

Załącznik 3a

Autoreferat

dr Andrzej Żądło
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

1. Imię i nazwisko: Andrzej Żądło

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

a) Tytuł magistra

Miejsce: Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii, kierunek: chemia, specjalność: chemia biologiczna

Data uzyskania: 23 czerwca 2003

Tytuł pracy magisterskiej: Wpływ fotodegradacji melaniny z nabłonka upigmentowanego siatkówki na jej właściwości antyutleniające w warunkach *in vitro*

Promotor: Prof. dr hab. Tadeusz Sarna

Recenzent: Prof. dr hab. Barbara Oleksyn

b) Stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biofizyki

Miejsce: Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Data uzyskania: 13 listopada 2009

Tytuł rozprawy doktorskiej: Wpływ fotodegradacji melanosomów z nabłonka upigmentowanego siatkówki na ich właściwości przeciwutleniające

Promotor: Prof. dr hab. Tadeusz Sarna

Recenzenci: Prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński, Prof. dr hab. Witold Korytowski

Stopień naukowy nadany uchwałą Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2003 – 2004 Praca w Zakładzie Biofizyki na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Kraków, Polska

2010 – 2012 Praca na stanowisku adiunkt naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Biofizyki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Kraków, Polska

2013 Praca na stanowisku post-doc w Instytucie Chemii Fizycznej i Teoretycznej Uniwersytetu Technicznego, Graz, Austria

2013 – obecnie Praca na stanowisku adiunkt naukowy w Zakładzie Biofizyki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Kraków, Polska

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego 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 (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

Zastosowanie wybranych kationów jako sond molekularnych w badaniu oksydacyjnych modyfikacji melaniny

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci

wydawnictwa)

1. Andrzej Żądło, Grzegorz Szewczyk, Michał Sarna, Anna Kozińska, Anna Piłat, Patrycja Kaczara, Tadeusz Sarna*, Photoaging of retinal pigment epithelial melanosomes: The effect of photobleaching on morphology and reactivity of the pigment granules, **2016**, *Free Radical Biology and Medicine*, 97:320-329.
 IF₂₀₁₇ = 6,02 IF_{5 lat} = 6,326 MNiSW = 40 Liczba cytowań: 6
2. Andrzej Żądło*, Anna Piłat, Michał Sarna, Anna Pawlak, Tadeusz Sarna, Redox Active Transition Metal ions Make Melanin Susceptible to Chemical Degradation Induced by Organic Peroxide, **2017**, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 75:319-333.
 IF₂₀₁₇ = 1,455 IF_{5 lat} = 1,62 MNiSW = 25 Liczba cytowań: 4
3. Andrzej Żądło, Grzegorz Szewczyk, Michał Sarna, Theodore G. Camenisch, Jason W. Sidabras, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu, Filip Sagan, Mariusz Mitoraj, Tadeusz Sarna*, Photobleaching of pheomelanin increases its phototoxic potential: Physicochemical studies of synthetic pheomelanin subjected to aerobic photolysis, **2019**, *Pigment Cell Melanoma Research*, 32: 359-372, doi: 10.1111/pcmr.12752.
 IF₂₀₁₇ = 6,115 IF_{5 lat} = 4,833 MNiSW = 40 Liczba cytowań: 0
4. Andrzej Żądło*, Application of transition metal ions in study of photoinduced modifications of melanin, *Acta Biochimica Polonica*, **2019**, Przyjęta 26. 04. 2019
 IF₂₀₁₇ = 1,239 IF_{5 lat} = 1,463 MNiSW = 15 Liczba cytowań: 0

* – Autor korespondujący

Sumaryczny IF prac stanowiących podstawę habilitacji: 14,829

Sumaryczna punktacja MNiSW:120

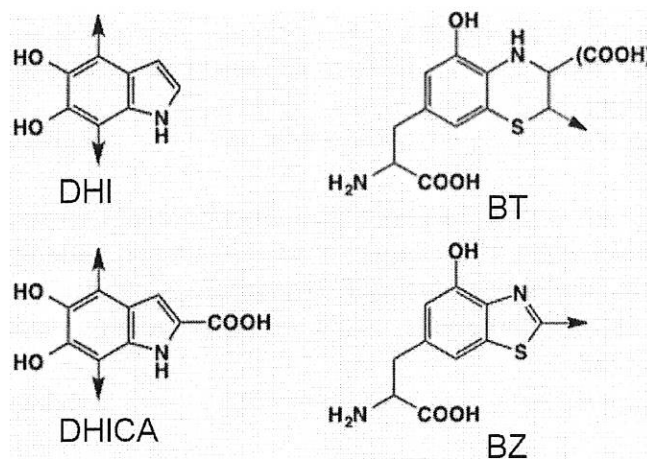
Liczba cytowań: 10

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

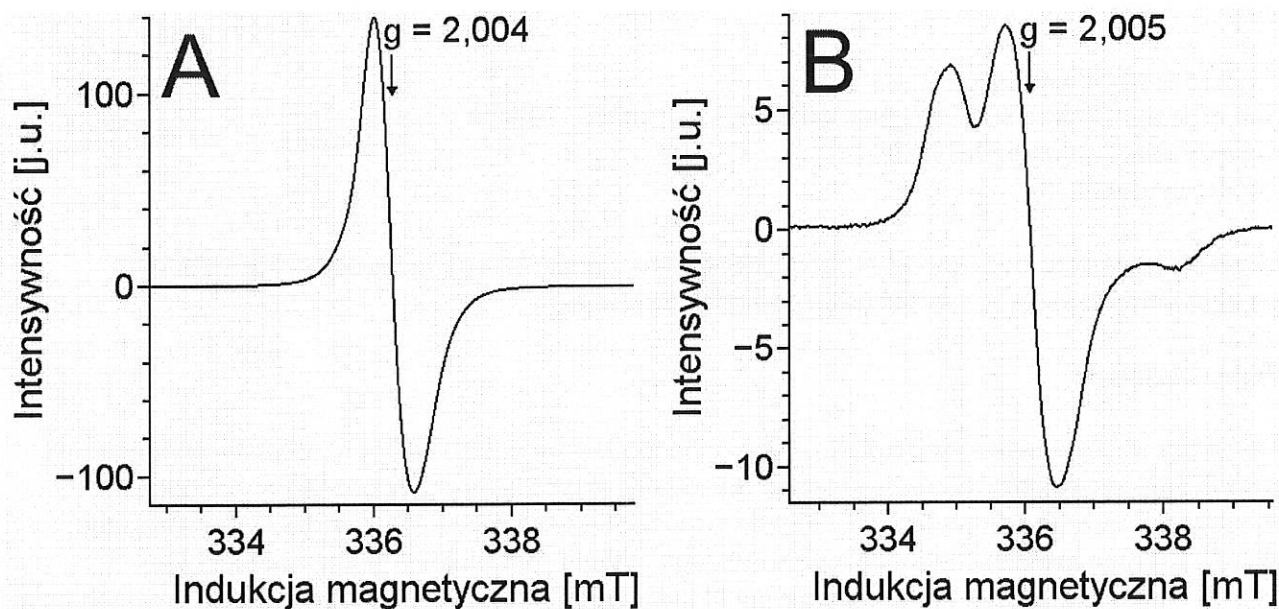
Wprowadzenie

Melaniny są pigmentami najbardziej rozpowszechnionymi w przyrodzie. Melaniny zwierzęce są przeważnie produktami oksydacyjnej polimeryzacji DOPA (3,4-dihydroksyfenyloalaniny). Większość naturalnych melanin występuje w postaci kopolimerów eumelaniny i feomelaniny. Odrębną grupę melanin stanowią neuromelaniny, które powstają w wyniku oksydacyjnej polimeryzacji dopaminy lub noradrenaliny (1). Eumelanina jest pigmentem czarnym powstałym w wyniku oksydacyjnej polimeryzacji wyłącznie DOPA. Jeżeli w środowisku reakcji znajduje się cysteina lub glutation to powstaje czerwona feomelanina. Podjednostkami charakterystycznymi dla eumelaniny są grupy 5,6-dihydroksyindolu (DHI) oraz kwasu 5,6-dihydroksyindol-2-karboksylowego (DHICA) (Rys. 1), w pełni utlenione formy chinonowe tych podjednostek oraz połowicznie utlenione formy semichinonowe. W feomelaninie występują podjednostki benzotiazynowe (BT) i benzotiazolowe (BZ) (Rys. 1), ich formy w pełni utlenione, a także formy semichinonowe. Dzięki równowadze komproporcjonacji, pomiędzy nierodnikowymi formami hydrochinonowymi i chinonowymi, a rodnikowymi formami semichinonowymi, melanina jest trwałą wolnym rodnikiem (2) i może być mierzona metodą spektroskopii elektronowej

rezonansu paramagnetycznego (EPR). Formy semichinonowe eumelaniny są rodnikami tlenocentrowymi. W paśmie X (~9.5 GHz) sygnał EPR tych rodników jest pojedynczą, trochę asymetryczną, linią o czynniku rozszczepienia spektroskopowego g równym 2,004 i szerokości 0,4 – 0,6 mT (Rys. 2A). W delokalizacji niesparowanego elektronu w rodnikach feomelaniny bierze udział atom azotu, a zatem sygnał EPR feomelaniny ulega rozszczepieniu na trzy linie. Całkowita szerokość sygnału EPR feomelaniny w paśmie X jest około 3 mT, a czynnik rozszczepienia spektroskopowego 2,005 (2) (Rys. 2B).



Rys. 1 Struktury podjednostek eumelaniny (DHI, DHICA) i feomelaniny (BT, BZ).



Rys. 2 Sygnały EPR eumelaniny (A) i feomelaniny (B) zarejestrowane w obecności 50 mM octanu cynku w temperaturze 77 K. Jako eumelaninę użyto syntetyczną melaninę uzyskaną w wyniku autooksydacji DOPA, natomiast modelem feomelaniny była syntetyczna melanina uzyskana na drodze enzymatycznego utlenienia 5-S-cysteinyli-DOPA.

Półprodukty syntezy melaniny są toksyczne dla żywych komórek, dlatego, w prawidłowych komórkach ssaków, melanina jest syntezowana w wyspecjalizowanych do tego obłonionych organellach – melanosomach (3) – zapewniających odseparowanie tych półproduktów od reszty komórki.

Melanina w skórze i w oczach człowieka pełni rolę fotoprotekcyjną – ekranuje promieniowanie słoneczne, głównie jego komponentę ultrafioletową i krótkofalową część światła widzialnego (4),(5),(6). Dotyczy to głównie eumelaniny. Badania w warunkach *in vitro* pokazały, że melanina wykazuje także właściwości przeciwutleniające, co może mieć znaczenie w ochronie upigmentowanych tkanek przed stresem oksydacyjnym (6),(7),(8),(9),(10),(11),(12),(13).

Melaninę w nabłonku upigmentowanym siatkówki (RPE) stanowi prawie wyłącznie eumelanina. Melanina w RPE jest syntezowana w czasie życia płodowego, natomiast po urodzeniu wykazuje bardzo mały, jeśli jakikolwiek, metabolizm (14). Zatem z wiekiem pigment ten może ulegać stopniowym oksydacyjnym modyfikacjom pod wpływem światła, tlenu oraz jonów metali przejściowych. Istotnie, wykazano spadek zawartości melaniny z wiekiem (15), a pozostała melanina wykazywała znaczne oksydacyjne modyfikacje, które mogą obniżać jej zdolności przeciwutleniające, a nawet powodować działanie proutleniające (16), (17), (18). Do badania zależnych od wieku modyfikacji melaniny zaproponowano prosty model fotostarzenia, w którym melanosomy z krowich lub świńskich RPE poddano działaniu intensywnego światła widzialnego (19), (20), (21). Badania te wykazały że melanosomy naświetlane światłem widzialnym traciły swoje właściwości przeciwutleniające, a nawet stawały się proutleniające. Jeżeli takie zmiany występują w ludzkim RPE *in situ* to mogą przyczyniać się do wzrostu fototoksyczności, która może prowadzić do zmian degeneracyjnych siatkówki.

Melanina w skórze jest syntezowana przez całe życie i usuwana ze złuszcżającym się naskórkiem. Jest zatem odnawiana i przez to mniej podatna na kumulację oksydacyjnych modyfikacji. Jednakże, niezależnie od stopnia pigmentacji, jedną czwartą melaniny naskórka stanowi feomelanina (22), która jest fotoreaktywna i bardziej niż eumelanina podatna na fotodegradację (23),(24),(25). Obecność tej melaniny może mieć istotną rolę w powstawaniu czerniaka skóry indukowanego bliskim promieniowaniem UV.

