



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Autoreferat

**Akumulacja i fotoreaktywność produktów utlenienia wielonienasyconych lipidów w
siatkówce i błonie Brucha.**

dr Anna Pawlak

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, kwiecień 2019

1. Imię i nazwisko: Anna Pawlak

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania, tytułu rozprawy doktorskiej i nazwisk osób, które pełniły funkcje promotora i recenzentów

2a. Stopień naukowy doktora

Data nadania stopnia naukowego doktora: 30.03.2004, Rada Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Dziedzina i dyscyplina nadanego stopnia: nauki biologiczne, biofizyka

Promotor: Prof. dr hab. Tadeusz Sarna

Recenzenci: Prof. dr hab. Janusz Sławiński; Dr hab. Witold Korytowski

Tytuł rozprawy doktorskiej: Analiza fotoreaktywności wybranych składników lipofuscyny ocznej.

2b. Tytuł zawodowy magistra

Data nadania tytułu zawodowego magistra: 27.06.1997, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Kierunek: Chemia ogólna, specjalność: chemia biologiczna

Promotor: Prof. dr hab. Tadeusz Sarna

Recenzent: Prof. dr hab. Leonard Proniewicz

Tytuł pracy magisterskiej: Badania fotoreaktywności syntetycznych modeli lipofuscyny ocznej

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Obecnie (od 01.02.12) - adiunkt, Zakład Biofizyki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

01.01.10-31.01.12 – staż podoktorski, Biophysical Laboratory, Division of Bioengineering and Bioinformatics, Hokkaido University, Sapporo, Japan

01.07.09-31.12.09 - adiunkt, Zakład Biofizyki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska;

01.05.07-30.06.09 – staż podoktorski, Centre for Vision Science, Queen's University Belfast, Belfast, UK

01.10.05-30.04.07 - adiunkt, Zakład Biofizyki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska;

15.02.04-30.09.05 - asystent, Zakład Biofizyki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska;

01.10.97-30.09.98 – pracownik techniczny, Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego, uzyskanego po otrzymaniu stopnia doktora, stanowiącego znaczny wkład w rozwój dyscypliny biofizyka ¹⁾ zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (wg pkt. 1.2 niniejszych *Zasad prowadzenia postępowań habilitacyjnych*)

a) tytuł osiągnięcia naukowego (zgodnie z wnioskiem)

Akumulacja i fotoreaktywność produktów utlenienia wielonienasyconych lipidów w siatkówce i błonie Brucha.

b) wykaz prac naukowych (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, nazwa czasopisma, tom, strony)²⁾ dokumentujących osiągnięcie (osiągnięcia) naukowe, stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego

Cykl publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego obejmuje 4 prace doświadczalne oraz 1 pracę przeglądową (w kolejności daty ich publikacji).

1) **Pawlak Anna M.**; Glenn Josephine V.; Beattie James R.; McGarvey JJ, Stitt AW. (2008) Advanced glycation as a basis for understanding retinal aging and non-invasive risk prediction.

Ann NY Acad. Sci., **1126**: 59-65 (praca przeglądowa)

(IF₂₀₀₈ 2,303; MNiSW 40; liczba cytowań: 17)

2) **Pawlak Anna M.**; Beattie J. Renwick; Glenn Josephine V.; Alan W. Stitt and John J. McGarvey (2008)

Raman spectroscopy of advanced glycation end products (AGEs), possible markers for progressive retinal dysfunction.

J. Raman Spectrosc., **39(11)**: 1635-1642

(IF₂₀₀₈ 3,526; MNiSW 30; liczba cytowań: 11)

3) Beattie J. Renwick; **Pawlak Anna M.**; Boulton Michael E.; Jianye Zhang, Vincent M. Monnier, John J. McGarvey, and Alan W. Stitt (2010)

Multiplex analysis of age-related protein and lipid modifications in human Bruch's membrane.

FASEB J., **24(12)**: 4816-4824

(IF₂₀₁₀ 6,515; MNiSW 40; liczba cytowań: 32)

4) Beattie J. Renwick; **Pawlak AM.**; McGarvey John J. and Stitt AW (2011) Sclera as a Surrogate Marker for Determining AGE-Modifications in Bruch's Membrane Using a Raman Spectroscopy-Based Index of Aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52(3)**: 1593-1598

(IF₂₀₁₁ 3,597, MNiSW 40, liczba cytowań: 10)

5) Koscielniak A, Serafin M, Duda M, Oles T, Zadło A, Broniec A, Berdeaux O, Gregoire S, Bretillon L, Sarna T, **Pawlak A** [✉] (2017)

Oxidation-Induced Increase In Photoreactivity of Bovine Retinal Lipid Extract.

Cell Biochem. Biophys., **75(3-4)**: 443-454

(IF₂₀₁₇ 1,455; MNiSW 25; liczba cytowań: 0)

Podsumowanie:

Sumaryczny IF prac stanowiących podstawę habilitacji: **17,396** (średni IF 3,479)

Sumaryczna punktacja MNiSW: **175**

Liczba cytowań: **70** (dane z marca 2019, wg. bazy *Web of Science*)

c) omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników, wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Proces starzenia się dotyczy wszystkich komórek, tkanek i organów, jednak w przypadku organu wzroku – oka, wiąże się nie tylko ze znaczącym wzrostem ryzyka rozwoju chorób degeneracyjnych, ale także groźbą utraty wzroku, co ma ogromne znaczenie wobec problemu starzenia się społeczeństw [1, 2]. Jedną z głównych przyczyn utraty wzroku w krajach wysoko rozwiniętych jest związana z wiekiem degeneracja plamki żółtej (AMD, ang. age-related macular degeneration). Szacuje się, że w Europie AMD dotyka nawet do 17 % osób powyżej 85 roku życia [3], a w Polsce liczba chorych sięga 1,3-1,5 miliona osób, z których co najmniej 10% jest zagrożonych całkowitą utratą wzroku [4]. Chociaż etiologia i patofizjologia AMD są bardzo złożone, największym czynnikiem ryzyka pozostaje wiek [5].

Wyjaśnienie procesów molekularnych, które towarzyszą starzeniu się siatkówki oraz/lub pojawieniu się i rozwojowi AMD jest bardzo istotne dla opracowania skutecznych strategii zapobiegania/spowalniania rozwoju tego schorzenia oraz, chociaż w pośredni sposób, może przyczynić się do poprawienia jakości życia najstarszych osób, szczególnie tych zagrożonych utratą wzroku. Pierwotnym miejscem zmian patologicznych we wczesnych stadiach AMD są komórki nabłonka upigmentowanego siatkówki (RPE, ang. retinal pigment epithelium) oraz błona Brucha (BM, ang. Bruch's membrane).

RPE to pojedyncza warstwa postmitotycznych, długożyjących komórek, oddzielonych od naczyńówki cienką, wyspecjalizowaną błoną podstawną – błoną Brucha, z którą tworzą kompleks RPE/BM będący integralną częścią bariery krew-siatkówka. Ponieważ zmiany starcze są najbardziej widoczne w komórkach długożyjących, kompleks RPE/BM jest miejscem bardzo wyraźnej manifestacji procesu starzenia się, szczególnie w obszarze makularnym charakteryzującym się największą gęstością fotoreceptorów [6]. W przypadku RPE zmiany te obejmują m.in. spadek gęstości komórek, spadek poziomu melaniny i innych przeciwutleniaczy, obniżenie wydajności degradacji złuszczonych POS i akumulację pigmentu starczego – lipofuscyny oraz wzrost poziomu oksydacyjnie zmodyfikowanych białek [7]. Zmiany te zakłócają prawidłowe funkcjonowanie komórek RPE, co może prowadzić w dłuższym czasie do degeneracji fotoreceptorów i zaburzeń w procesie widzenia. Powszechnie przyjmuje się, że u podstaw rozwoju AMD leżą uszkodzenia komórek siatkówki wywołane przez stres oksydacyjny [6].

Siatkówka jest częścią centralnego układu nerwowego i, tak jak inne jego elementy, charakteryzuje się wysoką zawartością lipidów. Lipidy stanowią 20-30% suchej masy siatkówki, z których ponad 80% to fosfolipidy (PL, ang. phospholipids) [8]. Jedna trzecia PL zawiera reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFAs, ang. polyunsaturated fatty acids). Do najobficiej występujących PUFAs w siatkówce należą kwas dokozaheksaenowy (22:6n-3) i kwas arachidonowy (20:4n-6), których poziom sięga, odpowiednio, 21 i 10% wszystkich reszt kwasów tłuszczowych [9, 10]. Obecność tak dużych ilości PUFAs w komórkach siatkówki, a szczególnie w zewnętrznych segmentach fotoreceptorów (POS, ang. photoreceptor outer segments), jest niezbędna dla utrzymania wysokiej płynności błon dysków w POS, od której zależy wydajność transdukcji sygnału wzrokowego [11, 12]. Jednak obecność wiązań nienasyconych sprawia, że PUFAs są bardzo

wrażliwe na utlenienie [13]. Ze względu na wysokie tempo metabolizmu, siatkówka wykazuje także bardzo duże zapotrzebowanie na tlen i glukozę [14].

Wszystkie te czynniki: duża zawartość PUFAs w komórkach siatkówki, wysokie stężenie tlenu i glukozy, ekspozycja na intensywne światło oraz obecność endogennych sensybilizatorów sprawia, że siatkówka jest miejscem chronicznego stresu oksydacyjnego [15, 16].

Lipofuscyna oczna

Wśród endogennych sensybilizatorów, szczególną uwagę badaczy od lat przykuwa lipofuscyna (Lf) – pigment starczy, który akumuluje się z wiekiem w komórkach RPE, zajmując nawet do 20% ich objętości u osób powyżej 80 roku życia [17]. Substratem w procesie powstawania Lf w komórkach RPE są produkty niepełnej degradacji POS [18]. Codzienne złuszczenie szczytowych fragmentów POS, fagocytowanych następnie przez komórki RPE, jest jednym z najbardziej wydajnych mechanizmów ochronnych w siatkówce [19]. Jednak wydajność procesu fagocytowania i degradowania POS przez komórki RPE spada z wiekiem, co prowadzi do akumulacji niestrawionego materiału we wtórnych lizosomach [18]. Lf to heterogeniczny materiał, charakteryzujący się żółto-pomarańczową fluorescencją, który wykazuje także wysoką fotoreaktywność po naświetlaniu światłem niebieskim [20, 21]. Co więcej, lipidy obecne w ziarnach LF są jednocześnie substratem w reakcji fotochemicznej indukowanej przez fotowzbudzoną LF i w reakcji tej ulegają utlenieniu [20]. Skład i własności Lf izolowanej z ludzkich komórek RPE, zmieniają się wraz z wiekiem donorów, m.in. rośnie stosunek białek do lipidów w ziarnach Lf, spada poziom PUFAs, zmieniają się własności absorpcyjne i fluorescencyjne [22, 23]. Uważa się, że ze względu na obserwowaną fotoreaktywność i fototoksyczność, Lf może pośredniczyć w fotouszkodzeniu komórek RPE poprzedzającym rozwój AMD [24].

Po wieloletnich badaniach mających na celu identyfikację głównych chromoforów odpowiedzialnych za fotoreaktywność Lf, zainteresowanie badaczy skierowało się na pochodne retinoidów obecnych w ziarnach Lf, przede wszystkim na produkt reakcji dwóch cząsteczek całkowicie *trans* retinalu z etanolaminą – A2E (ang. N-retinylidene-N-retinylethanolamine) [25].

Badania fotoreaktywności wybranych składników Lf: A2E i fosfolipidu 1-palmitoilo-2-dokozaheksaenylo fosfatydylocholiny ((16:0)(22:6)PC) stanowiły podstawę mojej pracy doktorskiej. Wyniki uzyskanych badań skłoniły mnie do zwrócenia większej uwagi na wielonienasycone lipidy wchodzące w skład siatkówki, obecne w największym stężeniu w błonach dysków POS, które stanowią z kolei substrat dla Lf.

