



Российская Академия Наук

Александр Е. ДОНЦОВ и Михаил А. ОСТРОВСКИЙ

**ЭКРАНИРУЮЩИЕ
ПИГМЕНТЫ ГЛАЗА –
МЕЛАНИНЫ
И ОММОХРОМЫ
(СТРУКТУРА, ФИЗИКОХИМИЯ,
ФУНКЦИИ)**

(работа основана на результатах многолетних исследований, выполненных в Институте химической физики имени Н.Н. Семенова и в Институте биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, РФ)

МОСКВА
2025

УДК 577
ББК 24.5
Д 67

Александр Е. Донцов и Михаил А. Островский / **Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)** – М.: РАН, 2025. – с. 232

Книга представляет собой обзор литературных данных и собственных многолетних исследований экранирующих пигментов глаза, выполненных авторами в Институте химической физики имени Н.Н. Семенова и в Институте биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, РФ. В книге подробно рассмотрены структура, физико-химические свойства и биологические функции меланинов и оммохромов, входящих в состав меланосом и оммохромасом пигментных клеток глаза позвоночных и беспозвоночных животных. Особое внимание уделено впервые обнаруженным авторами антиоксидантным свойствам пигментных гранул, а также механизмам возрастного исчезновения меланосом и их роли в старении и патологии глаза человека. Книга может быть интересна для химиков, биологов и медиков, интересующихся проблемами зрительной рецепции и природными механизмами защиты фоторецепторных клеток от повреждающего действия оксидантов.

СОДЕРЖАНИЕ

Глава I. ЭКРАНИРУЮЩИЕ ПИГМЕНТЫ ГЛАЗА – МЕЛАНИНЫ И ОММОХРОМЫ И ИХ ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА	8
1. Введение	8
2. Краткая история исследования меланинов и оммохромов	9
3. Основные функции меланинов	11
4. Основные пути биосинтеза меланинов	13
5. Основные функции и пути биосинтеза оммохромов	15
Глава II. МЕЛАНИНЫ И ОММОХРОМЫ КАК СВЕТОФИЛЬТРУЮЩИЕ И СВЕТОПОГЛОЩАЮЩИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ	20
А. Меланинсодержащие клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ) позвоночных животных – роль в зрительной рецепции	20
1. Важность РПЭ для протекания зрительных процессов	20
2. Морфогенез и дифференциация ткани РПЭ	23
3. Строение клеток РПЭ	25
4. Пигментные гранулы клеток РПЭ	29
Б. Оммохромы сложного глаза беспозвоночных животных	34
Глава III. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ТКАНЕЙ ГЛАЗА ПИГМЕНТИРОВАННЫХ И НЕПИГМЕНТИРОВАННЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ И БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ К ПОВРЕЖДАЮЩЕМУ ДЕЙСТВИЮ РАЗЛИЧНЫХ ОКСИДАНТОВ	42
А. Опасность повреждения фоторецепторных клеток в условиях окислительного стресса	42
Б. Защитная роль пигментации от повреждающего действия света, кислорода и его активных форм. Сравнительное исследование на нейральной сетчатке и ретинальном пигментном эпителии (РПЭ) глаза пигментированных и непигментированных позвоночных животных	46

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

В. Меланосомы как основной фактор, придающий клеткам РПЭ позвоночных животных повышенную устойчивость к действию оксидантов	50
Г. Сравнительное исследование аккумуляции продуктов пероксидации в глазах пигментированных мышей и мышей-альбиносов при действии общего рентгеновского облучения	55
Д. Сравнительное исследование аккумуляции продуктов пероксидации в глазах двух подвидов реликтовой креветки <i>Mysis relicta</i>, проявляющих разную чувствительность к фотоповреждению. Защитное действие оммохромов от повреждающего действия света и кислорода на омматидиях сложного глаза	59
Е. Усиление пигментации как фактор, повышающий устойчивость различных клеток к свободнорадикальным окислительным процессам	61
1. Усиление контакта нейральной сетчатки с пигментированной тканью РПЭ приводит к значительному уменьшению аккумуляции продуктов пероксидации при действии ультрафиолета и ионов двухвалентного железа	61
2. Накопление меланин-подобных веществ у людей, подвергнутых воздействию радиации	64
Глава IV. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА МЕЛАНИНОВ	70
А. Ингибирующее действие меланинов на процессы пероксидации липидов, индуцированные в темновых условиях	70
Б. Ингибирующее действие меланинов и оммохромов на процессы пероксидации липидов, индуцированные видимым светом, ультрафиолетом и γ-облучением	74
1. Сравнение величин оптической и химической составляющей ингибирующего действия меланинов на процессы ПОЛ, индуцированные ультрафиолетом и интенсивным видимым светом	74
2. Сравнительное исследование ингибирующей активности меланинов различного происхождения	80
3. Ингибирующее действие меланосом на процессы ПОЛ, индуцированные экзогенными фотосенсибилизаторами	82
4. Влияние меланина на кинетику накопления долгоживущих парамагнитных центров в белке	89
5. Устойчивость меланинов к деструктивному действию ультрафиолетового облучения	92
В. Ингибирующее действие меланинов в отношении фототоксичности А2Е – флуорофора липофусциновых гранул клеток РПЭ	93

Глава V. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ОММОХРОМОВ	99
1. Сравнение некоторых физико-химических характеристик оммохромов, выделенных из глаз различных беспозвоночных животных	99
2. Ингибирующее действие оммохромов на процессы перекисидации липидов, индуцированные в темновых условиях	106
3. Ингибирующее действие оммохромов на фотоиндуцированную перекисидацию липидов	109
Глава VI. МЕХАНИЗМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКРАНИРУЮЩИХ ПИГМЕНТОВ ГЛАЗА – МЕЛАНИНОВ И ОММОХРОМОВ	113
А. Связывание ионов двухвалентного железа меланинами и оммохромами в неактивные комплексы	113
1. Зависимость скорости перекисидации липидов в клетках РПЭ и нейральной сетчатки глаза от концентрации ионов двухвалентного железа	113
2. Исследование связывания ионов железа меланинами методом гаммарезонансной спектроскопии (спектроскопии Мессбауэра)	116
<i>а. Связывание ионов железа синтетическим ДОФА-меланином</i>	116
<i>б. Связывание ионов железа меланосомами РПЭ глаза быка</i>	121
<i>в. Связывание ионов железа оммохромами глаза креветки</i>	126
3. Определение констант и максимального числа связывания ионов железа с меланинами и оммохромами	131
Б. Исследование взаимодействия меланинов и оммохромов с активными формами кислорода	132
1. Взаимодействие с супероксидными радикалами кислорода	132
2. Тушение синглетного молекулярного кислорода экранирующими пигментами	137
3. Пути и условия процесса генерации радикалов супероксида при взаимодействии меланинов и оммохромов с кислородом	139
Глава VII. РОЛЬ ЭКРАНИРУЮЩИХ ПИГМЕНТОВ ПОЗВОНОЧНЫХ МЕЛАНОСОМ В ПРОЦЕССАХ СТАРЕНИЯ И РАЗВИТИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЙ	147
1. Уменьшение содержания меланосом в клетках РПЭ при старении и развитии различных патологий	147

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

2. Возможные механизмы, приводящие к разрушению меланосом в клетках РПЭ	150
2.1. Разрушение меланосом под действием УФ-облучения и интенсивного видимого света	150
2.2. Разрушение меланосом под действием окислителей – пероксида водорода и супероксидных радикалов	152
3. Токсичность продуктов окислительного распада меланосом для клеток РПЭ	158
3.1. Образование реактивных карбониллов при деструкции меланосом супероксидными радикалами	159
3.2. Фототоксичность продуктов окислительного распада меланосом	163
4. Пути исчезновения меланосом в клетках РПЭ	164
4.1. Слияние меланосом и липофусциновых гранул – основная причина понижения количества меланосом в клетке РПЭ	164
4.2. Сравнительное исследование продуктов, образующихся при действии света на меланолипофусциновые гранулы и при действии радикалов супероксида на меланосомы. Возможный механизм разрушения меланина меланосом в клетках РПЭ	167
Глава VIII. ВОЗМОЖНОЕ ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЭКРАНИРУЮЩИХ ПИГМЕНТОВ. СОЗДАНИЕ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ И УСТРОЙСТВ	175
А. Меланинсодержащий фитосорбент, полученный из лузги черных семян подсолнечника	175
1. Получение и физико-химические характеристики фитосорбента	175
1.1. Свободнорадикальные свойства фитосорбента	176
1.2. Антиоксидантная активность фитосорбента	177
2. Сорбционные свойства фитосорбента	180
2.1. Связывание фитосорбентом тяжелых металлов и радионуклидов из воды и водных растворов	180
2.2. Связывание токсичных органических веществ	181
2.3. Связывание гидрофобных жидкостей (нефть, нефтепродукты, масла, жиры)	182
3. Выведение тяжелых металлов из организма животных с помощью фитосорбента	182

Б. Меланинсодержащие мембраны для разделения водных растворов солей	184
В. Антимикробная и антигрибковая активность оммохромов и их комплексов с наноразмерными алмазами	188
Глава IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЭКРАНИРУЮЩИХ ПИГМЕНТОВ	191
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	196
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	197

Глава I

ЭКРАНИРУЮЩИЕ ПИГМЕНТЫ ГЛАЗА – МЕЛАНИНЫ И ОММОХРОМЫ И ИХ ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА

1. Введение

Различные многочисленные виды животных, возникшие в период “Кембрийского взрыва” (от 540 до 490 миллионов лет назад), обладают огромным разнообразием органов зрения. Однако всё это разнообразие можно разделить на два основных типа: первый – это сложный глаз большинства беспозвоночных (яркий тому пример – членистоногие: насекомые, пауки, ракообразные), второй – это камерный глаз позвоночных. Сложный глаз большинства беспозвоночных состоит из множества маленьких глазков (омматидиев), каждый со своими фоторецепторными клетками (рабдомами). Хотя головоногие моллюски (осьминоги, кальмары), как и позвоночные, имеют не сложный, а камерный глаз, фоторецепторные клетки у них такие же, как у членистоногих – рабдомеры. Во всех органах зрения беспозвоночных и позвоночных животных, наряду со светочувствительными ретинальсодержащими зрительными пигментами, присутствуют и несветочувствительные экранирующие пигменты. Их основная функция в глазах обоих типов – светофильтрующая и светопоглощающая. Поглощая и пропуская свет в определённых областях спектра, препятствуя его отражению и рассеянию, экранирующие пигменты играют важную роль в формировании спектральной чувствительности глаза; за счёт поглощения рассеянного света они определяют разрешающую способность глаза (контрастность и чёткость изображения); от них также зависит ряд других свойств зрительного восприятия.

Что касается оптических сред глаза позвоночных животных и человека, то ключевую роль в них играет хрусталик, защищающий фоторецепторы от ультрафиолета и частично от фиолетово-синего диапазона видимого света. У многих беспозвоночных животных оптические среды сложного глаза являются прозрачными и для ультрафиолета. Поэтому в системе защиты структур глаза беспозвоночных от опасности фотоповреждения экранирующим пигментам принадлежит особенно важная роль.

Экранирующие пигменты глаза позвоночных животных и человека – это меланинсодержащие гранулы – меланосомы, а экранирующие пигменты сложного глаза беспозвоночных – это гранулы, содержащие оммохромы. Меланины и оммохромы – это основные пигменты глаза, защищающие фоторецепторные клетки от прооксидантных факторов, как путем оптического экранирования, так и путем химической нейтрализации свободнорадикальных продуктов. Интересный факт эволюции: хотя практически все виды беспозвоночных живот-

ных могут синтезировать и аккумулировать меланины, в их органах зрения в качестве экранирующих пигментов содержатся, преимущественно, оммохромы. Вместе с тем, у ряда видов ракообразных экранирующими пигментами являются не оммохромы, а каротенопротеины – везикулы, содержащие каротиноиды (часто кетокаротиноид астаксантин) в комплексе с белком. Исключением являются медузы. В глазах медуз, имеющих, как и позвоночные, цилиарный тип фоторецепторов, в качестве экранирующего пигмента используется меланин. Камерные же глаза моллюсков, обладающие характерными для беспозвоночных микровиллярными фоторецепторами, содержат экранирующие пигменты, типичные для беспозвоночных, – оммохромы.

2. Краткая история исследования меланинов и оммохромов

Исследования меланинов охватывают почти 400-летний период. Однако на современном уровне историю изучения меланинов принято начинать с момента первого упоминания о черном природном пигменте как о меланине (от греческого слова “*melas*”, означающего “*черный*”), которое встречается в конце XIX – начале XX веков. В 1895 году была обнаружена тирозиназа в грибах и показано, что она превращает тирозин в черный пигмент, подобный найденному в тканях млекопитающих (Bertrand, 1896), а в 1901 году было высказано предположение, что формирование меланина происходит в результате взаимодействия внутриклеточной оксидазы с ароматическими группами определенных белков (Furth et al., 1902). В 1927 году Генри Стенли Рэпер (Raper) выделил диоксифенилаланин (ДОФА) как первый компонент процесса окисления тирозина при действии тирозиназы (Raper, 1927). Кроме того, ему удалось установить основные химические стадии процесса ферментативного окисления тирозина в меланин – он идентифицировал красный промежуточный продукт, известный как дофахром, и выделил производные 5,6-дигидроксииндола и 5,6-дигидроксииндол-2-карбоновой кислоты. Эта основополагающая работа Генри Рэпера продолжает служить основой, на которой строятся молекулярные модели биосинтеза меланинов.

Первые упоминания об окислительно-восстановительных свойствах меланинов относятся к 1938 году, когда было предположено, что меланин может быть природной редокс системой, сравнимой с глутатионом и рибофлавином (Figge, 1939). В дальнейшем было показано, что меланины могут окислять восстановленный никотинамид аденин динуклеотид (НАДН) и восстанавливать феррицианид, дихлорфенолиндофенол и цитохром *c* (Van Woert, 1967; Gan et al., 1976, 1977). Эти результаты показали, что меланины могут участвовать в сопряженных окислительно-восстановительных реакциях.

Важное событие в истории исследования меланинов – это обнаружение стабильного сигнала электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с высокой концентрацией парамагнитных центров в этих пигментах. Работа Барри Коммонера и соавторов (Commoner et al., 1954), в которой впервые упоминается о

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

свободнорадикальных свойствах меланина, вышла в 1954 году. В последующем свободнорадикальные свойства меланина и действия на них света и ингибиторов свободнорадикальных процессов были исследованы в работах Говарда Мейзона и соавторов (Mason et al., 1960), Севера и др. (Sever et al., 1962), а также в работах Михаила Островского и соавторов (Островский, Каюшин, 1963; Островский, 1966; Сакина и др., 1979). Обнаружение стабильного синглетного сигнала электронного парамагнитного резонанса меланинов с очень высокой концентрацией спинов, которая почти на два порядка превышает обычную концентрацию парамагнитных центров в биологических тканях, дало основание предполагать антирадикальную активность меланина (Lukiewicz, 1972). В этом качестве предполагалось рассматривать меланин как буфер свободных радикалов или как «мусорщик» возбужденных молекул и свободных радикалов, который химическую энергию возбужденных связей переводит и рассеивает в виде тепла. В частности, обнаружение свободнорадикальных свойств меланинов стимулировало исследования о возможной защитной роли пигмента в тканях, испытывающих высокий окислительный стресс.

В 1979 году в лаборатории физико-химических основ рецепции Института химической физики Александром Донцовым и соавторами была обнаружена способность меланинов глаза позвоночных животных подавлять процессы пероксидного окисления липидов, индуцированные различными прооксидантными системами (Донцов и др., 1980; Островский и др., 1980; Сакина и др., 1980). Способность меланинов подавлять развитие окислительных реакций могла быть связана с тем, что меланины взаимодействуют с активными формами кислорода. Это было подтверждено в 1981 году, когда Гудчайлд и др. (Goodchild et al., 1981) нашли, что меланины способны вызывать дисмутацию супероксидных радикалов, а также в работах 1984 года и последующих годов (Лапина и др., 1984б; Ostrovsky et al., 1987; Донцов и др., 1999), в которых было показано, что меланины, действительно, значительно ускоряют процесс дисмутации супероксидных радикалов, причем константа скорости этого процесса более чем на пять порядков превышает таковую для процесса генерации супероксида меланинами. Эти работы дали основание полагать существование ещё и другого (не только светофильтрующего) пути защиты пигментированных клеток меланином. Путь этот связан со способностью меланина нейтрализовать окислительные радикалы и другие активные формы кислорода, которые генерируются в ходе химических и фотохимических реакций.

История исследования оммохромов, по-видимому, недавно отметила свой 100-летний юбилей. Обнаружение оммохромов было связано с генетическими исследованиями разнообразных мутаций глаза мух, главным образом дрозофилы. По-видимому, оммохромы впервые были открыты А. Йохансенем в 1924 году в первичных и вторичных пигментных клетках омматидия сложного глаза дрозофилы, которые содержали два разных типа пигментных гранул – пурпурно-красного цвета и цвета охры (Johannsen, 1924). Причем среди мутантных форм А. Йохансен наблюдал наличие пигментов самой разнообразной окраски: коричневой, фиолетовой, рубиновой, розовой и др. Сам же термин «ом-

омохромы», по-видимому, впервые появился в работах немецкого исследователя Е. Бекера (Becker, 1941). Он предложил для пигментов, содержащихся в глазах мух родов *Drosophila* и *Calliphora*, общее название «Оммохромы», подразделив их на две большие группы – «Омматины» и «Оммины». Более подробно историю открытия оммохромов можно найти в работе (Ephrussi, Herold, 1944). Затем, в 50-х годах XX века была подробно исследована молекулярная структура и основные физико-химические характеристики оммохромов из самых разнообразных классов и видов беспозвоночных животных. Эти многочисленные работы были выполнены немецкими химиками – Нобелевским лауреатом А. Бутенандтом и соавторами (Butenandt et al., 1954; Butenandt, Schafer, 1962).

Способность оммохромов глаза дальневосточной креветки Травяной чилим (*Pandalus latorostris*) и глаз насекомых - стрекозы Красотка-блестящая (*Calopteryx splendens*) и бабочки Белянка капустная (*Pieris brassicae*) ингибировать реакцию перекисидации липидов была впервые показана в Институте химической физики в начале 80-х годов (Донцов, 1981; Донцов и др., 1984). В 1985 году также было обнаружено, что оммохромы, подобно меланинам, имеют стабильный сигнал ЭПР с высокой концентрацией парамагнитных центров, возрастающий при действии ультрафиолета и видимого света (Донцов и др., 1985). Таким образом, экранирующие пигменты беспозвоночных животных проявляют, как и меланины позвоночных, парамагнитные свойства.

3. Основные функции меланинов

Термин меланин относится к очень разнообразной группе пигментов, обнаруженных во всех биологических царствах. Меланин – это сложный биополимер, который образуется из различных исходных веществ и с использованием различных путей биосинтеза в зависимости от своего происхождения. В настоящее время меланины обычно подразделяют на 5 категорий: эумеланины (“eu”, греческий префикс, означающий «хороший»), феомеланины (“pheo”, греческий префикс, означающий «темный»), нейромеланины, пиомеланины (puomelanin) и алломеланины (allomelanin) (Cao et al. 2021). Первые три типа меланинов – это азотсодержащие полимеры, преимущественно встречающиеся у животных, причем в глазах позвоночных животных находят, главным образом, эу- и феомеланины. Пиомеланины и алломеланины существуют преимущественно у грибов, бактерий и растений (Xie et al. 2019, Belozerskaya et al., 2017). В отличие от меланинов животного происхождения эти меланины являются безазотистыми полимерами фенолсодержащих кислот – гомогентизиновой (пиомеланины) и кумаровой (алломеланины).

Меланины выполняют многие полезные защитные функции, улучшающие приспособляемость живых организмов к выживанию в экстремальных условиях, таких как высокое давление, высокую соленость, экстремальные температуры и воздействие различных видов облучения (Cordero, Casadevall, 2017). Давно известна защитная роль меланинов наружных покровов (кожи, кутикулы, оболочка семян и т.п.). Черный меланин экранирует проникновение активных

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

солнечных лучей вглубь клеток. Черный цвет меланина используется животными для маскировки. Так, например, кальмар в случае опасности выпускает «дымовую завесу» в виде темного чернильного облака, представляющего собой не что иное, как меланин. Черный цвет используется холоднокровными животными для быстрого прогрева организма. Кто быстрее согреется восходящими лучами солнца, тот быстрее выйдет на охоту или, наоборот, убежит от охотника.

Среди биополимеров меланины уникальны во многих отношениях. Другие природные биополимеры – белки, нуклеиновые кислоты, углеводы – химически полностью охарактеризованы, поскольку они составлены из различных мономерных единиц, линейно связанных между собой ковалентными связями, которые могут быть легко разорваны, или химическими методами или действием ферментов. С другой стороны, меланины составлены из многих различных типов мономерных единиц, которые связаны между собой сильными углерод-углеродными связями, образующими трехмерную структуру (Prota, 1992; Ito, 1998).

После обнаружения в конце 50-х годов прошлого столетия стабильного синглетного сигнала ЭПР меланинов с очень высокой концентрацией спинов почти на два порядка превышающей обычную концентрацию парамагнитных центров в биологических тканях, было предположено, что меланин может проявлять антирадикальную активность (Lukiewicz, 1972). В этом качестве меланин можно рассматривать как буфер свободных радикалов или как «мусорщик» возбужденных молекул и свободных радикалов, который химическую энергию возбужденных связей переводит в тепловую. Поэтому загар – защитная реакция организма, при которой меланин, сконцентрированный у поверхности кожных покровов, трансформирует энергию активных солнечных лучей в тепло, тем самым предотвращая развитие фотоповреждений в клетках. С другой стороны, поглощая высокоэнергетические кванты света, меланины могут чрезмерно сильно нагреваться и, рассеивая это тепло внутри клетки, приводить к разрушению клеточных органелл, например, лизосом, и к гибели пигментных клеток (Hata, 1979; Proctor et al., 1974).

В структурах глаза меланин, входящий в состав внутриклеточных органелл меланосом, рассматривали в основном как экранирующий пигмент, выполняющий функцию оптической защиты фоточувствительных клеток от избыточного света путем его поглощения. Окружая фоторецепторы «темным чехлом», меланины также повышают остроту зрения, поглощая рассеянный свет. Хорошо известно, что меланины защищают фоторецепторные клетки от повреждающего действия света (Sarna, 1992). Так, например, было показано, что сетчатка животных-альбиносов значительно более чувствительна к действию света, чем сетчатка пигментированных животных (Noell et al., 1966; Reuter, Hobbelen, 1977). Однако такие результаты в основном интерпретировались в терминах защитной роли меланина в качестве экрана, поглощающего свет (Rapp, Williams, 1980). О возможности меланосом клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) ингибировать развитие свободно радикальных процессов в темноте вообще ничего не было известно.