Tak więc, badanie oksydacyjnych modyfikacji melaniny może mieć kluczowe znaczenie w wyjaśnieniu etiologii zmian degeneracyjnych siatkówki i czerniaka skóry. Dotychczas takie modyfikacje były badane metodą spektroskopii EPR (15) oraz poprzez analizę chemiczną podjednostek melaniny (26),(27),(28).

Do podjęcia tematyki będącej przedmiotem niniejszego osiągnięcia naukowego zainspirowały mnie następujące osobliwości melaniny:

- Efektywne oddziaływanie dipol-dipolowe rodników melaniny z paramagnetycznymi jonami metali przejściowych, co prowadzi do silnego poszerzenia sygnału EPR melaniny (29).
- Stabilizacja rodnikowej formy melaniny przez diamagnetyczne jony metali przejściowych, w wyniku czego następuje przesunięcie równowagi komproporcjonacji w stronę formy rodnikowej i przez to wzrost sygnału EPR melaniny (30).
- Wysoce efektywne wygaszanie stanów elektronowo wzbudzonych kationowej pochodnej porfiryryny, tetra(4-N,N,N,N-trimetyloanilino)porfiryryny (TAP), przez melaninę (31).
- Silne przyspieszenie indukowanej nadtlaniem wodoru chemicznej degradacji melaniny przez jony żelaza i miedzi (32),(33).
- Zmniejszenie proutleniającego działania fotodegradowanych melanosomów przez dodatek deferoksaminy (20).

Ponadto w ostatnim czasie znacząco rozwinęła się wiedza o fotoreaktywności melaniny. Mianowicie, do niedawna uznawano że melanina nie jest zdolna do generowania tlenu singletowego. W związku z tym wydawało się że jedynym możliwym czynnikiem odpowiedzialnym za fotodegradację melaniny jest nadtlenek wodoru tworzony w wyniku dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego generowanego przez naświetlaną melaninę. Sytuacja zmieniła się w 2011 roku, kiedy wykazano, że melanina generuje tlen singletowy (34). Dalsze badania pozwoliły porównać wydajność tego procesu dla różnych typów melanin (35).

Celem niniejszego osiągnięcia naukowego było zbadanie oksydacyjnych modyfikacji melaniny przy pomocy wybranych jonów metali przejściowych i kationów organicznych.

Przedmiotem badania były następujące kwestie:

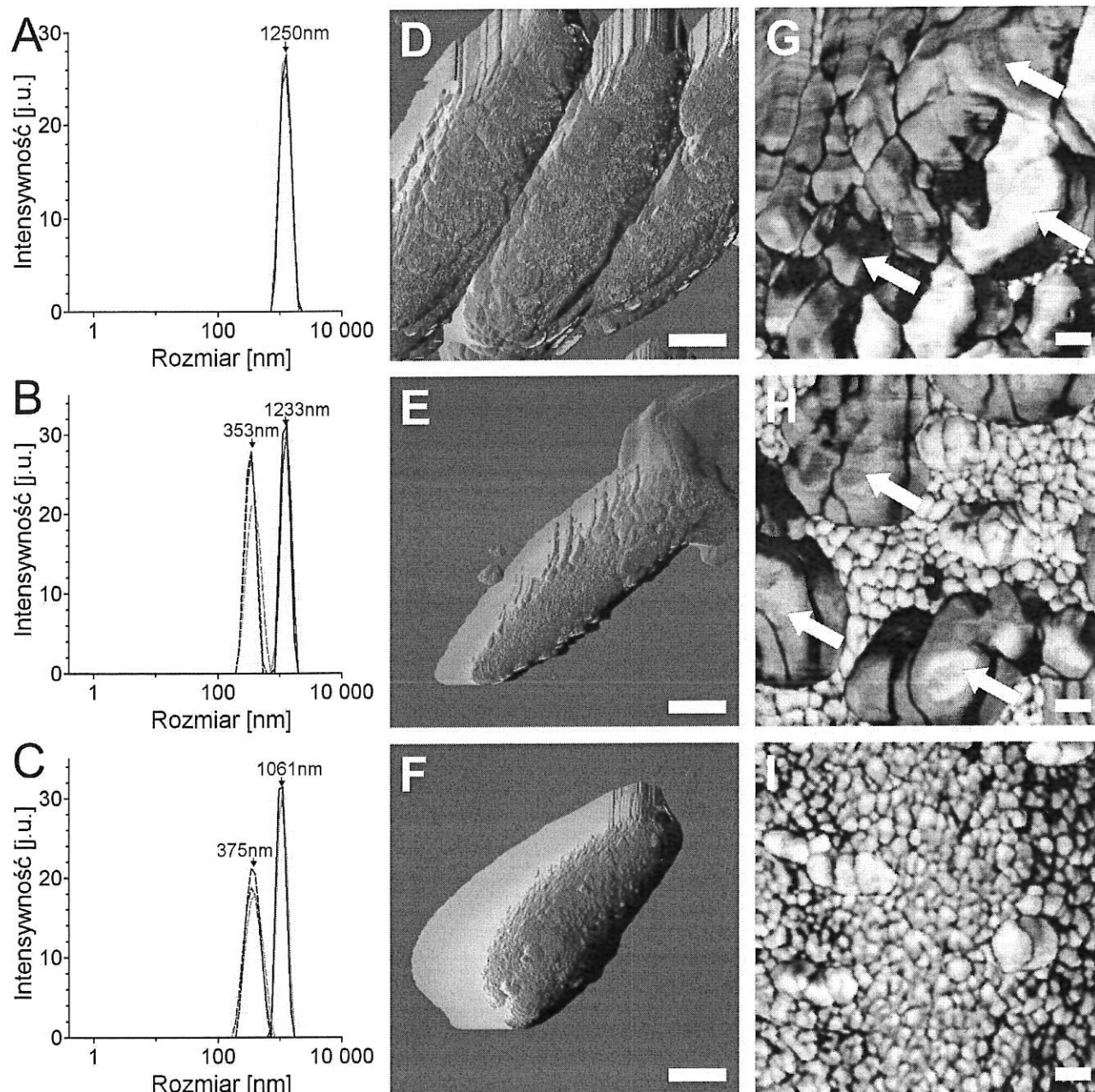
- Integralność strukturalna melanosomów
- Pojemność redokсова melaniny
- Modyfikacja chemiczna melaniny
- Działanie przeciwutleniające melaniny
- Mechanizm degradacji melaniny

Określenie wpływu fotodegradacji melanosomów na ich integralność (Zwięzły opis badań przedstawionych w publikacji: Photoaging of retinal pigment epithelial melanosomes: The effect of photobleaching on morphology and reactivity of the pigment granules, 2016, *Free Radical Biology and Medicine*, 97:320-329).

Nadrzędnym celem pracy było wyjaśnienie zależnych od wieku zmian właściwości antyutleniających i fotoprotekcyjnych melanosomów w ludzkim RPE poprzez zastosowanie odpowiedniego modelu zwierzęcego.

W niniejszej pracy zastosowano model fotostarzenia, w którym melanosomy z krowich RPE poddano działaniu intensywnego światła z zakresu 402 – 742 nm. Postęp fotodegradacji melaniny mierzono metodą spektroskopii EPR (15). Na podstawie pomiarów EPR przyjęto następujące stopnie fotodegradacji: melanosomy nie poddane fotodegradacji (Mel), melanosomy fotodegradowane o ubytku sygnału EPR około 20 % (PM-20) lub 50 % (PM-50). Rozmiar melanosomów mierzono metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Topografia powierzchni melanosomów była mierzona metodą mikroskopii sił atomowych (AFM) (36). Do badania indukowanych światłem modyfikacji melanosomów użyto także kationowe sondy molekularne takie jak: jony dysprozu (III), TEMPO-cholina i błękit metylenowy. Wpływ jonów dysprozu na czas relaksacji sygnału EPR melaniny mierzono metodą impulsowej spektroskopii EPR. Efektywność przechwytywania błękitu metylenowego przez melanosomy oznaczano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji nadsącza przy 664 nm. Wydajność generowania i czas życia tlenu singletowego badano poprzez czasowo-rozdzielczy pomiar fosforescencji tlenu singletowego. Fotosensybilizowana peroksydacja lipidów była wyznaczona pośrednio przez pomiar konsumpcji tlenu metodą tlenometrii EPR (20), (21), (37) oraz bezpośrednio testem jodometrycznym (38). Jako substrat peroksydacji użyto liposomy wielowarstwowe przygotowane z lipidów ekstrahowanych z siatkówek krowich.

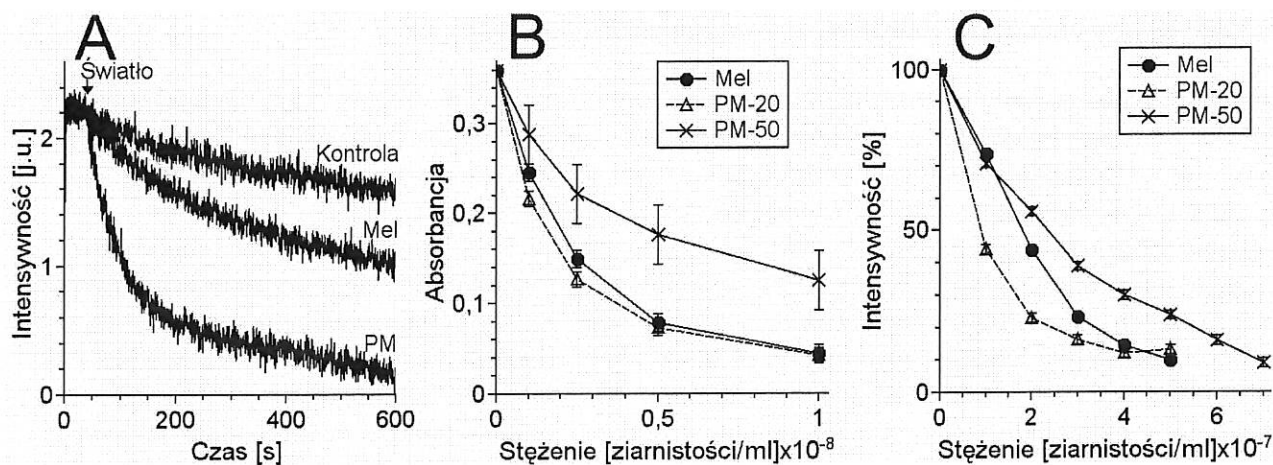
Pomiary DLS wykazały, że zastosowana w pracy fotodegradacja miała tylko nieznaczny wpływ na rozmiar melanosomów (Rys. 3A-C). Oznacza to że melanosomy nie uległy fragmentacji. W nadsączach z melanosomów degradowanych pojawiły się cząstki o rozmiarach pomiędzy 300 a 400 nm. Mikroskopia sił atomowych (AFM) pomogła ustalić że są to fragmenty błon lipidowych oderwanych od melanosomów. Na obrazkach AFM melanosomów nie degradowanych widoczne są takie struktury na powierzchni melanosomów (Rys. 3G-H). Ich liczba spada ze wzrostem stopnia degradacji. W przypadku PM-50 ich liczba jest bardzo niska, natomiast widoczne są znacznie mniejsze struktury o rozmiarze poniżej 50 nm, które mogą być uznane za nanoagregaty melaniny (39).