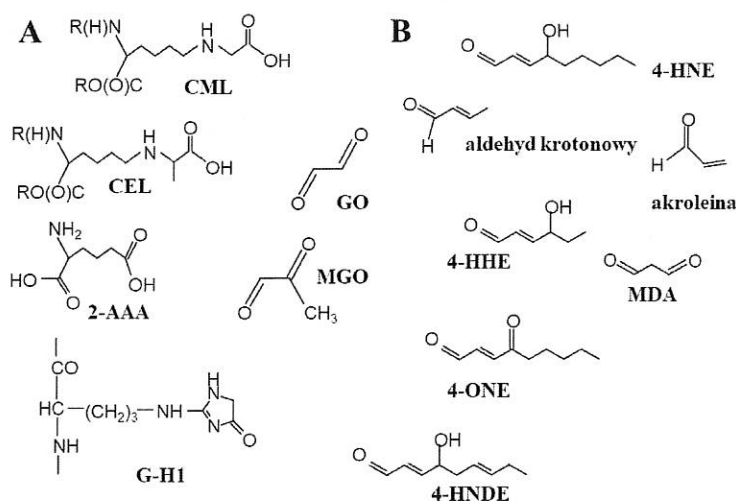
Badania, które prowadziłam od 2004 roku, po obronie pracy doktorskiej, w większości dotyczyły różnych aspektów funkcjonowania lipidów oraz produktów ich utlenienia w siatkówce i RPE/BM: ich własności strukturalnych i przeciwutleniających, reaktywności i fotoreaktywności oraz zmian wywołanych przez proces starzenia.

W jednej z pierwszych prac opublikowanych po obronie doktoratu, której jestem współautorem, wykazano, że fotoreaktywność Lf izolowanej z ludzkich RPE wzrasta wraz z wiekiem donorów. Ponadto stwierdzono, że dotyczy to obu badanych frakcji Lf: rozpuszczalnej (ChS) jak i nierozpuszczalnej w chloroformie (ChNS), zatem, w przypadku frakcji ChS, zawierającej głównie lipidowe składniki Lf [26]. Wyniki tej pracy utwierdziły

mnie w przekonaniu, że obrałam właściwy kierunek badań, a rola lipidów w (foto)uszkodzeniu siatkówki może mieć znacznie większe znaczenie niż dotychczas przypuszczano.

Późne produkty lipooksydacji (ALEs) i późnymi produkty glikacji (AGEs)

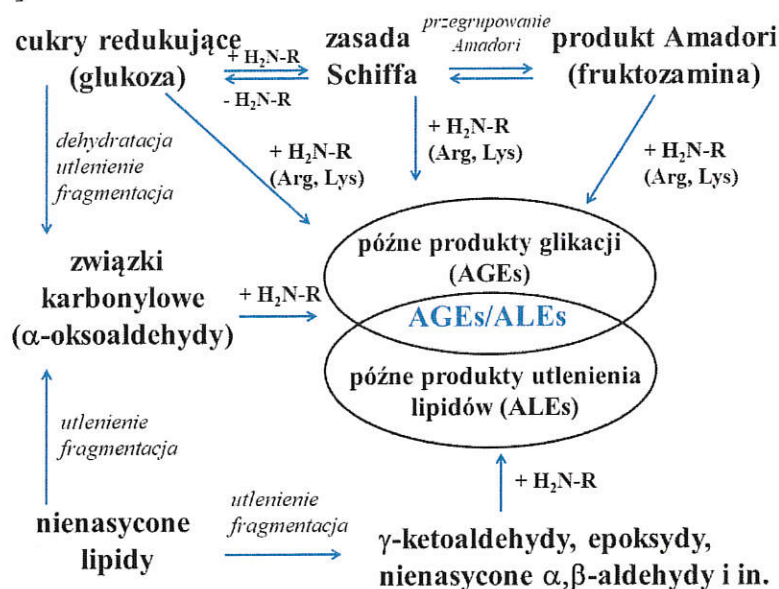
Wielokrotnie pokazano, że w czasie utleniania PUFAs powstają bardzo reaktywne produkty takie jak nienasycone γ -ketoaldehydy, α,β -hydroksyaldehydy czy epoksydy. Związki te w wyniku reakcji z grupami nukleofilowymi białek i DNA indukują ich nieenzymatyczne, nieodwracalne modyfikacje tworząc addukty nazywane ogólnie późnymi produktami lipooksydacji (ALEs, ang. advanced lipid oxidation end-products) [27]. Część końcowych produktów utleniania PUFA i rodzaj generowanych przez nie ALEs jest tożsamy z późnymi produktami glikacji (AGEs, ang. advanced glycation end-products) (Rysunek 1). Dzieje się tak dlatego, że zarówno AGEs jak i ALEs powstają w wyniku fragmentacji i/lub utlenienia często bardzo podobnych produktów przejściowych różnych reakcji i/lub procesów metabolicznych, takich jak związki karbonylowe (Schemat 1) [28, 29].



Rys. 1 Wzory strukturalne wybranych późnych produktów glikacji (AGEs) (A) oraz późnych produktów lipooksydacji (ALEs) (B); CML – karboksymetylizyna, CEL – karboksyetylizyna, 2-AAA – kwas 2-amino-adypinowy, G-HI – N5-(5-hydro-4-imidazol-2-yl)-L-ornityny, 4-HNE – 4-hydroksynonenal, 4-HHE – 4-hydroksyheksenal, MDA – dialdehyd malonowy, 4-ONE – 4-okso-2-nonenal, 4-HNDE – 4-hydroksy-2,6-nonadienal, GO – glioksal, MGO – metyloglioksal. GO i MGO powstają zarówno na drodze glikacji jak i peroksydacji lipidów (Pawlak AM et al., *J Raman Spectrosc.* 2008, 39: 1635-1642, zmodyfikowany)

AGEs powstają w wyniku oddziaływania grup karbonylowych redukujących cukrów (glukozy, fruktozy i in.), kwasu askorbinowego i jego pochodnych z ϵ -resztami aminowymi aminokwasów (lizyny, argininy). Wzrost poziomu białek zmodyfikowanych przez AGEs towarzyszy cukrzycy i procesowi starzenia [30], co jest nie tylko skutkiem, ale też inicjatorem kolejnych, często o charakterze patologicznym, zmian zależnych od wieku: powstawania wiązań krzyżowych, spadku aktywności enzymatycznej, zaburzeń oddziaływania białek z receptorami czy zaburzeń ekspresji czynników wzrostu [31]. Uważa się, że elementem, który pośredniczy w zaburzeniu funkcjonowania białek i nieprawidłowej odpowiedzi komórek

przez AGEs, jest receptor dla AGEs – RAGE (ang. receptor for advanced glycation endproducts) [32].



Schemat 1. Podstawowe szlaki powstawania późnych produktów glikacji (AGEs) oraz późnych produktów lipooksydacji (ALEs) w reakcji Maillarda i w procesie peroksydacji lipidów (Pawlak AM et al., *J Raman Spectrosc.* 2008, 39: 1635-1642, zmodyfikowany)

Jak już wspomniano, ALEs i AGEs akumulują się przede wszystkim w długożyjących, postmitotycznych komórkach oraz białkach macierzy zewnątrzkomórkowej, a zatem, akumulują się także w siatkówce, szczególnie w komórkach nabłonka upigmentowanego (RPE) oraz błonie Brucha i znacząco zaburzają funkcjonowanie kompleksu RPE/MB [33, 34]. Nagromadzenie takich modyfikacji wydaje się mieć duży udział w indukowaniu zmian patologicznych i procesu zapalnego w obrębie RPE/BM, co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju AMD [35, 36].

W 2002 roku wykazano, że poziom ALEs, szczególnie z grupy adduktów typu 2-(ω-karboksyalkilo)pyrroli powstających w wyniku utlenienia PUFAs, jest znacznie wyższy w zewnętrznej siatkówce osób dotkniętych AMD niż osób zdrowych [37]. Sugerowano nawet, że podniesiony poziom tego typu modyfikacji w białkach osocza może służyć za wskaźnik ryzyka wystąpienia AMD [38]. Przede wszystkim jednak po raz pierwszy pokazano, że immunizacja myszy albuminą mysią modyfikowaną carboxyetylpyrrolem (CEP) - produktem utlenienia kwasu dokozaheksaenowego (CEP-MSA, ang. CEP-modified mouse serum albumin) wystarcza do wywołania zmian patologicznych w obszarze siatkówki i kompleksu RPE/BM charakterystycznych dla AMD [39, 40].

Identyfikacji i pomiarów ilościowych ALEs/AGEs można dokonać przy użyciu metod analitycznych (HPLC, GC), spektroskopowych (MS, detekcja fluorescencji) czy immunohistochemicznych [41]. W 2007 roku zupełnie nowe podejście zaproponowała grupa Prof. Stitta wykorzystując konfokalną mikroskopię ramanowską (CRM, ang. confocal raman microscopy) do analizy wybranych AGEs w błonie Brucha [42]. Wyniki zamieszczone w cytowanej pracy zostały uzyskane za pomocą CRM, bardzo dobrze korelowały z wynikami otrzymanymi konwencjonalnymi metodami. Pozwoliło to na wypracowanie modelu

wiązącego proces starzenia się BM z określonymi zmianami w widmie Ramana. Bardzo dobra korelacja zmian spektralnych w widmie ramanowskim ze zmianami starczymi, dawała szansę wykorzystania modelu do przewidywania z dużą dokładnością wieku np. nieznanego dawcy BM. Po dołączeniu do grupy Prof. Stitta, wielokrotnie korzystałam z tego modelu.

W cytowanej pracy wykazano m.in. zależną od wieku akumulację wybranych AGEs w błonie Brucha, przede wszystkim jednak zademonstrowano użyteczność i skuteczność CRM dla analizy zmian zależnych od wieku w próbkach biologicznych.

Spektroskopia Ramana

U podstaw spektroskopii i mikroskopii ramanowskiej leży zjawisko nazywane efektem Ramana polegające na zdolności cząsteczki poddanej promieniowaniu o określonej częstotliwości do nieelastycznego rozpraszania tego promieniowania [43, 44]. W widmie promieniowania rozproszonego pojawiają się fotony o częstotliwości niższej oraz wyższej od częstotliwości fotonów promieniowania padającego (odpowiednio pasma stokesowskie i antystokesowskie). Obecność i intensywność pasm w widmie rozproszenia Ramana zależy od częstotliwości drgań poszczególnych wiązań i symetrii cząsteczki. Z tego względu rejestrowane widmo ramanowskie jest unikatowe dla badanej substancji i na jego podstawie można ją zidentyfikować. Indywidualność widm ramanowskich czyni spektroskopię Ramana bardzo czułą i specyficzną metodą analityczną, która dostarcza – w sposób bezpośredni – szczegółowej informacji o składzie chemicznym i biochemicznym badanych substancji. Wielką zaletą spektroskopii Ramana jest także to, że nie wymaga specjalnego przygotowania próbki do pomiaru, a w czasie samego pomiaru, przy odpowiednio dobranej długości fali i mocy lasera wzbudzającego, próbka nie ulega zniszczeniu [45].

Konfokalna mikroskopia ramanowska (CRM, ang. Confocal Raman Microscopy) dodatkowo umożliwia zbieranie widm ze znacznie wyższą rozdzielczością przestrzenną, jednoczesną identyfikację wielu różnych substancji oraz szczegółowe obrazowanie (2D i 3D) ich rozmieszczenia w „mapowanym” obszarze tkanki lub warstwie komórek [42, 46-48]. Z tego względu spektroskopia i mikroskopia Ramana stanowi doskonałe narzędzie analityczne w badaniach biomedycznych, o wciąż zbyt mało wykorzystywanym potencjale.

Wykorzystanie CRM do identyfikacji AGEs/ALEs i oceny ryzyka rozwoju AMD

W latach 2007-2009 odbyłam mój pierwszy staż podoktorski pracując w grupie Profesora Stitta, Queen's University, Belfast, UK. Zostałam wtedy zaangażowana w realizację projektu „*Raman spectroscopic evaluation of protein modification: a new, noninvasive diagnostic tool for age-related eye*” finansowanego przez Medical Research Council (MRC) (grant# G0600053).