4. Основные пути биосинтеза меланинов

Млекопитающие синтезируют, главным образом, два химически различных типа меланинов – черные или коричневые эумеланины и желтые или рыжие феомеланины. Оба типа меланинов формируются из общего предшественника дофахинона, который образуется при реакции окисления тирозина, катализируемого ферментом тирозиназой. Тирозиназа (монофенол монооксигеназа EC 1.14.18.1) является медьсодержащим гликопротеином. Она была обнаружена и охарактеризована еще очень давно (Raper, 1927; Mason, 1948). Тирозиназа является довольно своеобразным ферментом, который способен катализировать два типа различных реакций, гидроксילирование монофенолов в о-дифенолы, и окисление этих о-дифенолов в о-хиноны. В процессе меланогенеза животных тирозиназа катализирует превращение L-тирозина в L-дофахинон. Дофахинон химически высокоактивное вещество и в отсутствие сульфгидрильных соединений легко подвергается внутримолекулярной циклизации, приводящей последовательно к образованию эумеланинов (рис. I.1). Однако в присутствии тиолов, например цистеина, этот процесс переходит исключительно к синтезу серосодержащих производных ДОФА, среди которых главный, наиболее распространенный изомер – 5-S-цистеинилдофа. Дальнейшее окисление тиоловых производных приводит к образованию феомеланинов через бензотиазино-вые интермедиаты. Большинство меланиновых пигментов, присутствующих в пигментированных тканях животных, представляет собой или смесь или сополимер эумеланинов и феомеланинов.

Эумеланины представляют собой высоко гетерогенные полимеры, состоящие из 5,6-дигидроксииндолных и 5,5-дигидроксииндол-карбоксылных единиц в восстановленном или окисленном состоянии и пиррольных единиц, возникающих при их пероксидном расщеплении. Кроме тирозиназы, еще два родственных ей фермента – дофахром таутомераза (Aroca et al., 1990) и оксидаза дигидроксииндолкарбоновой кислоты (Hearing, 1998), регулируют синтез эумеланинов. Дофахром таутомераза катализирует недекарбоксилированную перегруппировку (таутомеризацию) дофахрома в 5,6-дигидроксииндол-2-карбоновую кислоту. Окислительная полимеризация 5,6-дигидроксииндола катализируется тирозиназой, тогда как окисление 5,6-дигидроксииндол-2-карбоновой кислоты в соответствующий хинон, по-видимому, катализируется оксидазой (Jimenez-Cervantes et al., 1994; Kobayashi et al., 1994). Соотношение активностей этих ферментов сильно влияет на количество и качество образованных эумеланинов. Условная структура полимера эумеланина приведена на рис. I.2.

Напротив, образование феомеланинов происходит, по-видимому, только при участии тирозиназы и не требует других ферментов (Kobayashi et al., 1995). Главная критическая точка, определяющая направление меланогенеза в сторону синтеза эумеланинов или в сторону синтеза феомеланинов, – это концентрация цистеина. Константа скорости реакции дофахинона с цистеином составляет $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, тогда как константа внутримолекулярной циклизации (таутомеризации) дофахинона равна всего $0,9 \text{ сек}^{-1}$ (Thompson et al., 1985). Это

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

означает, что даже при такой низкой концентрации цистеина как 1 мкМ, будет в основном протекать реакция синтеза феомеланинов.

Схема биосинтеза эу- и феомеланинов приведена на рис. I.1.

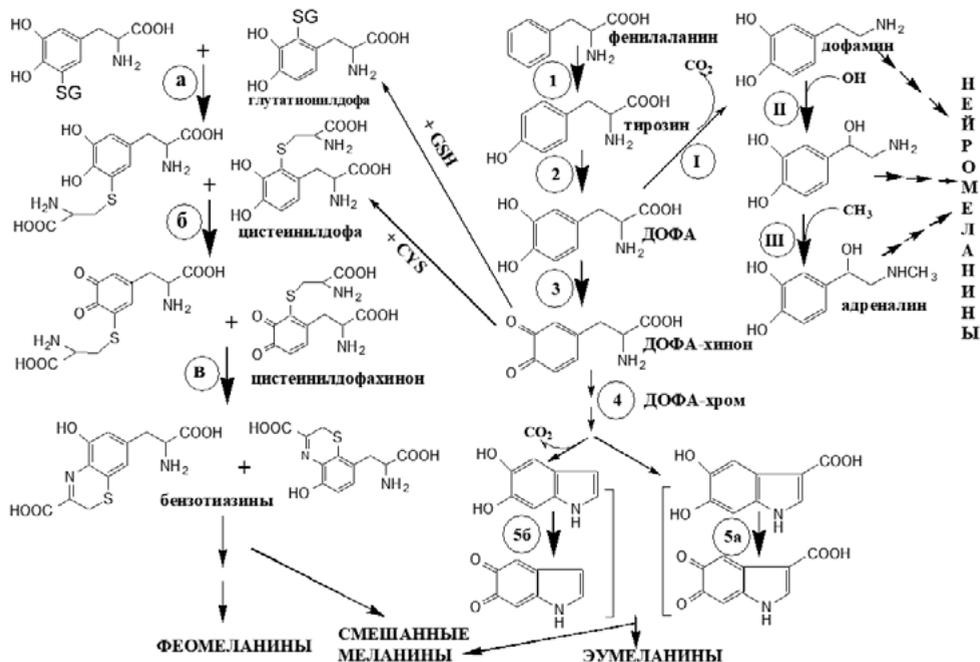


Рис. I.1. Схема биосинтеза меланинов

1 – гидроксирование фенилаланина (фенилаланингидроксилаза), 2 – гидроксирование тирозина (тирозидаза или тирозингидроксилаза), 3 – окисление ДОФА (тирозидаза, катионы металлов), 4 – таутомеризация дофахрома (дофахром таутомеразы/тирозидаза-подобный белок 2), 5а – окисление дигидроксииндолкарбоновой кислоты (тирозидаза-подобный белок 1 или оксидаза), 5б – окисление дигидроксииндола (тирозидаза или оксидаза); а – гидролиз глутатионилдофа (β -глутамилтранспептидаза), б – окисление цистеинилдофа (пероксидаза), в – внутримолекулярная циклизация цистеинилдофахинона (пероксидаза?); I – декарбоксилирование ДОФА (декарбоксилаза ароматических аминокислот), II – гидроксирование дофамина (дофамин β -гидролаза), III – метилирование норадrenalина (фенилэтаноламин N-метилтрансфераза)

Как видно из рисунка, окислительные превращения при метаболизме дофамина, адреналина и норадrenalина приводят к формированию в клетках нейромеланинов, основное количество которых аккумулируется в дофаминэргических нейронах черного вещества мозга (*substantia nigra*). Ранее было общепринято, что нейромеланины представляют собой по происхождению, главным образом, дофамин-меланины (Graham, 1979). Позже было обнаружено, что клетки «субстанции nigra» человека, так же, как и другие дофаминэргические клетки мозга, содержат значительные количества серосодержащего производного дофамина – 5-S-цистеи-

нилдофамина (Rosengren et al., 1985), который структурно близок не эу-, а феомеланинам. Предполагается, что нейромеланины играют важную роль в этиологии болезни Паркинсона (Fahn, Cohen, 1992; Enochs et al., 1994; D'Ischia, Prota, 1997).

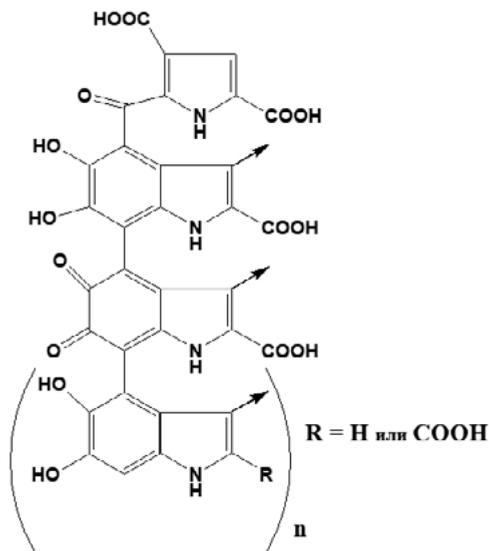


Рис. I.2. Предполагаемая химическая структура эумеланинового полимера

5. Основные функции и пути биосинтеза оммохромов

Оммохромы – природные органические пигменты, широко распространенные среди беспозвоночных животных и особенно характерные для типа Членистоногих (*Arthropoda*) (Butenandt, Schafer, 1962). В глазах членистоногих животных оммохромы локализуются как в пигментных, так и в фоторецепторных (ретинулярных) клетках. В клетке оммохромы связаны со специфическими белками и располагаются в специализированных органеллах – оммохромных гранулах (Kayser, 1985). Поскольку термин «гранулы» не подразумевает наличия внешней мембраны, а содержащиеся оммохромы органеллы окружены мембраной, было предложено называть гранулы, содержащие оммохромы, оммохромасомами (Needham, 1974; Figon, Casas, 2019). Считается, что химические предшественники оммохромов, особенно 3-гидроксикинуренин, транспортируются в оммохромасомы АТФ-зависимыми трансмембранными транспортерами семейства ABC (Mackenzie et al., 2000). Так, у дрозофилы предшественники оммохромов транспортируются гетеродимерами транспортера White/Scarlet ABC, и его участие в транспорте предшественников оммохромов считается эволюционно древним и широко распространенным, особенно у насекомых.

Органеллы, содержащие оммохромы, присущи практически всем клеткам омматида. По форме это сферические образования длиной 0,2–2,0 мкм, окруженные однослойной мембраной (Kayser, 1985; Shoup, 1966; Linzen, 1974; Stark, Sapp, 1988), причем в пигментных клетках диаметр оммохромасом, как

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

правило, значительно больше, чем в фоторецепторных (Грибакин, Чеснокова, 1984). Оммохромасомы обычно содержат электронно-плотный осмиофильный материал. Этот материал, вероятно, содержит комплексы предшественников оммохромов и самих оммохромов с оммохром-связывающими белками (Figon, Casas, 2019). Оммохромы принято делить на два основных типа – желто-красные омматины и менее изученные пурпурные оммины. Все оммохромы содержат в своем составе кольцевую структуру феноксазина/феноксазона. Разница между омматинами и омминами обусловлена тем, что оммины предположительно содержат дополнительное фенотиазинное кольцо (рис. 1.3).

Третий тип оммохромов – оммидины, встречается у членистоногих гораздо реже и был обнаружен в основном у прямокрылых (*Orthoptera*) (Linzen, 1966; Pinamonti et al., 1973). По своей химической структуре оммидины содержат серу и, предположительно, по аналогии с феомеланинами, являются продуктами совместного окисления двух аминокислот, в данном случае триптофана и цистеина.

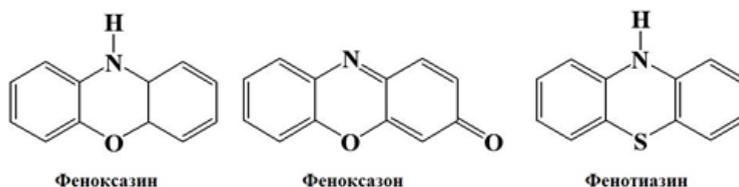


Рис. 1.3. Основные кольцевые структуры оммохромов

Поскольку оммохромы легко вступают в различные окислительно-восстановительные реакции, реакции декарбоксилирования и этерификации, в природе существует большое биологическое разнообразие оммохромов (Figon, Casas, 2019; Britton, 1983). Из омматинов наиболее распространены ксантомматины, имеющие в своей структуре характерную феноксазиновую группу (рис. 1.4) (Linzen, 1974; Strother, 1966; Langer, 1975). Особенно часто они встречаются в глазах насекомых.

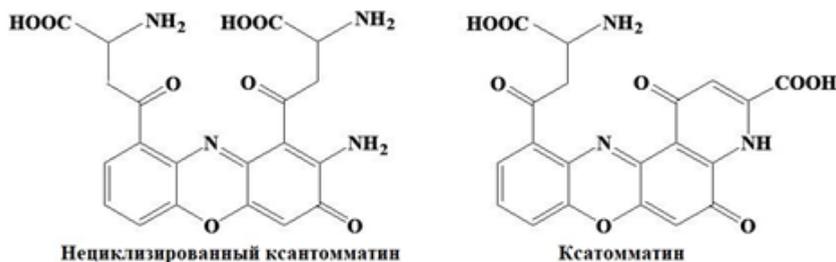


Рис. 1.4. Структура ксантомматина и его нециклизованной формы

Помимо ксантомматина, в глазах членистоногих встречаются и другие омматины, производные ксантомматина. Наиболее распространенным является родомматин, который представляет собой β-гликозид дигидроксантомматина, и сульфат родомматина омматин D, из омминов наиболее распространен оммин A.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

На рис. 1.5 представлена схема основных путей биосинтеза оммохромов. В конечном итоге, оммохромы образуются в результате окислительной конденсации 3-гидроксикинуруенина. На первом этапе синтеза триптофан окисляется до формилкинуруенина. Этот процесс катализируется ферментом триптофан 2,3-диоксигеназой (триптофанпирролаза; КФ 1.13.11.11). Этот фермент, впервые идентифицированный у дрозофил (ген «*vermilion*», необходимый для синтеза каревого пигмента глаз), представляет собой тетрамерный комплекс, содержащий гем, необходимый для окисления триптофана (Carrese et al., 2010; Huang et al., 2013). На втором этапе синтеза образуется кинуруенин. Этот процесс может быть как спонтанным, так и катализируемым ферментом кинуруенинформамидазой (КФ 3.5.1.9) (Moore, Sullivan, 1978). Поскольку известно, что N-формилкинуруенин нестабилен и быстро превращается в кинуруенин *in vitro*, фермент кинуруенинформамидаза может и не потребоваться для этого процесса. Третий этап биосинтеза – гидроксилирование кинуруенина до 3-гидроксикинуруенина ферментом кинуруенин-3-монооксигеназой (КМО) (КФ 1.14.13.9). Синтез КМО кодируется геном «киновари» у дрозофилы *D. melanogaster*. КМО содержит флавинадениндинуклеотид (ФАД) в качестве кофактора. ФАД восстанавливается до своей активной формы ФАДН₂ с помощью НАДФН. Затем ФАДН₂ и кинуруенин окисляются кислородом, что приводит к формированию ФАД и 3-гидроксикинуруенина (Smith et al., 2016). На последнем этапе образуется ксантомматин путем конденсации двух молекул 3-гидроксикинуруенина. Пока неясно, участвует ли в этом процессе фермент феноксазонсинтаза (КФ 1.10.3.4). Так, в ряде работ (Phillips, Forrest, 1970; Phillips et al., 1973; Yamamoto et al., 1976; Rasgon, Scott, 2004) показано, что органеллы, содержащие оммохромы, могут ускорять образование ксантомматина как ферментативным, так и не ферментативным путем. Предполагается, что предшественником ксантомматина может быть лабильный нециклизованный ксантомматин (рис. 1.4), который изначально образуется путем конденсации двух молекул 3-гидроксикинуруенина. Этот нециклизованный ксантомматин, который был выделен из ракообразных и насекомых, может спонтанно образовывать ксантомматин при комнатной температуре (Bolognese, Scherillo, 1974; Iwahashi, Ishii, 1997; Zhuravlev et al., 2018; Figon et al., 2020).

Процессы, приводящие к биосинтезу восстановленной формы ксантомматина, омматина D, родомматина, а также пути биосинтеза омминов пока еще недостаточно изучены.

Поскольку оммохромы окрашенные вещества, то они во многом определяют окраску многих беспозвоночных животных. Известно, что ксантомматин и его производные, такие как омматин D и декарбокислированный ксантомматин, определяют окраску и ее изменения у членистоногих (Riou, Christides, 2010; Stavenga et al., 2014; Panettieri et al., 2018). Изменения окраски оммохромов обычно связаны с окислительно-восстановительными переходами в молекуле пигмента. В этом случае восстановление приводит к смещению максимума поглощения в более длинноволновую область спектра (батохромный сдвиг). На-

пример, в период полового созревания у некоторых видов стрекоз окраска тела меняется с желтой на красную, что связано с появлением большего количества восстановленных оммохромов (Futahashi et al., 2012).

Другие функции оммохромов включают экранирование и изменение спектральной чувствительности сложного глаза (см. глава II), защиту клеток от повреждающего действия окислительного стресса (см. глава V) и детоксикацию триптофана. Последняя функция связана с тем, что избыток триптофана вреден для насекомых (Linzen, 1974; Kayser, 1985). Это связано с отсутствием у насекомых глутаратного пути утилизации триптофана до ацетата и углекислого газа. Отсюда следует, что путь превращения триптофана в оммохромы можно рассматривать в связи с регуляцией метаболизма триптофана и выведения его избытка из организма в виде оммохромов.

Глава II

МЕЛАНИНЫ И ОММОХРОМЫ КАК СВЕТОФИЛЬТРУЮЩИЕ И СВЕТОПОГЛОЩАЮЩИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ

А. Меланинсодержащие клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ) позвоночных животных – роль в зрительной рецепции

1. Важность РПЭ для протекания зрительных процессов

Ретинальный пигментный эпителий – это монослой постмитотических пигментированных клеток, расположенных в области глазного дна непосредственно между нейральной сетчаткой (НС) и сосудистой оболочкой, и являющейся частью гематоофтальмического барьера (Steinberg, 1985; Rizzolo, 1997; Marmorstein, 2001). Клетки РПЭ и НС функционируют настолько согласованно, что многие исследователи объединяют их в одну ткань – сетчатку. Клетки РПЭ, по-видимому, не столь строго дифференцированы, как клетки НС. Так, у некоторых амфибий (тритон, саламандра и др.) РПЭ может служить источником регенерации НС. Было показано, что при экспериментальном удалении НС у этих животных клетки РПЭ теряют пигментацию, начинают пролиферировать, и генерируют два новых эпителиальных слоя – пигментированный и непигментированный слои. В клетках непигментированного слоя начинается экспрессия генов, типичных для клеток-предшественников нейральной сетчатки, происходит экстенсивное клеточное деление и образуется новая НС (Stone, Stemitz, 1957; Reh, Nagy, 1987, 1989; Keefe, 1973). Эксперименты *in vitro* и эксперименты по трансплантации тканей показали, что РПЭ может быть источником тканей нейральной сетчатки и этот феномен был одним из первых хорошо установленных случаев «трансдифференциации» (Okada, 1981). Эмбриональная ткань высших позвоночных, например, цыпленка, также способна на подобную форму регенерации НС из ткани РПЭ (Park, Hollenberg, 1989; Pittack et al., 1991). Однако ключевое различие между регенерацией, которая наблюдается у амфибий, и регенерацией у высших позвоночных состоит в том, что у амфибий этот процесс может иметь место в течение всей жизни, тогда как у птиц и млекопитающих он ограничен эмбриональными стадиями.

Значение ткани РПЭ для развития и выживания фоторецепторных клеток известно в течение многих лет. Ткань РПЭ оказывает влияние на развитие НС уже на стадиях раннего морфологического развития. Например, установленный факт значительного ослабления развития наружных сегментов НС в отсутствие РПЭ у большинства видов животных указывает на то, что взаимодействие между этими двумя типами клеток может быть фундаментально

важным для структурной и функциональной дифференциации фоторецепторов (Hollyfield, Witkovsky, 1974). Подобное поддерживающее влияние клеток РПЭ в отношении клеток нейральной сетчатки происходит и во взрослом организме. Так, наружные сегменты фоторецепторных клеток в зрелой нейральной сетчатке приматов очень быстро дегенерируют после физического отделения НС от РПЭ, причем степень восстановления уменьшается обратно пропорционально продолжительности отслойки (Anderson et al., 1986; Guerin et al., 1989, 1993; Levis et al., 1991). В наших работах также было показано (Донцов и др., 1992; Lapina, Dontsov, 1994), что НС лягушки, находящейся в тесном контакте с пигментированным РПЭ, в отличие от НС с экспериментально нарушенным контактом с РПЭ, значительно более устойчива к повреждающему действию ультрафиолета и прооксидантных ионов двухвалентного железа. Эти защитные эффекты связаны, вероятно, с тем, что клетки РПЭ участвуют в различных процессах жизнеобеспечения клеток НС, таких как зрительный цикл, фагоцитоз, транспорт метаболитов и др. Кроме того, эти эффекты могут быть связаны с процессом секретирования клетками РПЭ неких факторов, защищающих нейральную сетчатку. Так, например, было показано, что белки, секретируемые клетками РПЭ *Xenopus laevis*, положительно влияют на выживание фоторецепторов (Gaur et al., 1992; Sheedlo et al., 1998). При удалении РПЭ происходит аномальная сборка наружных сегментов фоторецепторов, потеря субклеточной ультраструктуры в них и уменьшение уровня белка опсина по сравнению с контрольными сетчатками. Эта аномалия, однако, может быть предотвращена добавлением РПЭ белкового фактора PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor). PEDF представляет собой 50 кДа гликопротеин, который связывается с гликозаминогликанами межфоторецепторного матрикса (Wu et al., 1995). Он был впервые изолирован из клеток РПЭ человека (Tombran-Tink, Johnson, 1989), однако затем было выяснено, что он широко распространен в различных тканях глаза (Ortego et al., 1996) за исключением НС (Tombran-Tink et al., 1995). PEDF защищает фоторецепторные клетки от повреждающего действия света и способен имитировать защитную роль РПЭ на фоторецепторы в процессе морфогенеза сетчатки (Cao et al., 2001; Jablonski et al., 2000).

Сравнительно недавно было установлено, что клетки РПЭ могут отвечать на развитие окислительного стресса, активацией синтеза эндогенного нейрозащитного медиатора NPD1 (Bazan, 2007, 2008; Mukherjee et al., 2007). Это вещество, синтезируемое клетками РПЭ из докозагексаеновой кислоты (отсюда название: Neuro Protectin Docosatriene), поддерживает клеточный гомеостаз фоторецепторов и РПЭ, благодаря своей способности инактивировать проапоптические и про-воспалительные сигнальные пути. Например, NPD1 вызывает снижение экспрессии противовоспалительных генов, которые включают цитокин-индуцированную экспрессию циклооксигеназы-2 (COX-2) в клетках РПЭ (Mukherjee et al., 2004). Клетки РПЭ способны даже ежедневно поглощать мертвые фоторецепторы, удерживая тем самым постоянный функционально активный пул фоторецепторных клеток (Wenzel et al., 2005; Schraermeyer and Neimann, 1999).