Rys. 3 Rozmiar i topografia powierzchni melanosomów. Lewa kolumna rysunku pokazuje rozkład rozmiaru uzyskany metodą DLS dla niedegradowanych melanosomów (A), melanosomów degradowanych wykazujących ubytek sygnału EPR 20 % (B) lub 50 % (C). Linia ciągła – melanosomy, linia przerywana – fragmenty lipidowe oderwane od melanosomów. Różnokolorowe linie oznaczają kolejne powtórzenia dla tej samej próbki. Prawa część rysunku pokazuje obrazki z AFM niedegradowanych melanosomów (D,G) oraz melanosomów degradowanych o ubytku sygnału 20 % (E,H) i 50 % (F,I). Słupek skali przedstawia długość 500 nm (D-F) lub 50 nm (G-I)

Chociaż sama fotodegradacja nie miała wpływu na czas relaksacji spin-sieć wolnych rodników melaniny, wiązanie jonów dysprozu (III) przez melaninę redukowało czas relaksacji czterokrotnie silniej w melanosomach degradowanych w porównaniu z melanosomami niedegradowanymi. Z wcześniejszych badań wynika, że fotodegradacja zmniejsza zdolność melanosomów do wiązania jonów metali (19). Zatem większy wpływ dysprozu na czas relaksacji rodników melaniny w degradowanych melanosomach wynika raczej ze zmniejszonej odległości pomiędzy jonami

dysprozu a centrami wolnorodnikowymi melaniny niż z większej pojemności wiążącej. Obserwowany efekt oznacza że struktura degradowanych melanosomów jest luźniejsza i centra rodnikowe są bardziej dostępne dla czynników zewnętrznych. W porównaniu z melanosomami niedegradowanymi, fotodegradowane melanosomy efektywniej przyspieszały fotoredukcję TEMPO-choliny (Rys. 4A). Ponadto, melanosomy lekko fotobłaknięte (PM-20) efektywniej przechwytywały błękit metylenowy niż melanosomy niedegradowane (Mel) (Rys. 4B). Różnica była dostrzegalna szczególnie przy niskim stężeniu melanosomów. Uzyskane wyniki pokazują, że fotodegradacja zwiększa ekspozycję podjednostek melaniny oraz że lekka degradacja nie ma istotnego wpływu na podjednostki wiążące błękit metylenowy. Z drugiej strony silniej degradowane melanosomy (PM-50) wykazywały zmniejszoną zdolność do przechwytywania błękitu metylenowego. Bardziej spektakularne wyniki uzyskano badając wpływ melanosomów na fosforescencję tlenu singletowego generowanego przez 8 μM błękit metylenowy wzbudzony światłem laserowym o długości fali 532 nm. Dla porównania zastosowano 0,6 μM róż bengalski, który w pH obojętnym ma ładunek ujemny i nie jest wiązany przez anionowy polimer melaniny. W przypadku różu bengalskiego melanosomy o stężeniu $5 \cdot 10^7$ ziarnistości/ml obniżały intensywność fosforescencji tlenu singletowego o 30 %. Jeżeli fotosensybilizatorem był błękit metylenowy to Mel wykazywały silne zależne od stężenia obniżenie wydajności generowania tlenu singletowego (Rys. 4C). Obserwowany efekt jest wynikiem wydajnego gaszenia stanów elektronowo wzbudzonych kationowego fotosensybilizatora związanego przez melaninę (31). Wpływ PM-20 na intensywność fosforescencji tlenu singletowego był znacznie silniejszy niż efekt Mel szczególnie przy niskich stężeniach melanosomów. Z drugiej strony, efektywność PM-50 była obniżona. Zależność efektywności skrócenia czasu życia tlenu singletowego od stopnia degradacji była mniej wyraźna.



Rys. 4 A – Kinetyka fotoredukcji TEMPO-choliny. Próbkę zawierającą 25 μM TEMPO-choliny bez (Kontrola) lub z $5 \cdot 10^8$ ziarnistości/ml były naświetlane światłem 402 – 508 nm (56 mW/cm^2). Ziarnistościami były melanosomy niedegradowane (Mel) lub fotodegradowane (PM). B – Absorbancja błękitu metylenowego jako funkcja stężenia melanosomów niedegradowanych (Mel), fotodegradowanych wykazujących ubytek sygnału EPR 20 % (PM-20) lub 50 % (PM-50). C – Początkowa intensywność fosforescencji tlenu singletowego jako funkcja stężenia melanosomów. Opis ziarnistości jak na rys. B.

PM-20 efektywniej niż Mel hamowały peroksydację lipidów fotosensybilizowaną błękitem metylenowym, natomiast działanie ochronne PM-50 było obniżone. Można przypuszczać że lekko zmodyfikowane oksydacyjnie melanosomy mogą efektywniej przechwytywać kationowe metabolity siatkówkowe, które mogą być fototoksyczne. Jednakże, w tej pracy należy to rozpatrywać przede wszystkim jako dodatkową, pośrednią metodę pomiaru efektywności przechwytywania błękitu metylenowego.

Osiągnięte wyniki prowadzą do następujących wniosków:

Lekka fotodegradacja melanosomów prowadzi do częściowej utraty błony lipidowej i rozluźnienia struktury melanosomu, co zwiększa ekspozycję podjednostek melaniny na czynniki zewnętrzne.

Silniejsza fotodegradacja melanosomów prowadzi do częściowego zniszczenia podjednostek melaniny.

Zastosowanie kationowych sond molekularnych jest pomocne w analizie morfologii i topografii melanosomów. Należy nadmienić że analiza przechwytywania błękitu metylenowego przez melanosomy jest metodą komplementarną do pomiarów DLS i AFM. Z pomiarów przechwytywania błękitu metylenowego można uzyskać informację zarówno o ekspozycji podjednostek melaniny jak również o ich natywności, natomiast nie jest możliwe sprawdzenie czy melanosomy nie ulegają fragmentacji. Z drugiej strony pomiary DLS i AFM pozwalają stwierdzić że zwiększona ekspozycja podjednostek melaniny nie wynika z fragmentacji melanosomów tylko z częściowej utraty błony lipidowej, ale nie można uzyskać informacji o stanie podjednostek melaniny.

Oszacowanie pojemności redoksowej, modyfikacji chemicznej i właściwości

przeciwutleniających melaniny degradowanej nadttlenkiem organicznym (Zwięzły opis badań przedstawionych w publikacji: Redox Active Transition Metal ions Make Melanin Susceptible to Chemical Degradation Induced by Organic Peroxide, **2017**, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 75:319-333).

Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych jonów metali przejściowych na podatność melaniny na modyfikację chemiczną indukowaną wodoronadtlenkiem tert-butyłu.

Dotychczasowe badania opierały się na założeniu że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za zależne od wieku modyfikacje melaniny w RPE jest światło. Należy zaznaczyć że komórki RPE, będące aktywnymi metabolicznie komórkami postmitotycznymi, gromadzą pigment starczy lipofuscynę. Uważa się że lipofuscyna zawiera produkty peroksydacji lipidów połączone wiązaniami krzyżowymi z białkami (40). Jedną z kluczowych ról komórek RPE jest fagocytoza zewnętrznych segmentów fotoreceptorów, które zawierają duże ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (41). Melanosomy w RPE, na skutek fuzji z lipofuscyą, tworzą ziarnistości zwane melanolipofuscyą. Można przypuszczać że w takich złożonych ziarnistościach melanina jest modyfikowana chemicznie przez nadttlenki lipidów pochodzące z lipofuscyny, a jony metali przejściowych mogą przyspieszać ten proces. Ponieważ nadttlenki lipidów są nierozpuszczalne w wodzie, w niniejszej pracy użyto wodoronadtlenek tert-butyłu (TBH) jako modelowy nadttlenek organiczny. Przedmiotem badania była syntetyczna, rozpuszczalna w wodzie, eumelanina przygotowana na drodze autooksydacji DOPA (DMA) (30) oraz melanosomy izolowane z krowich komórek RPE (BMs). Degradacji chemicznej, 1 M TBH, poddano zarówno melaniny bez dodatku jonów metali przejściowych, DMA wzbogaconą jonami żelaza, miedzi lub cynku oraz BMs wzbogacone jonami żelaza w ilości 1 % wagowych. Postęp degradacji melaniny oraz zmiany zawartości żelaza i miedzi mierzono metodą spektroskopii EPR (15). Pomiary EPR były wykonane zarówno w pH 7,4, jak również w pH 0 po odpłukaniu jonów metali, co było możliwe dzięki agregacji melaniny w niskim pH. Dodatkowo postęp degradacji rozpuszczalnej melaniny mierzono spektrofotometrycznie w pH 6.8 i 14. Rozmiar cząstek DMA był mierzony metodą DLS natomiast rozmiar i topografia powierzchni melanosomów były badane metodą AFM (36). Dla wybranych czasów degradacji, degradację BMs zatrzymywano poprzez ich zwirowanie i trzykrotne płukanie, natomiast degradację DMA zatrzymywano poprzez jej liofilizację. Właściwości przeciwutleniające

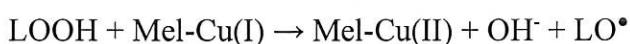
melanin określano poprzez badanie ich wpływu na indukowaną światłem (404 – 510 nm, 24 mW/cm²) peroksydację lipidów ekstrahowanych z siatekówek krowich. Lipidy te były podane do mieszaniny reakcyjnej w postaci liposomów wielowarstwowych. Peroksydacja lipidów była mierzona poprzez pomiar konsumpcji tlenu metodą tlenometrii EPR (20),(21),(37) oraz poprzez pomiar akumulacji nadtlenu lipidów metodą FOX (42). Metoda FOX była także stosowana do pomiarów rozkładu nadtlenu wodoru i TBH oraz do oznaczania pozostałości TBH po liofilizacji syntetycznej melaniny.

W przeciwieństwie do nadtlenu wodoru, nie zaobserwowano zdolności melanin do katalitycznego rozkładu TBH. Zatem nie należało spodziewać się zmiany kinetyki degradacji spowodowanej zmianą stężenia TBH gdyż był on w dwustu krotnym nadmiarze w porównaniu do melanin.

Żelazo i miedź silnie przyspieszały indukowaną TBH degradację DMA, przy czym żelazo było efektywniejsze niż miedź (Rys. 5). Podobny wpływ żelaza był obserwowany również w przypadku degradacji BMs. Taki wpływ redoksowo aktywnych jonów metali przejściowych wskazuje na rodnikowy mechanizm degradacji, w szczególności na rolę rodnika alkoksylowego (LO[•]) powstałego w reakcji typu Fentona:



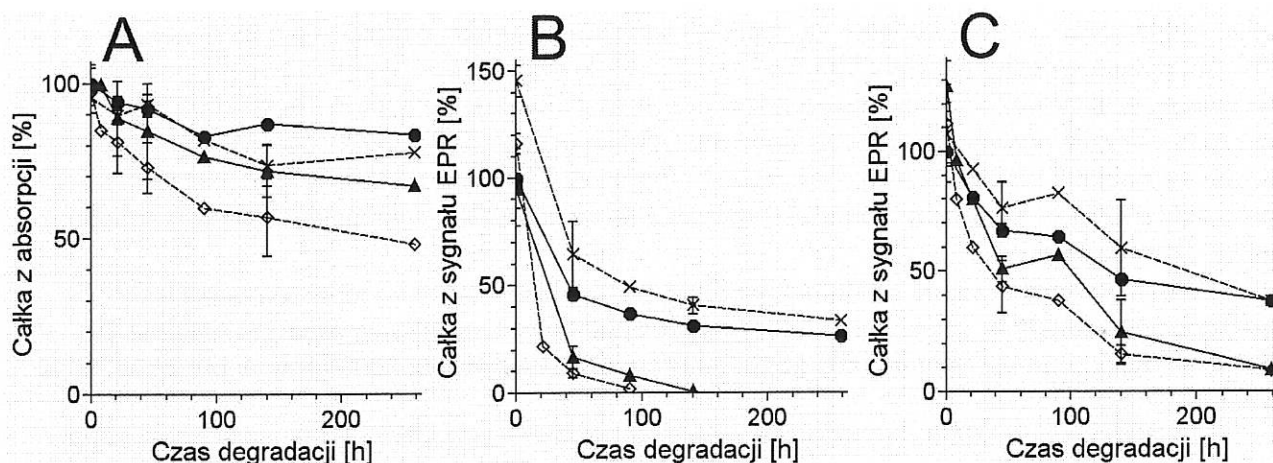
lub



gdzie LOOH to TBH (lub nadtlenek lipidu), a Mel-Fe(II), Mel-Fe(III), Mel-Cu(I) i Mel-Cu(II) to odpowiednio kompleksy żelaza (II), żelaza (III), miedzi (I) i miedzi (II) z melaniną. Spadek sygnału EPR melaniny był skorelowany ze spadkiem rozmiaru cząstek DMA oraz ze zmianami kształtu i rozmiaru BMs. Wskazuje to na fragmentację cząstek degradowanej melaniny i osłabione oddziaływanie nanocząstek melaniny z macierzą białkową w degradowanych melanosomach.

