

BARBARA BILIŃSKA, JERZY SZAFLIK
i ALEKSANDRA KOCHANKA-DZIUROWICZAnaliza spektroskopowa IR
melanin izolowanych z oczu
ssakówINFRARED SPECTROSCOPY OF MELANINS
ISOLATED FROM MAMMALIAN EYES

Comparative IR spectra of melanins isolated from choroid epithelium of human being, cattle and pig eyes were analyzed. Characteristic bands of IR melanin spectra are: 1600 cm^{-1} , about 1700 cm^{-1} , 2860 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} with shoulder 2960 cm^{-1} and broad band at about 3400 cm^{-1} . The presence of bands groups in the region: $1400\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ characteristic for the natural melanins was shown. Analysis of the obtained IR spectra of melanins indicates that there melanins are eumelanins.

HASŁA: melanina z oczu bydłęcych, melanina z oczu świni, melanina z oczu człowieka, widma IR melanin
KEY WORDS: melanin from cattle eyes, melanin from pig eyes, melanin from human eyes, IR spectra of melanin

teriałem wyjściowym dla każdej próbki była błona naczyniowa gałek ocznych danego osobnika. Każdą porcję materiału wyjściowego przemywano wodą destylowaną kilkakrotnie i trawiono w stężonym HCl przez 6-10 dni. Następnie przemywano wodą destylowaną poprzez wirowanie ($2000\text{--}5000\text{ obr./min.}$), aż do otrzymania obojętnego odczynu i nieobecności jonów chlorkowych (reakcja z 0.1N AgNO_3).

Melaninę z oczu krowy oraz oczu świni izolowano łącznie z wszystkimi upigmentowanymi częściami gałki metodą trawienia w stężonym kwasie solnym. Sposób postępowania był identyczny jak to opisano powyżej. Melaninę wyizolowaną z oczu świni poddano po hydrolyzie w stężonym HCl dodatkowo hydrolyzie w 6N HCl przez 24 h na gorąco.

Melaninę z naczyniówki i tęczówki oczu krowy otrzymano metodą Nicolauisa¹¹.

Melaniny syntetyczne z DOPA i dopaminy otrzymano metodą autooksydacji opisaną przez Swana¹². Melaninę z tyrozyny otrzymano metodą utleniania w obecności wyciągu z ziemniaka zawierającego tyrozinazę. Poddano ją hydrolyzie w 6N HCl przez 24 h. Wszystkie próbki przechowywano w eksykatorze nad CaCl_2 lub P_2O_5 . Probki do badań IR preparowano w postaci pastylek z KBr (melanina z oczu ludzkich: $0,5\text{--}1\text{ mg}/700\text{ mg KBr}$; melanina z oczu krowy i z oczu świni oraz melaniny syntetyczne: $2\text{ mg}/700\text{ mg KBr}$). Widma IR rejestrowano przy pomocy spektrofotometrów: UR-10 i UR-20 (Carl Zeiss, Jena) w zakresie widma $4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Widma IR melanin wyizolowanych z oczu człowieka, krowy i świni przedstawia ryc. 1. Wszystkie te widma wykazują bardzo duże podobieństwo. Dotyczy to szczególnie melanin wyizolowanych z oczu świni i krowy. Różnią się one tylko natężeniem pasm: 1700 cm^{-1} , 2860 cm^{-1} i 2930 cm^{-1} . Widmo melaniny z oczu człowieka

MELANINA jako biopolimer występuje na wszystkich filogenetycznych etapach rozwoju organizmów. W upigmentowanym nabłonku gałki ocznej melanina jest zlokalizowana w specjalnych wewnątrzkomórkowych strukturach w postaci melaniny związanej z białkiem. Melanina występuje w gałce ocznej w bardzo małych ilościach w przeliczeniu na wagę gałki, co stanowi dużą przeszkodę w prowadzeniu badań. Melaniny pełnią w siatkówce funkcję ekranującą i antyutleniającą; ich nieobecność w gałce ocznej, np. u ludzi albinosów, powoduje pogorszenie ostrości wzroku¹².