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Сформировавшись в процессе эмбриогенеза, клетки РПЭ начинают сразу выполнять свои функции и делают это в течение всей продолжительности жизни, ни разу не обновляясь при нормальных условиях путем деления. Это означает, что они должны оставаться жизнеспособными в течение всего периода жизни организма-хозяина (Vok, 1993). К основным функциям, выполняемым клетками РПЭ, могут быть отнесены следующие:

- РПЭ совместно с мембраной Бруха составляют так называемый гематофтальмический барьер, защищающий НС от проникновения нежелательных веществ;

- РПЭ осуществляет постоянный обмен ретиналя – хромофора зрительного пигмента, забирая его из фоторецепторов в виде полностью *трансформы* и возвращая назад в активной *цис-форме* (Baehr et al., 2003; Besch et al., 2003). Этот процесс называют зрительным циклом;

- клетки РПЭ осуществляют активный транспорт воды, кислорода и метаболитов между кровеносной системой и фоторецепторными клетками (Steinberg, 1985; Miller and Edelman, 1990; Namann, 2002);

- одна из основных и очень важных функций РПЭ – это фагоцитоз «отработанных» дисков наружных сегментов фоторецепторов (НСФ) (Spitznas, Hogan, 1970; Vok, 1993). В процессе фагоцитоза НСФ перевариваются клетками РПЭ;

- как слой пигментированных клеток РПЭ абсорбируют избыточный свет, прошедший через слои НС;

- РПЭ осуществляют адгезию целой сетчатки к сосудистой оболочке;

- РПЭ осуществляют структурирование и удерживание целостности межклеточного пространства;

- РПЭ защищают фоторецепторные клетки от повреждений, вызванных оксидативным стрессом.

Для осуществления этих функций клетка РПЭ должна иметь высокую активность метаболических процессов. Действительно, недавно было показано, что 10% из 19746 идентифицированных «значительно экспрессируемых» генов в клетках РПЭ человека, наиболее активными были гены, связанные с процессами окислительного фосфорилирования, синтеза АТФ и синтеза рибосом (Booij et al., 2009). Благодаря этим разнообразным функциям клетки РПЭ являются незаменимыми для зрительного процесса. Нарушение любой из этих функций может привести к дегенерации сетчатки, потере зрительных функций и к слепоте. Естественно, выполнение этих защитных функций может привести к гибели самих клеток РПЭ. Это может произойти, например, при аккумуляции в клетках РПЭ больших количеств окисленных, токсичных продуктов, поступающих из НС. Одна из ведущих гипотез патогенеза возрастной макулярной дегенерации (ВМД) основана как раз на феномене дегенерации клеток РПЭ, накопивших большие количества токсичных окисленных материалов (Holz et al., 1999; Zarbin, 2004; Decanini et al., 2007; Barnstable, Tombran-Tink, 2006).

2. Морфогенез и дифференциация ткани РПЭ

Морфогенез тканей глаза, в том числе ткани РПЭ, тесно связан с морфогенезом всей нервной системы организма, которая первично образуется из эктодермы гастрюлы. Процесс образования нервной системы из эктодермы называется нейруляцией. Процесс нейруляции начинается с утолщения широкого дорсального (спинного) участка эктодермы, который затем сворачивается в трубку и отделяется от остальной части клеточного слоя. Трубка, образовавшаяся из эктодермы, называется нервной трубкой. Нервная трубка дает начало головному отделу мозга, который вследствие неравномерного роста образует три расширения – мозговые пузыри: передний (prosencephalon), средний (mesencephalon) и задний (metencephalon). Передний мозговой пузырь разделяется на зачаток большого (telencephalon) и промежуточного мозга (diencephalon). Из боковых стенок переднего мозгового пузыря выпячиваются два полых выступа, которые растут по направлению к эктодерме – глазные пузырьки, зачатки глаз (рис. II.1) (Martinez-Morales et al., 2004). Непосредственно после формирования выпячивания зрительный нейроэпителий подразделяется на три зоны: дистальную, которая дает начало развитию будущей нейральной сетчатки, дорсальную, которая приводит к развитию будущего РПЭ и проксимальную, из которой развивается зрительный стебелек. Промежуточная, переходная зона между будущей нейральной сетчаткой и РПЭ, так называемая реснитчатая краевая зона CMZ (ciliary margin zone), будет формировать цилиарное тело и радужку, а промежуточная зона между РПЭ и глазным стебельком формирует точку выхода глазного нерва.



Рис. II.1. Схема развития глазных пузырьков

Расширение дистальной (периферической) части глазного пузырька и его растяжение в дорсальном направлении приводит к разделению глазного пузырька на три отдела: узкий глазной стебелек, нейральную сетчатку и РПЭ. В последующих стадиях процесса морфогенеза происходит формирование пузырька хрусталика из поверхностной эктодермы, что параллельно индуцирует

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

инвагинацию дистальной части глазного пузырька и этот процесс приводит к развитию двухслойного оптического бокала (рис. П.2).

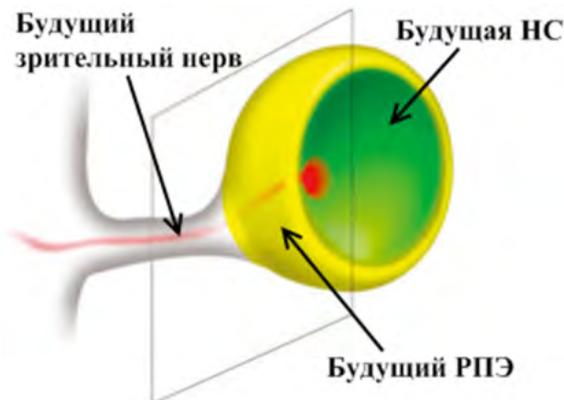


Рис. П.2. Схема разделения внутреннего слоя оптического бокала на НС и РПЭ

При этом внутренний слой оптического бокала развивается в многослойную нейральную сетчатку, а наружный слой – в однослойный пигментированный РПЭ (Chow, Lang, 2001).

В настоящее время еще относительно немного известно о молекулярных механизмах, специфичных именно для развития РПЭ. Предполагается, что сигналы, предопределяющие развитие нейроэпителия в РПЭ, приходят из мезенхимы, примыкающей к зрительному пузырьку (Chow, Lang, 2001; Martinez-Morales et al., 2004). По всей видимости, внешние сигналы, происходящие из поверхностной эктодермы и зрительной мезенхимы, индуцируют и репрессируют специфические транскрипционные факторы, которые и управляют процессами, приводящими к развитию либо ткани РПЭ, либо ткани НС (Chow, Lang, 2001; Martinez-Morales et al., 2004; Fuhrmann, 2010). То есть, дифференцировка зрительного нейроэпителия происходит в результате его экспозиции к различным внеклеточным лигандам, которые продуцируются окружающими тканями (мезенхима, эктодерма) и самим нейроэпителием.

К морфогенетическим факторам, участвующим в дифференцировке зрительного нейроэпителия, относятся белки семейства Wnt (wingless – ген бескрылости у дрозофилы), белки семейства Hh (Hedgehog) и суперсемейства трансформирующих факторов роста TGF β (transforming growth factor β), которые включают семейство костных морфогенетических белков – BMP (bone morphogenetic proteins) и ростовые факторы фибробластов FGF (fibroblast growth factor). Эти белки участвуют в клеточной дифференцировке тканей глаза и в определении дорсально-вентральной (спинально-брюшной) и дистально-проксимальной (назально-темпоральной) ретиальной полярности. Сигнальные пути, активируемые этими молекулами, определяют, какие типы клеток и в каких положениях будут формироваться при развитии и дифференцировке тканей глаза. Так, например, последовательность событий, приводящих

к вентральной идентичности сетчатки, определяется, главным образом, белками семейства Nh, которые иницируют экспрессию вентральных ретинальных транскрипционных факторов (Zhang, Yang, 2001). Формирование дорсально ретинального структурирования контролируется другим семейством ростовых факторов, а именно семейством BMP (Yang, 2004). Канонические Wnt сигнальные пути играют одну из ключевых ролей во многих важных аспектах развития центральной нервной системы позвоночных (Ihle et al., 2007; Bonner et al., 2008), а также во многих аспектах развития структур глаза позвоночных (van Raay, Vetter, 2004). Известно, что Wnt белки экспрессируются в дорсальном РПЭ и в окружающих тканях в течение раннего развития глаза (Burns et al., 2008; Cho, Серко, 2006; Fokina, Frolova, 2006).

Образовавшиеся в результате морфогенетических процессов ткани РПЭ и нейральной сетчатки функционально составляют одну ткань. Это, по-видимому, связано с тем, что ткань РПЭ в эмбриогенезе развивается в тесном контакте с нейральной сетчаткой из наружной нейроэктодермальной оболочки глазного бокала (Duke-Elder, 1961; Reichenbach, Pritz-Hohmeier, 1995). Клетки РПЭ дифференцируются координировано с клетками нейральной сетчатки, адаптируясь соответственно ее функциональным свойствам. Так, например, клетки РПЭ в макулярной области, в которой функциональная активность нейральной сетчатки максимальна, содержат больше ферментов, участвующих в процессе фагоцитоза, чтобы обеспечить значительно более высокую скорость переваривания дисков наружных сегментов фоторецепторов в этой области сетчатки (Teirstein et al., 1980; Dorey, et al., 1989; Gao, Hollyfield, 1992).

3. Строение клеток РПЭ

Гистологически РПЭ представляет собой непрерывный монослой гексагональных клеток, находящихся между нейральной сетчаткой и капиллярами сосудистой оболочки. Слой клеток РПЭ располагается от диска зрительного нерва до зубчатой линии («*ora serrata*»). В слое РПЭ клетки тесно прилегают друг к другу; объем межклеточной среды в РПЭ крайне незначителен. Общее число клеток РПЭ колеблется в глазу человека от 4,2 до 6,1 млн. Размер клеток варьирует в зависимости от их расположения в глазном бокале. В макулярной области у человека диаметр клеток составляет 10–15 мкм, а высота 10–14 мкм. В то время как на периферии у «*ora serrata*» клетки более плоские и широкие (до 60 мкм шириной) и имеют кубовидную форму (Hogan et al., 1971). В глазу человека одна клетка РПЭ контактирует примерно с 25–30 наружными сегментами палочек (Tso, Friedman, 1968; Gao, Hollyfield, 1992).

Клетка РПЭ имеет ярко выраженную полярность – апикальная (верхушечная) и базальная зоны клетки РПЭ значительно различаются в отношении их ультраструктуры, липидного и белкового состава, включая белки ионных каналов, ионных насосов и везикулярного транспорта (Marmorstein, 2001). Отдельная клетка РПЭ может быть условно разделена на три зоны (рис. II.3) (Garron, 1963).

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

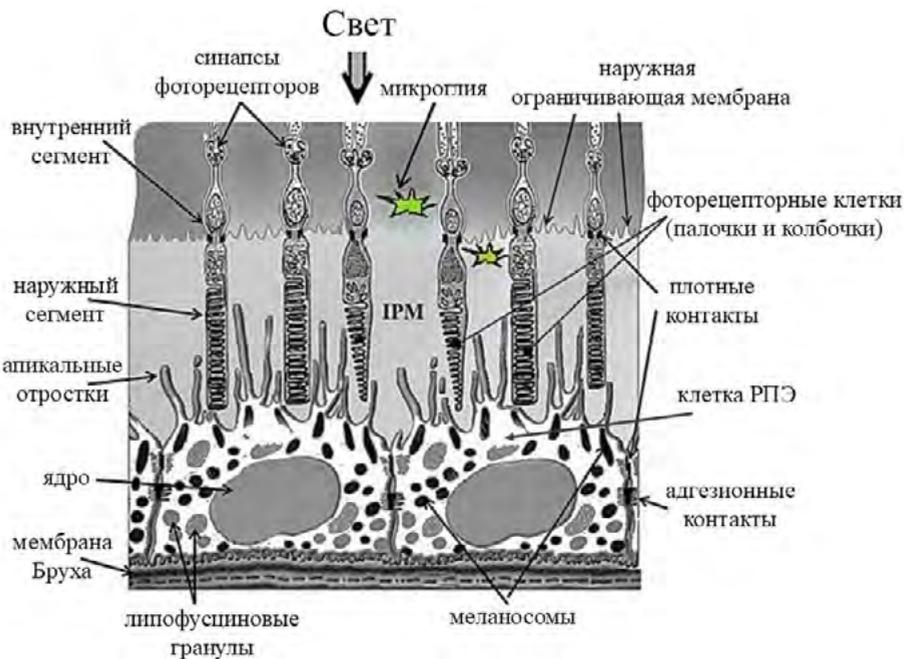


Рис. П.3. Структура глазного дна позвоночных животных.
IPM – межфоторецепторный матрикс

Это базальная зона, содержащая ядро и контактирующая с мембраной Бруха; апоикальная зона, содержащая большое количество меланосом и гладкий эндоплазматический ретикулум и зона тонких микровилл, простирающихся от апоикальной поверхности и разобщающих наружные сегменты фоторецепторов.

Апоикальная поверхность клетки РПЭ высоко специализирована. В этой части клеток находятся характерные выросты – микровиллы, которые образуют как бы оболочку или чехол, охватывающий дистальные участки наружных сегментов фоторецепторов. Эти специализированные структуры, образующие оболочку или чехол колбочек и палочек, содержат протеогликаны и могут связывать различные лектины (Blanks et al., 1988). Клетки РПЭ имеют два типа микровилл (Forrester et al., 2001; Hollyfield et al., 1990): длинные микровиллы (5–10 мкм), которые удлиняют апоикальную поверхность клеток для эпителиального транспорта и более короткие микровиллы (временные псевдоподии), которые участвуют в процессе фагоцитоза обломков НСФ (Steinberg et al., 1977). Один наружный сегмент колбочки окружен 30–40 апоикальными отростками клетки РПЭ; один наружный сегмент палочки окружен несколькими микровиллами (от 3 до 7). Микровиллы содержат различные белки цитоскелета, которые придают им способность изменять свою форму, перемещаться, а также передвигать органеллы (главным образом, меланосомы и фагосомы) в цитоплазме. Внутренняя центральная часть микровилл содержит пучки плотно упакованных актиновых филаментов (Vaughan, Fisher, 1987). Для выполне-

ния своей функции актиновые филаменты должны прикрепляться к мембране микровилл как к ее верхушечной части, так и к латеральной поверхности, простирающейся вдоль всей мембраны отростка. Предполагается, что функции белков, связывающих цитоскелет с мембраной, выполняют белки семейства ERM (ezrin-radixin-moesin) (Funayama et al., 1991; Sato et al., 1992). Члены этого семейства имеют N-концевой домен, состоящий примерно из 300 аминокислотных остатков (FERM домен), центральный домен, состоящий из примерно 150 аминокислотных остатков и C-концевой домен, известный как C-ERMAD (C-terminal ERM association domain) (Mangeat et al., 1999; Hanono et al., 2006). C-ERMAD домен способен связывать FERM домены всех членов ERM семейства белков (Gary, Bretscher, 1993) и, кроме того, имеет F-актин связывающий сайт, лежащий в пределах последних 30 аминокислотных остатков (Pestonjamas et al., 1995). Свойства ERM семейства белков связывать цитоскелет и плазматическую мембрану определяются способностью этих белков связываться с F-актином цитоскелета посредством C-концевого домена и с мембранными белками посредством FERM домена (Yonemura et al., 1998; Hanono et al., 2006).

Эзрин и мезин действительно присутствуют в микровиллах РПЭ мышей (Bonilha et al., 1999). Эзрин, мезин и белок EBP50 (ERM-binding phosphoprotein 50) локализованы, по-видимому, только на апикальной поверхности РПЭ (Bonilha et al., 1999; Bonilha et al., 2004). Эти белки не только связывают плазматическую мембрану микровилл с актиновыми филаментами цитоскелета, но и участвуют в процессах клеточной сигнализации. Так, например, эзрин способен, кроме своей чисто структурной функции, присоединять и прикреплять к мембране (заякоривать) цАМФ-зависимую протеинкиназу А (РКА) (тип I) и перемещать ее непосредственно к ее субстрату Csk – C-концевой Src киназе (Felicciello et al., 2001; Stokka et al., 2009). Последняя принадлежит к большому семейству внутриклеточных тирозинкиназ (Src), участвующих в регуляции многих важных функций клетки, в том числе в перестройке цитоскелета. Для осуществления этой функции, обеспечивающей пространственное сближение РКА и Csk, эзрин образует комплекс с белком EBP50, который с высоким сродством связывается с FERM доменом эзрина. Предполагается также, что эзрин и EBP50 могут образовывать комплексы в микровиллах с клеточным ретиналь-связывающим белком CRALBP (cellular retinaldehyde-binding protein) (Nawrot et al., 2004; Huang et al., 2009). Белок CRALBP, как и другие белки зрительного цикла, такие как 11-cis-ретинолдегидрогеназа (RDH5), клеточный ретинол-связывающий белок1 (CRBP), межфоторецепторный ретиноид-связывающий белок (IRBP) также обнаружены в обогащенной фракции микровилл апикальной части клеток РПЭ (Bonilha et al., 2004). Эти данные дают возможность предположить существование в апикальных микровиллах РПЭ структурно-функционального белкового комплекса, участвующего в процессах зрительного цикла.

В основании апикальных отростков находится белок миозин VIIa (Liu et al., 1997). Миозин VIIa участвует в процессе регуляции распределения меланосом в клетках РПЭ и находится как в микровиллах, так и в апикальной зоне клетки.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Важно отметить также присутствие в апикальных микровиллах РПЭ таких белков, как Na-K-АТРаза, карбоангидраза, транспортер глюкозы Glut-1, транспортер HCO_3^- , хлорный канал 6 (Bok, 1982; Harik et al., 1990; Bergersen et al., 1999; Wolfensberger et al., 1994; Mizukawa et al., 2002).

Интересно, что белки, участвующие в процессах взаимодействия между клетками РПЭ и фоторецепторами, например, интегрин $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ (рецептор витронектина) (Miceli et al., 1997; Finnemann et al., 1997), Na-K-АТРаза и эзрин, ассоциированы только с апикальной поверхностью клеток РПЭ (Bonilha et al., 1999; Finnemann, Rodrigues-Boulan, 1999; Gundersen et al., 1991). Напротив, белки, которые вовлечены в процессы прикрепления клетки РПЭ к базальной мембране и мембране Бруха, например, интегрин $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, локализованы только в базальной зоне клетки (Kang et al., 2009).

Базальная зона РПЭ содержит одно или два ядра и отделена от зоны кровеносных капилляров так называемой мембраной Бруха. Складки базальной мембраны РПЭ входят в цитоплазму клетки на расстояние до 1 мкм или более. Мембрана Бруха представляет собой многослойное образование, состоящее из следующих слоев (Hogan et al., 1971): мембраны-основания (толщиной 0,3 мкм), которая расположена на расстоянии примерно 0,1 мкм от базальной части мембраны РПЭ; внутренней коллагеновой зоны (1,5 мкм); среднего эластичного слоя (0,8 мкм); наружной коллагеновой зоны (0,7 мкм) и мембраны – основания кровеносных капилляров (0,14 мкм). Мембрана Бруха имеет разрывы в коллагеновых и эластичной зонах.

Межфоторецепторный матрикс заполняет внеклеточное пространство, ограниченное апикальной поверхностью клеток РПЭ, наружными сегментами фоторецепторных клеток и наружной лимитирующей мембраной, которая формируется, главным образом, плотно упакованными отростками Мюллеровских клеток. ИРМ образован сетью переплетенных молекул коллагена, полисахаридов и гликопротеинов (Campochiaro et al., 1986; Nigasawa et al., 1998). Основные функции ИРМ – это поддержка формы клеток, структуры ткани РПЭ и участие в передаче сигналов между различными типами клеток. ИРМ содержит различные водонерастворимые компоненты, включающие гликозаминогликаны, гликопротеины и протеоглики. Преобладающим гликозаминогликаном в ИРМ, не связанным с белками, является гиалуроновая кислота (гиалуронан) (Hollyfield, 1999), которая представляет собой неразветвленную цепь повторяющихся дисахаридных остатков, состоящих из глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Эта молекула может содержать до 12-13 тысяч таких остатков и достигать в длину 25 мкм. Из протеогликанов наиболее характерны для ИРМ хондроитинсульфат протеогликан (SPACRAN) и SPACR (sialoprotein associated with cones and rods) и обе эти молекулы ассоциированы с гиалуронаном (Acharya et al. 1998). Из других водонерастворимых белков, найденных в ИРМ, можно отметить люмикан (lumican), фибромодулин (fibromodulin) и нейрогликан С (neuroglycan) (Bonilha et al., 2004). Люмикан и фибромодулин – члены семейства небольших лейцин-обогащенных протеогликанов SLRP (small leucine-rich proteoglycan) (Iozzo, 1999). Люмикан – это основной кера-

тансульфат протеогликан, присутствующий в роговице глаза. Люмикан и фибромодулин, возможно, стабилизируют прикрепление нейральной сетчатки к РПЭ. Нейрогликан С – это трансмембранный хондроитинсульфат протеогликан, который преимущественно экспрессируется в клетках центральной нервной системы (Shuo et al., 2004). В IPM он был найден как в апикальной, так и в базальной зонах РПЭ. Из водорастворимых белков, присутствующих в IPM, следует отметить межфоторецепторный ретиноид связывающий белок IRBP – основной растворимый компонент межфоторецепторной матрицы, имеющий важное значение для функционирования, целостности и развития сетчатки позвоночных (Loew, Gonzalez-Fernandez, 2002). IRBP, так же известный, как ретинол-связывающий белок3 (RBP3), является липофильным гликопротеином, специфически секретируемым фоторецепторами. Обогащенный в межфоторецепторном матриксе и перерабатываемый ретинальным пигментным эпителием, IRBP необходим для зрения всех позвоночных, поскольку он облегчает перенос ретиноидов в зрительном цикле. Он также помогает транспортировать липиды между RPE и фоторецепторами (Zeng et al., 2020).

4. Пигментные гранулы клеток РПЭ

Клетка РПЭ содержит типичные органеллы, присущие всем другим типам клеток. Но наиболее характерные включения, отличающие РПЭ от многих других клеток – это фагосомы (вторичные лизосомы), меланосомы (МС), липофусциновые (ЛФГ) и меланолипофусциновые (МЛГ) гранулы.