Nadrzędnym celem projektu było wykorzystanie spektralnej i przestrzennej rozdzielczości oferowanej przez CRM do identyfikacji szeregu AGEs/ALEs w wybranych tkankach ocznych oraz badania procesu ich zależnej od wieku akumulacji. Dalekosiężnym celem z kolei było wykorzystanie AGEs/ALEs jako wskaźników procesu starzenia się tkanek ocznych oraz jako czynników służących do oceny ryzyka zwiększonej podatności na rozwój AMD.

Systematyczne badania metodą CRM – zbieranie pojedynczych widm oraz mapowanie określonych obszarów, makularnego i peryferialnego, badanych tkanek miało na celu identyfikację obecnych w nich AGEs/ALEs, ich rozmieszczenia przestrzennego oraz

zależności ich poziomu od wieku dawców. Takie kompleksowe podejście, przy dużej liczbie powtórzeń i dużej ilości badanych tkanek, od wielu dawców, dawało niepowtarzalną szansę na stworzenie nowego sposobu monitorowania procesu starzenia się oka, ale przede wszystkim nowej metody diagnozowania zwiększonego ryzyka czy podatności na rozwój AMD. Dlatego ostatecznym etapem realizacji projektu było zastosowanie metody wypracowanej na tkankach izolowanych *ex vivo* przy użyciu CRM do szybkiego, nieinwazyjnego oszacowania poziomu i rozmieszczenia AGEs/ALEs *in vivo* (np. poprzez mapowanie niewielkiego fragmentu twardówek) i na tej podstawie oceny ryzyka rozwoju AMD. Spektroskopia Ramana była już wykorzystywana do szacowania zawartości i rozkładu przestrzennego ksantofili w oku *in vivo* [49]. CRM jest metodą nieinwazyjną i niedestrukcyjną, a jednocześnie bardzo czułą i specyficzną. dlatego plan wykorzystania jej do ilościowych i jakościowych pomiarów poziomu i rozkładu AGEs/ALEs *in vivo* wydaje się bardzo obiecujący i jak najbardziej realny.

Opisane wyżej zjawiska towarzyszące procesowi starzenia się oka zostały dość szczegółowo omówione w mojej pracy przeglądowej, przygotowanej po rozpoczęciu pracy w grupie Prof. Stitta:

(1) Pawlak Anna M.; Glenn Josephine V.; Beattie James R.; McGarvey JJ, Stitt AW. (2008) Advanced glycation as a basis for understanding retinal aging and non-invasive risk prediction. *Ann NY Acad. Sci.*, **1126**: 59-65

W tej publikacji omówiono już dość dobrze wówczas poznane zmiany starcze manifestowane w obszarze kompleksu RPE/BM oraz ich wpływ na prawidłowe funkcjonowanie siatkówki, a także problem powstawania, akumulacji i udziału późnych produktów glikacji (AGEs) oraz lipooksydacji (ALEs) w indukowaniu w siatkówce zmian o charakterze patologicznym. Ponadto opisano możliwość wykorzystania AGEs/ALEs jako markerów starzenia się oka i wskaźników ryzyka rozwoju AMD przy zastosowaniu konfokalnej mikroskopii ramanowskiej CRM.

Natomiast wyniki uzyskane podczas realizacji projektu zostały opublikowane w trzech kolejnych pracach, które stanowią znaczną część osiągnięcia naukowego habilitanta.

Na początkowym etapie mojej pracy skoncentrowałam się na zarejestrowaniu i zanalizowaniu możliwie największej liczby widm ramanowskich syntetycznych i dostępnych komercyjnie AGEs/ALEs. Skontaktowałam się również z bardzo wieloma badaczami z laboratoriów zajmujących się identyfikacją, charakterystyką oraz syntezą nowych AGEs/ALEs. Dzięki uprzejmości tych badaczy otrzymałam wiele niedostępnych na rynku końcowych produktów glikacji i peroksydacji lipidów. Zebranie widm AGEs/ALEs miało na celu stworzenie unikatowej „biblioteki” ramanowskiej widm tych produktów, służącej na kolejnych etapach badań do wyodrębnienia pasm charakterystycznych dla AGEs/ALEs w widmach wybranych tkanek izolowanych z oczu ludzkich od dawców w różnym wieku (m.in. siatkówek, błon Brucha, twardówek). Identyfikacja AGEs i/lub ALEs w tkankach ocznych pozwoliłaby na ustalenie, czy istnieje korelacja pomiędzy poziomem zidentyfikowanych adduktów a wiekiem dawcy badanej tkanki.

Pierwszy krok w kierunku budowy obszernej ramanowskiej biblioteki spektralnej wykonałam szczegółowo analizując widma kilku wybranych AGEs i ALEs oraz zewnętrznych

segmentów fotoreceptorów izolowanych wyizolowanych z siatkówek bydlęcych i, *ex vivo*, poddanych procesowi utlenienia. Wyniki tych eksperymentów przedstawiono w pracy:

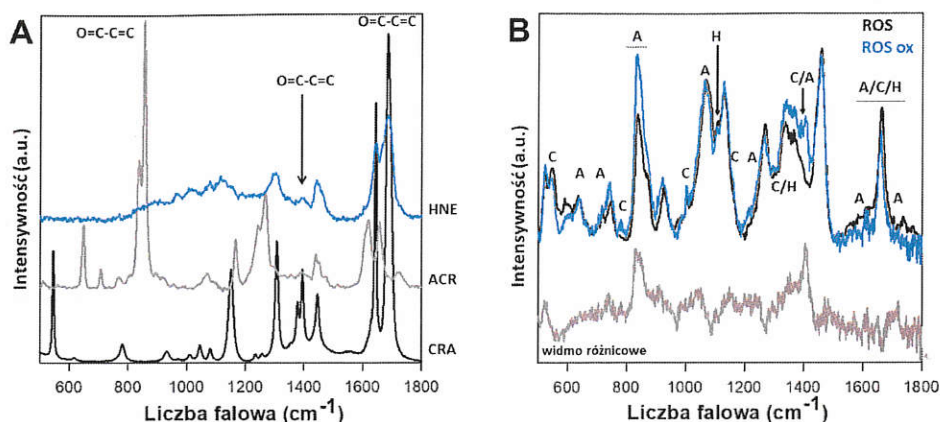
(2) **Pawlak Anna M.**; Beattie J. Renwick; Glenn Josephine V.; Alan W. Stitt and John J. McGarvey (2008), Raman spectroscopy of advanced glycation end products (AGEs), possible markers for progressive retinal dysfunction. *J. Raman Spectrosc.*, **39(11)**: 1635-1642

Główne cele naukowe pracy:

- szczegółowa analiza widm Ramana wybranych przedstawicieli AGEs i ALEs
- rejestracja widm natywnych i utlenionych zewnętrznych segmentów fotoreceptorów (POS) wyizolowanych z siatkówek bydlęcych oraz analiza zmian indukowanych procesem utlenienia
- podjęcie próby identyfikacji wybranych ALEs w utlenionych POS za pomocą spektroskopii ramanowskiej

W pracy bardzo dokładnie scharakteryzowano widma Ramana wybranych AGEs: karboksyetylizyny (CEL), karboksymetylizyny (CML), kwasu 2-aminoadypinowego (AAA) oraz ALEs: 4-hydroksynonenalu (HNE), akroleiny (ACR) i aldehydu krotonowego (CRA). Szczegółowo opisano charakterystyczne pasma i różnice pomiędzy bardzo podobnymi strukturalnie związkami w poszczególnych grupach [29]. W widmach Ramana badanych związków z grupy ALEs widoczny jest motyw charakterystyczny dla α,β -nienasyconych aldehydów, w których koniugacja grupy karbonylowej i wiązania podwójnego indukuje podwójne pasma przy 1644 i 1684 cm^{-1} w przypadku 4-HNE, 1642 i 1683 cm^{-1} oraz 1656 i 1718 cm^{-1} w widmach, odpowiednio, akroleiny i aldehydu krotonowego (Rysunek 2A). Aldehyd krotonowy od akroleiny, podobnie jak to jest w przypadku CEL i CML, różni jedynie obecność grupy metylowej. W widmie CRA, udział grupy metylowej wyraża się w postaci dubletu pasm przy 1377 i 1394 cm^{-1} . Widmo 4-HNE ma cechy widma typowego dla krótkiego łańcucha węglowodorowego z jednej strony i obecnym, typowym dla produktów peroksydacji lipidów, strukturalnym motywem grupy karbonylowej skoniugowanej z wiązaniem nienasyconym z drugiej (pasma typowe dla $\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$ między 1600-1700 cm^{-1}) (Rys. 2A). Ponadto, zarejestrowano i zanalizowano widma ramanowskie zewnętrznych segmentów fotoreceptorów (POS) wyizolowanych z siatkówek bydlęcych i poddanych utlenieniu na drodze autooksydacji w kontrolowanych warunkach. W widmie POS, tak jak w widmach innych materiałów bogatych w lipidy czy czystych lipidów, są obecne typowe dla tego typu próbek pasma: przy 1060 i 1130 cm^{-1} pochodzące z drgań rozciągających *trans/gauche* C-C w łańcuchu alkilowym czy intensywne pasma przy 1270 i 1662 cm^{-1} charakterystyczne dla wiązań nienasyconych (Rys. 2B).

Analiza widm ramanowskich natywnych i utlenionych POS wskazuje na indukowany procesem utlenienia wzrost intensywności pasm typowych dla produktów utlenienia lipidów (w tym α,β -nienasyconych aldehydów) przy jednoczesnym spadku intensywności pasm w obszarze 1650-1680 cm^{-1} wskazującym na spadek poziomu nienasycenia lipidów w badanej próbce. Porównanie widma Ramana POSox z widmami znanych ALEs, pozwoliło na identyfikację oraz potwierdzenie obecności opisywanych w pracy ALEs (głównie CRA i ACR) w utlenionych POS.



Rys. 2 Widma Ramana wybranych ALEs: 4-hydroksynonenalu (HNE), akroleiny (ACR) i aldehydu krotonowego (CRA) (A). Zaznaczono pasma typowe dla strukturalnego motywu skoniugowanej grupy karbonylowej z wiązaniem nienasyconym ($O=C-C=C$).

Widma natywnych zewnętrznych segmentów fotoreceptorów wyizolowanych z siatkówek bydłych (POS) oraz po poddaniu procesowi utlenienia na drodze autooksydacji w ciemności (POS ox) (B). Literkami A/C/H zaznaczono pasma typowe dla akroleiny, aldehydu krotonowego oraz 4-hydroksynonenalu. (Pawlak AM et al., *J Raman Spectrosc.* 2008, 39: 1635-1642)

Podsumowanie:

Wykazano, że wysoka rozdzielczość, czułość i specyficzność CRM pozwala na identyfikację i rozróżnienie, nawet podobnych strukturalnie, związków oraz potwierdzenie ich obecności w bardzo złożonym materiale biologicznym.

Zademonstrowano użyteczność CRM do monitorowania zmian indukowanych procesem utlenienia takich jak powstawanie i akumulacja ALEs czy rozpad związków wrażliwych na utlenienie w złożonym materiale biologicznym.

Błona Brucha (BM), wyizolowana i opisana po raz pierwszy w 1844 roku przez niemieckiego uczonego Carla LW Brucha w jego pracy doktorskiej, stanowi szczególny przypadek błony podstawnej [50]. BM to cienka, pięciowarstwowa błona leżąca pomiędzy RPE a naczyniówką i wraz z RPE stanowiąca część bariery krew-siatkówka [50]. Ponieważ BM, ze względu na dużą zawartość glikanów, jest obdarzona ujemnym ładunkiem [51], kontroluje przepływ jonów pomiędzy siatkówką a naczyniówką. Chociaż tak cienka, BM stanowi bardzo ważny element prawidłowego funkcjonowania siatkówki.