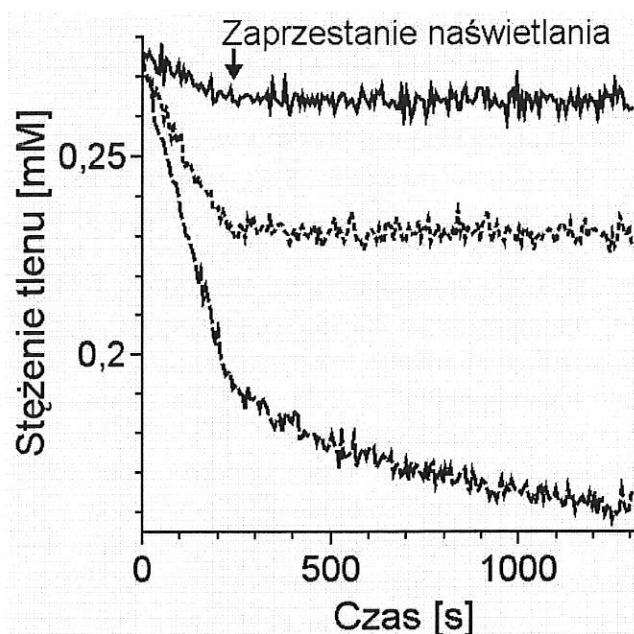
Pomiary EPR w pH 7,4 wykazały że indukowana TBH degradacja melanin z żelazem powodowała spadek sygnału EPR żelaza (III) skompleksowanego z melaniną. Wskazuje to na modyfikację chemiczną grup odpowiedzialnych za wiązanie żelaza. Z drugiej strony taka degradacja chemiczna melaniny z miedzią nie miała istotnego wpływu na całość sygnału EPR miedzi skompleksowanej z melaniną, a jedynie znikomy wpływ na charakterystyki tego sygnału.

Pomiary spektrofotometryczne melaniny w 1 M NaOH (Rys. 5A) były dobrze skorelowane z pomiarami EPR w pH 0 po odpłukaniu jonów metali (Rys 5C), chociaż sygnał EPR był bardziej czuły na degradację niż absorpcja optyczna. Z drugiej strony w pH 7,4 efekt żelaza i miedzi był najbardziej wyraźny (Rys. 5B). Ponadto, żelazo i miedź powodowały silne poszerzenie widma EPR melaniny. Należy pamiętać że w tym przypadku na wypadkowy sygnał ma silny wpływ oddziaływanie dipol-dipolowe rodników melaniny z paramagnetycznymi jonami żelaza i miedzi (29). Zatem miarodajne wyniki z pomiarów kinetyki degradacji melaniny są uzyskane z pomiarów spektrofotometrycznych (Rys. 5A) oraz z pomiarów EPR w pH 0 po odpłukaniu jonów metali (Rys. 5C). W tych warunkach widać brak wpływu cynku na szybkość chemicznej degradacji melaniny. Obserwowane na Rys. 5B zwiększenie sygnału EPR melaniny z cynkiem wynika ze stabilizacji rodnikowej formy melaniny przez diamagnetyczne jony cynku, w wyniku czego następuje przesunięcie równowagi komproporcjonacji w stronę formy rodnikowej (30). Co ciekawe, efekt cynku maleje ze wzrostem stopnia degradacji melaniny. Wskazuje to na spadek pojemności redoksowej tego polimeru.



Rys. 5 Zależne od czasu zmiany całki z absorpcji (A) oraz całki z sygnału EPR (B,C) DMA o stężeniu 1 mg/ml inkubowanej z 1M TBH w 37°C. A – pomiar spektrofotometryczny w buforze fosforanowym pH 6,8. B – pomiar EPR w PBS pH 7,4. C – pomiar EPR w 1 M kwasie solnym po odplukaniu jonów metali.

Same melaniny naświetlane światłem 404 – 510 nm (24 mW/cm^2) wykazywały słabą konsumpcję tlenu, która była niezależna od obecności jonów metali i stopnia degradacji. Naświetlanie samych wielowarstwowych liposomów z lipidów ekstrahowanych z siatekówek krowich również powodowało powolną ($0.044 \pm 0.005 \text{ } \mu\text{M/s}$) konsumpcję tlenu. Obserwowana konsumpcja tlenu w układzie zawierającym melaniny i liposomy była nałożeniem konsumpcji tlenu przez melaniny i konsumpcji tlenu związanej z peroksydacją lipidów. W celu obliczenia szybkości peroksydacji lipidów wyznaczono konsumpcję tlenu netto poprzez odjęcie konsumpcji tlenu w układzie zawierającym tylko melaninę od konsumpcji tlenu w układzie zawierającym odpowiednią melaninę i liposomy. W układzie zawierającym liposomy i niedegradowaną DMA konsumpcja tlenu netto była mniejsza niż konsumpcja tlenu w układzie zawierającym same liposomy, co wskazuje na hamowanie peroksydacji lipidów przez melaninę. Obecność jonów metali w niedegradowanej melaninie nie miała istotnego wpływu na obserwowane działanie przeciwutleniające. Degradacja melaniny bez jonów metali powodowała utratę właściwości przeciwutleniających melaniny. Ponadto degradowana TBH DMA z żelazem lub z miedzią przyspieszała konsumpcję tlenu netto, co wskazuje na działanie proutleniające. W przypadku DMA i BMs z żelazem efekt proutleniający był szczególnie silny i rósł prawie liniowo z czasem degradacji. Dwa mechanizmy mogą być odpowiedzialne za peroksydację lipidów w naświetlanym układzie zawierającym liposomy i melaninę degradowaną z żelazem. Pierwszy mechanizm to peroksydacja fotosensybilizowana retinoidami, które zapewne są obecne w ekstrakcie chloroformowym z siatekówek krowich. Drugim mechanizmem może być peroksydacja chemiczna indukowana reakcją typu Fentona. Aby rozdzielić te dwa mechanizmy, zmierzono konsumpcję tlenu w czasie naświetlania i bezpośrednio po zaprzestaniu naświetlania. Po zaprzestaniu naświetlania próbek zawierających same liposomy lub liposomy z degradowaną DMA, następowało całkowite zatrzymanie konsumpcji tlenu (Rys. 6). Z drugiej strony, w układzie zawierającym liposomy i DMA degradowaną DMA z żelazem obserwowano konsumpcję tlenu nawet po zaprzestaniu naświetlania, chociaż była to konsumpcja tlenu wolniejsza niż w naświetlanym układzie. Za tą ciemną konsumpcję tlenu odpowiada rodnikowa peroksydacja lipidów, w którą zaangażowany jest rodnik alkoksylowy generowany w reakcji typu Fentona. Obserwowane efekty wskazują że żelazo związane z degradowaną melaniną jest aktywne redoksovo oraz że degradowana melanina nie jest w stanie efektywnie zmiatać wolnych rodników.



Rys. 6 Konsumpcja tlenu w próbkach naświetlanych światłem (404 – 510 nm), a potem inkubowanych w ciemności. Próbki zawierały tylko liposomy (linia ciągła), liposomy z DMA bez żelaza degradowaną TBH przez 259 godzin (linia kropkowana) lub liposomy z DMA z żelazem degradowaną TBH przez 259 godzin (linia przerywana). Strzałka wskazuje czas zaprzestania naświetlania.

Bezpośrednie pomiary akumulacji nadtlenu lipidów wykazały że DMA degradowana z żelazem przyspieszała peroksydację lipidów w 22°C ale nie w 4°C, co potwierdza rodnikowy charakter peroksydacji.

Podsumowując:

Nadtlenki organiczne mogą powodować chemiczną degradację melaniny.

Melanosomy degradowane TBH wykazują istotne zmiany kształtu i topografii.

Degradacja indukowana TBH powoduje zmniejszenie pojemności redoksowej melaniny.

Należy podkreślić że pomiary EPR w pH 7,4 melaniny z cynkiem stały się prototypem zastosowania diamagnetycznych jonów cynku jako sondy molekularnej do określania pojemności redoksowej.

Redoksowo aktywne jony metali przejściowych, zwłaszcza żelazo, silnie przyspieszają degradację melaniny indukowaną TBH, co wskazuje na rodnikowy mechanizm tej degradacji.

Melanina degradowana TBH traci swoje właściwości przeciwutleniające.

Syntetyczna melanina i melanosomy wzbogacone w żelazo stają się proutleniające po degradacji TBH

Można przypuszczać że podobne oksydacyjne modyfikacje melaniny w ludzkim RPE następują w ziarnistościach melanolipofuscyny, co może zwiększać ryzyko stresu oksydacyjnego w zewnętrznej części siatkówki i przyczyniać się do zmian degeneracyjnych siatkówki.

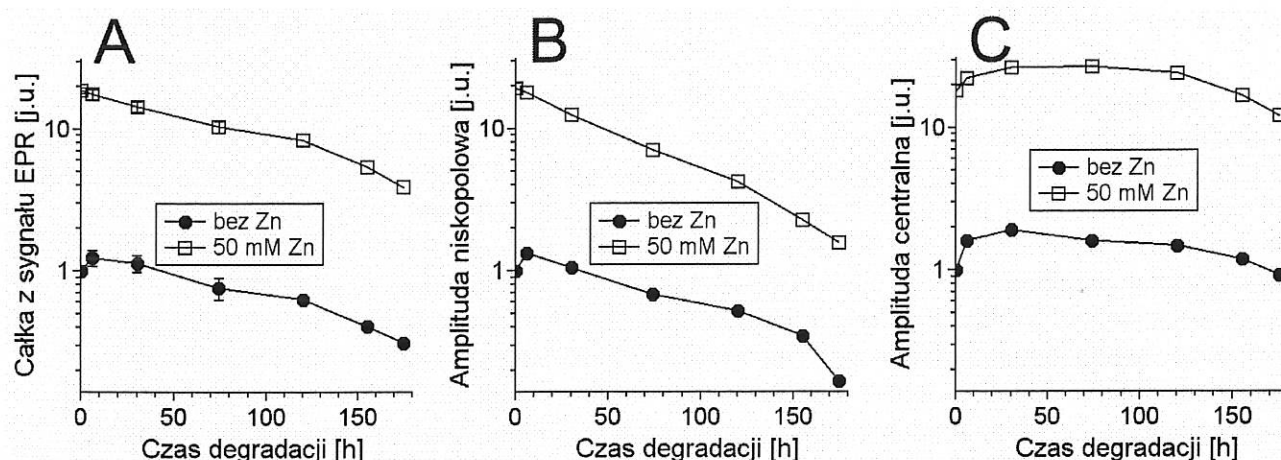
Określenie wpływu fotodegradacji feomelaniny na jej pojemność redoksową i analiza modyfikacji chemicznej w fotodegradowanej feomelaninie (Zwięzły opis badań

przedstawionych w publikacji: Photobleaching of pheomelanin increases its phototoxic potential: Physicochemical studies of synthetic pheomelanin subjected to aerobic photolysis, **2019**, *Pigment Cell Melanoma Research*, 32: 359-372)

Celem pracy było zbadanie właściwości chemicznych i fotochemicznych syntetycznej feomelaniny poddanej fotodegradacji krótkofalowym światłem widzialnym z komponentą bliskiego ultrafioletu.