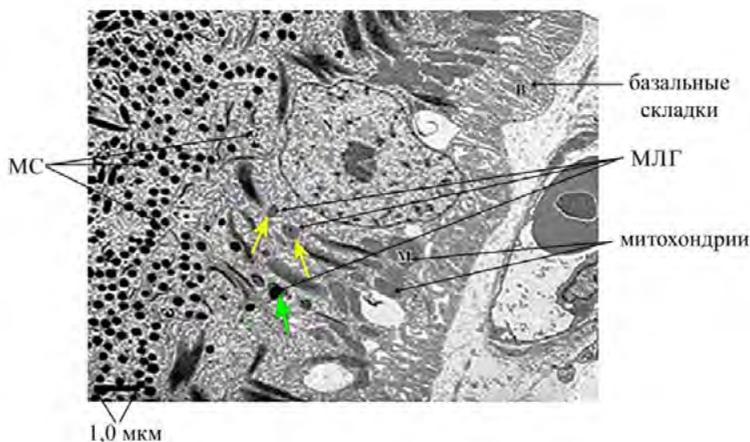


Рис. II.4. Ультраструктура клеток РПЭ молодых птиц японского перепела *Coturnix japonica*. МС – меланосомы, МЛГ – меланолипофусциновые гранулы (Serejnikova et al., 2024)

Своим названием РПЭ обязан пигменту меланину, который содержится в черных или коричневых пигментных гранулах – меланосомах (рис. II.4). Меланосомы - это специализированные внутриклеточные органеллы, которые синтезируют и хранят пигмент меланин. Размер отдельной гранулы меланосомы

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

варьирует от 1–3 мкм в длину и 0,8–1,0 мкм в диаметре. Меланосома окружена мембраной, которая, по-видимому, находится в прямом контакте с меланопротеином, заполняющим практически все внутреннее пространство гранулы.

Меланосомы появляются на ранних стадиях онтогенеза, развиваясь структурно из комплекса Гольджи. Вначале образуются так называемые премеланосомы, которые содержат в своем составе структурные меланосомальные белки, но не содержат пигмента (Orlow, 1995; Jimbow et al., 2000). Премеланосомы – это ранние эндосомальные органеллы эллипсоидальной формы с внутрипросветными полосами, состоящими из белкового фибриллярного матрикса. Затем премеланосома сливается с кислой эндосомой, содержащей тирозиназную активность. Показано, что как премеланосомы, так и эндосомы имеют в своем составе только мономеры меланина (Hatta et al., 1988). Полимер меланина находят только в зрелых меланосомах, и он всегда связан с белком (Del'Angelica, 2003; Duchon et al., 1973). Меланосомы, как и лизосомы, имеют кислый pH внутри органеллы в районе от 3 до 5 (Orlow, 1995). Предполагается, что величина меланосомального pH является важным фактором в регуляции синтеза меланина, отношения эу- и феомеланинов в их составе и скорости созревания меланосом. Премеланосомальные белки, как было показано, усиливают полимеризацию меланина при величине pH 5 (Wagh et al., 2000) и отличаются друг от друга по их способности связывать меланин.

Пигментация клеток РПЭ напрямую связана с фактором транскрипции MITF. MITF (microphthalmia-associated transcription factor) – фактор транскрипции, связанный с микрофтальмией, играет важную роль в регуляции транскрипции множественных генов пигментации, которые модулируют баланс между пролиферацией клеток, выживанием и дифференциацией в меланоцитах. Показано, что MITF экспрессируется в клетках РПЭ (Hodgkinson et al., 1993; Nakayama et al., 1998). MITF связывает и трансактивирует промоторную область генов, участвующих в терминальной дифференцировке RPE, включая фермент тирозиназу и связанные с тирозиназой белки TRP (tyrosinase-related protein) - TRP-1 и TRP-2 (Hallsson et al., 2004; Wang et al., 2024). Мутации, которые делают его нефункциональным, приводят к аномалиям в развитии клеток РПЭ, к отсутствию их пигментации, к дефектам процессов закрытия оптической щели и расширения глазного бокала, в результате чего формируются глаза маленького размера. Поскольку при этих мутациях нейральная сетчатка продолжает нормально пролиферировать, а размер глазного бокала остается маленьким, в нейральной сетчатке образуются многочисленные складки, она теряет свою форму и, в конце концов, дегенерирует (Gelineau-van Waes et al., 2008).

В течение эмбрионального развития глаза Mitf интенсивно экспрессируется в ткани РПЭ, в отличие от других тканей глаза. Однако экспрессия Mitf и синтез меланина в меланосомах РПЭ прекращаются вскоре после рождения. У человека биогенез меланосом РПЭ прекращается в течение первых трех месяцев беременности и клетки РПЭ в этот период уже содержат полный комплект меланосом (Feeney-Burns, 1980; Oguni, et al., 1991). Однако полимеризация гра-

нул меланина на белковых фибриллах и созревание меланосом продолжается вплоть до двухлетнего возраста (Feeney-Burns, 1980).

Зрелые меланосомы РПЭ имеют или яйцевидную, или сферическую форму. Первые локализуются, в основном, в апикальной части клетки РПЭ и в микровиллах, а вторые, как правило, находятся в средней части цитоплазмы. В базальной области клетки меланосомы практически не встречаются. Число сферических и яйцевидных меланосом примерно совпадает.

Клетки РПЭ, помимо меланосом, содержат еще, по крайней мере, два типа пигментных гранул – это липофуциновые гранулы и меланолипофуциновые гранулы. Липофуциновые гранулы содержат желтоватый флуоресцирующий пигмент, так называемый «пигмент старости» – липофусцин. ЛФГ являются конечным продуктом, накапливающимся в результате аномальной утилизации фагосом, содержащих обломки наружных сегментов фоторецепторных клеток (Sohal, Brunk, 1989; Yin, 1996) (рис. II.5.).

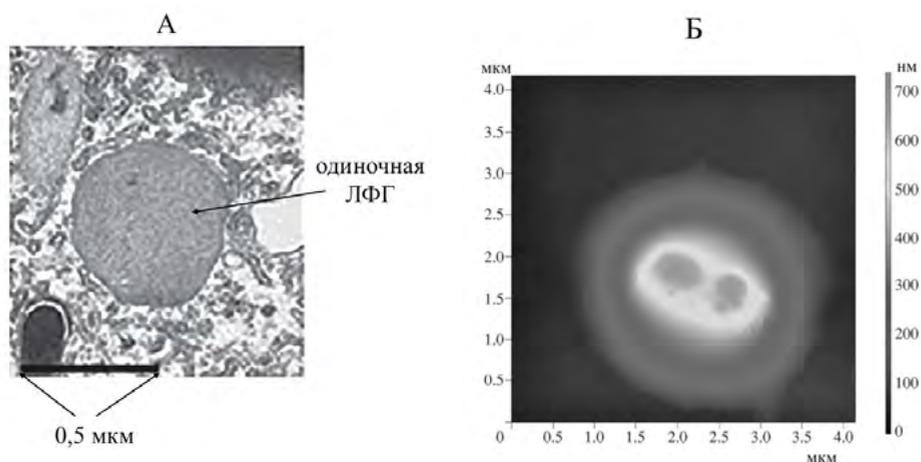


Рис. II.5. Микроскопия липофуциновой гранулы из клеток РПЭ. А. Типичная липофуциновая гранула из клетки РПЭ японского перепела с гомогенным светло окрашенным содержимым, окруженная мембраной и не содержащая меланина. Б. Топография одиночной липофуциновой гранулы, полученная с помощью атомно-силовой микроскопии (Петрухин и др., 2005)

Экспериментально выделенные липофуциновые гранулы представляют собой частички средним диаметром 0,8–1,2 микрона, окрашенные в интенсивный желтый цвет. С помощью атомно-силовой микроскопии и микроскопии ближнего поля нами были исследованы морфологические особенности липофуциновых гранул (Петрухин и др., 2005). На рис. II.5Б представлена топография одиночной гранулы липофусцина. Видно, что гранула представляет собой многослойное образование с широким основанием с диаметром порядка 2,9–3,3 микрона, с более узким верхом диаметром примерно 1,0 микрон и высотой 700 нм. Гранула имеет два «горба», расстояние между которыми составляет 80 нм, а глубина впадины между ними составляет 100 нм. Характер структуры гранулы свидетельствует о постепенном отложении материала в процессе

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

образования гранулы. Об этом же свидетельствует, по-видимому, и наличие жесткой структуры в центре гранулы, которое может быть следствием постепенного уплотнения материала гранулы в процессе ее образования. Материал же гранулы, расположенный на ее периферии, более рыхлый. Следует, однако, иметь в виду, что в этих микроскопических методах исследовались гранулы в высушенном состоянии, что, естественно, могло привести к значительному искажению структуры.

Меланолипофусциновые гранулы – это сложные органеллы, которые, по-видимому, представляет собой гранулы, в которой меланосома слилась с ЛФГ. Показано, что в начальный период развития человека происходит увеличение концентрации меланосом в клетке РПЭ, а затем к старости их количество постепенно уменьшается (Feeney-Burns et al., 1984; Schmidt, Peisch, 1986). Напротив, концентрация ЛФГ с возрастом постоянно увеличивается (Feeney-Burns et al., 1980; Feeney-Burns et al., 1984; Nordlund, 1989), достигая в некоторых случаях значительных величин. В этот же период наблюдается и возрастание количества меланолипофусциновых гранул. Вероятно, это связано с процессом слияния меланосом с липофусциновыми гранулами с образованием различного типа смешанных меланолипофусциновых гранул. Такие гранулы содержат как липофусцин, так и меланин, причем последний может располагаться в грануле различным способом. На рис. II.6 приведены примеры двух различных типов меланолипофусциновых гранул.

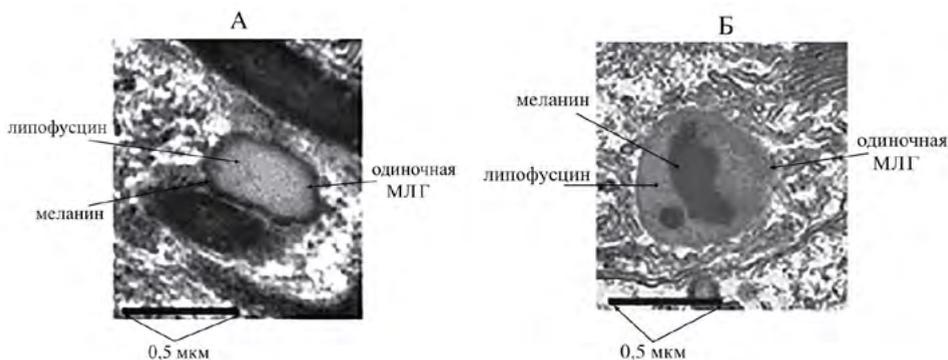


Рис. II.6. Электронная микроскопия меланолипофусцин-подобных гранул из клетки РПЭ глаза японского перепела. А – меланин расположен в виде ободка вокруг всей гранулы; Б – меланин расположен внутри гранулы (Serejnikova et al., 2024)

Поглощение рассеянного света является одной из наиболее важных функций меланина в глазу позвоночных животных и человека. Меланины как черные или темно-коричневые вещества имеют широкополосный спектр поглощения, монотонно возрастающий от ближнего инфракрасного диапазона до ближнего ультрафиолета. При этом не существует никаких абсорбционных максимумов или минимумов ни в видимой, ни в ультрафиолетовых областях спектра эумеланина. Большая часть световой энергии, поглощенной меланином, быстро

превращается в тепло по механизму внутренней конверсии. Как следствие, риск развития потенциально опасных фотохимических реакций, опосредованных меланином как хромофорной группой, существенно уменьшается.

Меланосомы, находящиеся в апикальной части клетки РПЭ, поглощают свет, проходящий через нейронные слои и фоторецепторный слой сетчатки. Тем самым они значительно уменьшают светорассеяние и светоотражение, способствуя улучшению качества изображения. Подсчитано, что РПЭ поглощает порядка 34–60% падающего света в фовеальной области и порядка 21–40% в экваториальной области (Rozanowska, 2011).

Ретиномоторный эффект в сетчатке не млекопитающих животных включает не только миграцию меланосом внутри апикальных отростков клеток РПЭ, но, одновременно, медленные сокращения и расслабления палочек и колбочек. В ходе световой адаптации меланосомы мигрируют (это минуты у птиц и десятки минут у рыб) внутри отростков РПЭ в сторону палочек, защищая их от яркого рассеянного света, при этом сами наружные сегменты палочек медленно смещаются в сторону РПЭ. В ходе темновой адаптации, наоборот, меланосомы внутри апикальных отростков РПЭ мигрируют от палочек, «открывая» их свету. В результате повышается светочувствительность сетчатки, что вносит определённый вклад в механизм скотопического – сумеречного и ночного зрения.

Что касается ночного зрения, то следует упомянуть о феномене отражения света тапетумом. Тапетум (*tapetum lucidum* – светящийся ковёр), слой, который отражает свет у многих ночных и сумеречных животных. Основная, приписываемая ему функция – усиление действия света на фоторецепторы, т.е. прямо противоположная экранирующему действию меланосом в клетках РПЭ. Действительно, для ночного зрения отражение может оказаться очень полезным, поскольку позволяет фоторецепторам поглотить добавочный, отражённый от тапетума свет и повысить, таким образом, светочувствительность сетчатки. Тапетум формируется в глазу позвоночных в сосудистой оболочке и редко в самом РПЭ. Известно, по крайней мере, три вида тапетумов: фиброзный, клеточный и гуаниновый. Тапетум имеется в структурах глаза как позвоночных, так и беспозвоночных. Его состав, свойства и спектры отражения могут быть чрезвычайно различны, но они всегда хорошо приспособлены к световой среде обитания (подробнее см. Schwab et al, 2002).

Возвращаясь к ретиномоторному эффекту, следует сказать, что наиболее раннее и подробное его изучение было проведено на рыбах. Было чётко показано, что меланосомы перемещаются в апикальных отростках клеток РПЭ, «обнимающих» наружные и внутренние сегменты фоторецепторных клеток.

В ходе световой адаптации меланосомы перемещаются в апикальных отростках по направлению к фоторецепторной клетке и окружают наружный сегмент палочки (рис. II.7Б). В ходе темновой адаптации они уходят из апикальных отростков вглубь клетки РПЭ, «открывая» палочку (рис. II.7А). В ходе световой адаптации глаза рыб меланосомы перемещаются с постоянной скоростью, и полностью «закрывают» палочку, приблизительно, в течение получаса.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

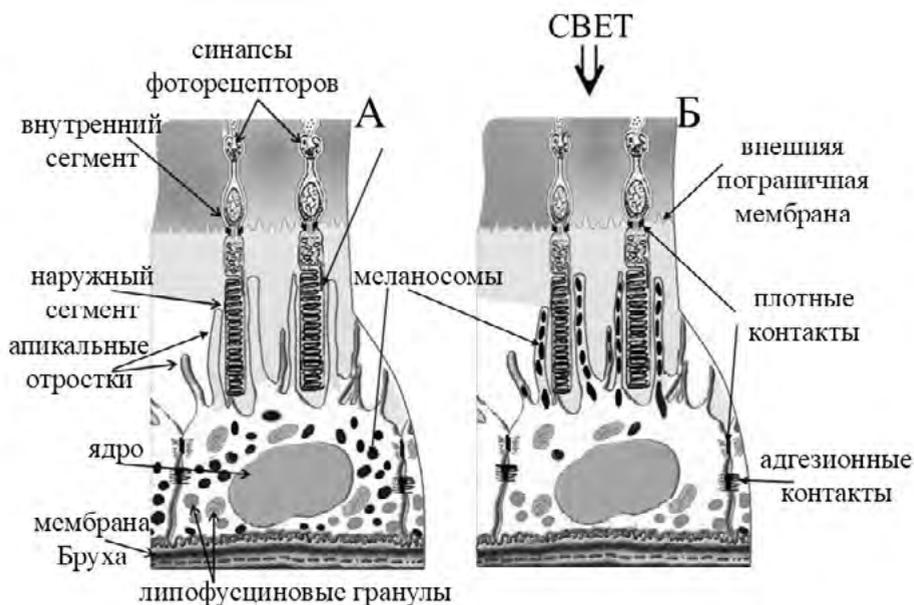


Рис. II.7. Схема ретиномоторного эффекта у позвоночных – положения меланосом в свете и темнадаптированной сетчатке глаза позвоночных. А – темнадаптированная сетчатка; Б – светадаптированная сетчатка

Дефицит или отсутствие меланина – альбинизм, как известно, существенно повышает опасность светового повреждения сетчатки, прежде всего её фоторецепторных клеток и клеток РПЭ. Альбинизм связан с целым рядом физиологических нарушений, в том числе со светобоязнью, понижением остроты зрения, прозрачной радужкой с серо-голубым или светло-коричневым оттенком и рядом других нарушений зрительного восприятия.

Б. Оммохромы сложного глаза беспозвоночных животных

Экранирующие пигменты беспозвоночных животных, как и меланины, локализуются в специфических оммохромных гранулах. Гранулы, содержащие экранирующий пигмент, присущи почти всем клеткам, входящим в состав омматидия. Диаметр гранул может достигать 2 микрон, причем в пигментных клетках диаметр, как правило, значительно больше, чем в фоторецепторных (Грибакин, Чеснокова, 1984). Кроме оммохромов в глазах беспозвоночных животных содержатся и другие экранирующие пигменты, например, птеридины (Langer, 1975). Оммохромы были также найдены в кутикуле, в экскрементах и даже в клетках нервной системы насекомых (Sawada et al., 2000).

В глазах ракообразных и большинства видов насекомых содержатся оммины, имеющие максимум поглощения в видимой области спектра при 520-540

нм. В глазах некоторых насекомых, например, мух, содержится ксантомматин, имеющий максимум поглощения при 440–475 нм в зависимости от растворителя (Linzen, 1974; Strother, 1966).

Основные функции оммохромов как экранирующих пигментов глаза - это защита фоторецепторных элементов ретикулярных клеток в ходе световой адаптации; экранирование отдельных омматидиев друг от друга и повышение, таким образом, разрешающей способности глаза; регулировка спектральной чувствительности фоторецепторов, а также раскраска кожных покровов и детоксикация излишков триптофана.

У головоногих, примером которых могут служить глаза осьминога, гранулы экранирующего пигмента находятся в середине наружного сегмента клетки ретикулы, между двумя рядами содержащих родопсин микроворсинок. В ходе темновой адаптации эти гранулы мигрируют к внутреннему сегменту, открывая наружный, светочувствительный сегмент. В ходе световой адаптации они мигрируют обратно к наружному сегменту, защищая его от избытка света. Более того, и сами наружные сегменты при этом сокращаются. Иными словами, перед нами ярко выраженный ретиномоторный эффект в глазу осьминога, представляющий собой один из механизмов световой и темновой адаптации.

В глазах беспозвоночных оммохромы локализуются как в пигментных, так и в рецепторных, ретикулярных клетках. На рис. II.8 показаны микроскопические картинки срезов омматидия сложного глаза краба, а на рис. II.9 – срез через рабдом балтийской креветки *Mysis relicta*. Хорошо видны темные пигментные гранулы, набитые оммохромами, которые в данном случае расположены в самих ретикулярных клетках (рис. II.8). Семь ретикулярных клеток, образующих «лепесток» вокруг рабдома, содержат пигментные гранулы с оммохромами. Омматидий окружен отражающими пигментными клетками, содержащими пузырьки, наполненные птеридином – отражающим пигментом.

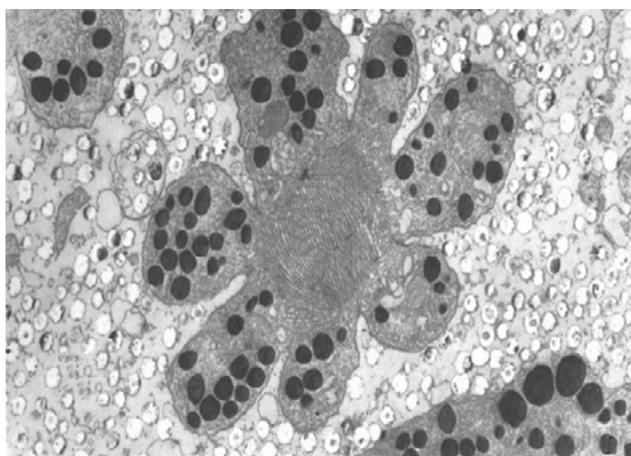


Рис. II.8. Микроскопия среза омматидия сложного глаза краба *Crangon crangon* (Elofsson R., Hallberg E., 1973)

**Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы
(структура, физикохимия, функции)**

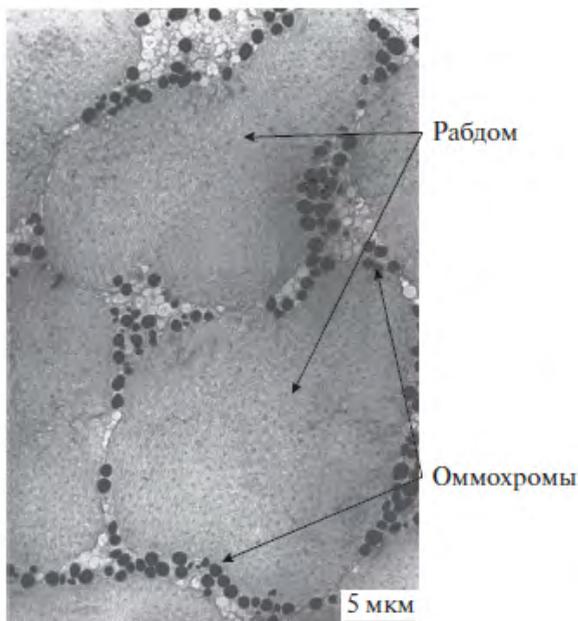


Рис. П.9. Электронная микроскопия среза через рабдом полностью тёмноадаптированной креветки *M. relicta* (Lindstrom, Nilsson, 1988)

На рис. П.9 видны обширные объемистые рабдомы и гранулы экранирующих пигментов, содержащие оммохромы, располагающиеся в узких цитоплазматических ободках, окружающие рабдом.

Другим ярким примером влияния ретиномоторного эффекта на остроту зрения является высокоразвитый сложный глаз насекомых, состоящий из множества отдельных «глазков» омматидиев. Омматидий обычно включает 6–7 фоторецептивных ретикулярных клеток, образующих единый рабдом (рис. П.10).

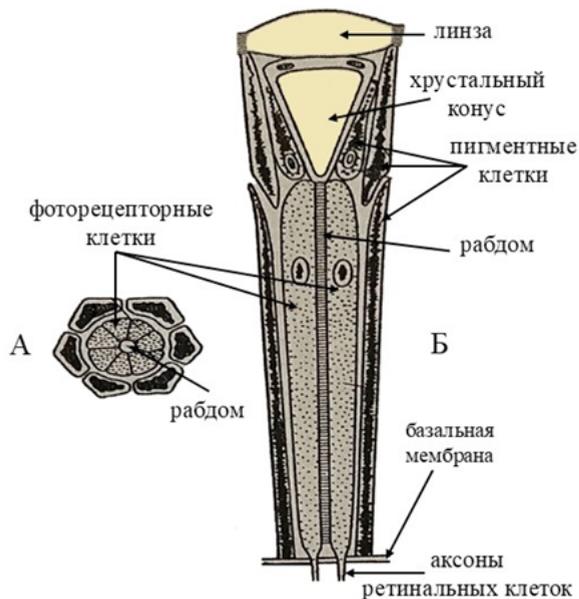


Рис. П.10. Схема строения омматидия сложного глаза насекомых. А – проекция поперечного среза омматидия на уровне фоторецепторных клеток; Б – структура омматидия сложного глаза

Рабдом в этих глазах действует как световод или оптическое волокно, как это подробно описано Феликсом Грибакиным в его монографии «Механизмы фоторецепции насекомых» (1981). Положение гранул экранирующего пигмента, которые окружают содержащие родопсин микроворсинки рабдомера, меняется в ходе суточного цикла. В светлое время суток гранулы окружают микроворсинки таким образом, что свет концентрируется на них и не рассеивается. Поэтому дневное зрение двукрылых обладает высокой остротой. В тёмное же время суток гранулы мигрируют из рабдомов, свет рассеивается, и острота зрения снижается, зато повышается чувствительность глаза (рис. II.10, А и Б).