Grubość starzejącej się błony Brucha wzrasta z wiekiem nawet 3-krotnie, a ona sama traci swoją elastyczność i przepuszczalność dla wody i jonów. Częściowo wynika to z faktu gromadzenia się w BM druzów i złogów o różnym pochodzeniu i składzie [52]. Druzy i niektóre złogi akumulujące się w BM zawierają neutralne lipidy, głównie wolny (Ch) i zestryfikowany cholesterol (ECh), ale także produkt metabolizmu i/lub utlenienia Ch -7-ketocholesterol, któremu jako czynnikowi prozapalnemu przypisuje się udział w AMD. Obecność druzów i BLM, ich wielkość i lokalizacja stanowią ważny czynnik oceny ryzyka rozwoju AMD i czynnik diagnostyczny na wczesnych etapach schorzenia. Wykazano także zależną od wieku akumulację AGEs i ALEs w BM, przy czym ich zwiększony poziom charakteryzował BM izolowaną od dawców ze zdiagnozowanym wczesnym etapem AMD [33, 53]. Jednoznaczna identyfikacja i ilościowe oznaczanie AGEs/ALEs w materiale biologicznym wymagają zastosowania inwazyjnych metod, dlatego kolejnym krokiem w

realizacji projektu było podjęcie systematycznych badań błon Brucha izolowanych z oczu ludzkich od dawców w różnym wieku przy wykorzystaniu, jak wcześniej wykazano nieinwazyjnej i niedestrukcyjnej metody CRM. Wyniki tej części badań zostały opublikowane w pracy:

(3) Beattie J. Renwick; **Pawlak Anna M.**; Boulton Michael E.; Jianye Zhang, Vincent M. Monnier, John J. McGarvey, and Alan W. Stitt (2010) Multiplex analysis of age-related protein and lipid modifications in human Bruch's membrane. *FASEB J.*, **24**(12): 4816-4824

Główne cele naukowe pracy:

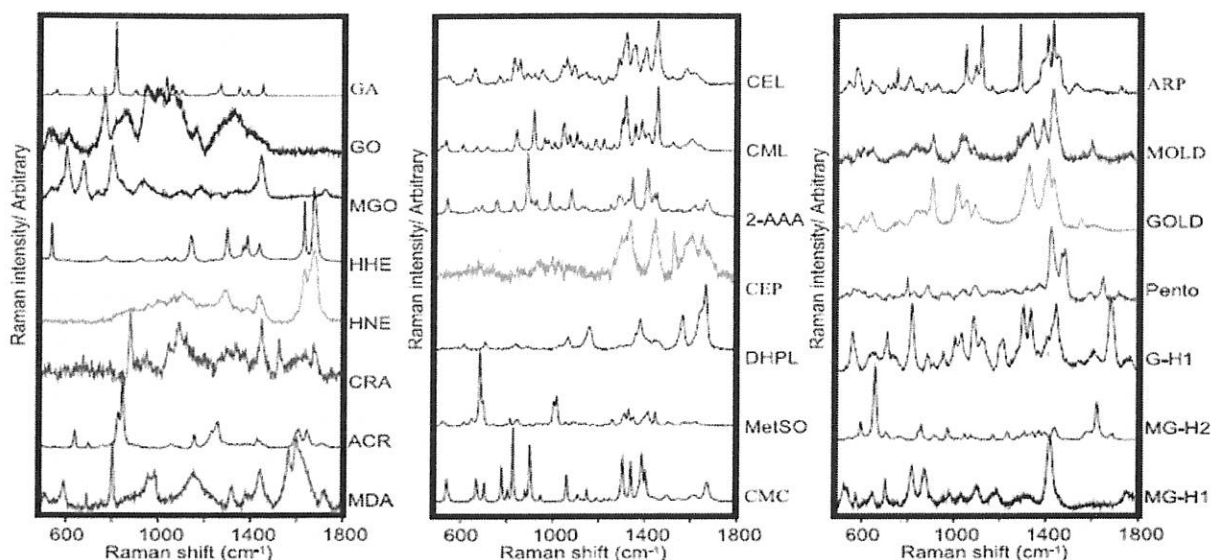
- przygotowanie możliwie szerokiej bazy danych widm Ramana AGEs i ALEs
- kompleksowa analiza wywołanych procesem starzenia zmian składników błony Brucha – białek i lipidów
- identyfikacja AGEs/ALEs akumulujących się z wiekiem w BM

Ponieważ zmiany starcze i patologiczne, związane z rozwojem AMD pojawiają się najpierw w obszarze makularnym i okołomakularnym, każda badana BM poddawana była analizie ramanowskiej zarówno w obszarze makularnym jak i peryferyalnym.

Podczas systematycznych pomiarów „mapowano” wybrane regiony BM zbierając od 64 do 400 widm z obszaru o powierzchni co najmniej $256 \mu\text{m}^2$ w części makularnej i peryferyalnej BM (w co najmniej 3 niezależnych powtórzeniach). W obszarze makularnym wybranych BM wykonano także mapy ze znacznie większych powierzchni $3900 \mu\text{m}^2$ zbierając kilkadziesiąt tysięcy widm. Wyniki zebrane z BM podzielonych, ze względu na wiek dawców, na grupy wiekowe zostały uśrednione i poddane analizie metodą PCA (ang. principal component analysis) oraz analizie statystycznej. Metoda PCA pozwala na wyodrębnienie głównych składników biochemicznych złożonego materiału biologicznego. W przypadku badanych BM analiza spektroskopowa ujawniła obecność 60 odrębnych składników, w tym osiem zidentyfikowano jako AGEs i/lub ALEs.

Do analizy widm BM, wyodrębnienia i identyfikacji składników budujących BM (m.in. kolagenu, elastyny, proteoglikanów, lipidów i innych) oraz tych pojawiających i akumulujących się z wiekiem (ECh, AGEs, ALEs) wykorzystano przygotowane wcześniej biblioteki widm Ramana. Na rysunku 3 przedstawiono tylko część ze zgromadzonych widm AGEs i ALEs, których obecność została potwierdzona w różnych tankach ludzkich *in vivo*.

Podział badanego materiału ze względu na wiek dawców, oprócz identyfikacji związków pojawiających i akumulujących się z wiekiem w BM, umożliwił także prześledzenie zmian wywołanych procesem starzenia w poziomie składników, z których zbudowana jest BM. I tak, wykazano, że poziom kolagenu typu I rośnie, a kolagenu III i IV spada w BM z wiekiem. Zanotowano także znacznie podwyższony poziom α -krystaliny w BM od dawców powyżej 80 roku życia. Warto zauważyć, że zwiększona zawartość α -krystaliny w druzach i BM towarzyszy AMD [37, 54]. Równie duże zmiany indukowane procesem starzenia zaobserwowano w obrębie lipidów. Podczas gdy poziom jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA, ang. monounsaturated fatty acids) pozostawał względnie stały niezależnie od wieku dawców, w BM od osób powyżej 80 roku życia zanotowano wzrost zawartości Ch i bardzo duży wzrost poziomu produktów utlenienia PUFAs (Rys. 4).



Rys. 3 Widma Ramana wybranych AGEs/ALEs (produktów przejściowych i końcowych modyfikacji białek) zidentyfikowanych dotychczas w tkankach ludzkich. GA – aldehyd glicerynowy, GO – glioksal, MGO – metyloglioksal, HHE – 4-hydrokseyheksenal, HNE – 4-hydroksynonenal, ACR – akroleina, MDA – dialdehyd malonowy, CEL – karboksyoetyllizyna, CML – karboksymetyllizyna, 2-AAA – kwas 2-aminoadypinowy, CEP – karboksyetylpyrrol, DHPL – dihydropirydyna lizyny, MetSO – sulfotlenek metioniny, CMC – karboksymetylcysteina, ARP – argpirydyna, MOLD – dimer metyloglioksal-lizyna, GOLD – dimer glioksal-lizyna, Pento – pentozydina, G-H1, MG-H2 i MG-H1 – hydroimidazolony, pochodne glioksalu i metyloglioksalu (Beattie JR, Pawlak AM et al, 2010, FASEB J., 24(12): 4816-4824)

Ponadto wykazano w BM akumulację modyfikacji indukowanych AGEs oraz ALEs, w tym CEP – produkt utlenienia kwasu dokozaheksaenowego (22:6n-3), obecnego w dużym stężeniu w POS (Rys. 4).

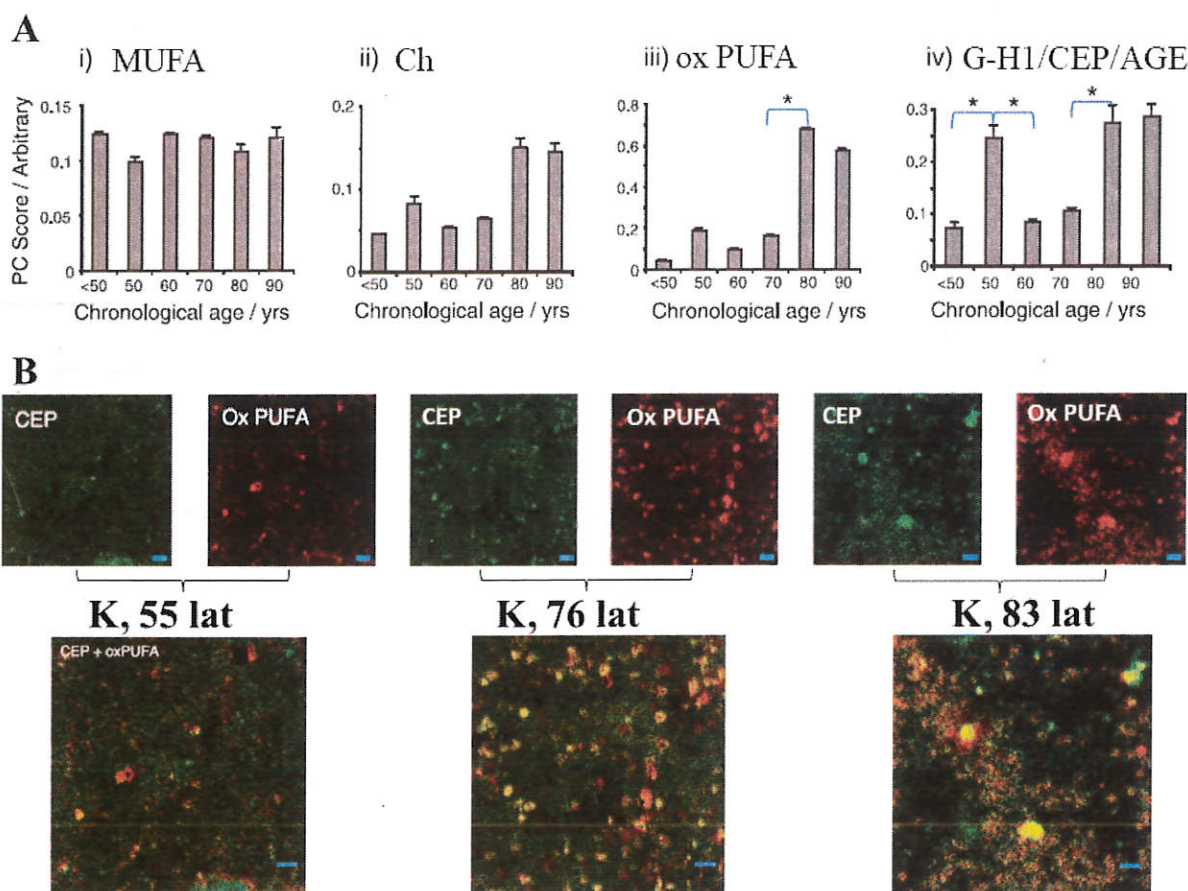
Podsumowanie:

Przygotowano obszerną bazę widm Ramana końcowych produktów glikacji i peroksydacji lipidów oraz modyfikacji przez nie indukowanych (AGEs/ALEs), umożliwiającą identyfikację poszczególnych związków w złożonym materiale biologicznym.

Wykazano zależną od wieku, istotną statystycznie, akumulację w błonach Brucha produktów utlenienia PUFAs i białek zmodyfikowanych przez produkty glikacji (AGEs) oraz ALEs, w tym CEP – produkt pochodzący z utlenienia kwasu dokozaheksaenowego (22:6n-3). Z widm BM wyodrębniono i zidentyfikowano osiem różnych AGEs/ALEs.

Wykazano także, że rozkład akumulującego się z wiekiem hemu w BM, pokrywa się z obszarem odkładania się produktów utlenienia PUFAs, m.in. CEP, co wskazuje na indukowaną hemem peroksydację lipidów w BM.

Zademonstrowano wysoką specyficzną i skuteczną CRM w analizie zależnych od wieku zmian w materiale biologicznym i możliwość jednoczesnego monitorowania zmian poziomu kilkunastu związków, zarówno białek i lipidów.