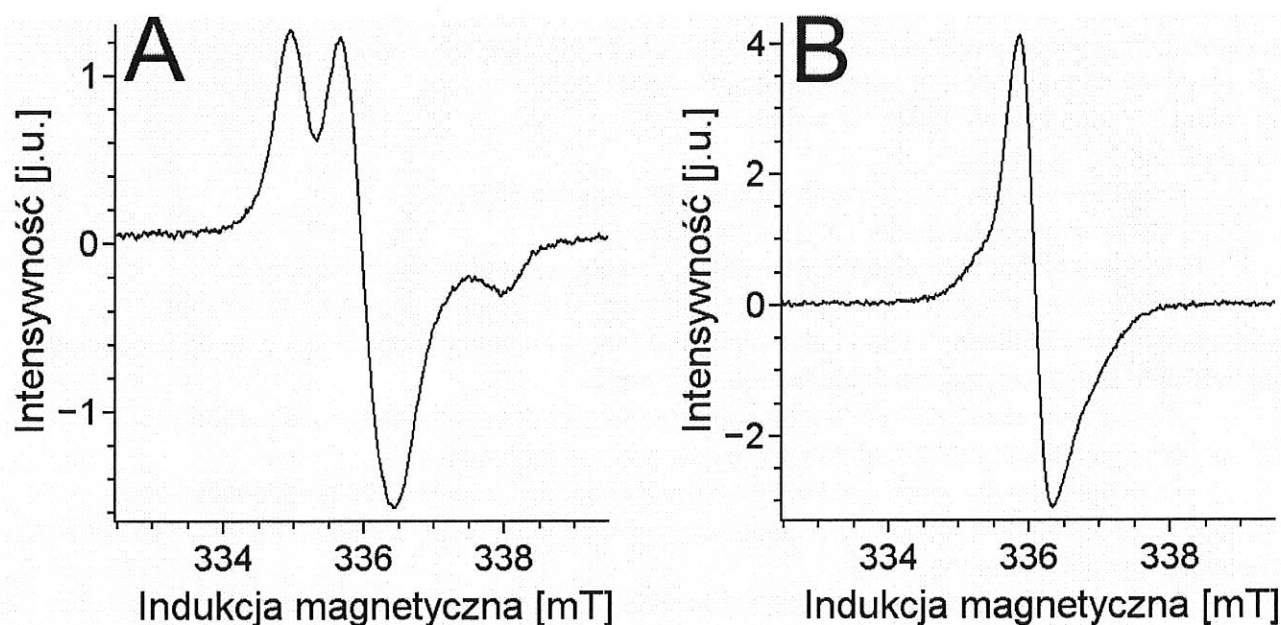
Problem fotoreaktywności feomelaniny dotyczy przede wszystkim skóry i włosów, gdzie występuje komponenta feomelaninowa. Niezależnie od stopnia pigmentacji skóry, feomelanina stanowi jedną czwartą całkowitej zawartości melaniny (22). O ile działanie ochronne przypisuje się przede wszystkim eumelaninie, to feomelaninę uważa się za fototoksyczną i mutagenną (43), (44), (45), (46). Naturalne feomelaniny zawierają komponentę eumelaninową, białka, lipidy i jony metali, co komplikuje analizę. Zatem w niniejszej pracy badano rozpuszczalną syntetyczną feomelaninę uzyskaną na drodze enzymatycznego utlenienia 5-S-cysteinylidopa (5SSD-M), którą poddano działaniu światła widzialnego z komponentą UV (326 – 502 nm). Postęp fotodegradacji mierzono metodą spektroskopii EPR (15) i spektrofotometrycznie. Dla wybranych stopni fotodegradacji wykonano pomiary EPR również w pasmie W. Metodą spektroskopii EPR mierzono także rodnikowe formy monomerów feomelaniny. Pomiary EPR wykonano w buforze octanowym o pH 5 bez cynku oraz w obecności 50 mM octanu cynku. Analizę chemiczną 5SSD-M i produktów jej fotodegradacji przeprowadzono metodą utleniania nadtlakiem wodoru w środowisku alkalicznym (26) i metodą hydrolizy w kwasie jodowodorowym (27). Hipotezy wysunięte na podstawie eksperymentów były potwierdzone obliczeniowo metodą DFT (47), (48). Fotoreaktywność niedegradowanej i fotodegradowanej 5SSD-M badano metodą tlenometrii EPR (20), (21), (37), metodą pułapkowania spinowego EPR i metodą czasowo-rozdzielczej detekcji tlenu singletowego (35). Rozmiar cząstek 5SSD-M badano metodą DLS oraz metodą AFM (36).

Fotodegradacja 5SSD-M powodowała spadek absorpcji optycznej poprzedzony przejściowym wzrostem na początkowym etapie fotodegradacji. W wyniku fotodegradacji zanika też charakterystyczne pasmo w przedziale 400-600 nm i widmo staje się monotoniczne co wskazuje na znaczną modyfikację chemiczną. Pomiary EPR bez cynku również wykazały przejściowy wzrost sygnału EPR, po którym następował stopniowy spadek tak że po 175 godzinach fotodegradacji całość z sygnału EPR była trzykrotnie mniejsza od sygnału wyjściowego (Rys. 7A). W obecności nasycających stężeń jonów cynku sygnał EPR melaniny jest ponad rząd wielkości intensywniejszy, co ułatwia analizę parametrów widma. Efekt cynku jest wynikiem przesunięcia równowagi komproporcjonacji w stronę formy rodnikowej (30). Pomiary w obecności jonów cynku nie wykazały przejściowego wzrostu sygnału EPR tylko szybki spadek, tak że po 175 godzinach sygnał EPR był pięciokrotnie niższy od wyjściowego. Taki malejący wpływ jonów cynku na sygnał EPR melaniny świadczy o fotoindukowanym zmniejszeniu pojemności redoksowej melaniny. Co ciekawe, pomiary EPR zarówno w obecności cynku jak również pod jego nieobecność wykazały że fotodegradacja powoduje zanik niskopolowej komponenty charakterystycznej dla feomelaniny (Rys. 7B,C) i po 175 godzinach fotodegradacji widmo EPR jest pojedynczą linią podobnie jak widmo eumelaniny. Z drugiej strony parametry widm EPR dogradowanej 5SSD-M uzyskane w pasmie W znacznie różnią się od widma eumelaniny. Chociaż w pasmie X sygnał EPR 5SSD-M degradowanej 175 godzin jest bardzo podobny do sygnału eumelaniny, anizotropia sygnału EPR w pasmie W jest znacznie większa niż anizotropia eumelaniny, co wyklucza eumelaninę. Również analiza chemiczna wskazuje na niski poziom podjednostek charakterystycznych dla eumelaniny. Analiza oparta na hydrolizie kwasem jodowodorowym (27) wykazuje że fotodegradacja powoduje szybki spadek podjednostek benzotiazynowych i benzotiazolowych charakterystycznych dla feomelaniny. Z drugiej strony, analiza chemiczna oparta na utlenieniu nadtlakiem wodoru w środowisku alkalicznym (26) wskazuje na wzrost zmodyfikowanych podjednostek benzotiazolu. Co ważne, zanik podjednostek benzotiazynowych jest dobrze skorelowany z zanikiem niskopolowej komponenty widma EPR, co wskazuje że za obserwowane rozszczepienie nadsubtelne odpowiadają podjednostki benzotiazynowe.



Rys. 7 Kinetyka zmian całki sygnału EPR (A), niskopolewej komponenty widma EPR (B), centralnej komponenty widma EPR (C) 5SCD-M naświetlanej światłem 326 – 502 nm; 1500 mW/cm².

Aby potwierdzić ten wniosek wykonano pomiary EPR na rodnikowych formach monomerów feomelaniny. Jako benzotiazynę użyto Kwas 7-(2-amino-2-karboksymetylo)-5-hydroksy-3,4-dihydro-2H-1,4-benzotiazyno-2-karboksylowy (DHBTCa), natomiast jako benzotiazol, 6-(2-amino-2-karboksymetylo)-4-hydroksy-benzotiazol (BZ-AA). Monomery te utleniono do form rodnikowych żelazicyjankiem potasu. Intensywność uzyskanych sygnałów EPR była znacznie podniesiona w obecności 40 mM octanu cynku dzięki stabilizacji formy rodnikowej (30). Rozszczepienie na atomie azotu, charakterystyczne dla feomelaniny było obserwowane tylko w przypadku utlenionego DHBTCa (Rys. 8A). Sygnał EPR produktu utlenienia BZ-AA był pojedynczą asymetryczną linią (Rys 8B) bardzo podobną sygnału fotodegradowanej 5SCD-M.



Rys. 8 Widma EPR rodników benzotiazynowego (A) i benzotiazolowego (B) uzyskanych poprzez utlenienie 5mM DHBTCa (A) oraz 5mM BZ-AA (B) 4 mM żelazicyjankiem potasu w obecności 40 mM octanu cynku.

Uzyskany wynik wskazuje że rodnik benzotiazolowy nie jest azocentrowy. Wniosek ten został potwierdzony metodą obliczeniową. Z rozkładu gęstości spinowej wynika że w rodnikowej formie

DHBTCA niesparowany elektron jest zlokalizowany głównie na atomie azotu, podczas gdy w rodnikowej formie BZ-AA niesparowany elektron jest zlokalizowany na atomie tlenu i węgla.

Modyfikacja chemiczna degradowanej 5SCD-M jest skorelowana ze zmniejszeniem rozmiaru nanoagregatów melaniny, co może być wynikiem ich rozkładu spowodowanego modyfikacją chemiczną monomerów 5SCD-M. Potencjał zeta niedegradowanej 5SCD-M był równy -18 mV, podczas gdy w degradowanej 5SCD-M stwierdzono 4 frakcje o różnych potencjałach zeta, co sugeruje uwalnianie mniejszych nanoagregatów. Te mniejsze nanoagregaty mogą wykazywać podwyższoną fotoreaktywność. Wraz ze stopniem fotodegradacji malała zdolność 5SCD-M do indukowanej światłem 404 – 510 nm konsumpcji tlenu i generowania anionorodnika ponadtlenkowego. Z drugiej strony, fotodegradacja 5SCD-M powodowała wzrost wydajności fotogenerowania tlenu singletowego. Ten wzrost wydajności był poprzedzony przejściowym spadkiem dobrze skorelowanym z przejściowym wzrostem sygnału EPR na początkowym etapie fotodegradacji. Podobny spadek wydajności generowania tlenu singletowego obserwowano dla niedegradowanej 5SCD-M utlenionej żelazicyjankiem potasu, co wskazuje że również w przypadku fotodegradacji obserwowany efekt wynika z utlenienia podjednostek 5SCD-M. Wzrostowi wydajności generowania tlenu singletowego na dalszych etapach degradacji 5SCD-M towarzyszył spadek zdolności tej melaniny do gaszenia tlenu singletowego generowanego przez egzogenne fotosensybilizator. Aby sprawdzić na ile obserwowany efekt wynika z modyfikacji chemicznej, sprawdzono zdolność DHBTCA i BZ-AA do generowania tlenu singletowego. Wykazano że wydajność generowania tlenu singletowego przez DHBTCA jest pięciokrotnie większa niż w przypadku BZ-AA. Jednocześnie DHBTCA gasił tlen singletowy znacznie efektywniej (dwucząsteczkowa stała gaszenia $4,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) niż BZ-AA ($6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Wyniki te potwierdzają że obserwowane efekty wynikają z zaniku podjednostek benzotiazynowych i pojawieniem się zmodyfikowanych podjednostek benzotiazolowych w 5SCD-M. Zarówno wzrost wydajności generowania tlenu singletowego jak również spadek zdolności do jego gaszenia przez degradowaną feomelaninę mogą mieć ogromne znaczenie biologiczne jeśli te efekty występują w ludzkiej skórze. Należy pamiętać że efekt fotoochronny melaniny wynika nie tylko z efektywnej dyssypacji energii zaabsorbowanego promieniowania, ale również z efektywnego usuwania reaktywnych form tlenu generowanych przez fotowzbudzaną melaninę. Jeśli reaktywne formy tlenu nie są efektywnie usuwane to mogą one wydostać się na zewnątrz ziaren melaniny i utlenić kluczowe składniki komórki upigmentowanej.

Uzyskane wyniki prowadzą do następujących wniosków:

Feomelanina jest niestabilna fotochemicznie.

Fotodegradacja feomelaniny prowadzi do utraty jej pojemności redoksowej.

Indukowana światłem modyfikacja chemiczna feomelaniny prowadzi do utraty jej podjednostek benzotiazynowych i natywnych podjednostek benzotiazolowych oraz do pojawienia się zmodyfikowanych podjednostek benzotiazolowych.

Rodnik benzotiazynowy jest azocentrowy, natomiast w rodniku benzotiazolowym niesparowany elektron jest zlokalizowany na atomie tlenu i węgla.

Fotodegradowana feomelanina wykazuje zwiększoną zdolność do generowania tlenu singletowego i obniżoną efektywność gaszenia tej reaktywnej formy tlenu, co wynika z modyfikacji chemicznej podjednostek melaniny.

Jeśli podobne zjawiska zachodzą w ludzkiej skórze to mogą prowadzić do wzrostu fototoksyczności fotodegradowanej feomelaniny.