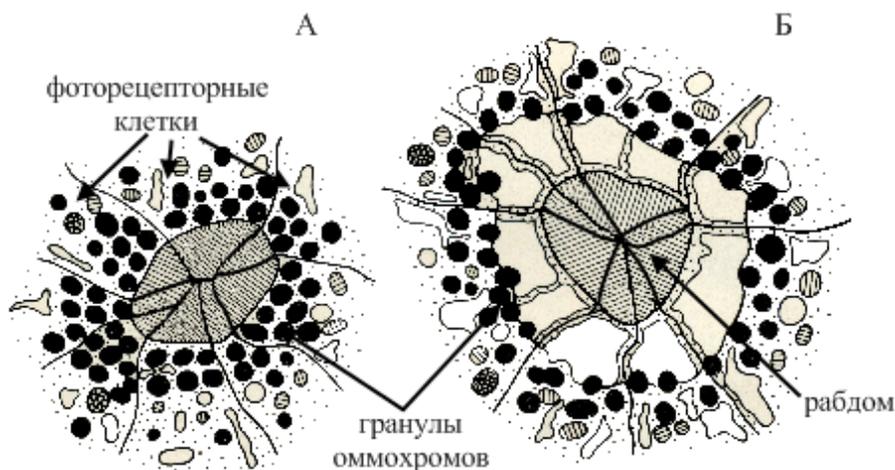


Рис. II.10. Схема ретиномоторного эффекта у беспозвоночных – положение гранул оммохромов в свет и тёмноадаптированном сложном глазу. А – оммохромные гранулы в ретикулярных (фоторецепторных) клетках плотно окружают родопсинсодержащие рабдомы в светоадаптированном глазу; Б – оммохромные гранулы мигрируют от рабдомов, открывая их свету в тёмноадаптированном глазу

В настоящее время достаточно подробно исследована регулировка спектральной чувствительности глаза беспозвоночных с помощью экранирующих пигментов. Одним из примеров может служить регулировка спектральной чувствительности глаза насекомых, а именно, мух. В норме в глазах мух есть два типа экранирующих пигментов: красные оммохромы и желтоватые птерины. Первые поглощают свет видимого диапазона, пропуская его лишь в красной области спектра, вторые поглощают, в основном, в ультрафиолетовой области. Поэтому весь свет, проходящий к рабдому через его собственную фасетку, то есть неэкранированный, поглощается зрительным пигментом родопсином. Свет же, проходящий к рабдому сбоку, через соседние фасетки, фильтруется оммохромами. В результате до рабдома доходит лишь красный свет. Таким образом, глаз мухи оказывается наделенным своеобразным дополнительным красночувствительным ($\lambda_{\text{макс}}=620$ нм) светоприемником «фильтровой» при-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

роды. Вместе с основным зеленочувствительным ($\lambda_{\text{макс}} \approx 500$ нм) светоприемником этот дополнительный «фильтровой» светоприемник, в основе которого лежит тот же самый родопсин, позволяет мухам различать цвета. Подробная информация о спектральной чувствительности глаза мух и роли экранирующих пигментов в её формировании приведена в работах (Gribakin, Ukhanov, 1993; Lall et al., 1988; Stavenga, 2002).

Другим ярким примером участия экранирующих пигментов в спектральной настройке фоторецепторов и формировании спектральной чувствительности глаза может служить глаз рака-богомолы. Следует отметить, что рака-богомолы из отряда Ротоногих (тип Членистоногие - *Arthropoda*, подтип Ракообразные - *Crustacea*, класс Высшие раки – *Malacostraca*, отряд Ротоногие - *Stomatopoda*) имеют одну из самых сложных фоторецепторных систем. Удивительная сложность состоит в том, что у них шестнадцать функциональных, спектрально различающихся типов фоторецепторов. Фоторецепторы рака-богомолы разделены на группы, ответственные за восприятие видимого и ультрафиолетового света, за формирование пространственного и цветового зрения и даже за восприятие циркулярно-поляризованного света (круговой дихроизм). Спектральная настройка многих из этих шестнадцати типов фоторецепторов обеспечивается экранирующими пигментами, локализованными как внутри фоторецепторных элементов – рабдомов, так и между рабдомами. Интересно, что сетчатка рака-богомолы может содержать разнообразные светофильтрующие пигменты, спаренные с вполне определёнными фоторецепторными клетками. Химическая природа большинства экранирующих пигментов не установлена. Известно, что большая часть пигментов, поглощающих свет в видимой области, это каротиноиды (например, астаксантин), как правило, связанные с белком. Вместе с тем, некоторые красные фильтры имеют спектр поглощения чистого астаксантина. Таким образом, свободные каротиноиды вполне могут служить у рака-богомолы светофильтрующими пигментами. Если же это белковые комплексы, содержащие пигмент, то они “упакованы” в везикулы. Эти везикулы образуют или латеральные, межрабдомные, или внутрирабдомные фильтры. Ультрафиолет-фильтрующие пигменты обеспечивают зрение этих ракообразных в ультрафиолете. Некоторые, собственно «ультрафиолетовые» фоторецепторы, функционируют как фильтры двойного лучепреломления, формируя у рака-богомолы циркулярно-поляризованное зрение. Иными словами, в ходе эволюции систем зрения Ротоногие (*Stomatopoda*) достигли в использовании экранирующих пигментов как светофильтров для спектральной настройки фоторецепторов поразительного совершенства. В результате они прекрасно приспособились к самым различным условиям световой среды обитания, расширив, благодаря экранирующим пигментам, свой спектральный диапазон от ультрафиолетовой до далёкой красной области видимого спектра. И это при том, что довольно широкие спектры поглощения собственно зрительных пигментов (родопсинов) Ротоногих охватывают лишь небольшую область видимого спектра – около 150 нм (от 400 до 550 нм) (Porter et al., 2010; Cronin et al., 2014).

Наш собственный опыт исследования экранирующих пигментов ракообразных касается ледниково-реликтовых креветок рода Мизид (*Mysis*). Мы исследовали их экранирующие пигменты и как светофильтрующие, и как антиоксидантные органеллы (см. главу V). Многочисленные виды мизид в постледниковый период оказались в самых различных условиях освещения в морской, слабосоленой и в озерной, пресноводной средах обитания. Было показано, что у видов, обитающих в морских балтийских водах, максимумы кривых спектральной чувствительности глаза, как правило, смещены на 20–30 нм в коротковолновую область спектра, по сравнению с озерными видами мизид. Мы подробно исследовали две популяции креветок одного и того же вида *Mysis relicta*, разделившихся на морскую и озерную около десяти тысяч лет назад. Озерные креветки, обитающие на большой глубине в коричнево-красной световой среде, как оказалось, имеют длинноволновую спектральную чувствительностью с максимумом около 600 нм. Морские же креветки, обитающие на небольшой глубине Балтийского моря, имеют более коротковолновую спектральную чувствительность с максимумом около 570 нм. Нами было показано (Абу Хамидах и др., 2010), что обе популяции содержат два типа родопсинов в двух типах рабдомов – один с максимумом поглощения 525–530 нм, и другой с максимумом поглощения 565–570 нм (рис. II.11).

Однако у озерной популяции содержание более длинноволнового родопсина существенно преобладает, в то время как у морской популяции, напротив, существенно преобладает содержание более коротковолнового родопсина (Jokela-Määttä et al., 2005; Donner et al., 2016). Важно подчеркнуть, что и у морской, и у озерной популяций *M. relicta* спектральная чувствительность глаза заметно сдвинута в длинноволновую область спектра по отношению к спектрам поглощения их зрительных пигментов.

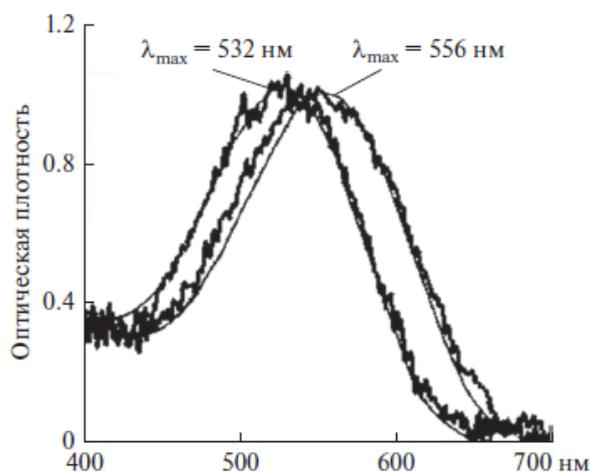


Рис. II.11. Спектры поглощения зрительных пигментов в одиночных рабдомих двух популяций креветок *M. relicta*. Слева – спектр рабдома морской популяции, справа – спектр рабдома озерной популяции

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Мы исследовали спектры поглощения экранирующих пигментов и их вклад в формировании более длинноволновой, по сравнению со спектрами поглощения родопсинов, спектральной чувствительности глаза этих популяций, хорошо приспособленной к их световой (спектральной) среде обитания (Абу Хамидах и др., 2010; Островский и др., 2018). Методом микроспектрофотометрии нами были зарегистрированы спектры поглощения гранул экранирующих пигментов в глазах обеих популяций креветок *M. relicta*. Большинство гранул имели спектры поглощения в синей области спектра, что характерно для ксантомматинов (максимум при 455 нм). Меньшее количество гранул имело спектры поглощения, характерные для смеси оммохромов – омматинов и омминов (невывраженные максимумы при 440 и 555 нм) (рис. II.12, а и б). Помимо этого, в глазах креветок морской, но не озерной, популяции были зарегистрированы в небольшом числе, спектры, характерные для омминов (максимум около 580 нм). Спектры, характерные для каротиноидов, встречались в единичных случаях в виде крупных жировых капель.

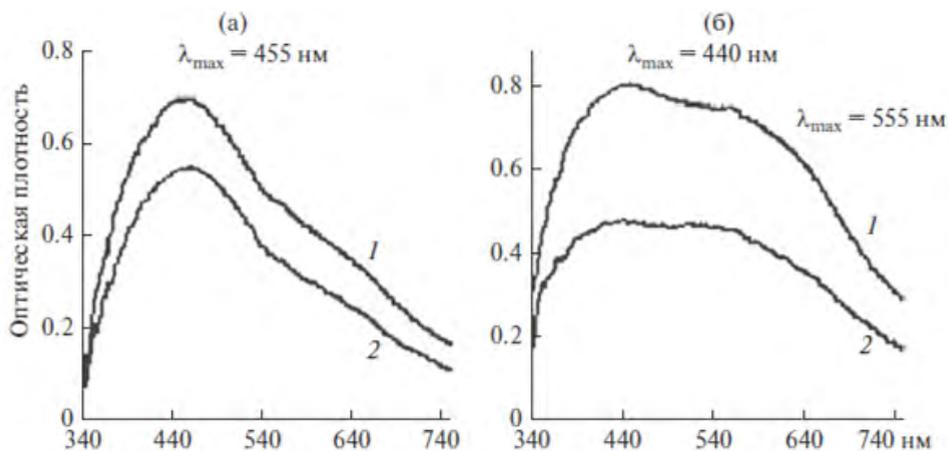


Рис. II.12. Спектры поглощения гранул экранирующих пигментов двух популяций креветок *M. relicta*. а) Гранулы с ксантомматин-подобными спектрами; 1 – морская популяция, 2 – озерная популяция. б) Гранулы с омматин-оммин-подобными спектрами; 1 – морская популяция, 2 – озерная популяция

Были проведены расчеты спектральной чувствительности глаза *M. relicta*, формируемой спектрами поглощения зрительных пигментов в сочетании со световой фильтрацией более многочисленными ксантомматин подобными гранулами (рис. II.13, а и б) (Абу Хамидах и др., 2010). Как можно видеть, расчётные кривые спектральной чувствительности, построенные с учетом ксантомматиновой светофильтрации, хорошо описывают характер реальной спектральной чувствительности креветок *M. relicta*. Иными словами, световая фильтрация экранирующими гранулами, содержащими ксантомматин, позволяет сформировать кривую спектральной чувствительности, идентичную спектральной чувствительности глаза *M. relicta*.

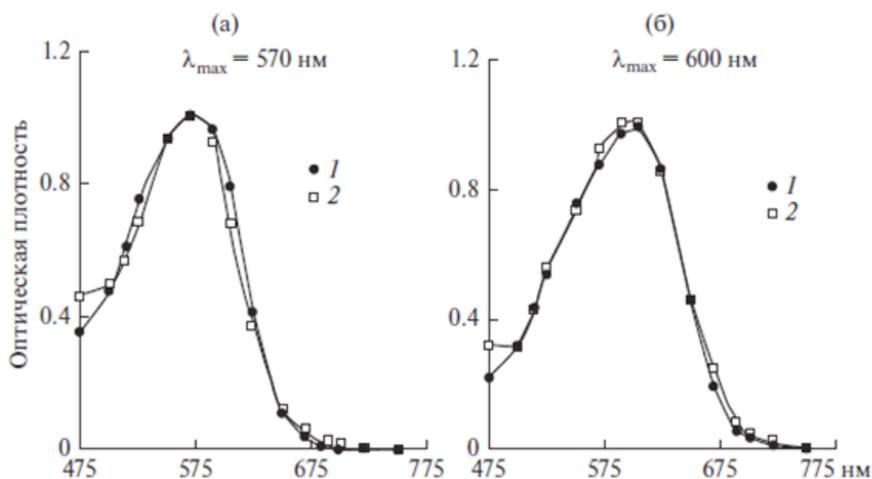


Рис. 11.13. Кривые спектральной чувствительности морской (а) и озерной (б) популяций *M. relictus*. 1 – расчетные кривые; 2 – экспериментальные электроретинографические кривые

Таким образом, не вызывает сомнения важнейшая роль экранирующих пигментов как светофильтров в формировании как кривой спектральной чувствительности глаза, так и ряда других не менее важных физиологических параметров зрительного восприятия у беспозвоночных и позвоночных животных и человека.

Глава III

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ТКАНЕЙ ГЛАЗА ПИГМЕНТИРОВАННЫХ И НЕПИГМЕНТИРОВАННЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ И БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ К ПОВРЕЖДАЮЩЕМУ ДЕЙСТВИЮ РАЗЛИЧНЫХ ОКСИДАНТОВ

А. Опасность повреждения фоторецепторных клеток в условиях окислительного стресса

Как уже говорилось, все позвоночные животные содержат в тканях глаза черные или темно-коричневые меланины в качестве экранирующих пигментов. В клетках РПЭ меланины, в основном, локализованы в пигментных гранулах – меланосомах, меланолизосомах и меланолипофусциновых гранулах. Ранее было общепринято, что меланосомы в глазах позвоночных животных выполняют только функцию пассивного экрана, защищающего фоточувствительные структуры от избыточного света. Кроме того, поглощая лишний рассеянный свет, меланосомы повышают остроту зрения и уменьшают количество обесцвеченного родопсина (Back et al., 1965). Животные-альбиносы, у которых в клетках РПЭ отсутствуют меланосомы, проявляют повышенную светочувствительность (фотофобия) и плохо видят при ярком дневном свете (дневная слепота). Так, например, для развития дегенеративных процессов в сетчатке крыс-альбиносов достаточно в 60 раз меньшей интенсивности света, чем для пигментированных особей того же вида (Rapp, Williams, 1980). Это связано с тем, что структуры глаза чрезвычайно чувствительны к различным повреждающим факторам. Повреждающие факторы как внешней (экзогенные), так и внутренней среды организма (эндогенные), приводящие к развитию окислительного стресса, мы будем называть прооксидантными факторами.

К основным факторам окислительного стресса (прооксидантным факторам) относят кислород и его активные формы (супероксидный радикал, синглетный кислород, пероксид водорода, гидроксильный радикал, гидропероксиды липидов и их радикалы, радикалы оксидов азота и др.), ионы металлов переменной валентности (особенно широко распространенные в организме ионы двухвалентного железа, катализирующие свободнорадикальные процессы), карбонильные соединения, накапливающиеся при оксидации липидов и при реакции Майяра, а также различные виды электромагнитного излучения (ви-

димый свет, ультрафиолет, γ -излучение) и фотосенсибилизаторы. При этом эндогенные оксиданты в основном образуются в результате функционирования митохондриальной электрон-транспортной цепи, NO оксидазной реакции, реакции Фентона, метаболизма аргинина, микросомальной детоксикации, пероксисомальном β -окислении, в процессах фагоцитоза, воспаления, гликирования и др. Источниками экзогенных оксидантов являются УФ облучение, рентгеновское и γ -облучение, видимый свет в присутствии фотосенсибилизаторов, ультразвук, наночастицы, пестициды, гербициды, ионы металлов переменной валентности, озон, ксенобиотики.

Высокая чувствительность зрительных клеток при окислительном стрессе обусловлена тремя основными причинами.

Свет. Известно, что почти 90% света, проходящего в глаз, поглощается меланосомами ретинального пигментного эпителия. Природный парадокс зрения состоит в том, что свет, являясь носителем зрительной информации, одновременно выступает как фактор риска. Действительно, сочетание света и кислорода – необходимое условие для осуществления нормального фоторецепторного процесса – одновременно способствует возникновению и развитию в структурах глаза деструктивных химических реакций. Чувствительность фоторецепторных клеток нейральной сетчатки и клеток пигментного эпителия к фотоповреждению связана с присутствием в них всех факторов, необходимых для свободнорадикальной реакции фотоокисления. Во-первых, это эффективно поглощающие свет хромофоры (т.н. фотосенсибилизаторы окисления), во-вторых, высокое парциальное давление кислорода и, в-третьих, наличие субстратов, способных окисляться с большой легкостью. Клетки РПЭ и сетчатки содержат высокие концентрации различных фотосенсибилизаторов, среди которых наиболее активны ретиналь и его производные. Ретиналь способен выступать фотосенсибилизатором окисления и повреждения не только родопсина, но и других белков. Показано, что он сенсibiliзирует, например, фотоокисление и повреждение двух ключевых белков зрительного цикла – ABCR кассетного транспортера и водорастворимого межфоторецепторного ретиналь/ретинол переносящего белка (Островский, 2005).

Субстраты окисления. Молекулярные компоненты фоторецепторной мембраны – белки (родопсин) и липиды – представляют собой идеальные субстраты для реакции свободнорадикального окисления. Как и любая биологическая мембрана, эта мембрана состоит из липидного бислоя и пронизывающих его мембранных белков. Основным белком этой мембраны является родопсин: на его долю приходится до 95–98% всех интегральных мембранных белков. Тремя основными фосфолипидами фоторецепторной мембраны являются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин. Уникален состав этих фосфолипидов: более 60% – это полиненасыщенные жирные кислоты, причем на долю докозагексаеновой кислоты, содержащей 22 углеродных атома и 6 двойных связей (C22:6), приходится около 75% от всех жирных кислот (Островский, Говардовский, 1992). Благодаря этому фоторецепторная мембра-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

на обладает исключительно низкой вязкостью. Фотоокисление белков и липидов фоторецепторной мембраны идет параллельно и практически независимо. Действительно, ингибитор пероксидного окисления липидов – 2,6-ди-трет-бутилокситолуол (дибунол) полностью предотвращает фотоокисление липидов в этой мембране и лишь частично снижает скорость окисления тиоловых групп белка (Погожева и др., 1981).

Важным субстратом для свободнорадикального окисления могут являться фагоцитируемые обломки апикальных фрагментов наружных сегментов фоторецепторов. Эти обломки появляются между сетчаткой и ретинальным пигментным эпителием. Фагоцитоз обломков – одна из основных функций этого эпителия. Освещение ускоряет обновление мембран наружных сегментов и фагоцитоз их обломков. При этом внутри клетки пигментного эпителия может накапливаться большое количество фагосом. Так, при обычной циклической смене дня и ночи в клетке РПЭ обнаруживается 20-30 фагосом, а после интенсивного освещения их число увеличивается до 250-400, в результате чего в цитоплазме они начинают занимать до 70% ее объема (Marshall, 1970). При некоторых патологиях, когда механизм фагоцитоза нарушается, обломки наружных сегментов могут скапливаться в пространстве между сетчаткой и пигментным эпителием, и это представляет для глаза большую опасность. Токсичность отработанных фоторецепторных мембран определяется высоким содержанием в них полиненасыщенных жирно-кислотных остатков липидов и сенсibilизаторов фотоокислительных процессов. О токсичности продуктов автоокисления фоторецепторных мембран свидетельствует, например, тот факт, что обломки наружных сегментов фоторецепторов эффективно ингибируют синтез ДНК и РНК в лимфоцитах морской свинки; α -токоферол и другие антиоксиданты оказывают при этом защитное действие (Gery, 1980).

Кислород. Кислород является важным участником реакции свободнорадикального окисления. Следует отметить, что вдоль фоторецепторной клетки сетчатки парциальное давление кислорода различно. В дистальной части ее наружного сегмента, ближе расположенной к пигментному эпителию и сосудистой оболочке, концентрация кислорода, по сравнению с проксимальной (базальной) частью, больше. Действительно, если в верхней области наружного сегмента напряжение кислорода PO_2 составляет около 100 мм ртутного столба, что эквивалентно концентрации кислорода в артериальной крови, то в области проксимальной части (на границе с внутренним сегментом) PO_2 составляет только примерно 10 мм ртутного столба в темноте и порядка 30 мм ртутного столба на свету. Разница может объясняться тем, что во внутреннем сегменте фоторецепторной клетки содержится большое скопление митохондрий, которые, как известно, являются основными потребителями кислорода. С различным парциальным давлением кислорода вдоль фоторецепторной клетки, вероятнее всего, связан градиент фотоповреждения ее наружных сегментов. Дистальная часть наружных сегментов содержит «старые», накопившие молекулярные дефекты, фоторецепторные диски более чувствительные к

повреждению. Свидетельством тому служит обнаруженный градиент уменьшения количества титруемых SH-групп, идущий от верхушки наружного сегмента («старые» диски) к его основанию (базальные «новые» диски) (Деревянченко и др., 1985).