Rys. 4 Poziom wybranych składników: jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA), cholesterolu (Ch), produktów utlenienia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFAs ox) oraz G-H1/CEP/AGE – produktów modyfikacji białek indukowanych różnymi AGEs i karboksyetylpyrrolem (CEP) w błonach Brucha w zależności od wieku dawców (A)

Mapy ramanowskie BM od dawców w wieku 55, 76 oraz 83 lat przedstawiające rozkład CEP (kolor zielony) oraz PUFAs ox (kolor czerwony) na obszarze ok. 2500 μm^2 oraz ich nałożenie (B). (Beattie JR, Pawlak AM et al, 2010, FASEB J., 24(12): 4816-4824)

Ostatnim etapem projektu, w którego realizację byłam zaangażowana, były badania zmian starczych w obrębie twardówek izolowanych z ludzkich gałek ocznych od dawców w różnym wieku. Badania te były kluczowe w aspekcie dalekosiężnych planów zastosowania CRM jako nieinwazyjnej i niedestrukcyjnej, a jednocześnie szybkiej i wiarygodnej metody w badaniach *in vivo* i wykorzystania AGEs/ALEs jako biomarkerów służących ocenie ryzyka rozwoju AMD u badanych pacjentów. Błona Brucha, ze względu na liczne ograniczenia nie mogłaby być wykorzystana w diagnostycznych badaniach *in vivo*, natomiast twardówka znakomicie spełnia podstawowe wymagania: ma wystarczającą grubość, jest nieprzeźroczysta, zatem dobrze rozprasza światło, a jej lokalizacja pozwala na wykonanie pomiarów bez ryzyka uszkodzenia kluczowych tkanek wewnątrz oka.

Własności i skład biochemiczny twardówki podlegają znaczącym zmianom z wiekiem. Tkanka staje się mniej elastyczna i cieńsza, następuje zwiększona synteza dużych glikobiałek (agrekany) przy jednoczesnym spadku poziomu małych (biglikanu i dekorinu) oraz wzrost poziomu AGEs [55, 56]. Ze względu na te zmiany, a przede wszystkim obecność AGEs,

twardówka mogłaby służyć jako tkanka zastępcza w monitorowaniu procesu starzenia się oka i oceny ryzyka rozwoju AMD.

Wyniki systematycznych badań ludzkich twardówek od dawców z różnych grup wiekowych metodą CRM opublikowano w pracy:

(4) Beattie J. Renwick; **Pawlak AM.**; McGarvey John J. and Stitt AW (2011) Sclera as a Surrogate Marker for Determining AGE-Modifications in Bruch's Membrane Using a Raman Spectroscopy-Based Index of Aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52(3)**: 1593-1598

Główne cele naukowe pracy:

- ustalenie, czy AGEs/ALEs mogą być równie skutecznie zidentyfikowane za pomocą CRM w twardówce tak jak w przypadku BM
- ustalenie, czy wyniki uzyskane z badań zależnych od wieku zmian w obrębie BM korelują i w jaki stopniu z wynikami takich samych pomiarów przeprowadzonych na twardówkach
- ocena przydatności twardówki jako tkanki do nieinwazyjnych badań procesu starzenia się oka *in vivo* i pośredniej oceny stanu BM

Chociaż obecność tych samych komponentów, które zostały zidentyfikowane wcześniej w BM, została również potwierdzona w twardówce, to zależność ich poziomu od wieku w obu tkankach przedstawiała się zupełnie inaczej. W twardówce z wiekiem akumulują się jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA), których poziom nie zmieniał się w przypadku BM. Chociaż w twardówce, podobnie jak w BM, akumulują się z wiekiem niektóre AGEs: CML/CEL i G-H1, to obserwowany wzrost nie jest tak spektakularny jak w przypadku BM. Dopiero po zsumowaniu udziału wszystkich pojedynczych zidentyfikowanych AGEs/ALEs, uzyskano wyraźny trend potwierdzający zależną od wieku akumulację AGEs/ALEs w twardówce. Zestawienie tej zależności obliczonej dla twardówek z zależnością wyliczoną w ten sam sposób dla BM, wskazuje, że tempo akumulacji AGEs/ALEs w twardówce jest około czterokrotnie niższe niż w BM. Niemniej model przewidywanych zmian spektralnych w widmie Ramana badanej próbki korelujących z jej wiekiem wypracowany dla BM [42], dość dobrze korelował z wynikami uzyskanymi dla twardówek. Mimo, iż tempo zmian starczych w twardówce jest niższe niż w BM i zachodzą one w mniejszej skali, są mierzalne, a dzięki wykorzystaniu nieinwazyjnej spektroskopii ramanowskiej, mogą, nawet w ograniczonym zakresie, stanowić podstawę do szybkiej, ale wiarygodnej oceny stanu BM.

Podsumowanie:

Wykazano zależną od wieku akumulację w twardówkach kilku różnych późnych produktów glikacji i peroksydacji lipidów AGEs/ALEs, których łączna zawartość bardzo dobrze korelowała z wiekiem badanej tkanki

Wykazano, że tempo zmian starczych w twardówce, chociaż czterokrotnie wolniejsze niż w przypadku BM, dobrze koreluje z ramanowskim modelem zmian starczych wypracowanym dla BM, co pozwala na wykorzystanie twardówek do szybkich, nieinwazyjnych pomiarów metodą spektroskopii Ramana *in vivo* mających na celu wstępną ocenę stanu BM

Chociaż rola wysoce reaktywnych produktów utlenienia PUFAs, a szczególnie indukowanych przez nie ALEs, jest znana i szeroko dyskutowana jako istotny czynnik w patogenezie wielu

chorób degeneracyjnych, w tym AMD [57], wszelkie opracowania zupełnie pomijają ich potencjalną fotoreaktywność indukowaną światłem widzialnym. To bardzo ważny aspekt ich reaktywności, szczególnie w siatkówce, gdzie – jak już wielokrotnie wykazano – produkty utlenienia PUFAs i ALEs akumulują się z wiekiem i mogą być ekspozowane na krótkofalowe światło widzialne. Wykazano także, że poziom zmodyfikowanych przez HNE i HHE białek w siatkówce wzrasta po ekspozycji na światło [58].

Połowa fosfolipidów w błonach dysków zewnętrznych segmentów fotoreceptorów zawiera PUFAs, które w warunkach chronicznego stresu oksydacyjnego panującego w zewnętrznej części siatkówki łatwo ulegają utlenieniu. Mimo nieustannego procesu złuszczenia i fagocytowania przez komórki RPE dysków znajdujących się w szczytowej części POS, czas życia pojedynczego dysku wynosi 10-12 dni [59]. Zatem, jeśli końcowe produkty utlenienia PUFAs mogą przejściowo gromadzić się w POS, gdzie są ekspozowane na silne krótkofalowe światło widzialne, to jeśli są fotoreaktywne, mogą stanowić dodatkową pulę endogennych sensybilizatorów i pośredniczyć w procesie fotouszkodzenia siatkówki.

Dlatego kolejnym etapem podjętych badań dotyczących roli lipidów w procesie starzenia się i degeneracji siatkówki była analiza fotoreaktywności lipidów ekstrahowanych z siatkówek bydlęcych.

Przygotowany przeze mnie projekt zatytułowany „Rola produktów utlenienia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w fotouszkodzeniu komórek siatkówki oraz udział plazmalogenów w ochronie siatkówki przed skutkami stresu oksydacyjnego” obejmujący m.in. ten rodzaj badań, złożony w konkursie Narodowego Centrum Nauki SONATA BIS w 2012 roku otrzymał pozytywne recenzje i został sfinansowany.

Część wyników uzyskanych podczas realizacji projektu w latach 2013-2016 została opublikowana w pracy:

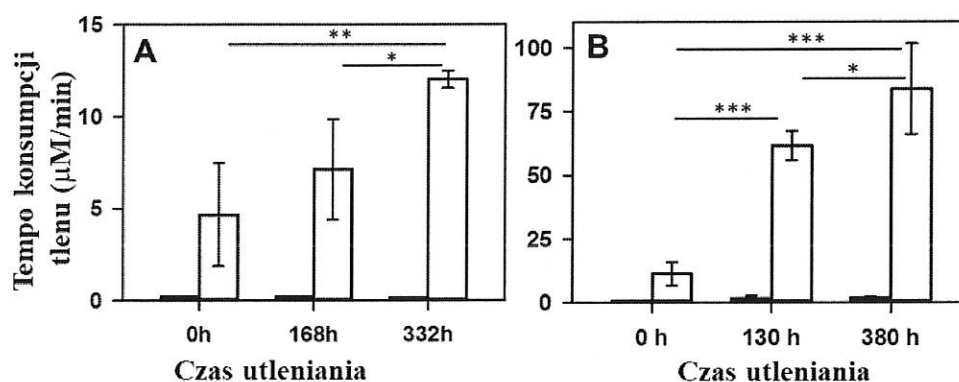
(5) Koscielnik A, Serafin M, Duda M, Oles T, Zadło A, Broniec A, Berdeaux O, Gregoire S, Bretillon L, Sarna T, **Pawlak A** [✉] (2017) Oxidation-Induced Increase In Photoreactivity of Bovine Retinal Lipid Extract. *Cell Biochem. Biophys.*, **75(3-4)**: 443-454

Główne cele naukowe pracy:

- Zbadanie fotoreaktywności ekstraktu Folcha z neuronalnej części siatkówek bydlęcych oraz zmian ewentualnie obserwowanej fotoreaktywności w czasie utleniania ekstraktu w liposomach, w kontrolowanych warunkach
- Porównanie fotoreaktywności ekstraktu Folcha z neuronalnej części siatkówek bydlęcych z fotoreaktywnością mieszaniny syntetycznych lipidów o składzie lipidowym zbliżonym do składu tego ekstraktu, utlenianych w takich samych warunkach

Procedura ekstrakcji Folcha [60] pozwala na bardzo wydajną ekstrakcję lipidów z komórek, tkanek czy innych układów biologicznych. Głównymi składnikami ekstraktu Folcha są oczywiście lipidy, ale ekstrakt ten zawiera także inne hydrofobowe składniki materiału poddanego ekstrakcji. W przypadku neuronalnej części siatkówek, ekstrakt Folcha zawiera, oprócz lipidów, także endogenne hydrofobowe przeciwutleniacze (np. α -tokoferol, karotenoidy czy retinoidy) oraz endogenne hydrofobowe sensybilizatory (np. produkty blaknięcia rodopsyny - całkowicie *trans* retinal). Ponieważ obecność endogennych sensybilizatorów i przeciwutleniaczy w badanym ekstrakcie Folcha poważnie utrudnia ocenę

udziału samych lipidów i produktów ich utlenienia w badanej fotoreaktywności ekstraktu, przygotowano dodatkowy układ badawczy składający się z syntetycznych lipidów, których skład i stosunek molowy odpowiadał w przybliżeniu składowi lipidowemu ekstraktu Folcha z siatkówek bydłych (BRex). Skład lipidowy BRex został szczegółowo zanalizowany przy użyciu chromatografii gazowej oraz spektrometrii masowej sprzężonej z chromatografią cieczą. Przygotowano liposomy z BRex oraz z mieszanin syntetycznych lipidów i poddano je procesowi utleniania na drodze autooksydacji w ciemności, w temperaturze 37°C. W wybranych punktach czasowych odbierano część utlenionych liposomów i badano ich fotoreaktywność. Zarówno w liposomach przygotowanych z nieutlenionego ekstraktu Folcha z siatkówek bydłych jak i w liposomach sporządzonych z mieszaniny syntetycznych lipidów, zaobserwowano wyraźną konsumpcję tlenu indukowaną światłem niebieskim. Tempo konsumpcji tlenu w obu badanych próbkach dramatycznie wzrastało wraz z czasem utleniania obu rodzajów liposomów (Rys. 5)



Rys.5 Tempo konsumpcji tlenu w liposomach przygotowanych z ekstraktu Folcha z siatkówek bydłych (A) oraz w liposomach przygotowanych z mieszaniny syntetycznych lipidów o składzie odpowiadającym składowi lipidowemu ekstraktu Folcha siatkówek bydłych (B). Konsumpcja tlenu mierzona w ciemności (czarne słupki) i podczas naświetlania światłem białym (395-700 nm, 34-40 mW/cm²) w próbkach nieutlenionych (0 h) i po różnym czasie utleniania (130-380 h). Gwiazdkami oznaczone różnice istotne statystycznie. (Kościelniak A. et al., 2017, *Cell Biochem. Biophys.*, 75(3-4): 443-454)

Za obserwowaną w obu próbkach, indukowaną światłem konsumpcję tlenu częściowo odpowiada generowany w układzie tlen singletowy ($^1\text{O}_2$, $^1\Delta_g$) oraz anionorodnik ponadtlenny. Z pomiarów przeprowadzonych w roztworach homogenicznych wynika, że w obu próbkach tlen singletowy generowany jest z podobną wydajnością kwantową. W przypadku ekstraktu Folcha z siatkówek bydłych utlenianego przez 332 h, wartości wydajności kwantowej generowania $^1\text{O}_2$ wynosiły odpowiednio 0,08 i 0,06 po wzbudzeniu światłem o długości fali 360 i 410 nm. W obu badanych próbkach wydajność kwantowa generowania $^1\text{O}_2$ wydaje się nie zależeć od czasu utleniania. Tempo generowania anionorodnika ponadtlennego rośnie z czasem utleniania zarówno BRex jak i mieszaniny syntetycznych lipidów [61].