Zbadanie stopnia ekspozycji i funkcjonalności podjednostek melaniny poddanej

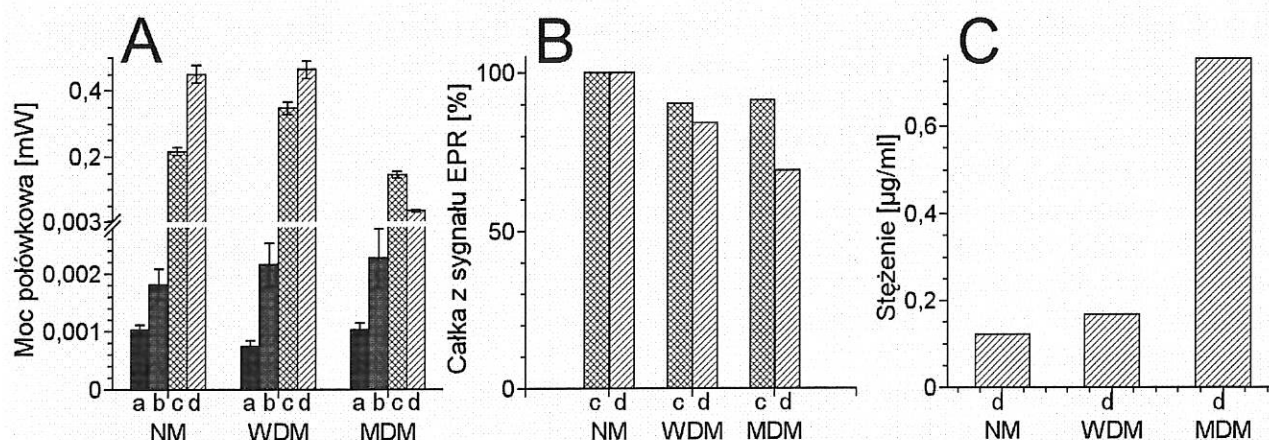
fotodegradacji (zwięzły opis prac przedstawionych w publikacji: Application of transition metal ions in study of photoinduced modifications of melanin, Acta Biochimica Polonica, **2019**, Przyjęta 26.04.2019)

Celem pracy było zbadanie fotoindukowanych modyfikacji melaniny przy pomocy żelaza i cynku jako sond molekularnych.

W niniejszej pracy posłużono się rozpuszczalną w wodzie syntetyczną melaniną uzyskaną na drodze autooksydacji DOPA (DMA), którą poddano fotodegradacji światłem 400 nm (265 mW/cm^2). Postęp fotodegradacji monitorowano metodą spektroskopii EPR w pH 0. Do dalszych eksperymentów użyto melaninę o następujących stopniach degradacji: natywna melanina (NM) – melanina nienaświetlana lekko degradowana melanina (WDM) – melanina wykazująca 19 % ubytku sygnału EPR oraz umiarkowanie degradowana melanina (MDM) – melanina odznaczająca się 55 % spadkiem sygnału EPR. Jony metali przejściowych dodawano do próbek melaniny po zakończeniu fotodegradacji. Wpływ tlenu, żelaza i cynku na parametry sygnału EPR melaniny badano w buforze octanowym o pH 5. Pomiary warunkach anaerobowych wykonano tylko dla próbek bez jonów metali przejściowych. Badanymi parametrami była szerokość połówkowa ($B_{1/2}$) czyli odległość pomiędzy ekstremami pierwszej pochodnej oraz moc połówkowa ($P_{1/2}$) czyli moc mikrofal, przy której amplituda pierwszej pochodnej stanowi połowę amplitudy jaka by była gdyby sygnał nie nasyczał się. W celu zminimalizowania efektu nasycenia, $B_{1/2}$ była wyznaczana przy najmniejszej stosowanej mocy mikrofal ($0,265 \mu\text{W}$). $P_{1/2}$ była wyznaczana na podstawie wykresu zależności amplitudy pierwszej pochodnej od pierwiastka z mocy mikrofal, do którego dopasowywano zależność: $f(x) = A \cdot x \cdot [1 + (2^{1/\varepsilon} - 1) \cdot x^2 / P_{1/2}]^{-\varepsilon}$ (49), gdzie x to jest pierwiastek z mocy mikrofal, $f(x)$ to amplituda pierwszej pochodnej, A to początkowe nachylenie krzywej nasycenia, ε to współczynnik homogeniczności. Efektowność wiązania żelaza badano metodą spektroskopii EPR. Uwolnione żelazo oznaczano w nadsącu ze zagregowanej melaniny z cynkiem metodą rodankową (50).

Tlen miał istotny wpływ na nasycalność sygnału EPR melaniny. Moc połówkowa dla melaniny nie degradowanej była 1,8 krotnie wyższa w warunkach tlenowych niż w warunkach beztlenowych (Rys. 9A). Jednakże fotodegradacja nie miała istotnego wpływu na efekt tlenu. Paramagnetyczne jony żelaza (III) miały silny wpływ zarówno na szerokość sygnału melaniny jak również na jego nasycalność. Obserwowany efekt jest skutkiem efektywnego oddziaływania dipol-dipolowego rodników melaniny z paramagnetycznymi jonami żelaza (29). Wraz ze wzrostem stopnia degradacji wpływ żelaza na szerokość sygnału EPR nieznacznie malał, co może świadczyć o rosnącym udziale paramagnetycznych podjednostek niezdolnych do wiązania żelaza. Wpływ żelaza na nasycalność sygnału EPR był zwiększony w przypadku lekko degradowanej melaniny (WDM). O ile żelazo zwiększało moc połówkową dla melaniny nie degradowanej (NM) 119 krotnie to w przypadku WDM efekt ten był 161 krotny, co wskazuje na zwiększoną ekspozycję podjednostek WDM na czynniki zewnętrzne. Ta zwiększona ekspozycja może być efektem zmniejszonego rozmiaru nanoagregatów melaniny (51) lub ich zwiększonej hydrofilowości. Z drugiej strony, w przypadku melaniny degradowanej umiarkowanie (MDM), żelazo zwiększało moc połówkową tylko 63-krotnie. Efekt ten sugeruje że w przypadku MDM część żelaza jest związana z innymi grupami niż w NM. Jony cynku zwiększały sygnał EPR NM z żelazem 10-krotnie w porównaniu do NM tylko z żelazem. Dzieje się tak dzięki stabilizacji rodnikowej formy melaniny przez diamagnetyczne jony cynku, w wyniku czego następuje przesunięcie równowagi komproporcjonacji w stronę formy rodnikowej (30). W przypadku MDM z żelazem efekt cynku był tylko czterokrotny, co wskazuje na obniżoną pojemność redoksową tej melaniny. Co ciekawe, przy

niskiej mocy mikrofal ($0,265\mu\text{W}$) sygnał EPR MDM z żelazem i cynkiem był dużo węższy niż analogiczny sygnał EPR uzyskany dla NM oraz niż sygnał uzyskany przy $0,265\text{ mW}$. Efekt ten nie był obserwowany pod nieobecność cynku. Jeśli nie był dodany cynk to sygnał EPR żelaza był porównywalny dla wszystkich badanych próbek, co wskazuje że, w badanym przedziale fotodegradacji, wszystkie próbki są w stanie wiązać praktycznie całe dodane żelazo niezależnie od stopnia degradacji (Rys.9B). Z drugiej strony, w obecności cynku, sygnał EPR żelaza związanego przez MDM jest o 30 % mniejszy. Metodą rodankową wykazano że w obecności cynku ilość żelaza uwolnionego przez NM i WDM nie przekracza 3,4 % całkowitej ilości dodanego żelaza, podczas gdy dodanie cynku do MDM powodowało uwolnienie 30 % dodanego żelaza (Rys. 9C), co wskazuje że wiązanie żelaza przez degradowaną melaninę jest słabe i niespecyficzne. W NM żelazo jest wiązane przez orto-fenolowe grupy hydroksylowe (52). Oksydacyjna degradacja melaniny prowadzi do niszczenia podjednostek melaniny poprzez otwieranie pierścieni i tworzenie grup karboksylowych (32). Można przypuszczać że te grupy karboksylowe uczestniczą w słabym i niespecyficznym wiązaniu jonów żelaza, które mogą być łatwo wyparte przez inne kationy. Jeżeli takie modyfikacje melaniny występują w ludzkim RPE to mogą zwiększać ryzyko uwalniania żelaza związanego w ciągu życia i wywołać działanie protleniające, które może przyczynić się do zmian degeneracyjnych siatkówki.



Rys 9. A – moc połówkowa, B – sygnał EPR żelaza (III) związanego z melaniną, C – stężenie żelaza w nadsączy z melaniny z żelazem i cynkiem. NM – natywna melanina, WDM – lekko degradowana melanina, MDM – umiarkowanie degradowana melanina. Pomiary wykonane w warunkach anaerobowych bez jonów metali przejściowych (słupki a), w warunkach aerobowych bez jonów metali przejściowych (słupki b), w warunkach aerobowych z żelazem (słupki c) oraz w warunkach aerobowych z żelazem i z cynkiem (słupki d). Pomiary EPR wykonano w 77 K.

Uzyskane wyniki prowadzą do następujących wniosków:

Lekka fotodegradacja zwiększa ekspozycję podjednostek melaniny na czynniki zewnętrzne, podczas gdy silniejsza fotodegradacja powoduje niszczenie podjednostek melaniny.

Grupy karboksylowe powstające z oksydacyjnie modyfikowanych podjednostek melaniny mogą brać udział w wiązaniu jonów metali przejściowych przez degradowaną melaninę. Takie wiązanie jest słabe i niespecyficzne. Jeśli takie modyfikacje mają miejsce w ludzkim RPE to mogą przyczyniać się do schorzeń siatkówki.

Najważniejsze wnioski płynące z publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

Zastosownie jonów metali przejściowych i kationów organicznych wraz z pomiarami fizykochemicznymi i metodami obliczeniowymi pozwoliło wykazać że:

- Fotodegradacja melanosomów powoduje utratę błony lipidowej, co zwiększa ekspozycję podjednostek melaniny
- Zwiększenie ekspozycji podjednostek melaniny może być również efektem zwiększonej hydrofilowości lub zmniejszonego całkowitego rozmiaru cząstki degradowanej melaniny. Jednakże wydaje się że w przypadku naturalnych melanin ma znaczenie drugorzędne.
- Pojemność redoksowa melaniny spada z jej stopniem degradacji.
- Fotodegradacja feomelaniny powoduje utratę podjednostek benzotiazynowych i natywnych podjednostek benzotiazolowych oraz tworzenie zmodyfikowanych podjednostek benzotiazolowych
- Rodniki benzotiazynowe są azocentrowe, natomiast w rodnikach benzotiazolowych niesparowany elektron jest zlokalizowany na atomach tlenu i węgla
- Melanina degradowana traci swoje właściwości przeciwutleniające, a nawet staje się proutleniająca niezależnie od drogi degradacji.
- Uzyskane wyniki potwierdzają postulat o ochronnym działaniu melaniny w komórkach upigmentowanych poprzez wiązanie aktywnych redoksowo jonów metali. Ten mechanizm ochronny zanika w przypadku degradowanej melaniny, w której to wiązanie jest słabe i niespecyficzne.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza moimi pracami wymienionymi w części przedstawiającej osiągnięcie wynikające 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 (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.) jestem współautorem 23 prac (w tym jednej pracy przeglądowej).

Prace dotyczące modulującej roli melaniny w stresie oksydacyjnym siatkówki

W pierwszej i czwartej z wymienionych prac badano wpływ kontrolowanego naświetlania melanosomów na ich właściwości przeciwutleniające. Indukowana degradacja wywołana światłem była modelem fotostarzenia melanosomów w ludzkim RPE. Właściwości przeciwutleniające melanosomów badano poprzez ich wpływ na peroksydację lipidów ekstrahowanych z siatkówek krowich. W pierwszej pracy peroksydacja lipidów była indukowana żelazem (III), które w celu zapoczątkowania peroksydacji lipidów było redukowane kwasem askorbinowym. W czwartej pracy peroksydacja lipidów była fotosensybilizowana różem bengalskim lub indukowana silnym światłem z komponentą niebieską w układzie bez egzogennych fotouczulaczy. Opisane badania wykazały, że w układzie ze specyficznym wzbudzonym różem bengalskim, melanosomy natywne wykazują umiarkowaną zdolność do hamowania peroksydacji lipidów, natomiast melanosomy fotodegradowane tracą tę zdolność. W układzie z żelazem oraz w układzie naświetlanym silnym światłem z komponentą niebieską, melanosomy natywne wykazywały wyraźne działanie przeciwutleniające, natomiast melanosomy fotodegradowane działały proutleniająco. Wyniki tych prac stały się podstawą do przygotowania rozprawy doktorskiej.

Druga praca była pracą przeglądową opisującą dytychczasowy stan wiedzy na temat działania przeciwutleniającego i proutleniającego melanin.

Celem badań opisanych w trzeciej pracy było sprawdzenie, czy związany z wiekiem wzrost fotoreaktywności ludzkich melanosomów siatkówki może powodować fototoksyczność dla komórek nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE). Wyniki tych badań pokazują, że starzejące się

melanosomy mogą być fototoksyczne dla ludzkich komórek RPE, co sugeruje rolę melanosomów w starzeniu się RPE i w patogenezie związanego z wiekiem zwyrodnienia plamki żółtej.