В глазах беспозвоночных животных опасность фотоповреждения имеет свои особенности. Во-первых, процесс фагоцитоза отработанных фоторецепторных мембран осуществляется здесь, по-видимому, не пигментными клетками, как у позвоночных, а ретикулярными клетками (Stowe, 1983). Следовательно, в условиях длительной световой экспозиции в светочувствительных клетках может накапливаться большое количество фагосом, представляющих собой субстрат для фотоиндуцированного окисления. В ходе же окисления фагосом накапливаются токсичные продукты (гидропероксиды, альдегиды, супероксидные радикалы), способные проникать в мембраны рабдома и повреждать их. Во-вторых, оптические среды глаза многих беспозвоночных прозрачны для УФ излучения, чрезвычайно активного индуктора процессов фотоокисления.

Таким образом, опасность фотоповреждения в омматидии сложного глаза, по всей видимости, более высока, чем в глазах позвоночных животных. В то же время, известно, что меланина в глазах ракообразных, головоногих и членистоногих нет. По непонятным до конца причинам несмотря на то, что меланин присутствует и синтезируется практически у всех видов этих животных, в пигментных и фоточувствительных клетках глаза его нет. Вместо меланина они содержат другие экранирующие пигменты – оммохромы. Оммохромы, как было ранее общепринято, выполняют в клетках сложного глаза функции оптического экранирования светочувствительных элементов ретикулярных клеток, экранирования отдельных омматидиев друг от друга, повышения разрешающей способности глаз и изменения спектральной чувствительности фоторецепторов (Грибакин, Чеснокова, 1984). А функции защиты от фотоповреждения у них выполняют каротиноиды, тушители синглетного кислорода - одного из первичных продуктов фотосенсибилизированного окисления (Zhu, Kirschfeld, 1984).

Все эти факты свидетельствуют о высокой потенциальной чувствительности клеток глаза к действию прооксидантных факторов. Однако, как показывают наши исследования, все эти факторы существенны, в основном, только для клеток глаза животных-альбиносов или для слабо пигментированных особей. Напротив, структуры глаза пигментированных животных были крайне резистентными к действию различных прооксидантов. Нам удалось доказать, что причиной такой высокой устойчивости являются меланинсодержащие органеллы – меланосомы у позвоночных животных и оммохромсодержащие органеллы – оммохромасомы у беспозвоночных животных, которые эффективно защищают фоточувствительные клетки в условиях окислительного стресса, ингибируя процессы перекисидации липидов.

Б. Защитная роль пигментации от повреждающего действия света, кислорода и его активных форм. Сравнительное исследование на нейральной сетчатке и ретинальном пигментном эпителии (РПЭ) глаза пигментированных и непигментированных позвоночных животных

Исследование кинетики пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в тканях нейральной сетчатки и РПЭ под действием гипероксии и активных форм кислорода в темновых условиях было проведено на кроликах породы «шиншилла». Нейральную сетчатку и РПЭ извлекали из глазного бокала адаптированных к темноте животных. Реакцию ПОЛ индуцировали путем интенсивного пропускания кислорода через гомогенаты исследуемых тканей при температуре 37°. О развитии процесса судили по накоплению продуктов реакции, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой – ТБК-активных продуктов, согласно (Buege, Aust, 1978).

Пропускание кислорода через гомогенаты тканей сетчатки и пигментного эпителия кроликов-альбиносов вызывает существенное увеличение в них скорости ПОЛ – в среднем в 3 раза. В табл. III.1 представлены результаты опытов, в которых сравнивали влияние повышенных концентраций кислорода на развитие процесса ПОЛ в РПЭ и сетчатке глаза пигментированных животных и альбиносов.

Табл. III.1. Сравнение скоростей ПОЛ у пигментированных кроликов и кроликов-альбиносов в условиях гипероксии

Животное	Концентрация ТБК-активных продуктов в тканях, нмоль/мг белка за 2 часа инкубации		
	Нейральная сетчатка	РПЭ	Смесь нейральной сетчатки с РПЭ (1:1)
Пигментированные кролики	2,3 ± 1,2	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,05
Кролики-альбиносы	2,7 ± 1,0	2,5 ± 0,8	4,6 ± 0,2

Из таблицы видно, что абсолютные количества ТБК-активных продуктов, накопившиеся за 2 часа реакции в условиях гипероксии, примерно одинаковы в тканях сетчатки и РПЭ альбиносов, а также сетчатки, извлеченной из глаз пигментированных кроликов. В то же время, скорость ПОЛ в гомогенатах ткани РПЭ и в смеси РПЭ и нейральной сетчатки пигментированного кролика оказалась в несколько раз ниже, чем у непигментированных животных (в среднем в 6,5 раз по результатам 4 экспериментов). При пропускании кислорода через гомогенат смеси пигментированного РПЭ и нейральной сетчатки защитный антиоксидантный эффект пигментного эпителия, содержащего

меланосомы, выражен особенно сильно. Это видно из рис. III.1, на котором представлена кинетика накопления ТБК-активных продуктов в гомогенате смеси двух тканей – сетчатки и РПЭ, извлеченных из глаз альбиносов (верхняя кривая) и пигментированных (нижняя кривая) кроликов. Из этих данных видно, что в условиях гипероксии в РПЭ глаза пигментированных животных, в отличие от альбиносов, не происходит сколько-нибудь заметного процесса ПОЛ. Более того, пигментированный РПЭ, содержащий меланосомы, оказывает защитный антиоксидантный эффект при действии кислорода на нейральную сетчатку.

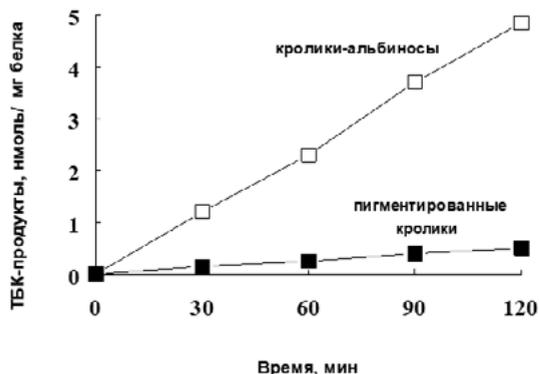


Рис. III.1. Сравнительная кинетика пероксидного окисления липидов при гипероксии в смеси тканей нейральной сетчатки и РПЭ кроликов-альбиносов и нормально пигментированных кроликов

Подобное защитное действие пигментированного РПЭ наблюдается и при индукции ПОЛ активными формами кислорода. В этих экспериментах в качестве оксидантов были использованы системы индукции ПОЛ, содержащие либо ионы двухвалентного железа и аскорбиновую кислоту, либо ксантин и ксантиноксидазу. Было показано, что даже при индукции ПОЛ ионами двухвалентного железа в присутствии аскорбата не происходит сколько-нибудь заметного накопления ТБК-активных продуктов в РПЭ пигментированных кроликов в пределах 2-х часов инкубации (рис. III.2, кривая 4).

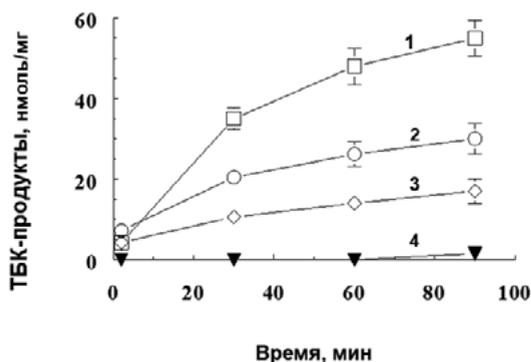


Рис. III.2. Сравнительная кинетика ПОЛ, индуцированного системой Fe^{2+} -аскорбат в тканях сетчатки и РПЭ кроликов-альбиносов и нормально пигментированных кроликов (1 – нейральная сетчатка пигментированных животных, 2 – нейральная сетчатка альбиносов, 3 – РПЭ альбиносов, 4 – РПЭ пигментированных животных)

С другой стороны, в этих же условиях наблюдается довольно высокая скорость пероксидации гомогенатов тканей сетчатки обоих типов животных (кривые 1 и 2) и гомогената ткани РПЭ кроликов-альбиносов

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

(кривая 3). Хорошо видно, что различие в скоростях ПОЛ в сетчатке и РПЭ альбиносов (кривые 2 и 3) намного меньше такового у пигментированных животных (кривые 1 и 4). Это свидетельствует о том, что ткань пигментированного РПЭ значительно более устойчива к действию прооксидантов в темновых условиях, чем непигментированная ткань РПЭ. Поскольку оба типа тканей РПЭ отличаются друг от друга, вероятно, в основном только содержанием меланосом, такое выраженное различие в их резистентности в отношении действия оксидантов, по-видимому, не связано с особенностями их липидного состава или уровнем антиоксидантной активности. Мы предположили, что это различие связано с отсутствием у альбиносов пигмента меланина, который оказывает сильный защитный эффект у пигментированных животных. Действительно, пигментированная ткань РПЭ не только не способна к окислению изученными прооксидантными системами, но и способна оказывать защитный эффект на процессы ПОЛ в сетчатке глаза.

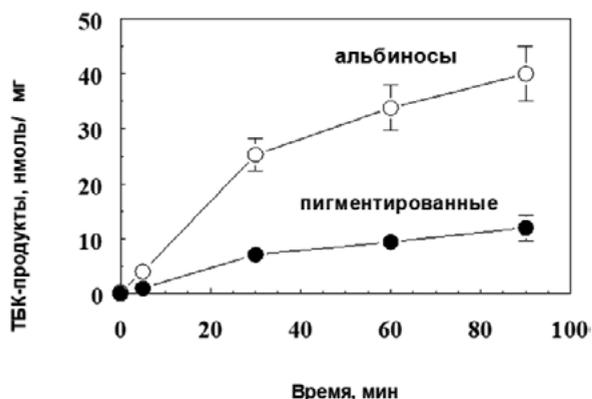


Рис. III.3. Сравнительная кинетика ПОЛ, индуцированного системой Fe^{2+} -аскорбат в смеси тканей нейральной сетчатки и РПЭ кроликов-альбиносов и нормально пигментированных кроликов

На рис. III.3 представлена кинетика железо-аскорбат-индуцированного ПОЛ в гомогенате смеси двух тканей – нейральной сетчатки и пигментного эпителия, взятых в отношении 1:1, как это имеет место *in vivo*. Видно, что смесь тканей кроликов-альбиносов окисляется даже лучше, чем нейральная сетчатка и РПЭ по отдельности. В то же время, РПЭ пигментированных кроликов значительно замедляет скорость ПОЛ нейральной сетчатки.

Исходя из вышесказанного, логично предположить, что ингибиторами реакции ПОЛ в пигментированном РПЭ являются меланосомы. Тогда удаление их из гомогената пигментированного РПЭ должно приводить к усилению процесса перекисидации. Для удаления гранул было применено центрифугирование при $600 \times g$ в течение 30 мин (Nicotra, Livrea, 1976). При этом удаляются ядра и меланосомы, которые отбрасываются, а оставшийся гомогенат используется в эксперименте. Оказалось, что удаление меланосом из гомогената РПЭ действительно приводит к возрастанию скорости ПОЛ (рис. III.4). В этом случае в качестве системы индукции ПОЛ использовали ксантиноксидазу, которая генерирует супероксидные радикалы кислорода при окислении ксантина.

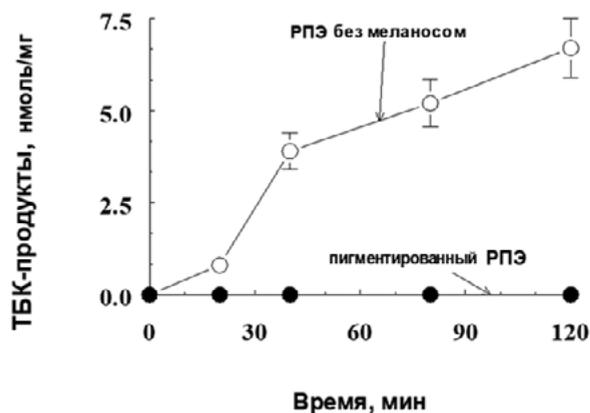


Рис. III.4. Кинетика ПОЛ в ткани РПЭ лягушки *Rana temporaria*, индуцированное системой ксантин-ксантиноксидаза

Эта прооксидантная система оказалась эффективной лишь для гомогената РПЭ с удаленными меланосомами. В пигментированной ткани процесс ПОЛ полностью отсутствовал.

Высокая устойчивость пигментированной ткани РПЭ по сравнению с непигментированной была характерна также и при действии света. На рис. III.5 показана кинетика фотоиндуцированной видимым светом пероксидации смеси нейральной сетчатки и РПЭ, выделенных из глаз пигментированных (кривая 2) и непигментированных (кривая 1) морских свинок.

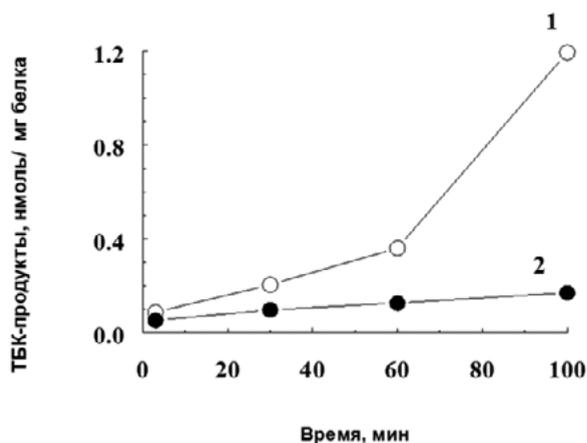


Рис. III.5. Кинетика ПОЛ гомогената смеси нейральной сетчатки и РПЭ пигментированных (кривая 2) и непигментированных (кривая 1) морских свинок под действием видимого света

Видно, что хотя интенсивность реакции пероксидации в этих условиях была невелика, наблюдается достоверное различие в концентрации накопившихся продуктов пероксидации у пигментированных свинок и свинок-альбиносов, особенно при длительных экспозициях. При использовании света в качестве прооксиданта следует учитывать также экранирующий эффект меланосом. Поскольку меланосомы хорошо поглощают свет во всех диапазонах спектра, они будут уменьшать световой поток, поглощаемый субстратами окисления и фотосенсибилизаторами. Это должно приводить к уменьшению скорости фотопероксидации по сравнению с альбиносами, у которых меланосомы отсутствуют.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Поэтому уменьшение интенсивности процесса фотопероксидации у пигментированных животных связано с двумя факторами – экранирующим действием меланина и ингибирующей активностью меланосом на ПОЛ.

Удаление меланосом из пигментированной ткани РПЭ также приводит к усилению процесса светоиндуцированного ПОЛ. На рис. III.6 приведена сравнительная кинетика пероксидации РПЭ лягушки в присутствии и в отсутствии меланосом, индуцированная интенсивным видимым светом. Видно, что нативная пигментированная ткань (кривая 2) была значительно устойчивее ткани РПЭ, из которой были удалены меланосомы (кривая 1).

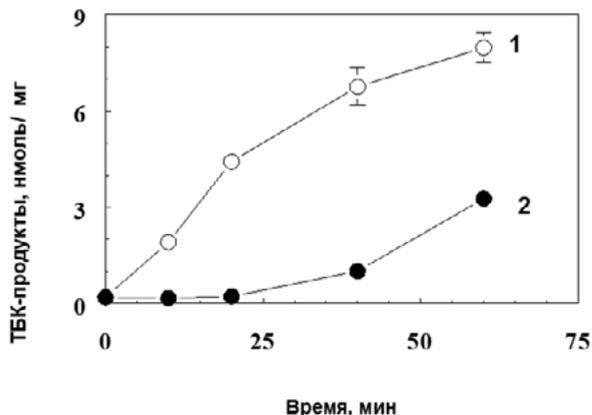


Рис. III.6. Защитное действие меланосом на индуцированное видимым светом ПОЛ в клетках РПЭ лягушки *Rana temporaria*. 1 – гомогенат ткани РПЭ без меланосом; 2 – гомогенат исходной, пигментированной ткани

В. Меланосомы как основной фактор, придающий клеткам РПЭ позвоночных животных повышенную устойчивость к действию различных оксидантов

Итак, как было показано в предыдущем разделе этой главы, пигментированная ткань РПЭ глаза позвоночных животных гораздо более устойчива к действию различных прооксидантных систем (гипероксия, ионы двухвалентного железа, супероксидные радикалы, свет), чем непигментированная. Было сделано предположение о том, что это различие связано с наличием в пигментированной ткани РПЭ меланинсодержащих меланосом. Действительно, удаление меланосом из гомогената клеток пигментированной ткани РПЭ приводило к усилению процесса ПОЛ.

Вместе с тем все же нельзя полностью исключить, что высокая устойчивость пигментированного РПЭ связана с более высокой активностью в нем антиоксидантов и антиоксидантных ферментов, а также с большим содержанием в липидах ненасыщенных жирно-кислотных остатков. Поэтому важно было оценить ингибирующую активность пигментированного и непигментированного РПЭ в отношении пероксидации одного и того же субстрата. В этом разделе рассмотрены факты, свидетельствующие о высокой антиоксидантной активности пигментированного РПЭ по сравнению с непигментированным и о роли меланосом в этом процессе.

В модельных экспериментах были сравнены способности гомогенатов двух видов тканей РПЭ ингибировать процесс ПОЛ. РПЭ и нейральную сетчатку выделяли из глаз пигментированных кроликов породы «шиншилла». В качестве модельной системы использовали липосомы, полученные из общей фракции фосфолипидов мозга кролика. Индукцию процесса ПОЛ осуществляли системой Fe^{2+} - аскорбат. Добавляя к этой системе различные количества гомогенатов тканей РПЭ, регистрировали снижение скорости накопления ТБК-активных продуктов, вызванное ингибирующим действием антиоксидантов, присутствующих в тканях РПЭ. Как видно на рис. III.7, пигментированная ткань РПЭ гораздо эффективнее ингибирует процесс перекисидации липидов ткани мозга, чем непигментированная. Это видно по замедлению кинетики ПОЛ – добавление гомогената пигментированной ткани РПЭ тормозит скорость ПОЛ сильнее (в среднем в 1,6 раза), чем добавление гомогената ткани РПЭ из глаз альбиносов.

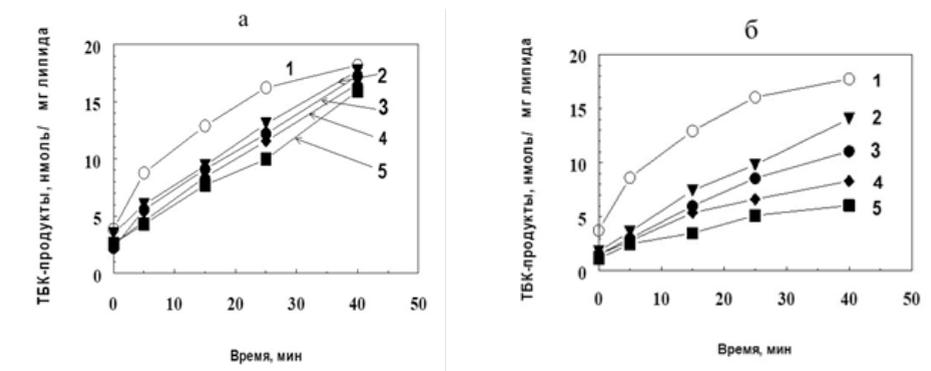


Рис. III.7 (а и б). Влияние различных количеств гомогената ткани РПЭ из глаз альбиносов (а) и пигментированных животных (б) на скорость ПОЛ мозга

Такая же направленность проявляется и в отношении максимального (за время реакции) накопления ТБК-активных продуктов (рис. III.7). Видно, что добавление ткани РПЭ глаз альбиносов практически не изменяет скорость накопления продуктов ПОЛ, в то время как при добавлении пигментированной ткани максимальное накопление ТБК-активных продуктов существенно уменьшается по мере увеличения количества добавленного гомогената ткани РПЭ.

Таким образом, способность пигментированной ткани РПЭ ингибировать процесс ПОЛ выше по сравнению с тканью РПЭ глаз альбиносов. Это выражается в большем снижении скорости ПОЛ и максимального накопления ТБК-активных продуктов. Такое различие в ингибирующих способностях двух видов тканей РПЭ, скорее всего, связано с наличием в пигментированной ткани меланосом (рис. III.8).

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

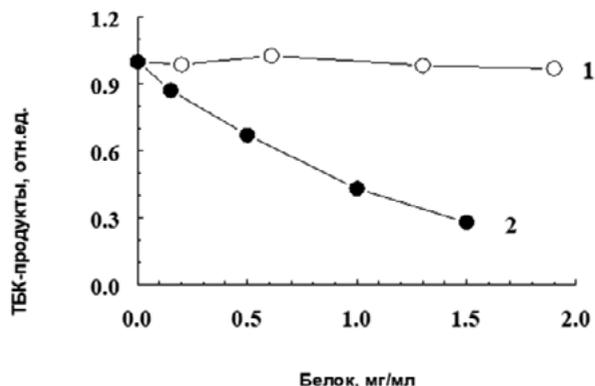


Рис. III.8. Влияние различных количеств гомогената ткани РПЭ глаз альбиносов (1) и пигментированных животных (2) на накопление ТБК-активных продуктов в липидной фракции мозга кролика за 40 мин реакции

Удаление меланосом из ткани РПЭ приводило к уменьшению ингибирующего действия исходного гомогената (рис. III.9, кривые 2 и 3), т.е. к увеличению скорости процесса ПОЛ мозга в 1,8 раза. Добавление же выделенных из пигментированной ткани меланосом к гомогенату ткани РПЭ глаз альбиносов приводило к увеличению ингибирующей активности этого гомогената примерно до уровня, характерного для цельной пигментированной ткани.

Таким образом, способность пигментированной ткани РПЭ более эффективно ингибировать процессы ПОЛ по сравнению с непигментированной тканью, в значительной мере обусловлена наличием в ней меланинсодержащих меланосом.