Obserwowaną fotoreaktywność nieutlenionego BRex można przypisywać obecności endogennych sensybilizatorów, w tym wolnego całkowicie *trans* retinalu. Niskie wartości tempa fotokonsumpcji tlenu w próbkach nieutlenionych mogą być również wynikiem przeciwutleniającego działania obecnych w BRex wydajnych hydrofobowych

przeciwutleniaczy. Związki te jednak (atRAL czy ksantofile) ulegają dość szybkiej degradacji podczas procesu utleniania, dlatego wyraźny wzrost fotoreaktywności BRex po 168 czy 332 h autooksydacji wskazuje na rosnącą rolę utlenionych lipidów. Obserwacje te potwierdzają wyniki badań fotoreaktywności mieszaniny syntetycznych lipidów, które nie zawierały żadnych sensybilizatorów ani przeciwutleniaczy [61].

Podsumowanie:

Dokonano szczegółowej analizy składu lipidowego ekstraktu Folcha z neuronalnej części siatkówek bydlęcych

Wykazano, że ekstrakt Folcha z neuronalnej części siatkówek generuje tlen singletowy oraz rodniki tlenowe w wyniku naświetlania światłem niebieskim, a obserwowana fotoreaktywność ekstraktu wyraźnie rośnie z czasem utleniania

Potwierdzono, że za obserwowaną fotoreaktywność utlenionych ekstraktów Folcha z siatkówek bydlęcych, odpowiedzialne są głównie produkty utlenienia lipidów wchodzących w skład ekstraktu

Najważniejsze osiągnięcia i wnioski naukowe płynące z cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego.

Znaczna część mojej dotychczasowej pracy badawczej dotyczyła roli lipidów i produktów ich utlenienia w procesie starzenia się i fotouszkodzenia siatkówki i kompleksu RPE/BM. Wyniki opublikowane w kilku pracach pozwalają na sformułowanie kilku kluczowych wniosków:

- Produkty utlenienia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFAs) oraz indukowane przez nie addukty (ALEs) oraz addukty generowane przez późne produkty glikacji (AGEs) akumulują się w błonach Brucha oraz twardówkach oczu ludzkich, a ich poziom bardzo dobrze koreluje z wiekiem dawców tkanek
- Produkty utlenienia PUFA akumulują się w zewnętrznych segmentach fotoreceptorów izolowanych z siatkówek bydlęcych podczas procesu ich utleniania *ex vivo*, a konfokalna mikroskopia ramanowska może być wykorzystana do monitorowania zmian zachodzących podczas procesu utleniania nawet w złożonym materiale biologicznym
- Konfokalna mikroskopia ramanowska umożliwia jednoczesną identyfikację wielu, nawet bardzo podobnych strukturalnie AGEs/ALEs oraz odtworzenie ich rozkładu przestrzennego w tkankach ocznych w szybki i nieinwazyjny sposób
- Twardówki, mimo znacznie wolniejszego tempa akumulacji AGEs/ALEs i zmian starczych, mogą zostać wykorzystane do szybkich, nieinwazyjnych pomiarów monitorujących proces starzenia się oka *in vivo* oraz służących szacunkowej ocenie kondycji błony Brucha
- Produkty utlenienia PUFAs, które mogą powstawać i akumulować się w siatkówce są fotoreaktywne i zdolne do generowania tlenu singletowego oraz wolnych rodników po naświetleniu krótkofalowym światłem widzialnym

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych wnioskodawcy, świadczących o istotnej aktywności naukowej habilitanta

5.1. Prace poświęcone badaniu własności plasmalogenów

Drugim istotnym problemem, którym zajmuję się w swojej pracy badawczej jest rola plasmalogenów (PLs) w komórkach siatkówki. Własności przeciwutleniające PLs i badania ich wpływu na fotoreaktywność innych lipidów obecnych w siatkówce stanowiły znaczną część mojego projektu badawczego (SONATA BIS, Grant 2012/05/E/NZ3/00473, 2013-2016). Plasmalogeny stanowią unikalną grupę glicerofosfolipidów, która charakteryzuje się obecnością wiązania winylowo-eterowego w pozycji sn-1 glicerolu [62]. Plasmalogeny w siatkówce stanowią 10% wszystkich glicerofosfolipidów i występują w formie fosfatydyloetanolaminy sięgając odpowiednio 29% i 28% wszystkich fosfatydyloetanolamin odpowiednio w siatkówce i w RPE [63]. Poziom PLs w siatkówce zmienia się z wiekiem, szczególnie w początkowej fazie rozwoju, natomiast brak PLs powoduje szereg zaburzeń w rozwoju i funkcjonowaniu tkanek ocznych, co wskazuje na istotną rolę plasmalogenów w tych procesach [63]. Uważa się, że obecność wiązania winylowo-eterowego redukuje hydrofilowość cząsteczek PLs i sprawia, że PLs są istotnymi składnikami mikrodomen lipidowych [62]. Sugeruje się także, że plasmalogeny mogą działać jako endogenne przeciwutleniacze [64]. Wiązanie winylowo-eterowe w PLs jest bowiem pierwszym celem ataku wolnych rodników czy tlenu singletowego chroniąc w ten sposób nienasycone kwasy tłuszczowe w pozycji sn-2 samego plasmalogenu i innych fosfolipidów, co wykazaliśmy w naszej pracy:

Broniec A, Klosinski R, **Pawlak A**, Wrona-Krol M, Thompson D, Sarna T (2011), Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems, *Free Radic Biol Med.*, **50(7)**: 892-898;
(IF₂₀₁₁ 5,423; MNiSW 40; liczba cytowań: 43)

Reaktywność PLs w kierunku wolnych rodników jest znacznie bardziej złożona i istotnie zależy zarówno od rodzaju lipidów sąsiadujących z PLs (mechanizm międzycząsteczkowy) jak i kwasu tłuszczowego zestryfikowanego w pozycji sn-2 samego plasmalogenu (mechanizm wewnątrzcząsteczkowy). Wyniki badań tych mechanizmów przedstawiono w pracy:

Broniec A, Żądło A, **Pawlak A**, Fuchs B, Kłosiński R, Thompson D, Sarna T. (2017) Interaction of plasmenylcholine with free radicals in selected model systems. *Free Radic Biol Med.*, **106**: 368-378;
(IF₂₀₁₇ 6,020; MNiSW 40; liczba cytowań: 4)

W pracy tej wykazano, że podczas gdy w pozycji sn-2 plasmalogenu znajduje się zestryfikowany jednonienasycony kwas tłuszczowy, reakcja PLs z wolnymi rodnikami nie różni się od reakcji jego diacylowego analogu. Jeżeli natomiast w tym miejscu znajduje się kwas wielonienasycony, wówczas wiązanie winylowo-eterowe chroni ten właśnie PUFA przed utlenieniem. To bardzo ważny wewnątrzcząsteczkowy mechanizm przeciwutleniający.

Podczas realizacji projektu wykazano również, że obecność PLs wyraźnie obniża wydajność kwantową generowania tlenu singletowego w mieszaninie syntetycznych lipidów o składzie zbliżonym do składu lipidowego siatkówek, nie wpływają natomiast na poziom generowanych wolnych rodników. Ponadto, wykazano, że PLs indukują ekspresję niektórych enzymów przeciwutleniających w komórkach ARPE-19 (dane nie opublikowane).

Część wyników uzyskanych podczas realizacji projektu została wykorzystana w projekcie zatytułowanym "*The role of plasmalogens in physiology and pathophysiology of the human retina – cellular and molecular aspects*" złożonym przez habilitanta do Europejskiej Rady ds. Badań Naukowych (ERC – European Research Council) w konkursie ERC *Consolidator Grant* (ERC-2016-COG, proposal number 726427) w 2016 roku. Projekt niestety nie uzyskał finansowania.

5.2. Praca związana z badaniem strukturalnej roli lipidów

Jak już wspomniano, wysokie stężenie wielonienasyconych lipidów w siatkówce, a szczególnie w zewnętrznych segmentach fotoreceptorów (POS) jest kluczowe dla utrzymania wysokiej płynności błon dysków w POS, od której zależy wydajność transdukcji sygnału wzrokowego [11, 12]. Pigment wzrokowy, rodopsyna, zlokalizowany jest w błonach dysków lub w fałdkach błony plazmatycznej w przypadku, odpowiednio, pręcików i czopków. Szczytowe części zewnętrznych segmentów fotoreceptorów, czyli te najstarsze i najbardziej „zużyte” dyski są złuszczone i fagocytowane przez komórki nabłonka upigmentowanego siatkówki (RPE). Jeszcze w latach 90’ wykazano, że skład lipidowy błony plazmatycznej fotoreceptorów oraz młodych i starych dysków bardzo się różni [65]. Błony najstarszych dysków zawierają zaledwie 5 % molowych cholesterolu i niemal 35% molowych kwasu dokozaheksaenowego (22:6, n-3) [66]. Ponadto, w błonach fotoreceptorów obecne są także kasantofile, które obok istotnej roli przeciwutleniającej, pełnią także ważną rolę strukturalną [67, 68]. Fizykochemiczne własności błon, powstawanie i skład lipidowy domen oraz wpływ cholesterolu (Ch) i ksantofili na własności i funkcjonowanie błon są przedmiotem pracy badawczej Prof. Anny Wiśniewskiej-Becker, z którą od lat współpracuję.

Badania, które prowadzimy dotyczą wpływu produktów utlenienia PUFAs i produktów degradacji ksantofili na własności strukturalne błon fotoreceptorów. W naszych badaniach wykorzystujemy głównie metodę elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Część wyników naszych badań została opublikowana w pracy:

Duda M, Kawula K, **Pawlak A**, Sarna T, Wisniewska-Becker A. (2017) EPR Studies on the Properties of Model Photoreceptor Membranes Made of Natural and Synthetic Lipids. *Cell Biochem. Biophys.*, **75**(3-4): 433-442;
(IF₂₀₁₇ 1,455; MNiSW 25; brak cytowań)

W tej pracy opublikowano wyniki badań własności strukturalnych modeli błon naśladujących trzy typy błon obecnych w POS: błony plazmatycznej oraz błon młodych i starych dysków. Ponadto, badano także wpływ procesu utlenienia na ich własności. Wykazano, że fizykochemiczne własności badanych błon znacznie się różnią. Błona plazmatyczna, ze względu na wysokie stężenie cholesterolu (dochodzące do 40% molowych) wykazuje dużą sztywność, podczas gdy błona starych dysków zawierająca zaledwie 5% molowych Ch, charakteryzuje się największą płynnością. Zaobserwowano tylko niewielki wpływ utleniania

powodujący zwiększenie sztywności błon w ich centralnej części. Brak silnych efektów utlenienia lipidów wchodzących w skład błon można tłumaczyć tym, że błony były utleniane w bardzo łagodnych warunkach, w których nie uzyskano wystarczająco wysokiego poziomu reaktywnych produktów utlenienia, które mogłyby spowodować istotne zmiany własności błon. W siatkówce jednak, lipidy obecne w POS są ekspozycjonowane na silny i długotrwały stres oksydacyjny, zatem zaproponowany model błon POS znacznie odbiega od warunków fizjologicznych. Badania te są kontynuowane przy znacznie zmodyfikowanych warunkach eksperymentu.

