Photosensitization of melanin: an electron spin resonance study of sensitized radical production and oxygen consumption. *Photochem. Photobiol* 40: 453-459, 1984.

Shima T, Sarna T, Swartz HM, Stroppolo A, Gerbasi R, Zecca L. Binding of iron to neuromelanin of human substantia nigra and synthetic melanin: an electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Free Radic. Biol. Med* 23: 110-119, 1997.

Simon JD, Hong L, Peles DN. Insights into melanosomes and melanin from some interesting spatial and temporal properties. *J Phys Chem B* 112: 13201-13217, 2008.

Smith-Thomas L, Richardson P, Thody AJ, Graham A, Palmer I, Flemming L, Parsons MA, Rennie IG, MacNeil S. Human ocular melanocytes and retinal pigment epithelial cells differ in their melanogenic properties in vivo and in vitro. *Curr. Eye Res* 15: 1079-1091, 1996.

Sotomatsu A, Tanaka M, Hirai S. Synthetic melanin and ferric ions promote superoxide anion-mediated lipid peroxidation. *FEBS Lett* 342: 105-108, 1994.

Sparrow JR, Boulton M. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp Eye Res* 80: 595-606, 2005.

Sparrow JR, Kim SR, Cuervo AM, Bandhyopadhyayand U. A2E, a pigment of RPE lipofuscin, is generated from the precursor, A2PE by a lysosomal enzyme activity. *Adv. Exp. Med. Biol* 613: 393-398, 2008.

Steinberg RH. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol* 60: 327-346, 1985.

Stepień K, Dzierzega-Leczna A, Tam I. [The role of neuromelanin in Parkinson's

disease--new concepts]. *Wiad. Lek* 60: 563-569, 2007.

**Strauss O.** The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev* 85: 845-881, 2005.

**Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Ng TF, Zamiri P.** Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res* 42: 487-495, 2002.

**Sundelin S, Wihlmark U, Nilsson SE, Brunk UT.** Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells reduces their phagocytic capacity. *Curr. Eye Res* 17: 851-857, 1998.

**Swartz HM, Sarna T, Zecca L.** Modulation by neuromelanin of the availability and reactivity of metal ions. *Ann. Neurol* 32 Suppl: S69-75, 1992.

**Thompson A, Land EJ, Chedekel MR, Subbarao KV, Truscott TG.** A pulse radiolysis investigation of the oxidation of the melanin precursors 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) and the cysteinyl dopas. *Biochim. Biophys. Acta* 843: 49-57, 1985.

**Totan Y, Yağci R, Bardak Y, Ozyurt H, Kendir F, Yilmaz G, Sahin S, Sahin Tiğ U.** Oxidative macromolecular damage in age-related macular degeneration. *Curr. Eye Res* 34: 1089-1093, 2009.

**Vollrath D, Feng W, Duncan JL, Yasumura D, D'Cruz PM, Chappelow A, Matthes MT, Kay MA, LaVail MM.** Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98: 12584-12589, 2001.

**Wang Z, Dillon J, Gaillard ER.** Antioxidant properties of melanin in retinal pigment epithelial cells. *Photochem. Photobiol* 82: 474-479, 2006.

**Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.** Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol* 68: 251-306, 1980.

**Ye T, Simon JD, Sarna T.** Ultrafast energy transfer from bound tetra(4-N,N,N,N-trimethylanilinium)porphyrin to synthetic dopa and cysteinyl dopa melanins. *Photochem. Photobiol* 77: 1-4, 2003.

**Zadlo A, Burke JM, Sarna T.** Effect of untreated and photobleached bovine RPE melanosomes on the photoinduced peroxidation of lipids. *Photochem. Photobiol. Sci* 8: 830-837, 2009.

**Zadlo A, Rozanowska MB, Burke JM, Sarna TJ.** Photobleaching of retinal pigment epithelium melanosomes reduces their ability to inhibit iron-induced peroxidation of lipids. *Pigment Cell Res* 20: 52-60, 2007.

**Zajac GW, Gallas JM, Cheng J, Eisner M, Moss SC, Alvarado-Swaisgood AE.** The fundamental unit of synthetic melanin: a verification by tunneling microscopy of X-ray scattering results. *Biochim. Biophys. Acta* 1199: 271-278, 1994.

**Zareba M, Bober A, Korytowski W, Zecca L, Sarna T.** The effect of a synthetic neuromelanin on yield of free hydroxyl radicals generated in model systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1271: 343-348, 1995.

Zareba M, Raciti MW, Henry MM, Sarna T, Burke JM. Oxidative stress in ARPE-19 cultures: do melanosomes confer cytoprotection? *Free Radic. Biol. Med* 40: 87-100, 2006a.

Zareba M, Szewczyk G, Sarna T, Hong L, Simon JD, Henry MM, Burke JM. Effects of photodegradation on the physical and antioxidant properties of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium. *Photochem. Photobiol* 82: 1024-1029, 2006b.

Zecca L, Gallorini M, Schünemann V, Trautwein AX, Gerlach M, Riederer P, Vezzoni P, Tampellini D. Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J. Neurochem* 76: 1766-1773, 2001.

Zecca L, Swartz HM. Total and paramagnetic metals in human substantia nigra and its neuromelanin. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 5: 203-213, 1993.

Zecca L, Casella L, Albertini A, Bellei C, Zucca FA, Engelen M, Zadlo A, Szewczyk G, Zareba M, Sarna T. Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. *J Neurochem* 106: 1866-75, 2008.

Zecca L, Stroppolo A, Gatti A, Tampellini D, Toscani M, Gallorini M, Giaveri G, Arosio P, Santambrogio P, Fariello RG, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Hornykiewicz O, Zucca FA. The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101: 9843-9848, 2004.

Zecca L, Wilms H, Geick S, Claasen J, Brandenburg L, Holzknecht C, Panizza ML, Zucca FA, Deuschl G, Sievers J, Lucius R. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 116: 47-55, 2008.

Żądło A. *Wpływ fotodegradacji melanosomów z nabłonka upigmentowanego siatkówki na ich właściwości przeciwutleniające*. Kraków: praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński, 2009.