Badania Watta i wspólr.¹⁴ przeprowadzone na oczach chomika wykazały średnią zawartość melaniny — $0,45\%$ w przeliczeniu na wagę całej gałki. Wyniki omawianej pracy wskazują, że oczy chomika, czerniak chomika i inne, dobrze upigmentowane czerniaki zwierzęce zawierały od $0,3$ do $0,8\%$ melaniny w przeliczeniu na masę tkanki¹⁴. W naszych badaniach otrzymywaliśmy z jednej pary oczu ludzkich około $0,5\text{--}1\text{ mg}$ melaniny. Wykazano, że ziarna melaniny wyizolowane z oczu żaby mają postać wyciągniętej elipsoidy o rozmiarach $1 \times 1 \times 2\ \mu\text{m}$, a badania ugięcia promieni rentgenowskich pod małymi kątami potwierdziły, że w ziarenkach melanina—białko, uporządkowanymi strukturami są makrocząsteczki białka chronione melaniną⁶. Są one powtarzającymi się podjednostkami, a ich sposób upakowania jest podobny jak dla cieczy⁶. Informacje tego typu mogą mieć znaczenie przy badaniu właściwości fotofizycznych melanin i ich kompleksów z białkiem, co wiąże się z poznaniem procesów widzenia.

Badania melaniny występującej w oczach zwierząt i ludzi prowadzone są głównie w kierunku jej właściwości kompleksujących z różnymi lekami podawanymi chorym w chorobach oczu lub innych, o których wiadomo, że wywołują zaburzenia widzenia.

Badania struktury melaniny z gałek oczu ludzkich zostały podjęte przez Menona i wspólr.⁷⁻⁹ i uwzględniają zależności niektórych właściwości od barwy oczu. Autorzy ci zastosowali spektroskopię IR, UV-VIS, analizę elementarną oraz modyfikację chemiczną niektórymi metabolitami i lekami, m.in. chlorpromazyną, protoporfiryną i paraquatem. Badali również właściwości oksydacyjno-redukcyjne i fotobiologiczne.

Interpretację widma IR melaniny otrzymanej z oczu wolicz oraz L-DOPA dla różnych wartości pH oraz w zależności od stopnia jej wysuszenia opracowali Bridelli i wspólr.⁴. Widmo IR melaniny z oczu kur przedstawił Mikulski¹⁰.

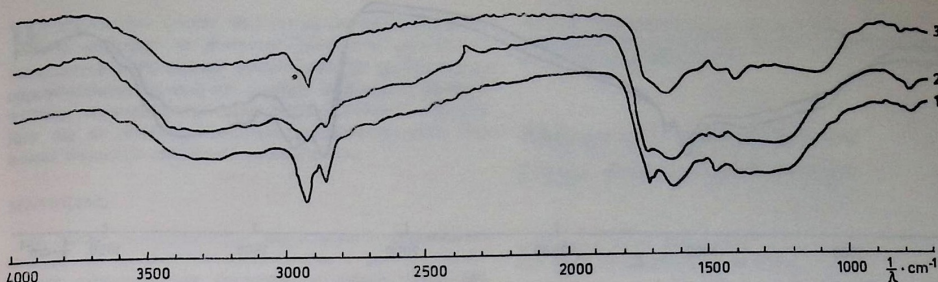
Celem pracy była porównawcza analiza widm w podczerwieni melanin wyizolowanych z oczu człowieka, oczu krowy i oczu świni dla oceny struktury melanin pochodzących od różnych dawców. Jako melaniny modelowe obrano melaniny syntetyczne otrzymane drogą oksydacyjnej polimerizacji z DOPA i dopaminy oraz utleniania enzymatycznego tyrozyny.

MATERIAŁ I METODYKA

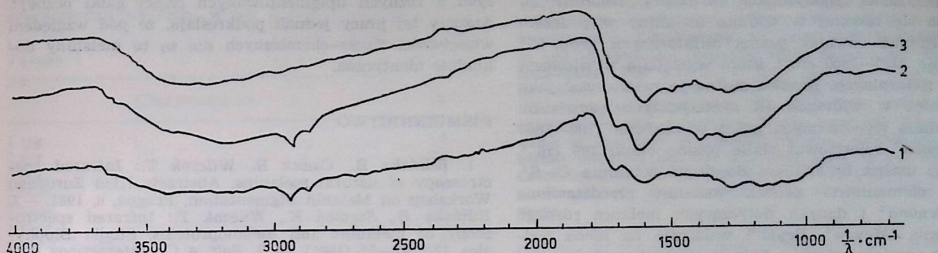
Melaninę izolowano z tęczówki i naczyniówki oczu ludzkich otrzymywanych jako materiał posekcyjny. Ma-