5.3. Prace poświęcone badaniu składników lipofuscyny.

Po obronie pracy doktorskiej w marcu 2004 roku, kontynuowałam badania fotoreaktywności lipofuscyny ocznej (Lf) oraz jej wybranych składników. Wyniki badań fotoreaktywności rozpuszczalnych (ChS) i nierozpuszczalnych w chloroformie (ChNS) frakcji Lf izolowanej z ludzkich komórek nabłonka upigmentowanego siatkówki (RPE) od dawców z różnych grup wiekowych opublikowano w pracy:

Rózanowska M, **Pawlak A**, Rózanowski B, Skumatz C, Zareba M, Boulton ME, Burke JM, Sarna T, Simon JD. (2004) Age-related changes in the photoreactivity of retinal lipofuscin granules: Role of chloroform-insoluble components, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **45(4)**: 1052-60

(IF₂₀₀₄ 3,577; MNiSW 40; liczba cytowań: 45)

W pracy wykazano, że fotoreaktywność obu badanych frakcji Lf wzrasta z wiekiem donorów komórek RPE (wspomniano już o tym wyżej w podrozdziale „Lipofuscyna oczna”). Jednocześnie zaobserwowano stopniowy wzrost zawartości ChNS w ziarnach Lf z wiekiem, podczas gdy zawartość ChS pozostawała względnie stała niezależnie od wieku donorów. Warto podkreślić, że gdy uzyskane wyniki znormalizowano do suchej masy obu frakcji, a nie liczby ziaren Lf, obserwowana fotoreaktywność wydawała się nie zależeć od wieku. Wskazuje to na rosnącą rolę składników frakcji ChNS w wypadkowej fotoreaktywności Lf i rosnące z wiekiem zagrożenie ze strony akumulującej się Lf dla komórek RPE.

Wyniki badań fotoreaktywności produktu reakcji dwóch cząsteczek całkowicie *trans* retinalu z etanolaminą – A2E (ang. N-retinylidene-N-retinylethanolamine) stanowiły znaczną część mojej rozprawy doktorskiej (uzyskane wyniki zostały opublikowane w pięciu pracach przed uzyskaniem stopnia doktora). W mojej pracy doktorskiej wykazałam, że stany wzbudzone i generowanie tlenu singletowego nie są wprost odpowiedzialne za indukowane światłem reakcje A2E, co jednak nie wykluczało udziału form wolnorodnikowych A2E w tych reakcjach. Badania A2E kontynuowałam koncentrując się głównie na reaktywności form wolnorodnikowych A2E. Wyniki pomiarów metodą radiolizy impulsowej zostały opublikowane w pracy:

Broniec A, **Pawlak A**, Sarna T, Wielgus A, Roberts JE, Land EJ, Truscott TG, Edge R, Navaratnam S. (2005) Spectroscopic properties and reactivity of free radical forms of A2E, *Free Radic Biol Med.*, **38(8)**: 1037-46;

(IF₂₀₀₅ 4,971; MNiSW 40; liczba cytowań: 10)

Ponieważ radioliza impulsowa oferuje możliwość badania rodnikowych form przejściowych różnych substancji, podjęto się charakterystyki form rodnikowych A2E w układzie micellarnym i układach homogenicznych. Wykazano, że ze względu na długi czas życia, produkt jednoelektronowej redukcji A2E (neutralny rodnik A2E[•]), może wydajnie oddziaływać z biologicznie znaczącymi akceptorami elektronów (np. z tlenem i melaniną). Uzyskane wyniki wskazują też, że A2E w przeciwieństwie do karotenoidów i retinoidów, raczej nie ulega reakcji jednoelektronowego utlenienia, chociaż z silnie utleniającymi rodnikami, zaobserwowano powstawanie kationorodnika A2E (A2E^{•2+}). W obecności karotenoidów, kationorodnik A2E ulegał redukcji, której towarzyszyło generowanie kationorodników karotenoidów. Reakcje oddziaływania neutralnego rodnika A2E z tlenem i melaniną oraz kationorodnika A2E z karotenoidami sugerują, że ewentualne powstawanie rodników A2E in situ w siatkówce, może mieć duże znaczenie biologiczne.

5.4. Praca dotycząca wykorzystania spektroskopii EPR do wizualizacji rodników w układach modelowych i tkankach biologicznych

W 2010 roku rozpoczęłam swój drugi staż podoktorski w zespole Prof. Hiroshi Hiraty na Uniwersytecie Hokkaido, Sapporo, Japonia, podczas którego zostałam zaangażowana do realizacji dwóch projektów: „Development of fast CW-EPR Imaging” oraz „Imaging of chiral molecules based on magnetic resonance”. Badania, które tam prowadziłam dotyczyły zastosowania elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) do wizualizacji rozkładu rodników w układach modelowych oraz próbkach biologicznych. Profesor Hiroshi Hirata jest bardzo doświadczonym konstruktorem spektrometrów EPR (kilka jego projektów nowych rezonatorów zostało opatentowanych), a przede wszystkim szybkich spektrometrów służących do obrazowania EPR (tzw. imagerów). W 2010 roku, kiedy rozpoczynałam pracę w grupie Profesora Hiraty, dysponował on najszybszym imagerem EPR na świecie, umożliwiającym rejestrację obrazu 3D dystrybucji rodnika w czasie 3.6s

Ponadto, Profesor Hirata opracował metodę jednoczesnego pomiaru i wizualizacji dwóch różnych rodników. Część wyników uzyskanych tą metodą zostało opublikowanych w pracy:

Pawlak A, Ito R, Fujii H, Hirata H (2011) Simultaneous molecular imaging based on electron paramagnetic resonance of (14)N- and (15)N-labelled nitroxyl radicals, *Chem. Comm.*, **47** (11): 3245-3247

(IF₂₀₁₁ 6,169; MNiSW 40; liczba cytowań: 6)

Wypracowana przez grupę Prof. Hiraty metoda wykorzystania dwóch oznakowanych różnymi izotopami azotu (N¹⁴ i N¹⁵) rodników nitroksylowych umożliwiła symultaniczne zobrazowanie przestrzennego rozkładu dwóch rodników w mózgu myszy. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania tej metody do pomiarów chiralnych związków i badania farmakokinetyki chiralnych leków.

5.5. Inne prace

Ze względu na moje zainteresowania naukowe, szczególnie z dziedziny fotobiologii oraz znajomość technik stosowanych w badaniach (foto)biofizycznych, wielokrotnie byłam angażowana w projekty dotyczące badań własności fotochemicznych i fizykochemicznych

różnych związków. Współpraca z wieloma wybitnymi badaczami zaowocowała kilkoma bardzo dobrymi, wielokrotnie cytowanymi, publikacjami dotyczącymi:

5.5.1. Badań własności zupełnie nowych sensybilizatorów:

Mroz P, **Pawlak A**, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, Sarna T, Hamblin MR. (2007) Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism, *Free Radic Biol Med.*, **43(5)**: 711-9
(IF₂₀₀₇ 4,813; MNiSW 40; liczba cytowań: 149)

Vakrat-Haglili Y, Weiner L, Brumfeld V, Brandis A, Salomon Y, McLlroy B, Wilson BC, **Pawlak A**, Rozanowska M, Sarna T, Scherz A. (2005) The microenvironment effect on the generation of reactive oxygen species by Pd-bacteriopheophorbide. *J Am Chem Soc.*, **127(17)**: 6487-97
(IF₂₀₀₅ 7,419; MNiSW 45; liczba cytowań: 131)

5.5.2 Badań własności melaniny i kwasów humusowych

Ye T, Hong L, Garguilo J, **Pawlak A**, Edwards GS, Nemanich RJ, Sarna T, Simon JD. (2006) Photoionization thresholds of melanins obtained from free electron laser-photoelectron emission microscopy, femtosecond transient absorption spectroscopy and electron paramagnetic resonance measurements of oxygen photoconsumption., *Photochem. Photobiol.*, **82(3)**: 733-737
(IF₂₀₀₆ 2,061; MNiSW 25; liczba cytowań: 62)

Ye T, **Pawlak A**, Sarna T, Simon JD, (2008) Different molecular constituents in pheomelanin are responsible for emission, transient absorption and oxygen photoconsumption. *Photochem. Photobiol.*, **84(2)**: 437-443
(IF₂₀₀₈ 2,287; MNiSW 25; liczba cytowań: 21)

Polewski K; Slawinska D; Slawinski J; **Pawlak A** (2005) The effect of UV and visible light radiation on natural humic acid EPR spectral and kinetic studies, *GEODERMA*, **126(3-4)**: 291-299
(IF₂₀₀₅ 1,773; MNiSW 45; liczba cytowań: 25)

5.5.3 Badań reakcji tokoferoli i tokotrienoli z tlenem singletowym

Gruszka Jolanta; **Pawlak Anna**; Kruk Jerzy (2008) Tocochromanols, plastoquinol, and other biological prenyllipids as singlet oxygen quenchers-determination of singlet oxygen quenching rate constants and oxidation products, *Free Rad. Biol. Med.*, **45(6)**: 920-928
(IF₂₀₀₈ 5,399; MNiSW 40; liczba cytowań: 61)

Literatura

1. Franceschi, C., P. Garagnani, C. Morsiani, M. Conte, A. Santoro, A. Grignolio, D. Monti, M. Capri, and S. Salvioli, *The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 61.
2. Luu, J. and K. Palczewski, *Human aging and disease: Lessons from age-related macular degeneration*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115(12)**: p. 2866-2872.

3. Colijn, J.M., G.H.S. Buitendijk, E. Prokofyeva, D. Alves, M.L. Cachulo, A.P. Khawaja, A. Cougnard-Gregoire, B.M.J. Merle, C. Korb, M.G. Erke, A. Bron, E. Anastasopoulos, M.A. Meester-Smoor, T. Segato, S. Piermarocchi, P. de Jong, J.R. Vingerling, F. Topouzis, C. Creuzot-Garcher, G. Bertelsen, N. Pfeiffer, A.E. Fletcher, P.J. Foster, R. Silva, J.F. Korobelnik, C. Delcourt, C.C.W. Klaver, E.-R. consortium, and c. European Eye Epidemiology, *Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future*. Ophthalmology, 2017. **124**(12): p. 1753-1763.
4. Stankiewicz, A., *Okulistyka i choroby siatkówki w aspekcie zdrowego i aktywnego starzenia się*. 2015. p. 25-28.
5. Lambert, N.G., H. ElShelmani, M.K. Singh, F.C. Mansergh, M.A. Wride, M. Padilla, D. Keegan, R.E. Hogg, and B.K. Ambati, *Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration*. Prog Retin Eye Res, 2016. **54**: p. 64-102.
6. Beatty, S., H. Koh, M. Phil, D. Henson, and M. Boulton, *The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration*. Surv Ophthalmol, 2000. **45**(2): p. 115-34.
7. Pawlak, A.M., J.V. Glenn, J.R. Beattie, J.J. McGarvey, and A.W. Stitt, *Advanced glycation as a basis for understanding retinal aging and noninvasive risk prediction*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1126**: p. 59-65.
8. Bretillon, L., G. Thuret, S. Gregoire, N. Acar, C. Joffre, A.M. Bron, P. Gain, and C.P. Creuzot-Garcher, *Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects*. Exp Eye Res, 2008. **87**(6): p. 521-8.
9. Fliesler, S.J. and R.E. Anderson, *Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina*. Prog Lipid Res, 1983. **22**(2): p. 79-131.
10. van Kuijk, F.J. and P. Buck, *Fatty acid composition of the human macula and peripheral retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992. **33**(13): p. 3493-6.
11. Brown, M.F., *Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer*. Chem Phys Lipids, 1994. **73**(1-2): p. 159-80.
12. Wensel, T.G., *Signal transducing membrane complexes of photoreceptor outer segments*. Vision Res, 2008. **48**(20): p. 2052-61.
13. Tanito, M., R.S. Brush, M.H. Elliott, L.D. Wicker, K.R. Henry, and R.E. Anderson, *High levels of retinal membrane docosahexaenoic acid increase susceptibility to stress-induced degeneration*. J Lipid Res, 2009. **50**(5): p. 807-19.
14. Wong-Riley, M.T., *Energy metabolism of the visual system*. Eye Brain, 2010. **2**: p. 99-116.
15. Wu, J., S. Seregard, and P.V. Algvere, *Photochemical damage of the retina*. Surv Ophthalmol, 2006. **51**(5): p. 461-81.
16. Boulton, M., M. Rozanowska, and B. Rozanowski, *Retinal photodamage*. J Photochem Photobiol B, 2001. **64**(2-3): p. 144-61.
17. Feeney-Burns, L., E.S. Hilderbrand, and S. Eldridge, *Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984. **25**(2): p. 195-200.
18. Feeney-Burns, L. and G.E. Eldred, *The fate of the phagosome: conversion to 'age pigment' and impact in human retinal pigment epithelium*. Trans Ophthalmol Soc U K, 1983. **103** (Pt 4): p. 416-21.
19. Nguyen-Legros, J. and D. Hicks, *Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium*. Int Rev Cytol, 2000. **196**: p. 245-313.
20. Rozanowska, M., J. Jarvis-Evans, W. Korytowski, M.E. Boulton, J.M. Burke, and T. Sarna, *Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species*. J Biol Chem, 1995. **270**(32): p. 18825-30.
21. Rozanowska, M., J. Wessels, M. Boulton, J.M. Burke, M.A. Rodgers, T.G. Truscott, and T. Sarna, *Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media*. Free Radic Biol Med, 1998. **24**(7-8): p. 1107-12.
22. Boulton, M., F. Docchio, P. Dayhaw-Barker, R. Ramponi, and R. Cubeddu, *Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanosomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium*. Vision Res, 1990. **30**(9): p. 1291-303.