W piątej pracy badano zdolność melanosomów do wiązania żelaza w żywej komórce. Wyniki wskazują, że żelazo wcześniej dodane do melanosomów nie jest uwalniane w komórce, a żelazo dostarczane do komórek przez pożywkę hodowlaną jest akumulowane w melanosomach. Ponadto wzbogacenie melanosomów w żelazo nie wpływa na ich zdolności ochronne przed stresem oksydacyjnym indukowanym nadtlaniem wodoru.

W szóstej pracy porównywano modyfikacje chemiczne syntetycznych eumelanin indukowane promieniowaniem UV z modyfikacjami chemicznymi w ludzkich melanocytach napromienianych UVA, w melanosomach z krowich RPE naświetlanych światłem niebieskim oraz w melanosomach izolowanych z ludzkich RPE z różnych grup wiekowych. Wyniki wskazują, że stosunek PTCA/PTCA jest czułym markerem utleniania eumelaniny ekspozowanej na promieniowanie UVA lub światło niebieskie i że melaniny w ludzkich komórkach RPE ulegają rozległym modyfikacjom strukturalnym pod wpływem długotrwałej ekspozycji na niebieskie światło.

1. Zadło A, Rozanowska MB, Burke JM, Sarna TJ (2007) Photobleaching of retinal pigment epithelium melanosomes reduces their ability to inhibit iron-induced peroxidation of lipids. *Pigment Cell Res.* 20:52-60.
2. Sarna T, Szewczyk G, Zadło A (2008) Melanin and Oxidative Reactions w Free Radicals in Ophthalmic Disorders, M Zierhut, E Cadenas, N Rao, eds (New York, Informa Healthcare USA, Inc.) pp. 147-158.
3. Rozanowski B, Cuenco J, Davies S, Shamsi FA, Żądło A, Dayhaw-Barker P, Rózanowska M, Sarna T, Boulton ME (2008) The phototoxicity of aged human retinal melanosomes. *Photochem Photobiol.* 84:650-657.
4. Zadło A, Burke JM, Sarna T (2009) Effect of untreated and photobleached bovine RPE melanosomes on the photoinduced peroxidation of lipids. *Photochem Photobiol Sci.* 8:830-837
5. Kaczara P, Zareba M, Herrnreiter A, Skumatz CM, Żądło A, Sarna T, Burke JM (2012) Melanosome-iron interactions within retinal pigment epithelium-derived cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25:804-814
6. Ito S, Pilat A, Gerwat W, Skumatz CM, Ito M, Kiyono A, Zadło A, Nakanishi Y, Kolbe L, Burke JM, Sarna T, Wakamatsu K (2013) Photoaging of human retinal pigment epithelium is accompanied by oxidative modifications of its eumelanin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 26:357-366

Inne prace dotyczące modulującej roli melaniny w stresie oksydacyjnym

Zawartość neuromelaniny w istocie czarnej mózgu naczelnych rośnie z wiekiem (1). Chociaż nie jest jasne czy neuromelanina działa ochronnie czy toksycznie, u osób z chorobą Parkinsona zawartość neuromelaniny jest ponad dwukrotnie mniejsza niż u osób zdrowych w tym samym wieku (53).

W pierwszej z wymienionych prac badano interakcje neuromelaniny z ludzką istotą czarną z żelazem w obecności kwasu askorbinowego, dopaminy i nadtlenu wodoru. Wykazano, że w zastosowanych układach modelowych neuromelanina wykazuje działanie przeciwutleniające,

co wskazuje że *in situ* może działać neuroprotekcynie. Z drugiej strony neuromelanina skompleksowana z żelazem była całkowicie degradowana w obecności nadtlenu wodoru, a szybkość degradacji zależała od zawartości żelaza. Takie procesy mogą zachodzić w chorobie Parkinsona gdy pozaneuronalne kompleksy melanina z żelazem są fagocytowane przez komórki mikrogleju.

W drugiej z wymienionych prac badano modyfikacje chemiczne melaniny, jakie mogą występować w ludzkiej skórze w czasie opalania indukowanego promieniowaniem UVA. Co ważne, ciemnienie skóry indukowane promieniowaniem UVA nie wynika ze stymulacji melanogenezy tylko z utlenienia istniejącej melaniny (54). W niniejszej pracy użyto syntetyczną eumelaninę uzyskaną na drodze enzymatycznego utlenienia DHICA (DHICA-M). Wyniki pokazują że naświetlanie promieniowaniem UVA indukuje utlenienie DHICA do kwasu indolo-5,6-chinono-2-karboksylowego, który jest następnie rozszczepiany do podjednostek pirolowych i ostatecznie do wolnego PTCA. W ten proces może być zaangażowany zarówno anionorodnik ponadtlenkowy jak również tlen singletowy. Czasowo-rozdzielcze pomiary fosforescencji tlenu singletowego potwierdziły zarówno generowanie jak też gaszenie tej reaktywnej formy tlenu przez DHICA-M.

W trzeciej z wymienionych prac badano fotoreaktywność syntetycznych eumelanin i feomelanin. Wszystkie badane melaniny wykazywały zdolność do indukowanego światłem generowania anionorodnika ponadtlenkowego z różną wydajnością. Chociaż wydajność generowania tlenu singletowego była niska w zakresie światła widzialnego to znacznie wzrastała w zakresie UV. Badane melaniny wykazywały wysoką zdolność do chemicznego gaszenia tlenu singletowego, co może być powodem ich podatności na fotodegradację.

1. Zecca L, Casella L, Albertini A, Bellei C, Zucca FA, Engelen M, Zadło A, Szewczyk G, Zareba M, Sarna T (2008) Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. *J Neurochem.* 106:1866-1875
2. Ito S, Kikuta M, Koike S, Szewczyk G, Sarna M, Zadło A, Sarna T, Wakamatsu K (2016) Roles of reactive oxygen species in UVA-induced oxidation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid-melanin as studied by differential spectrophotometric method. *Pigment Cell Melanoma Res.* 29:340-351.
3. Szewczyk G, Zadło A, Sarna M, Ito S, Wakamatsu K, Sarna T. (2016) Aerobic photoreactivity of synthetic eumelanins and pheomelanins: generation of singlet oxygen and superoxide anion. *Pigment Cell Melanoma Res.* 29:669-678.

Prace dotyczące wpływu melaniny na właściwości mechaniczne komórek upigmentowanych

Czerniak jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów odznaczających się wysoką śmiertelnością gdy jest diagnozowany na późnych etapach rozwoju (55). Dlatego nowe metody ułatwiające diagnozę na wczesnym etapie zwiększają szanse wyleczenia.

W pierwszej z wymienionych prac zbadano wpływ melaniny na elastyczność ludzkich komórek czerniaka. Uzyskane wyniki wskazują, że melanina znacząco zwiększa sztywność upigmentowanych komórek czerniaka, co kwestionuje paradygmat, że wszystkie komórki nowotworowe są bardziej miękkie niż ich normalne odpowiedniki.

W drugim artykule po raz pierwszy pokazano, że melanosomy hamują zdolności transmigracyjne komórek czerniaka w sposób zależny od ilości ziarnistości. Ten efekt ma charakter

mechaniczny. Uzyskane dane pokazują znaczenie elastyczności komórek w skuteczności przerzutowania komórek czerniaka *in vivo*.

Wyniki czwartej pracy jasno pokazują bezpośredni związek właściwości mechanicznych komórek czerniaka z ich zdolnością do przerzutowania.

W trzeciej pracy analizowano wpływ melanosomów na właściwości mechaniczne komórek RPE. Wykazano że ziarnistości melaniny zwiększają sztywność komórek RPE, co może mieć kluczowe znaczenie w prawidłowej funkcji RPE, który oddziela siatkówkę od naczyńówki.

1. Sarna M, Zadło A, Pilat A, Olchawa M, Gkogkolou P, Burda K, Böhm M, Sarna T (2013) Nanomechanical analysis of pigmented human melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 26:727-730.
2. Sarna M, Zadło A, Hermanowicz P, Madeja Z, Burda K, Sarna T (2014) Cell elasticity is an important indicator of the metastatic phenotype of melanoma cells. *Exp Dermatol.* 23:813-818
3. Sarna M, Olchawa M, Zadło A, Wnuk D, Sarna T (2017) The nanomechanical role of melanin granules in the retinal pigment epithelium. *Nanomedicine.* 13:801-807.
4. Sarna M, Zadło A, Czuba-Pelech B, Urbanska K (2018) Nanomechanical Phenotype of Melanoma Cells Depends Solely on the Amount of Endogenous Pigment in the Cells. *Int J Mol Sci.* 19. pii: E607

Prace dotyczące potencjalnych czynników modyfikujących melanogenezę

Celem przedstawionej pracy było zbadanie wpływu naturalnego, łagodnego i względnie nieszkodliwego czynnika, jakim jest kurkumina, na melanogenezę w komórkach czerniaka B16F10. Nie wykazano zdolności kurkuminy do zmiany proporcji pomiędzy eumelaniną a feomelaniną, a jedynie w pewnych warunkach, do obniżenia ogólnego poziomu syntezy melaniny.

1. Wolnicka-Głubisz A, Nogal K, Żądło A, Płonka PM (2015) Curcumin does not switch melanin synthesis towards pheomelanin in B16F10 cells. *Arch Dermatol Res.* 307:89-98.

Prace dotyczące potencjalnego zastosowania fotosensybilizatorów w terapii fotodynamicznej nowotworów i zakażeń bakteryjnych

W trzech pierwszych pracach badano potencjalne zastosowanie pseudohalogenków w zwiększaniu skuteczności fotosensybilizowanej błękitem metylenowym terapii fotodynamicznej zakażeń bakteryjnych.

W pierwszej z wymienionych prac wykazano, że azydek sodu umożliwił fotosensybilizowane zabijanie komórek bakteryjnych nawet w warunkach beztlenowych. Za obserwowany efekt odpowiadał rodnik azydkowy tworzony w wyniku bezpośredniego oddziaływania z tripletem błękitu metylenowego.

W drugiej pracy wykazano zdolność rodanku sodu do potęgowania fotodynamicznego zabijania bakterii. Działo się tak dzięki oddziaływaniu rodanku z tlenem singletowym, co ostatecznie prowadziło do powstawania rodnika siarczynowego.

W trzeciej pracy potęgujący efekt tiocyjanianu potasu przypisano tworzeniu selenocyjanogenu.

W czwartej pracy badano zdolność funkcjonalizowanych fulerenów i modyfikowanych powierzchniowo tlenków tytanu do indukowania fotosensybilizowanej peroksydacji lipidów w układzie liposomalnym oraz w hodowlach komórkowych. Wykazano, że fulereny indukują peroksydację lipidów zarówno na drodze rodnikowej jak również poprzez tlen singletowy, podczas gdy modyfikowane powierzchniowo tlenki tytanu indukują peroksydację lipidów wyłącznie na drodze rodnikowej.

1. Huang L, St Denis TG, Xuan Y, Huang YY, Tanaka M, Zadło A, Sarna T, Hamblin MR (2012) Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide: role of ambient oxygen and azide radicals. *Free Radic Biol Med.* 53:2062-2071
2. 5. St Denis TG, Vecchio D, Zadło A, Rineh A, Sadasivam M, Avci P, Huang L, Kozinska A, Chandran R, Sarna T, Hamblin MR (2013) Thiocyanate potentiates antimicrobial photodynamic therapy: in situ generation of the sulfur trioxide radical anion by singlet oxygen. *Free Radic Biol Med.* 65:800-810
3. Huang L, Xuan W, Zadło A, Kozinska A, Sarna T, Hamblin MR (2018) Antimicrobial photodynamic inactivation is potentiated by the addition of selenocyanate: Possible involvement of selenocyanogen? *J Biophotonics.* 11:e201800029
4. Kozinska A, Zadło A, Labuz P, Broniec A, Pabisz P, Sarna T (2019) The Ability of Functionalized Fullerenes and Surface-Modified TiO₂ Nanoparticles to Photosensitize Peroxidation of Lipids in Selected Model Systems. *Photochem Photobiol.* 95:227-236.

Prace dotyczące peroksydacji lipidów

Celem pierwszej pracy była weryfikacja postulowanej roli przeciwutleniającej plazmalogów – naturalnie występujących glicerofosfolipidów z grupą winylowoeterową w pozycji sn-1. Nie wykazano zdolności plazmalogenów do ochrony lipidów przed peroksydacją. Jedynie zaobserwowano wewnątrzcząsteczkowe działanie ochronne grupy winylowoeterowej w nienasyconym plazmalogenie. Dane te kwestionują rolę plazmalogenów jako przeciwutleniaczy.