Z Katedry Biochemii i Biofizyki Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, kierownik: prof. dr n. przyrodn. Tadeusz Wilczok i z Oddziału Okulistycznego Szpitala Górniczego w Sosnowcu, ordynator: prof. dr med. Jerzy Szaflik

Reprint requests to: Dr n. przyrodn. Barbara Bilińska, ul. Warszawska 9a m. 32; 41-200 Sosnowiec, Poland



Ryc. 1. Widma IR melanin wyizolowanych z oczu: 1 — świni, 2 — krowy, 3 — człowieka.



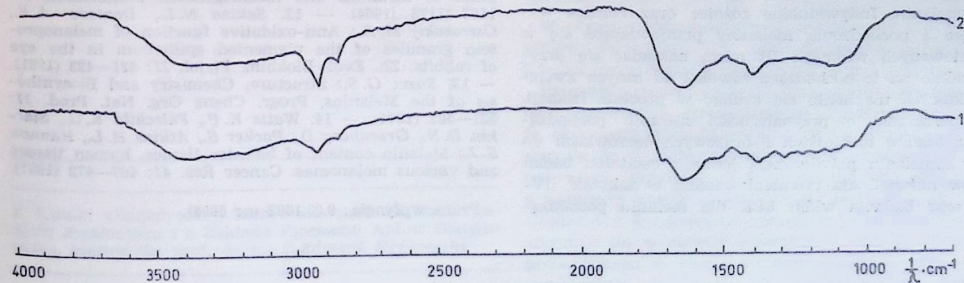
Ryc. 2. Widma IR melanin syntetycznych: 1 — DOPA melanina, 2 — melanina z tyrozyny, 3 — melanina z dopaminy.

jest bardzo podobne do pozostałych, z wyjątkiem zakresu widma $1400\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, co może być spowodowane mniejszą ilością próbki melaniny. Duża częstość szerokiego pasma przy 1640 cm^{-1} z ramieniem przy około 1530 cm^{-1} może wskazywać na obecność białka w próbce^{4,5}. Potwierdzeniem tego może być słabe pasmo 1700 cm^{-1} . Widma w podczerwieni analizowanych próbek naturalnych melanin świadczą o dużym podobieństwie tych melanin do eumelanin syntetycznych, których prekursorami są DOPA i tyrozyna. Widma syntetycznych eumelanin przedstawia ryc. 2. Jak wynika z ryc. 2, do widma IR melaniny syntetyzowanej z tyrozyny w procesie enzymatycznego utleniania są najbardziej zbliżone widma melanin wyizolowanych z oczu człowieka i krowy.

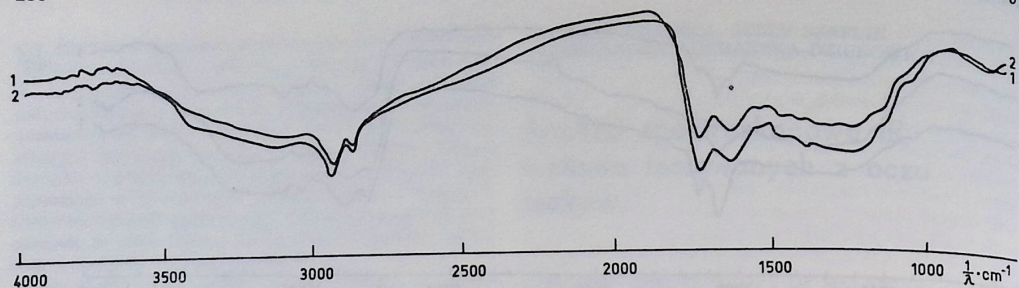
W widmach IR melanin z oczu człowieka występują nieznaczne różnice indywidualne (ryc. 3). Dotyczy to zakresu niższych liczb falowych (około 1100 cm^{-1}), gdzie obserwuje się różne natężenia pasm pochłaniania. Te efekty prawdopodobnie mogą być spowodowane np. ilościowym udziałem naddbudowanych jednostek w cząsteczce melaniny, co może być związane z barwą tę-

czówki lub innymi cechami osobniczymi, a nawet wiekiem dawcy.