23. Bazan, H.E., N.G. Bazan, L. Feeney-Burns, and E.R. Berman, *Lipids in human lipofuscin-enriched subcellular fractions of two age populations. Comparison with rod outer segments and neural retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990. **31**(8): p. 1433-43.
24. Dorey, C.K., G. Wu, D. Ebenstein, A. Garsd, and J.J. Weiter, *Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989. **30**(8): p. 1691-9.
25. Wu, Y.L., J. Li, and K. Yao, *Structures and biogenetic analysis of lipofuscin bis-retinoids*. J Zhejiang Univ Sci B, 2013. **14**(9): p. 763-73.
26. Rozanowska, M., A. Pawlak, B. Rozanowski, C. Skumatz, M. Zareba, M.E. Boulton, J.M. Burke, T. Sarna, and J.D. Simon, *Age-related changes in the photoreactivity of retinal lipofuscin granules: role of chloroform-insoluble components*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(4): p. 1052-60.
27. Baynes, J.W. and S.R. Thorpe, *Glycoxidation and lipoxidation in atherogenesis*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(12): p. 1708-16.
28. Miyata, T., K. Kurokawa, and C. Van Ypersele De Strihou, *Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(9): p. 1744-52.
29. Pawlak, A.M., J.R. Beattie, J.V. Glenn, A.W. Stitt, and J.J. McGarvey, *Raman spectroscopy of advanced glycation end products (AGEs), possible markers for progressive retinal dysfunction*. Journal of Raman Spectroscopy, 2008. **39**(11): p. 1635-1642.
30. Baynes, J.W., *The role of AGEs in aging: causation or correlation*. Exp Gerontol, 2001. **36**(9): p. 1527-37.
31. Stitt, A.W., *Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease*. Br J Ophthalmol, 2001. **85**(6): p. 746-53.
32. Koyama, H., H. Yamamoto, and Y. Nishizawa, *RAGE and soluble RAGE: potential therapeutic targets for cardiovascular diseases*. Mol Med, 2007. **13**(11-12): p. 625-35.
33. Schutt, F., M. Bergmann, F.G. Holz, and J. Kopitz, *Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(8): p. 3663-8.
34. Handa, J.T., N. Verzijl, H. Matsunaga, A. Aotaki-Keen, G.A. Luttj, J.M. te Koppele, T. Miyata, and L.M. Hjelmeland, *Increase in the advanced glycation end product pentosidine in Bruch's membrane with age*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(3): p. 775-9.
35. Howes, K.A., Y. Liu, J.L. Dunaief, A. Milam, J.M. Frederick, A. Marks, and W. Baehr, *Receptor for advanced glycation end products and age-related macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(10): p. 3713-20.
36. Hammes, H.P., H. Hoerauf, A. Alt, E. Schleicher, J.T. Clausen, R.G. Bretzel, and H. Laqua, *N(epsilon)(carboxymethyl)lysine and the AGE receptor RAGE colocalize in age-related macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(8): p. 1855-9.
37. Crabb, J.W., M. Miyagi, X. Gu, K. Shadrach, K.A. West, H. Sakaguchi, M. Kamei, A. Hasan, L. Yan, M.E. Rayborn, R.G. Salomon, and J.G. Hollyfield, *Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14682-7.
38. Gu, X., S.G. Meier, M. Miyagi, M.E. Rayborn, J.G. Hollyfield, J.W. Crabb, and R.G. Salomon, *Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 42027-35.
39. Hollyfield, J.G., V.L. Bonilha, M.E. Rayborn, X. Yang, K.G. Shadrach, L. Lu, R.L. Ufret, R.G. Salomon, and V.L. Perez, *Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration*. Nat Med, 2008. **14**(2): p. 194-8.
40. Hollyfield, J.G., V.L. Perez, and R.G. Salomon, *A hapten generated from an oxidation fragment of docosahexaenoic acid is sufficient to initiate age-related macular degeneration*. Mol Neurobiol, 2010. **41**(2-3): p. 290-8.
41. Nagai, R., J. Shirakawa, R. Ohno, K. Hatano, H. Sugawa, S. Arakawa, K. Ichimaru, S. Kinoshita, N. Sakata, and M. Nagai, *Antibody-based detection of advanced glycation end-products: promises vs. limitations*. Glycoconj J, 2016. **33**(4): p. 545-52.

42. Glenn, J.V., J.R. Beattie, L. Barrett, N. Frizzell, S.R. Thorpe, M.E. Boulton, J.J. McGarvey, and A.W. Stitt, *Confocal Raman microscopy can quantify advanced glycation end product (AGE) modifications in Bruch's membrane leading to accurate, nondestructive prediction of ocular aging*. FASEB J, 2007. **21**(13): p. 3542-52.
43. Hanlon, E.B., R. Manoharan, T.W. Koo, K.E. Shafer, J.T. Motz, M. Fitzmaurice, J.R. Kramer, I. Itzkan, R.R. Dasari, and M.S. Feld, *Prospects for in vivo Raman spectroscopy*. Phys Med Biol, 2000. **45**(2): p. R1-59.
44. Choo-Smith, L.P., H.G. Edwards, H.P. Endtz, J.M. Kros, F. Heule, H. Barr, J.S. Robinson, Jr., H.A. Bruining, and G.J. Puppels, *Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation*. Biopolymers, 2002. **67**(1): p. 1-9.
45. Petry, R., M. Schmitt, and J. Popp, *Raman spectroscopy--a prospective tool in the life sciences*. Chemphyschem, 2003. **4**(1): p. 14-30.
46. Erckens, R.J., F.H. Jongsma, J.P. Wicksted, F. Hendrikse, W.F. March, and M. Motamedi, *Raman spectroscopy in ophthalmology: from experimental tool to applications in vivo*. Lasers Med Sci, 2001. **16**(4): p. 236-52.
47. Beattie, J.R., A.M. Pawlak, M.E. Boulton, J. Zhang, V.M. Monnier, J.J. McGarvey, and A.W. Stitt, *Multiplex analysis of age-related protein and lipid modifications in human Bruch's membrane*. FASEB J, 2010. **24**(12): p. 4816-24.
48. Krafft, C. and J. Popp, *The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis*. Anal Bioanal Chem, 2015. **407**(3): p. 699-717.
49. Ermakov, I.V., M.R. Ermakova, and W. Gellermann, *Simple Raman instrument for in vivo detection of macular pigments*. Appl Spectrosc, 2005. **59**(7): p. 861-7.
50. Curcio, C.A. and M. Johnson, *Retina*. 5th ed. Vol. 1. 2013: Elsevier Inc. 2564.
51. Clark, S.J., S. McHarg, V. Tilakaratna, N. Brace, and P.N. Bishop, *Bruch's Membrane Compartmentalizes Complement Regulation in the Eye with Implications for Therapeutic Design in Age-Related Macular Degeneration*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1778.
52. Ardeljan, D. and C.C. Chan, *Aging is not a disease: distinguishing age-related macular degeneration from aging*. Prog Retin Eye Res, 2013. **37**: p. 68-89.
53. Ishibashi, T., T. Murata, M. Hangai, R. Nagai, S. Horiuchi, P.F. Lopez, D.R. Hinton, and S.J. Ryan, *Advanced glycation end products in age-related macular degeneration*. Arch Ophthalmol, 1998. **116**(12): p. 1629-32.
54. Nakata, K., J.W. Crabb, and J.G. Hollyfield, *Crystallin distribution in Bruch's membrane-choroid complex from AMD and age-matched donor eyes*. Exp Eye Res, 2005. **80**(6): p. 821-6.
55. Dunlevy, J.R. and J.A. Rada, *Interaction of lumican with aggrecan in the aging human sclera*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(11): p. 3849-56.
56. Girard, M.J., J.K. Suh, M. Bottlang, C.F. Burgoyne, and J.C. Downs, *Scleral biomechanics in the aging monkey eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(11): p. 5226-37.
57. Handa, J.T., M. Cano, L. Wang, S. Datta, and T. Liu, *Lipids, oxidized lipids, oxidation-specific epitopes, and Age-related Macular Degeneration*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017. **1862**(4): p. 430-440.
58. Tanito, M., M.H. Elliott, Y. Kotake, and R.E. Anderson, *Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(10): p. 3859-68.
59. Young, R.W., *The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey*. J Cell Biol, 1971. **49**(2): p. 303-18.
60. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
61. Kościelniak, A.S., M.; Duda, M.; Oles, T.; Zadło, A.; Broniec, A.; Berdeaux, O.; Gregoire, S.; Bretillon, L.; Sarna, T.; Pawlak, A., *Oxidation-induced increase in photoreactivity of bovine retinal lipid extract*. Cell Biochemistry and Biophysics, submitted, 2017.
62. Braverman, N.E. and A.B. Moser, *Functions of plasmalogen lipids in health and disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(9): p. 1442-52.
63. Acar, N., S. Gregoire, A. Andre, P. Juaneda, C. Joffre, A.M. Bron, C.P. Creuzot-Garcher, and L. Bretillon, *Plasmalogens in the retina: in situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate*

- acyltransferase (DHAP-AT)--the first enzyme involved in their biosynthesis--and comparative study of retinal and retinal pigment epithelial lipid composition. Exp Eye Res, 2007. 84(1): p. 143-51.*
64. Lessig, J. and B. Fuchs, *Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. Curr Med Chem, 2009. 16(16): p. 2021-41.*
 65. Boesze-Battaglia, K. and A.D. Albert, *Phospholipid distribution among bovine rod outer segment plasma membrane and disk membranes. Exp Eye Res, 1992. 54(5): p. 821-3.*
 66. Boesze-Battaglia, K. and A.D. Albert, *Fatty acid composition of bovine rod outer segment plasma membrane. Exp Eye Res, 1989. 49(4): p. 699-701.*
 67. Subczynski, W.K., A. Wisniewska, and J. Widomska, *Location of macular xanthophylls in the most vulnerable regions of photoreceptor outer-segment membranes. Arch Biochem Biophys, 2010. 504(1): p. 61-6.*
 68. Wisniewska-Becker, A., G. Nawrocki, M. Duda, and W.K. Subczynski, *Structural aspects of the antioxidant activity of lutein in a model of photoreceptor membranes. Acta Biochim Pol, 2012. 59(1): p. 119-24.*

Kraków, 29.04.19


Podpis wnioskodawcy