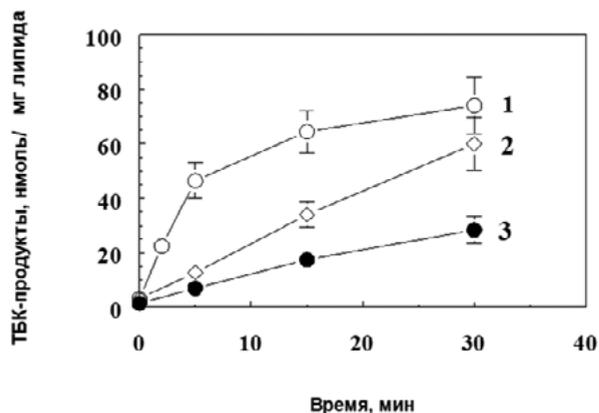


Рис. III.9. Участие меланосом в ингибировании ПОЛ мозга гомогенатом ткани РПЭ глаз пигментированных животных. 1 – контроль (липидная фракция мозга); 2–3 – опыт. Добавлено к контролю: 2 – гомогенат ткани РПЭ, из которого были удалены меланосомы, 3 – исходный гомогенат ткани РПЭ, содержащий меланосомы

Если условно не учитывать меланосомы в качестве фактора, ингибирующего реакцию ПОЛ, то различия в антиоксидантных свойствах РПЭ пигментированных животных и альбиносов можно теоретически объяснить, например, различиями в эффективности компонентов системы антиоксидантной защиты или различиями в субстратах окисления этих тканей. Для проверки этого предположения было проведено сравнение устойчивости к окислению липидных фракций, выделенных из ткани РПЭ пигментированных животных и альбиносов (Сакина и др., 1985). Липиды из гомогенатов РПЭ экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2:1) по методу Фолча и др. (Folch et al., 1957). Процесс

ПОЛ индуцировали системой Fe^{2+} -аскорбат. Предполагалось, что если фракция липидов из пигментированной ткани РПЭ содержит меньшее количество полиненасыщенных жирно-кислотных остатков и больше антиоксидантов по сравнению с непигментированной тканью, то должна наблюдаться более низкая скорость ПОЛ. В этом случае высокую устойчивость к окислению пигментированной ткани можно было бы объяснить особенностями состава их липидных фракций.

На рис. III.10 представлена кинетика накопления ТБК-активных продуктов при пероксидном окислении липидных фракций пигментированного РПЭ (кривая 1) и РПЭ альбиносов (кривая 2). Видно, что липидная фракция из пигментированного РПЭ более чувствительна к окислению. Это следует из сравнения скоростей ПОЛ и максимального накопления ТБК-активных продуктов. Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что различия в устойчивости к окислению двух видов тканей РПЭ не связаны с различиями в составе липидных фракций.

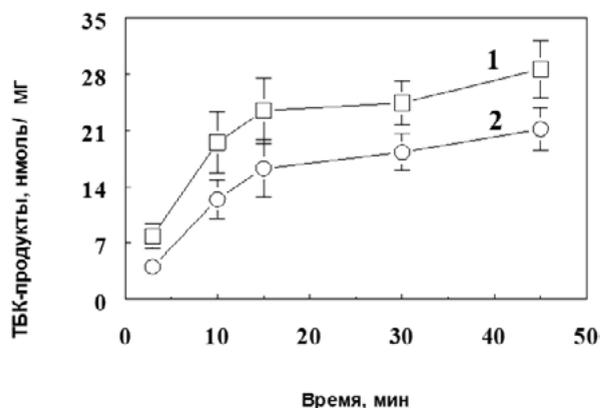


Рис. III.10. Кинетика ПОЛ липидных фракций, экстрагированных из ткани РПЭ пигментированных животных (1) и альбиносов (2)

Однако эти различия могли быть связаны с различным содержанием систем антиоксидантной защиты в РПЭ пигментированных и непигментированных животных. Для сравнения систем антиоксидантной защиты, клеток РПЭ пигментированных животных и альбиносов были выбраны три основных компонента, действие которых проявляется на разных стадиях процесса ПОЛ: активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы и содержание α -токоферола. Активность супероксиддисмутазы определяли в водорастворимых фракциях РПЭ по методу, предложенному ранее (Beauchamp, Fridovich, 1971) с небольшой модификацией. Реакционную смесь, содержащую 0,05 М калий-фосфатный буфер, рН 7,8, 5,15 μ М рибофлавин, 70 μ М нитросиний тетразолий, 10 мМ метионин, 17 μ М цианид натрия, 0,01% бромистый цетилтриметиламмоний, освещали лампой ДРК-120 со светофильтрами ФС-1 и ФС-6. В этих условиях наблюдается восстановление нитросинего тетразолия супероксидным анион-радикалом и образование формазана ($\lambda_{\text{макс}}$ 560 нм). Присутствие бромистого цетилтриметиламмония предотвращало выпадение формазана в осадок, в результате чего оптическая

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

плотность возрастала линейно в течение всего времени реакции. Как показано в контрольных экспериментах, бромистый цетилтриметиламмоний в этих концентрациях не влиял на активность СОД из эритроцитов быка. Для проверки специфичности действия фермента вместо водорастворимых фракций РПЭ, обладающих активностью СОД, в реакционную среду добавляли бычий сывороточный альбумин (до 2 мг) или фракцию РПЭ, инактивированную нагреванием до 100° в течение 30 мин. Во всех опытах на активность СОД во фракции РПЭ, содержащей примесь крови, вводили поправку. Для этого с помощью реактива Драбкина (Дервиз, 1973) определяли концентрацию примесного гемоглобина, а также активность СОД в крови. Активность СОД, обусловленная примесью крови в гомогенатах ткани РПЭ, не превышала 10%.

Активность глутатионпероксидазы определяли по методу, предложенному в работе (Paglia, Valentine, 1967). Инкубационная смесь содержала 0,05 М фосфатный буфер, рН 7,4, 1,0 мМ ЭДТА, 0,2 мМ НАДФН, 1,0 мМ восстановленный глутатион, 1,0 мМ азид натрия, 1,0 мМ гидропероксид *трет*-бутила, 1,0-1,5 единицы/мл глутатионредуктазы и различные количества ткани РПЭ. Скорость окисления НАДФН измеряли спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Содержание α -токоферола определяли по методу Тейлора и др. (Taylor et al., 1976) по интенсивности флуоресценции гексанового экстракта ткани РПЭ при длине волны возбуждения 236 нм и длине волны эмиссии 330 нм в спектрофлуориметре Aminco SPF-500 ТМ (США). Полученные результаты представлены в табл. III.2.

Табл. III.2. Сравнение активностей СОД, глутатионпероксидазы и содержания α -токоферола, в клетках РПЭ глаз пигментированных кроликов и кроликов-альбиносов

Ткань	Глутатион пероксидаза, нмоль НАДФН/мин мг	Супероксид дисмутаза, единиц/мг	α -токоферол, μ г/мг белка
РПЭ пигментированных кроликов	120 \pm 26	1,1	0,44 \pm 0,06
РПЭ кроликов-альбиносов	105 \pm 15	0,98	0,73 \pm 0,15

Данные, представленные в табл. III.2, показывают, что активности СОД в РПЭ глаз пигментированных животных и альбиносов близки по величине. Результаты опытов по определению активности глутатионпероксидазы в РПЭ показали, что активность этого фермента у пигментированных животных и альбиносов также практически одинакова. Определение содержания α -токоферола показало, что его количество даже ниже в ткани РПЭ глаз пигментированных кроликов.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ окисляемости липидных фракций, активности СОД и глутатионпероксидазы, содержания α -токофе-

рола тканей РПЭ глаз пигментированных животных и альбиносов показал, что различия в способности ингибировать процесс ПОЛ этих двух видов тканей не могут быть связаны ни с одним из перечисленных факторов. Следовательно, более высокая антиоксидантная способность пигментированной ткани РПЭ глаза с большой вероятностью обусловлена наличием в ней меланосом, принимающих участие в ингибировании процесса ПОЛ. Можно отметить, что эффективность компонентов системы антиоксидантной защиты ткани РПЭ глаза альбиносов несколько выше, чем пигментированной ткани. Возможно, это связано с определенными адаптивными особенностями животных-альбиносов. Не исключено, что дефицит меланина, способного принимать участие в ингибировании ПОЛ, частично компенсируется большей активностью обычных компонентов системы антиоксидантной защиты в тканях животных-альбиносов.

Г. Сравнительное исследование аккумуляции продуктов пероксидации в глазах пигментированных мышей и мышей-альбиносов при действии общего рентгеновского облучения

Известно, что рентгеновское облучение оказывает повреждающее действие на различные структуры глаза (Rozsival et al., 1985). Так, облучение кроликов в дозах 7-8 Грей (Гр) приводит к полному исчезновению b-волны электроретинограммы (Krohn, et al., 1970). Облучение в этих дозах уже через 24 ч вызывает дегенерацию 50-70% палочек и колбочек сетчатки (Newton, et al., 1980). Также обнаружено резкое уменьшение активности окислительных ферментов (цитохромоксидазы, сукцинатдегидрогеназы) в сетчатке через 24 ч после облучения в дозе 7Гр.

Одной из причин повреждающего действия облучения является развитие вторичных реакций свободнорадикального окисления. Это должно приводить к накоплению продуктов ПОЛ в структурах глаза. Важно выяснить, существуют ли различия в этих процессах при облучении пигментированных животных и альбиносов.

Хорошо известна радиопротекторная роль меланинов при действии ионизирующей радиации на темнопигментированные микроорганизмы и грибы (Лях, 1981). Экзогенный меланин повышает жизнеспособность дрожжей и снижает уровень различных мутаций, индуцированных γ -облучением (Моссэ и др., 1986), повышает устойчивость к облучению мышей-альбиносов (Бердышев, 1964). Быстрое развитие воспалительных процессов (через 1,5–3 ч после облучения в дозе 10 Гр) при прямом облучении глаза кролика также значительно интенсивней протекает у животных-альбиносов (Bito, Klein, 1981).

Очень большое количество исследований посвящено радиопротекторным свойствам меланина грибов. Меланизированные грибы были обнаружены в таких экстремальных местах, как Международная космическая станция (МКС), Чернобыльская атомная электростанция (ЧАЭС) и антарктические пустыни,

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

которые являются местами с повышенным уровнем радиации, и при всех обстоятельствах меланизированные грибы превосходят по численности своих не меланизированных аналогов, что свидетельствует о селективном преимуществе меланина (Pacelli et al. 2018; Selbmann et al. 2018; Onofri et al. 2015; Mironenko et al. 2000; Zhdanova et al. 2000).

Это селективное преимущество, во-первых, обусловлено способностью меланина обеспечивать физическую защиту посредством улучшения структурной целостности и комптоновского рассеяния (Dadachova et al., 2008; Revskaya et al., 2012; Schweitzer et al., 2009; Malo et al., 2018). Во-вторых, меланин играет роль в химической защите как антиоксидант и «мусорщик» свободных радикалов (Kim et al., 2020; Tugay et al., 2011; Panzella et al., 2013). Наконец, меланин обеспечивает преимущество посредством своей способности координировать биологическую реакцию в ответ на стимулы окружающей среды (Malo et al., 2021; Malo et al., 2020; Dighton et al., 2008; Tugay et al., 2006). Меланин, полученный из грибкового источника, может служить легкодоступной и жизнеспособной мерой противодействия случайному воздействию радиации на организм. Так, например, было показано, что алломеланины повышают медианную и общую выживаемость мышей даже после воздействия на них летальной дозы радиации 10 Гр (Malo et al., 2022). Все эти факты могут свидетельствовать о радиозащитной роли меланина.

В этом разделе главы III представлены результаты исследования развития процессов ПОЛ в сетчатке и РПЭ мышей при рентгеновском облучении в разных дозах, динамики развития свободнорадикального окисления в разные сроки после облучения и роль меланина в этих процессах (Сакина и др., 1990; Malo et al., 2022). опыты проводили на темнопигментированных мышцах линии C57B1/6 и белых мышцах колонии SNK массой 18–20 г. Общее рентгеновское облучение проводили на аппарате РУТ-200 (напряжение 200 кВ, сила тока 10 мА, фильтр Cu – 0,5 см, мощность дозы 48,5 мКл/кг). Животных облучали однократно в дозах 6 и 12 Гр или фракционировано в дозе 1,5 Гр x 4, один раз в неделю (общая доза 6 Гр).

Продукты ПОЛ определяли в гомогенате смеси нейтральной сетчатки и РПЭ. Содержание первичных продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты) определяли по поглощению при 232 нм экстракта липидов в смеси метанол–гептан (5:1, V:V) и оценивали как отношение интенсивности поглощения при 232 нм к интенсивности поглощения при 206 нм. Флуоресцирующие конечные продукты ПОЛ (конъюгированные основания Шиффа) определяли в экстрактах липидов в смеси метанол–гептан (5:1; V:V). Относительную интенсивность флуоресценции оценивали по величине спектрального максимума в области 440 нм при длине волны возбуждения 370 нм (Dillard, Tappel, 1984).

Сравнительное исследование уровня ТБК-активных продуктов в сетчатке и РПЭ необлученных пигментированных мышей и мышей-альбиносов показало более высокое их содержание у последних (по данным всех опытов $2,2 \pm 0,4$ нмоль/мг белка у альбиносов и $1,3 \pm 0,6$ нмоль/мг белка у пигментированных мышей). Это свидетельствует либо о более интенсивном окислительном ме-

таболизме у альбиносов, либо о меньшей активности у них систем антиоксидантной защиты. Второе предположение, на наш взгляд, более вероятно, так как в структурах глаза альбиносов отсутствует меланин, оказывающий ингибирующее действие на процесс ПОЛ.

На рис. III.11 представлены результаты опытов, в которых исследовали действие облучения в относительно высоких дозах (6 и 12 Гр) на динамику накопления ТБК-активных продуктов в сетчатке и РПЭ мышей. При облучении в дозе 12 Гр, приводящей к гибели всех мышей на 7–8-е сутки после облучения, наблюдали резкое возрастание уровня ТБК-активных продуктов в структурах глаза мышей-альбиносов через 24 ч после облучения (рис. III.11).

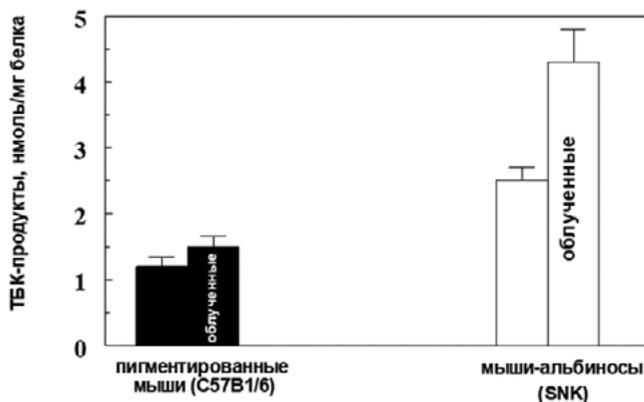


Рис. III.11. Аккумуляция ТБК-активных продуктов в сетчатке и РПЭ при однократном общем облучении пигментированных и непигментированных мышей в дозе 12 Гр

Максимальное увеличение уровня ТБК-активных продуктов достигало 60–70%, а в отдельных опытах 100% по сравнению с таковым у необлученных животных. В то же время, пигментированные мыши оказались по этому критерию гораздо менее чувствительными к облучению в этих дозах. Аналогичные данные были получены при облучении в дозе 6 Гр. В этом случае пигментированные животные также были малочувствительными, а у альбиносов наблюдалось заметное возрастание уровня ТБК-активных продуктов, более выраженное через 24 ч после облучения (рис. III.12).

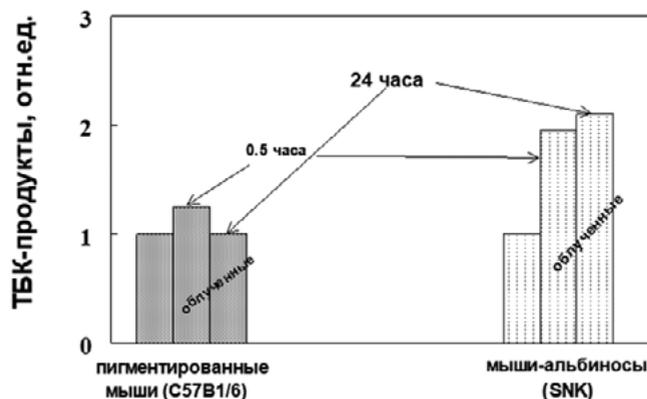


Рис. III.12. Динамика нарастания концентрации ТБК-активных продуктов при общем облучении мышей в дозе 6 Гр

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Таким образом, облучение в летальных дозах практически не вызывает усиления процессов ПОЛ в структурах глаза пигментированных мышей линии C57Bl/6. В то же время, наблюдается достоверное возрастание уровня ТБК-активных продуктов у белых мышей линии SNK. Большая чувствительность альбиносов к индуцированному облучением процессу ПОЛ отчасти может быть объяснена более высоким исходным содержанием у них окисленных продуктов в липидах сетчатки и РПЭ.

В другой серии опытов исследовали действие облучения в нелетальных дозах 1,5 Гр, 4 раза с интервалом в 1 неделю. Продукты ПОЛ измеряли в отдаленные периоды после облучения (через 1, 2 и 3 месяца) (рис. III.13).

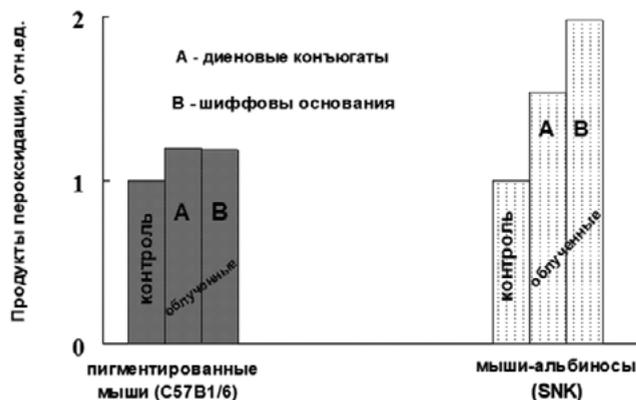


Рис. III.13. Уровни диеновых конъюгатов (А) и оснований Шиффа (В) в норме и при 4-х кратном облучении (в дозе 1,5 Гр) у пигментированных и непигментированных мышей. Концентрация продуктов ПОЛ дана в относительных единицах

На рис. III.13 приведены результаты опытов, в которых уровень ПОЛ определяли через 3 месяца после облучения. Видно, что уровни начальных продуктов (диеновые конъюгаты) и конечных продуктов ПОЛ (основания Шиффа) у облученных пигментированных мышей слабо отличаются от таковых у интактных необлученных животных. Это свидетельствует о том, что в отдаленные сроки после облучения у мышей C57Bl/6 интенсивность процессов ПОЛ практически не возрастает. В то же время, облученные мыши-альбиносы характеризуются более высокими уровнями диеновых конъюгатов и оснований Шиффа, чем необлученные. Особенно велика разница в концентрации конечного продукта ПОЛ – оснований Шиффа.

Таким образом, рентгеновское излучение приводит к достоверному нарастанию уровня ПОЛ в сетчатке и РПЭ мышей-альбиносов, которое сохраняется на протяжении, по крайней мере, 3 месяцев после облучения. Механизм усиления процесса ПОЛ может быть связан либо с непосредственной стимуляцией свободнорадикальных реакций при облучении, либо с проникновением в глаз через гематофтальмический барьер вторичных продуктов окисления и инициацией в тканях РПЭ и сетчатки свободнорадикального окисления. Нарушение гематофтальмического барьера при облучении известно (Арлашенко и др., 1979). Результаты показывают, что у пигментированных мышей, в отличие от альбиносов, рентгеновское облучение практически не приводит к усилению процесса накопления продуктов ПОЛ в тканях сетчатки и РПЭ.

Д. Сравнительное исследование аккумуляции продуктов пероксидации в глазах двух подвидов реликтовой креветки *Mysis relicta*, проявляющих разную чувствительность к фотоповреждению. Защитное действие оммохромов от повреждающего действия света и кислорода на омматидиях сложного глаза

В конце последнего ледникового периода (The Last Glacial Period) около 11–12 тысяч лет назад балтийские креветки вида *Mysis relicta* разделились на несколько популяций с разными средами обитания. Мы исследовали две генетически подобные популяции этого вида креветки, одна из которых (морская популяция) обитает в море на небольшой глубине, где освещённость достаточно высокая, а другая (озерная популяция) в озерах (в частности, в озере «Пааярви», максимальная глубина которого около 80 м) на весьма значительной глубине, где освещённость крайне низкая. Оказалось, что озерная популяция намного чувствительней к повреждающему действию света по сравнению с морской популяцией – даже умеренное освещение животных, например, на поверхности воды вечером в отсутствие солнца приводит к полной потере зрения (Lindstrom, Nilsson, 1988). Мы предположили, что одна из возможных причин высокой чувствительности озерной популяции креветки к свету может быть связана с более низким уровнем защиты клеток глаза от действия свободно-радикальных продуктов, индуцированных облучением. Для выяснения этого предположения исследовали сравнительную активность антиоксидантных систем и их компонентов в глазах двух популяций креветок *M. relicta* (Dontsov et al., 1999; Фельдман и др., 2008).

Эксперименты показали, что гомогенаты глаз морской популяции креветок оказались более устойчивыми к пероксидации, индуцированной ионами двухвалентного железа в присутствии аскорбата (рис. III.14).

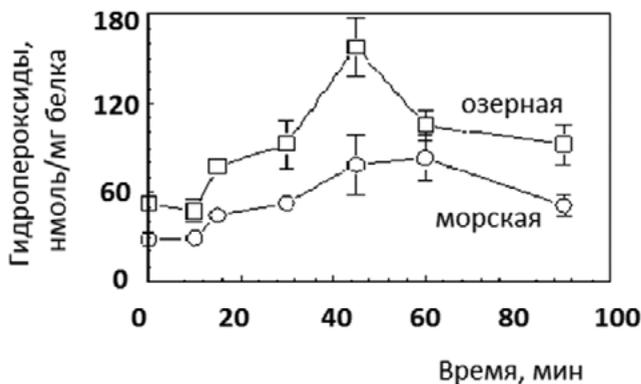


Рис. III.14. Сравнительная кинетика накопления гидропероксидов при Fe^{2+} -аскорбат-индуцированной пероксидации гомогената глаз *M. relicta* озерной и морской популяций

Более высокая устойчивость креветок морской популяции к действию прооксидантов связана с более высокой активностью систем антиоксидантной защиты у этой популяции животных. Однако исследование основных антиок-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

сидантных энзимов – супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, а также содержания α -токоферола в гомогенатах обоих типов глаз, не показало значительной разницы в их активности. Результаты представлены на рис. III.15.