Najbardziej charakterystyczne pasma we wszystkich przedstawionych widmach melanin naturalnych to: 1600 cm^{-1} , około 1700 cm^{-1} , 2860 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} z ramieniem przy 2960 cm^{-1} oraz bardzo szerokie, silne pasmo około 3400 cm^{-1} . W zakresie widma $1100\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ występuje grupa pasm często nakładających się, co jest charakterystyczne szczególnie dla widm IR melanin naturalnych. Można nawet ten zakres widma w podczerwieni uznać jako charakterystyczny dla melaniny wyizolowanej z określonego źródła¹¹. Widma IR melanin wyizolowanych z brązowych i niebieskich oczu człowieka opublikowane przez Menona i wspólr.⁷ praktycznie nie wykazały istotnych różnic. Przedstawione widma⁷ charakteryzuje natomiast bardzo silne pasmo 1100 cm^{-1} . To pasmo pochłaniania często występuje w widmach IR melanin naturalnych, rzadko jednak o tak dużym natężeniu. Melaniny izolowane przez Menona i wspólr.⁷ pochodziły z tęczówki, naczyniówki oraz ciała rzęskowego. Otrzymano je metodą trawienia w 6N HCl na zimno i na gorąco. Wiadomo, że sposób preparatyki mo-



Ryc. 3. Widma IR melanin wyizolowanych z oczu ludzi: 1 — próbka A (0,9 mg), 2 — próbka B (1 mg).



Ryc. 4. Widma IR melaniny wyizolowanych z oczu krowy: 1 — melanina z naczyńiówki, 2 — melanina z tęczęwki.

że być przyczyną „modyfikacji” struktury melaniny, co przejawia się również w widmie melaniny w podczerwieni. Opisano również pasma alifatycznych grup CH w zakresie 2950–2800 cm^{-1} , które występują w widmach melanin naturalnych. Rzadko można je rejestrować jako silne pasma w widmach IR syntetycznych eumelanin. Oprócz słabo wyróżnionych pasm w zakresie 1700–1600 cm^{-1} Menon⁷ rejestrował słabe pasmo około 700 cm^{-1} . Pasma to można by odnieść do drgań wiązania C–S². Analiza elementarna próbek melanin przedstawiona przez Menona⁷ i danych dotyczących melanin różnego pochodzenia (Menon⁸, Dryja⁹) wskazuje na nieco podwyższony poziom siarki. Jednak badania właściwości fizykochemicznych przeprowadzone dla tych melanin¹⁰ skłaniają ku wnioskowi, że są to melaniny należące do grupy eumelanin.

Analiza widm w podczerwieni melanin wyizolowanych z tęczęwki i naczyńiówki tych samych oczu krowy nie wykazuje istotnych różnic (ryc. 4). W widmie melaniny otrzymanej z naczyńiówki oczu krowy zaobserwowano występowanie słabszego pasma 860 cm^{-1} , pasma w zakresie 1300–1200 cm^{-1} oraz brak pasm pochłaniania: 1230 cm^{-1} i 1310 cm^{-1} w porównaniu z widmem melaniny z tęczęwki. Również te widma charakteryzuje duże podobieństwo do widm IR eumelanin.

Interesujące jest silne pasmo około 1700 cm^{-1} , które w widmach IR syntetycznych eumelanin jest dużo słabsze w porównaniu z pasmem około 1600 cm^{-1} . Analiza parametrów magnetycznych wyznaczonych z widm EPR otrzymanych dla poszczególnych melanin wyizolowanych z tęczęwki, naczyńiówki, ciała rzęskowego i warstwy barwnikowej siatkówki oczu ludzkich o barwie brązowej i niebieskiej wykazała ich podobieństwo do eumelaniny pochodzącej od DOPA⁹.

Przedstawiona analiza widm w podczerwieni melanin wyizolowanych z oczu człowieka, bydłych i świni metodą trawienia w stężonym kwasie solnym skłania ku pogładowi, że otrzymane próbki melanin należą do grupy eumelanin. Indywidualne różnice oraz różnice wynikające z pochodzenia melaniny przejawiające się w prezentowanych widmach IR mogą nakładać się przypuszczalnie na te pochodzące również od innych związków, których nie udało się usunąć w procesie izolacji.