Nadrzędnym celem drugiej pracy było zbadanie potencjalnej fototoksyczności utlenionych lipidów w siatkówce oka ludzkiego. W niniejszej pracy posłużono się modelem zwierzęcym – lipidami wyekstrahowanymi z siatkówek oczu krowich, których skład jest bardzo podobny do składu lipidów w siatkówce oka ludzkiego. Lipidy te poddano kontrolowanej peroksydacji. Wykazano zależny od stopnia peroksydacji wzrost fotoreaktywności tych lipidów, szczególnie wzrost fotogenerowania anionorodnika ponadtlenkowego.

1. 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.
2. 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.* 75:443-454.

Inne prace

Spektroskopia EPR i pomiary DLS we współpracy z osobami z innych zakładów zaowocowały trzema różnotematycznymi publikacjami.

1. Szymańska R, Kołodziej K, Ślesak I, Zimak-Piekarczyk P, Orzechowska A, Gabruk M, Żądło A, Habina I, Knap W, Burda K, Kruk J (2016) Titanium dioxide nanoparticles (100-1000 mg/l) can affect vitamin E response in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Pollut.* 213:957-965.
2. Gajos K, Kamińska A, Awsiuk K, Bajor A, Gruszczyński K, Pawlak A, Żądło A, Kowalik A, Budkowski A, Stępień E (2017) Immobilization and detection of platelet-derived extracellular vesicles on functionalized silicon substrate: cytometric and spectrometric approach. *Anal Bioanal Chem.* 409:1109-1119.
3. Nowicka B, Żądło A, Pluciński B, Kruk J, Kuczyńska P (2017) The oxidative stress in allelopathy: Participation of prenyl lipid antioxidants in the response to juglone in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry.* 144:171-179.

Dydaktyka

Byłem promotorem jednej pracy magisterskiej

Imię i nazwisko magistranta: Michał Dziekan

Tytuł pracy magisterskiej: Analiza zmian fotoreaktywności produktów utlenienia lipidów w zależności od stopnia nienasycenia kwasów tłuszczowych

Data nadania stopnia magistra: 25. 06. 2010

Zajęcia dydaktyczne

Kursy, w ramach których prowadziłem wykłady:

Fotobiofizyka widzenia i fotouszkodzenie oka (BT242)

Kursy, w ramach których prowadziłem wykłady i ćwiczenia:

Egzo- i endogenne przeciwutleniacze, a zdrowie i wieczna młodość (BT275)

Kursy, w ramach których prowadziłem ćwiczenia:

Biofizyka (BT308)

Biofizyka (BT233)

Biofizyka (BT267)

Biofizyka (WBT-084Z)

Fotobiofizyka (BT315)

Nowoczesne metody biologii na poziomie molekularnym (BT201)

Wprowadzenie do fotobiologii (BT325)

Biologia strukturalna błon (BT168)

Wykorzystanie liposomów do transportu leków (BT146)

Podsumowując, mój dorobek naukowy obejmuje:

26 artykułów z listy filadelfijskiej w tym 4 stanowiące podstawę osiągnięcia naukowego.

Łączny IF: 107,784

1 praca przeglądowa opublikowana jako rozdział w książce

h-index: 12, liczba cytowań: 424, bez autocytowań: 377

Udział w 6 międzynarodowych konferencjach naukowych w tym w 5 w formie wykładu

Współautorstwo wyników do 24 międzynarodowych konferencjach naukowych

Wypromowanie jednej pracy magisterskiej

Recenzja jednego artykułu naukowego

Literatura

1. Zecca L, Zucca FA, Wilms H, Sulzer D (2003) Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* 26(11):578–580.
2. Sarna TJ, Swartz HA (2006) The physical properties of melanins. *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*, eds James J Nordlund, et al. (Blackwell Publishing Ltd, Malden, MA, USA), pp 311–341.
3. Seiji M, Fitzpatrick TB, Birbeck MS (1961) The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J Invest Dermatol* 36:243–252.
4. Meredith P, Sarna T (2006) The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment Cell Res* 19(6):572–594.
5. Brenner M, Hearing VJ (2008) The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol* 84(3):539–549.
6. d'Ischia M, et al. (2015) Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. *Pigment Cell Melanoma Res* 28(5):520–544.
7. Ostrovsky MA, Sakina NL, Dontsov AE (1987) An antioxidative role of ocular screening pigments. *Vision Res* 27(6):893–899.
8. Sarna T, Pilas B, Land EJ, Truscott TG (1986) Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochim Biophys Acta* 883(1):162–167.
9. Sealy RC, Sarna T, Wanner EJ, Reszka K (1984) Photosensitization of melanin: an electron spin resonance study of sensitized radical production and oxygen consumption. *Photochem Photobiol* 40(4):453–459.
10. Korytowski W, Sarna T, Zarba M (1995) Antioxidant action of neuromelanin: the mechanism of inhibitory effect on lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 319(1):142–148.
11. Zareba M, Bober A, Korytowski W, Zecca L, Sarna T (1995) The effect of a synthetic neuromelanin on yield of free hydroxyl radicals generated in model systems. *Biochim Biophys Acta* 1271(2–3):343–348.

12. Rózanowska M, Sarna T, Land EJ, Truscott TG (1999) Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radic Biol Med* 26(5–6):518–525.
13. Kaczara P, et al. (2012) Melanosome-iron interactions within retinal pigment epithelium-derived cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 25(6):804–814.
14. Sarna T (1992) Properties and function of the ocular melanin--a photobiophysical view. *J Photochem Photobiol B, Biol* 12(3):215–258.
15. Sarna T, et al. (2003) Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. *Exp Eye Res* 76(1):89–98.
16. Rózanowska M, et al. (2002) Photoreactivity of aged human RPE melanosomes: a comparison with lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(7):2088–2096.
17. Rózanowski B, et al. (2008) The phototoxicity of aged human retinal melanosomes. *Photochem Photobiol* 84(3):650–657.
18. Ito S, et al. (2013) Photoaging of human retinal pigment epithelium is accompanied by oxidative modifications of its eumelanin. *Pigment Cell Melanoma Res* 26(3):357–366.
19. Zareba M, et al. (2006) Effects of photodegradation on the physical and antioxidant properties of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium. *Photochem Photobiol* 82(4):1024–1029.
20. Zadło A, Rozanowska MB, Burke JM, Sarna TJ (2007) Photobleaching of retinal pigment epithelium melanosomes reduces their ability to inhibit iron-induced peroxidation of lipids. *Pigment Cell Res* 20(1):52–60.
21. Zadło A, Burke JM, Sarna T (2009) Effect of untreated and photobleached bovine RPE melanosomes on the photoinduced peroxidation of lipids. *Photochem Photobiol Sci* 8(6):830–837.
22. Del Bino S, et al. (2015) Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio. *Pigment Cell Melanoma Res* 28(6):707–717.
23. Wenczl E, et al. (1998) (Pheo)melanin photosensitizes UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol* 111(4):678–682.
24. Chedekel MR (1982) Photochemistry and photobiology of epidermal melanins. *Photochem Photobiol* 35(6):881–885.
25. Greco G, et al. (2009) Isomeric cysteinyl dopas provide a (photo)degradable bulk component and a robust structural element in red human hair pheomelanin. *Pigment Cell Melanoma Res* 22(3):319–327.
26. Ito S, et al. (2011) Usefulness of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin in various tissue samples: application to chemical analysis of human hair melanins. *Pigment Cell Melanoma Res* 24(4):605–613.

27. Wakamatsu K, Nakanishi Y, Miyazaki N, Kolbe L, Ito S (2012) UVA-induced oxidative degradation of melanins: fission of indole moiety in eumelanin and conversion to benzothiazole moiety in pheomelanin. *Pigment Cell Melanoma Res* 25(4):434–445.
28. Ozeki H, Ito S, Wakamatsu K, Thody AJ (1996) Spectrophotometric characterization of eumelanin and pheomelanin in hair. *Pigment Cell Res* 9(5):265–270.
29. Sarna T, Hyde JS, Swartz HM (1976) Ion-exchange in melanin: an electron spin resonance study with lanthanide probes. *Science* 192(4244):1132–1134.
30. Felix CC, Hyde JS, Sarna T, Sealy RC (1978) Interactions of melanin with metal ions. Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metal ions with free radicals. *J Am Chem Soc* 100(12):3922–3926.
31. Ye T, Simon JD, Sarna T (2003) Ultrafast energy transfer from bound tetra(4-N,N,N,N-trimethylanilinium)porphyrin to synthetic dopa and cysteinyl-dopa melanins. *Photochem Photobiol* 77(1):1–4.
32. Korytowski W, Sarna T (1990) Bleaching of melanin pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of synthetic dopa-melanin. *J Biol Chem* 265(21):12410–12416.
33. Zecca L, et al. (2008) Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. *J Neurochem* 106(4):1866–1875.
34. Chiarelli-Neto O, et al. (2011) Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. *Free Radic Biol Med* 51(6):1195–1202.
35. Szewczyk G, et al. (2016) Aerobic photoreactivity of synthetic eumelanins and pheomelanins: generation of singlet oxygen and superoxide anion. *Pigment Cell Melanoma Res* 29(6):669–678.
36. Wytrwal M, et al. (2015) Gene delivery efficiency and intracellular trafficking of novel poly(allylamine) derivatives. *Int J Pharm* 478(1):372–382.
37. Rózanowska M, et al. (1995) Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species. *J Biol Chem* 270(32):18825–18830.
38. Cheeseman KH (1990) Methods of Measuring Lipid Peroxidation in Biological Systems: An Overview. *Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids*, NATO ASI Series., eds de Paulet AC, Douste-Blazy L, Paoletti R (Springer US, New York, NY), pp 143–152.
39. Simon JD, Hong L, Peles DN (2008) Insights into melanosomes and melanin from some interesting spatial and temporal properties. *J Phys Chem B* 112(42):13201–13217.
40. Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine* (OUP Oxford).
41. Strauss O (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85(3):845–881.

42. Kaczara P, Sarna T, Burke JM (2010) Dynamics of H₂O₂ availability to ARPE-19 cultures in models of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 48(8):1064–1070.
43. Pilas B, Felix CC, Sarna T, Kalyanaraman B (1986) Photolysis of pheomelanin precursors: an ESR-spin trapping study. *Photochem Photobiol* 44(6):689–696.
44. Koch WH, Chedekel MR (1987) Photochemistry and photobiology of melanogenic metabolites: formation of free radicals. *Photochem Photobiol* 46(2):229–238.
45. Kvam E, Dahle J (2004) Melanin synthesis may sensitize melanocytes to oxidative DNA damage by ultraviolet A radiation and protect melanocytes from direct DNA damage by ultraviolet B radiation. *Pigment Cell Res* 17(5):549–550.
46. Takeuchi S, et al. (2004) Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(42):15076–15081.
47. Fonseca Guerra C, Snijders JG, te Velde G, Baerends EJ (1998) Towards an order-N DFT method. *Theor Chem Acc* 99(6):391–403.
48. Velde G te, et al. (2001) Chemistry with ADF. *Journal of Computational Chemistry* 22(9):931–967.
49. Altenbach C, Greenhalgh DA, Khorana HG, Hubbell WL (1994) A collision gradient method to determine the immersion depth of nitroxides in lipid bilayers: application to spin-labeled mutants of bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(5):1667–1671.
50. Luke CL (1966) New spectrophotometric thiocyanate determination of iron in metals, alloys, acids and salts. *Analytica Chimica Acta* 36:122–129.
51. Żądło A, Pilat A, Sarna M, Pawlak A, Sarna T (2017) Redox Active Transition Metal ions Make Melanin Susceptible to Chemical Degradation Induced by Organic Peroxide. *Cell Biochem Biophys* 75(3–4):319–333.
52. Sarna T, Korytowski W, Pasenkiewicz-Gierula M, Gudowska E (1981) Ion-exchange studies in melanins. *Proceedings of the 11th International Pigment Cell Conference, Sendai*, ed Seiji M (University of Tokyo Press, Tokyo), pp 23–29.
53. Zecca L, et al. (2002) The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 510(3):216–220.
54. Miyamura Y, et al. (2011) The deceptive nature of UVA tanning versus the modest protective effects of UVB tanning on human skin. *Pigment Cell Melanoma Res* 24(1):136–147.
55. Jemal A, et al. (2006) Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56(2):106–130.

Andrzej Żądło