Przypuszczenie o przynależności melanin pochodzących z oczu o niebieskich i brązowych tęczęwkach do grupy eumelanin potwierdzają jedne z ostatnich badań efektów naświetlania promieniowaniem w zakresie UV-VIS oraz badania widm EPR dla melanin pochodzą-

cych z różnych upigmentowanych części gałki ocznej. Autorzy tej pracy jednak podkreślają, że pod względem właściwości fizykochemicznych nie są to melaniny dokładnie identyczne.

PIŚMIENNICTWO

- Bilińska B., Cudak B., Wilczok T.: Infrared spectroscopy of natural melanins, Abstracts IIIrd European Workshop on Melanin Pigmentation, Prague, 6, 1981. — 2. Bilińska B., Stepien K., Wilczok T.: Infrared spectroscopy of melanins and melanoproteins. *Studia Biophysica* 12: 47–55 (1987). — 3. Bolt A.C.: Interactions between human melanoprotein and chlorpromazine derivatives. I. Isolation and purification of human melanoprotein from hair, melanoma tissue, *Life Sci.* 5: 1277–1283 (1967). — 4. Bridelli M.G., Capelletti R., Crippa P.R.: Infrared Spectroscopy of Eye and Synthetic Melanins at Various Values of pH and Hydration. *Physiol. Chem. Phys.* 12: 233–240 (1980). — 5. Dryja T.P., O'Neil-Dryja M., Albert D.M.: Elemental analysis of melanins from bovine hair, iris, choroid, and retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 18: 231–236 (1979). — 6. Lvov Yu.M., Krivandin A.V., Fiodorovitsch I.B., Ostrovskij M.A.: Obnaruzhenije pierioditschnosti v strukture melanoproteinovykh granul kletki pigmentnovo epitelia glaza (Rentgenovskoje malugolovoe issledovanij). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 265: 214–216 (1982). — 7. Menon I.A., Persad S., Haberman H.F., Kurian C.J., Basu P.K.: A qualitative study of the melanins from blue and brown human eyes. *Exp. Eye Res.* 34: 531–537 (1982). — 8. Menon I.A., Persad S., Haberman H.F., Kurian C.J.: A comparative study of the physical and chemical properties of melanins isolated from human black and red hair. *J. Invest. Dermatol.* 80: 202–206 (1983). — 9. Menon I.A., Basu P.K., Persad S., Avaria M., Felix C.C., Kalyamaraman B.: Is there any difference in the photobiological properties of melanins isolated from human blue and brown eyes?. *Br. J. Ophthalmol.* 71: 549–552 (1987). — 10. Mikulski T.: Widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) oraz w podczerwieni melaniny oczu i barwnika z substantia nigra. *Acta Physiol. Pol.* 2: 219–224 (1970). — 11. Nicolaus R.A., Piattelli M., Fattorusso E.: The structure of melanins and melanogenesis. *Tetrahedron* 20: 1163–1172 (1964). — 12. Sakina N.L., Dontsov A.E., Ostrovskij M.A.: Anti-oxidative function of melanoprotein granules of the pigmented epithelium in the eye of rabbits. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 17: 421–423 (1981). — 13. Swan G.S.: Structure, Chemistry and Biosynthesis of the Melanins, *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.* 31: 521–582 (1974). — 14. Watts K.P., Fairchild R.G., Siatkin D.N., Greenberg D., Packer S., Atkins H.L., Hannon S.J.: Melanin content of hamster tissues, human tissues and various melanomas. *Cancer Res.* 41: 467–472 (1981).

Praca wpłynęła: 9.03.1992 (nr 5805).

WYKAZANO wzrost aktywności proteolitycznej ciała szklistego w przebiegu niektórych stanów patologicznych gałki ocznej. Stwierdzono, że za ten wzrost odpowiedzialne są enzymy z grupy katepsyn¹. Postanowiliśmy sprawdzić, czy płyn podsiatkówkowy pojawiający się w przebiegu samoistnego odwarstwienia siatkówki wykazuje aktywność proteolityczną

MATERIAŁ

Do badań biochemicznych użyto płynów podsiatkówkowych od 40 chorych operowanych z powodu samoistnego odwarstwienia siatkówki w latach 1989–1991. Wiek chorych zamykał się w przedziale od 19 do 78 lat. Dominowali mężczyźni (23 osoby). Czas trwania odwarstwienia przedstawiono w tab. I.

Tabela I

Czas trwania o.s.	n
1 tyg.	5
2 tyg.	12
3 tyg.	3
1 mies.	7
2 mies.	5
3 mies.	5
powyżej 3 mies.	3

U 9 osób stwierdzono krótkowzroczność średnią (2) lub dużą (7), zaś u 6 osób występowała bezszewkowość. U pozostałych 11 stwierdzono emetrię, zaś u 14 nadwzroczność. U 32 osób na obwodzie dna oka występowały zmiany zwyrodnieniowe o typie zwyrodnienia drobnorobielowatego (22), kraciastego (6) i kamieni brukowych (4). U 20 osób odwarstwienie obejmowało 2 kwadranty dna oka, u 9 stwierdzono całkowite odwarstwienie siatkówki (tab. II).

Klasyfikację o.s. w zależności od stadium PVR przedstawiono w tab. III.

Tabela II

Rozległość o.s. w kwadrantach	n
1	4
2	20
3	7
4	9

Tabela III

Stadium PVR	n
A	5
B	14
C	6
1	5
2	7
3	2
D	1
1	1
2	0
3	0

Z Kliniki Okulistycznej, kierownik: prof. dr med. Andrzej Stankiewicz i z Zakładu Biochemii AM w Białymstoku, kierownik: prof. dr med. Edward Bańkowski

Reprint requests to: Dr med. Alina Bakunowicz-Lazarczyk, ul. Mieszka I 1 m. 59; 15-001 Białystok, Poland

ALINA BAKUNOWICZ-LAZARCZYK,
ANDRZEJ STANKIEWICZ, MAŁGORZATA WOLAŃSKA
i KAZIMIERZ WRÓBEL

Aktywność proteolityczna płynu podsiatkówkowego

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF THE SUBRETINAL FLUID

Evaluated was the proteolytic activity of the subretinal fluid in idiopathic retinal detachment. The fluid has been taken from 40 patients aged 19–78 years. The proteolytic activity was determined using as a substrate haemoglobin denaturated by urea and was formulated in μM of tyrosine liberated from protein during 4 h of incubation. The subretinal fluid showed the presence of proteases active in the range of pH 2.5–8.5 with an activity peak in pH 3.5–4.5. The proteolytic activity of the enzymes in the subretinal fluid increased from the 3d week of the time of detachment and subsequently diminishes between the 4th and 8th week to remain at the same level above the 8th week. This activity rises proportionally to the extensiveness of the retinal detachment.

HASŁA: aktywność proteolityczna, płyn podsiatkówkowy, odwarstwienie siatkówki

KEY WORDS: proteolytic activity, subretinal fluid, retinal detachment

Chorych operowano w znieczuleniu ogólnym metodą Schepensa z użyciem gąbki silikonowej lub wszczepu z silikonu twardego z opaską wokół gałki ocznej. W trakcie operacji starano się całkowicie ewakuować płyn podsiatkówkowy, który poddawano badaniom enzymatycznym. Z badań eliminowano płyn podsiatkówkowy zanieczyszczony krwią.

METODA

W celu oznaczenia aktywności proteolitycznej do 0,5 ml hemoglobiny zdenaturowanej mocznikiem dodawano 0,5 ml płynu podsiatkówkowego (oba o odpowiednim pH). Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 h. Reakcję przerywano przez dodanie 2,5 ml 5% kwasu trójchloroctowego (TCA) i w klarownym przesączu oznaczano ilość uwolnionej tyrozyny metodą kolorymetryczną po reakcji z odczynnikiem Folina-Ciocalteu¹.

WYNIKI I OMÓWIENIE

W płynie podsiatkówkowym stwierdzono obecność enzymów proteolitycznych działających w zakresie pH 2,5–8,5, przy szczycie aktywności w pH 3,5–4,5.

Przeanalizowano zależność aktywności proteolitycznej od czasu trwania odwarstwienia siatkówki. Stwierdzono, że aktywność proteolityczna w płynie podsiatkówkowym wzrasta do 3 tygodnia trwania odwarstwienia, osiągając najwyższą wartość w 3 tygodniu (ok. 250 μM Tyr/ml), a następnie maleje aż do wartości około 100 μM Tyr/ml między 4 a 8 tygodniem choroby i na tym poziomie utrzymuje się w okresie późniejszym (ryc. 1). Aktywność proteolityczna w płynie podsiatkówkowym wzrasta proporcjonalnie do rozległości odwarstwienia siatkówki (ryc. 2).