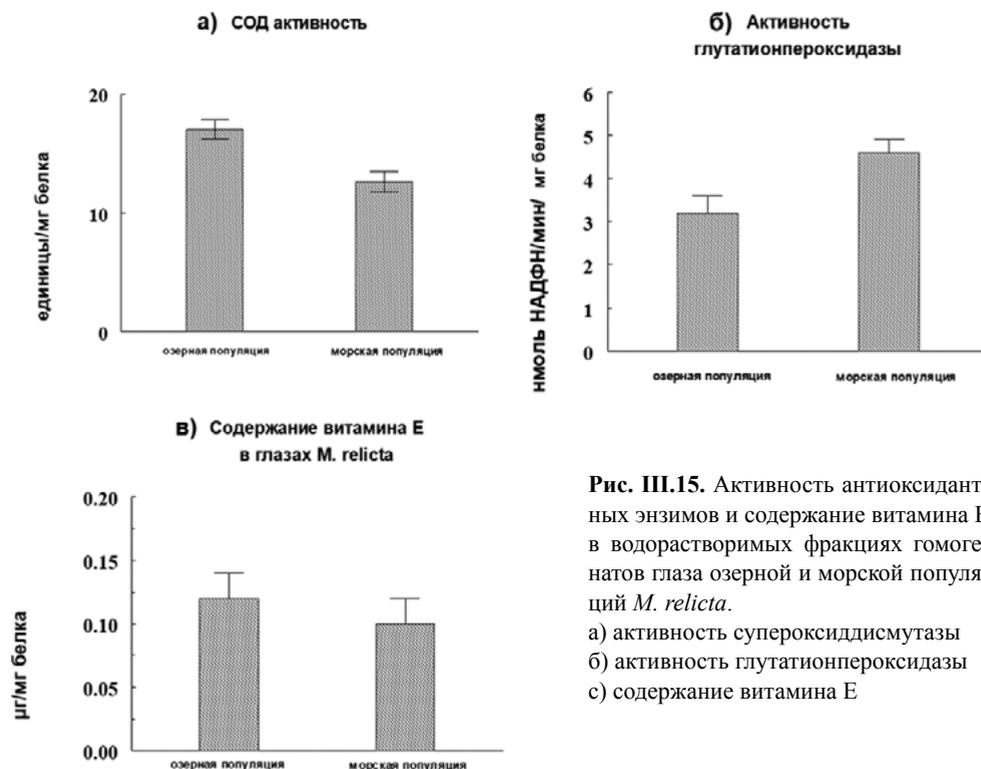


Рис. III.15. Активность антиоксидантных энзимов и содержание витамина Е в водорастворимых фракциях гомогенатов глаза озерной и морской популяций *M. relictus*.

а) активность супероксиддисмутазы
б) активность глутатионпероксидазы
с) содержание витамина Е

Из рисунка видно, что средняя активность СОД озерной популяции составляла $17,0 \pm 0,8$ единиц/мг, а морской популяции – $12,6 \pm 0,9$ единиц/мг. В то же время, активность глутатионпероксидазы была, наоборот, несколько выше у креветок морской популяции ($4,6 \pm 0,3$ нмоль НАДФН/мин мг по сравнению с $3,2 \pm 0,4$ нмоль НАДФН/мин мг). Концентрация витамина Е была несколько выше у креветок озерной популяции. Таким образом, активность СОД и содержание α -токоферола у креветок озерной популяции было даже выше, чем у креветок морской популяции. В этой связи представляется маловероятным, что намного более высокая антиоксидантная активность гомогената глаз креветок морской популяции связана с несколько большей активностью у них глутатионпероксидазы. По аналогии с пигментированными и непигментированными позвоночными животными мы предположили, что более высокая резистентность морской популяции креветок может быть связана с большим содержанием у них экранирующих пигментов, проявляющих антиоксидантные свойства. Для проверки этого предположения была проведена полная экстракция оммохромов из глаз обеих типов популяций *M. relictus*. Результаты приведены в табл. III.3.

Табл. III.3. Суммарное содержание оммохромов в глазах озерной и морской популяций *M. relicta*

Популяция <i>M. relicta</i>	Количество глаз	Содержание оммохромов		
		µг сухого веса/глаз	µг сухого веса/мг сухого веса глаз	µг сухого веса/мг белка
“Озерная”	150	14.3 ± 1.8	128 ± 14	90.5
“Морская”	150	39.3 ± 2.9	225 ± 16	218.6

Из таблицы видно, что концентрация оммохромов в глазах креветок морской популяции достигает почти 40 µг на глаз. Если принять, что объем одного глаза реликтовой креветки не больше 0,5 µл, то концентрация оммохромов достигает 80 мг сухого веса на 1 мл. Эксперименты также показали, что в глазах креветок озерной популяции содержится значительно меньшее количество оммохромов (примерно в 2,5 раза), чем в глазах морской популяции. Это может быть связано с потерей экранирующего пигмента в процессе адаптации к глубоководному образу жизни в условиях очень низкой освещенности. При этом по своим спектральным и флуоресцентным характеристикам оммохромы морской и озерной популяций идентичны. Данные свидетельствуют о том, что более высокая антиоксидантная активность гомогената глаза креветок морской популяции действительно может быть связана с большим содержанием в них оммохромов.

Е. Усиление пигментации как фактор, повышающий устойчивость различных клеток к свободнорадикальным окислительным процессам

1. Усиление контакта нейральной сетчатки с пигментированной тканью РПЭ приводит к значительному уменьшению аккумуляции продуктов пероксидации при действии ультрафиолета и ионов двухвалентного железа

Хорошо известно, что фоторецепторы нейральной сетчатки должны быть тесно связаны с клетками РПЭ для нормального функционирования. У многих видов животных отслойка нейральной сетчатки от РПЭ приводит к выраженным изменениям в фоторецепторных клетках (например, к дезорганизации процесса обновления фоторецепторных дисков), в конечном итоге заканчивающихся дегенерацией наружных сегментов (Korenbrot, Fernald, 1989; Kaplan et al., 1990; Honda et al., 1997). Хотя фотоповреждения были показаны как на интактной, находящейся в тесном контакте с РПЭ, так и на отслоенной нейральной сетчатке (Zilis, Machemer, 1991), о сравнительной интенсивности процесса ПОЛ в этих тканях известно немного. С одной стороны, ряд исследова-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

дователей предполагает, что пигментный эпителий может стимулировать повреждающее действие прооксидантов, поскольку, как уже говорилось, в ткани РПЭ содержится большое разнообразие веществ, стимулирующих процесс ПОЛ. С другой стороны, можно предполагать, что при нарушении анатомического контакта между нейральной сетчаткой и РПЭ окисленные обломки наружных сегментов не будут фагоцитироваться клетками РПЭ, что может привести к нарастанию процесса ПОЛ в нейральной сетчатке. Как мы уже видели выше, гомогенаты клеток РПЭ, содержащие меланин, сильно ингибируют реакцию ПОЛ в сетчатке, индуцированную различными прооксидантными системами. В этой связи представлялось интересным выяснение вопроса о том, оказывает ли какое-либо влияние контакт РПЭ с нейральной сетчаткой на интенсивность в последней процессов перексидного окисления липидов (Донцов и др., 1992).

В качестве объекта исследования были использованы глазные бокалы темно и светоадаптированных травяных лягушек *Rana temporaria* (2 ч адаптации при комнатной температуре). Лягушки *Rana temporaria* имеют высокопигментированную, содержащую много черных меланосом ткань РПЭ. Получение препаратов глазных бокалов, содержащих нейральную сетчатку, тесно связанную с РПЭ («контактная» сетчатка), проводили при комнатном освещении, а содержащих отслоенную от РПЭ («неконтактная» сетчатка) – в темноте. В некоторых опытах дополнительно проводили механическую отслойку нейральной сетчатки. Приготовленные таким образом препараты помещались в 0,1 М К-фосфатный буфер, рН 7,4 и подвергались либо автоокислению (20 препаратов), либо воздействию ионов двухвалентного железа (в концентрации 100 мкМ – 40 препаратов), либо ультрафиолетовому облучению через кварцевую фокусирующую линзу (лампа ДРК-120, 8 мВт/см², 5–60 мин – 20 препаратов). Интенсивность ПОЛ измеряли по накоплению ТБК-активных продуктов в ткани сетчатки и в окружающей среде. Фиксацию сетчатки для морфологических исследований проводили в 3% глутаровом альдегиде на 0,1 М фосфатном буфере с последующей дофиксацией в 1% растворе OsO₄. Срезы, полученные на ультратоме ЛКВ-III (Швеция), исследовали в световом микроскопе UNIVAR.

Исследование концентрации продуктов ПОЛ показало их значительно большее содержание в «неконтактных» сетчатках из адаптированных к темноте лягушек. Процесс накопления пероксидов чувствителен к содержанию кислорода и резко стимулируется в присутствии ионов двухвалентного железа. Инкубация глазного бокала в среде, содержащей 100 мкМ двухвалентного железа в присутствии 0,5 мМ аскорбата в течение 60–90 мин, приводила к накоплению ТБК-активных продуктов как в ткани сетчатки, так и в окружающей среде. При этом «неконтактная» сетчатка проявляла большую чувствительность, чем сетчатка, находящаяся в контакте с РПЭ (табл. III.4). Аналогичная закономерность наблюдается и в отношении УФ-облучения (табл. III.4). Ультрафиолетовое облучение «неконтактных» сетчаток в течение 5–10 мин приводило к повышению уровня продуктов перексидации, заметно большому, чем при

облучении «контактных сетчаток». Однако морфологические изменения при этих временах облучения практически отсутствуют у обоих типов сетчаток. При УФ-облучении «контактных» сетчаток в течение 40 мин морфологически наблюдаются лишь начальные деструктивные процессы – незначительная вакуолизация и дезориентация наружных сегментов.

Табл. III.4. Аккумуляция ТБК-активных продуктов в ткани нейральной сетчатки тёмно и светоадаптированных лягушек при действии ионов Fe^{2+} и УФ-облучения

Объект исследования	ТБК-активные продукты, нмоль/мг белка	
	Fe^{2+} -индуцированная пероксидация, 60 мин	УФ-индуцированная пероксидация, 40 мин
Темноадаптированные лягушки («неконтактные» сетчатки)	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,4
Светоадаптированные лягушки («контактные» сетчатки)	0,3 ± 0,05	0,8 ± 0,2

В то же время, в «неконтактных» сетчатках через 40 мин УФ-облучения обнаруживаются значительные морфологические нарушения, затрагивающие все слои, начиная от ганглиозных клеток и кончая фоторецепторами. Наружные сегменты дегенерируют. В ядрах фоторецепторов полностью отсутствует структура, появляются пустоты. Таким образом, результаты показывают, что ткань РПЭ не только не стимулирует повреждающее действие Fe^{2+} и УФ-облучения на нейральную сетчатку, а напротив, нарушение контакта между нейральной сетчаткой и РПЭ приводит к усилению накопления продуктов ПОЛ в ткани сетчатки и в окружающей среде и к более сильному повреждению мембранных структур во всех слоях сетчатки.

Однако механизм повышения устойчивости нейральной сетчатки, находящейся в контакте с пигментированными клетками РПЭ, к действию оксидантов не ясен. Он может быть связан с различными факторами. Это может быть активация систем антиоксидантной защиты при световой адаптации, активная утилизация продуктов пероксидного окисления липидов клетками РПЭ, антиоксидантное и фотоэкранирующее действие меланина, более высокая степень интактности сетчатки, находящейся в контакте с РПЭ (структурный антиоксидант). Возможно также, что в данном случае защитное действие проявляет фактор PEDF. PEDF представляет собой 50 кДа гликопротеин, который связывается с гликозаминогликанами межфоторецепторного матрикса (Wu et al., 1995). PEDF защищает фоторецепторные клетки от повреждающего действия света и способен имитировать защитную роль РПЭ на фоторецепторы в процессе морфогенеза сетчатки (Cao et al., 2001; Jablonski et al., 2000).

2. Накопление меланин-подобных веществ у людей, подвергнутых воздействию радиации

Как уже упоминалось выше, радиопротекторная роль меланинов при действии ионизирующей радиации на естественно пигментированные организмы или на биологические структуры в присутствии экзогенного пигмента хорошо известна (Бердышев, 1964; Латыпов и др., 1979; Лях, 1981; Bito, Klein., 1981; Моссэ и др., 1986). Более того, у животных и людей, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения, наблюдается дополнительный синтез меланинов в различных органах и тканях. Это может быть связано с тем, что меланинсодержащие органеллы участвуют в обезвреживании свободно-радикальных процессов, развивающихся на фоне облучения. Иными словами, накопление меланина является приспособительной реакцией организма в ответ на усиление вторичных свободнорадикальных процессов, индуцированных облучением. В этом разделе главы III представлены данные о появлении меланинсодержащих пигментов у людей, подвергавшихся длительному облучению в малых дозах (Чучалин и др., 1993).

Нами было установлено, что у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС происходило накопление меланинсодержащих продуктов в сыворотке крови и в бронхоальвеолярных смывах (БАС), причем концентрация их возрастала в зависимости от времени пребывания на промплощадке 4-го энергоблока ЧАЭС.

Методом электронного парамагнитного резонанса исследовали цельную кровь и бронхоальвеолярные смывы у больных с легочной патологией и ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС. Бронхоальвеолярный смыв получали до начала лечения в ходе диагностической фибробронхоскопии по методике, рекомендованной рабочей группой Европейского общества пульмонологов. Общее количество введенного апириногенного и подогретого до температуры тела изотонического раствора хлорида натрия составляло 250 мл. В качестве материала для исследования использовали 2–5 порции клеточных взвесей. Пробирочным методом в камере Горяева проводили подсчет абсолютного числа клеток в 1 мл жидкости и определяли показатель жизнеспособности клеток в 0,1% растворе трипанового синего и эозина. Затем жидкость БАС центрифугировали в пластиковых апириногенных пробирках при 800xg при 4°C в течение 10 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в сбалансированном солевом растворе Хенкса и доводили концентрацию клеток до 2×10^6 /мл. Венозную кровь забирали натошак из локтевой вены в стеклянные пробирки после проведения БАС. В кровь добавляли гепарин из расчета 5 ЕД/мл. Цельную гепаринизированную кровь (0,6 мл) хранили при 4°C. Остальную порцию крови инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем микропипеткой отбирали надэритроцитарную плазму и лейкоцитарную массу, находящуюся на границе между осевшими эритроцитами и плазмой. Образцы БАС и крови для анализа методом ЭПР готовили с помощью шприца со снимаемой насадкой из полиэтиленовой трубочки длиной 40 мм и внутренним диаметром 4,5 мм. На каждую пробу отбирали 0,3–0,4 мл крови и быстро в полиэтиленовой тру-

бочке замораживали в жидком азоте (-196°C). Затем из трубочки поршнем выдавливали замороженный столбик крови. Аналогичным образом готовили образцы плазмы и сыворотки крови, а также лейкоцитарной массы крови и концентрата клеток бронхоальвеолярного смыва. Образцы сохраняли в замороженном виде до момента измерения. Регистрацию спектров ЭПР образцов проводили при 77 К на радиоспектрометре ЭПР ER-220 D «Bruker-Analitische-Messtechnik» (Germany), укомплектованном мини-ЭВМ «Aspect-2000».

Основную клиническую группу составили 8 ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС. Для пациентов этой группы были характерны следующие признаки:

- отсутствие жалоб и клинико-лабораторных данных, указывающих на наличие заболеваний органов дыхания до работ на промплощадке ЧАЭС;
- работа в условиях большой запыленности;
- отсутствие средств защиты органов дыхания или неточное их применение;
- наличие анамнестических данных о сухом надсадном кашле в период работ на промплощадке ЧАЭС;
- отсутствие других пневмотропных профессиональных факторов воздействия на легкие до и после работ по ликвидации последствий аварии на ЧАЭС;
- рецидивирующие инфекции дыхательных путей в последующие годы и неэффективность традиционных методов терапии;
- наличие инструментальных данных о нарушении диффузионно-перфузионных процессов и процессов транспорта кислорода в легких в настоящее время.

Группу сравнения составили:

- больные с хроническим обструктивным бронхитом, москвичи, не принимавшие участия в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС (коды 9 и 10);
- больной с бронхиальной астмой на фоне хронического обструктивного бронхита, проживавший до и после аварии на ЧАЭС в г. Киеве (код 11);
- больной с аденокарциномой легких, принимавший активное участие в организации работ по ликвидации последствий аварии на ЧАЭС в мае-августе 1986 года (код 12);
- ликвидатор последствий аварии на ЧАЭС в Брянской области (код 13).

В табл. III.5 приведены краткие данные о ликвидаторах последствий аварии на ЧАЭС под кодовыми номерами 1-8.

Табл. III.5. Краткие данные о пациентах групп исследования

Кодовый номер пациента	Возраст	Пол	Участие в ликвидации последствий аварии. Характер и период работ	Паспортная доза
1	33	Муж.	Ликвидатор; Ликвидация завалов строительного мусора у 4-го энергоблока, снятие грунта и дезактивация машин; 6-8 месяцы 1986	24 Бэр
2	38	Муж	Ликвидатор; Ликвидация завалов, снятие грунта; 7-9 месяцы 1986	23,6 Бэр

Кодовый номер пациента	Возраст	Пол	Участие в ликвидации последствий аварии. Характер и период работ	Паспортная доза
3	39	Муж	Ликвидатор; Дезактивация машин со строительным мусором из зоны; 6–8 месяцы 1986	18 Бэр
4	42	Муж	Ликвидатор; Ликвидация завалов мусора; 9 месяц 1986	?
5	42	Муж	Ликвидатор; Бурильные работы и дезактивация машин; с 9 месяца 1986 по 3 месяц 1987	?
6	43	Муж	Ликвидатор; Дезактивация машин; 7–9 месяцы 1986	23 Бэр
7	35	Муж	Ликвидатор; Строительство насыпных дамб в 1–3 км от 4 энергоблока, уборочные работы на крыше 4-го энергоблока; 7–9 месяцы 1986	20,2 Бэр
8	43	Муж	Ликвидатор; Демонтаж оборудования и строительные работы у 4-го энергоблока; 7–10 месяцы 1986	18,5 Бэр
9	16	Жен.	Группа сравнения	–
10	32	Муж	Группа сравнения	–
11	40	Муж	Группа сравнения	–
12	66	Муж	Группа сравнения	–
13	37	Муж	Снятие грунта, загрязненного радиоактивными осадками, в Брянской области; 6–7 месяцы 1989	?
14	35	Муж	Практически здоровый донор	–

Кроме того, для контроля изменений в периферической крови исследовали кровь практически здорового мужчины 35 лет (код 14). Краткие данные о пациентах группы сравнения представлены также в табл. III.5.

При обследовании в образцах концентрата клеток БАС, а также в плазме и лейкоцитарной массе крови был зарегистрирован сигнал ЭПР неизвестной природы, но исключительно у пациентов – ликвидаторов аварии на ЧАЭС (рис. III.16).

Были изучены физико-химические свойства парамагнитных центров, ответственных за этот сигнал ЭПР, кратко обозначенные как центры «М». Исследование зависимости интенсивности сигнала ЭПР центров «М» от значения микроволновой мощности $P_{\text{свч}}$ показало, что его интенсивность возрастает с увеличением значения $P_{\text{свч}}$ вплоть до 2 мВт, а затем выходит на плато (рис. III.17). Из такой зависимости следует, что интенсивность сигнала ЭПР

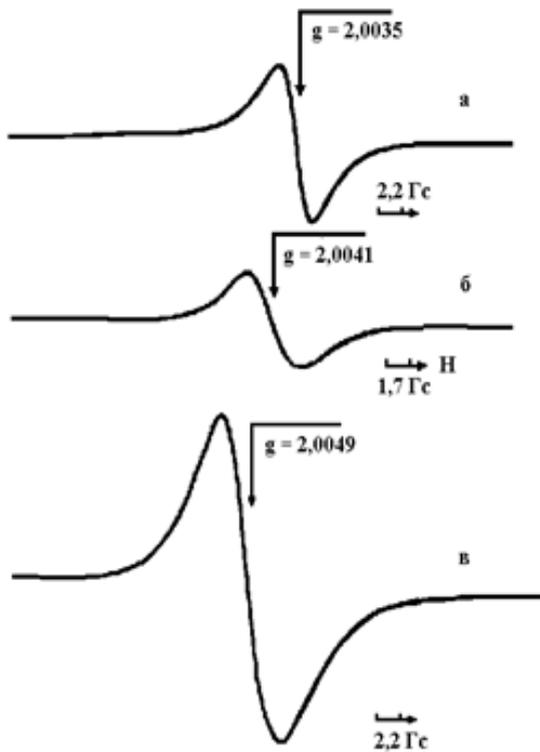


Рис. III.16. Сигналы ЭПР парамагнитных центров «М» в образцах. а) концентрат клеток бронхоальвеолярного смыва у ликвидатора № 5; б) раствор синтетического ДОФА-меланина; в) меланосомы человека. Условия записи: $\Delta H = 50$ Гс; $P_{свч} = 2$ мВт; усиление $G = 105$ Н центр = 3303 Гс; амплитуда модуляции – 2 Гс; температура регистрации – 77 К

центров «М» легко насыщается уже при небольших величинах $P_{свч}$. Обнаружено, что данные свободнорадикальные центры термоустойчивы и сохраняются как при комнатной температуре, так и при 37°C в течение длительного времени. У пациентов со светлой окраской БАС сигнал ЭПР парамагнитных центров «М» не регистрировался.

Если же в образцах была высокая концентрация парамагнитных центров «М», то окраска БАС была темно-серой. Анализ полученных результатов и данных литературы о свободнорадикальных центрах, имеющих подобные радиоспектроскопические параметры, характер зависимости интенсивности сигнала ЭПР от величины микроволновой мощности, а также термоустойчивость и темно-серая

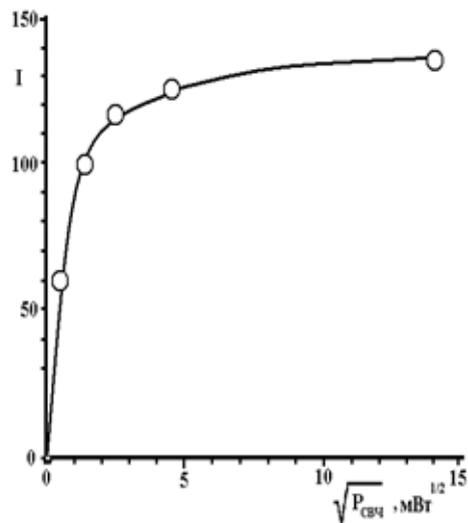


Рис. III.17. Зависимость интенсивности сигнала ЭПР парамагнитных центров «М» в концентрате клеток бронхоальвеолярного смыва от значений микроволновой мощности $P_{свч}$

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

окраска позволили нам предположить, что в изученных образцах содержатся соединения подобные меланину. Дополнительным доказательством того, что центры «М» представляют собой свободные радикалы меланин-подобных веществ, явились исследования флуоресцентных спектров концентрата клеток БАС и образцов плазмы крови, которые полностью совпадали со спектрами флуоресценции меланосом. Все данные об обнаружении центров «М» у ликвидаторов и пациентов группы контроля приведены в табл. III.6. Анализ данных табл. III.6 показывает, что парамагнитные центры «М» обнаруживаются у людей, участвовавших в ликвидации аварии на ЧАЭС. Поражение щитовидной железы инкорпорируемым радиоактивным йодом как возможная причина появления парамагнитных центров «М», по-видимому, исключается, т.к. все обследованные нами ликвидаторы были на территории ЧАЭС в период июнь-декабрь 1986 г.

Табл. III.6. Данные об обнаружении и локализации центров «М» в крови и концентрате клеток БАС у обследованных людей

Пациент	Интенсивность сигнала ЭПР, условные ед.	
	концентрат клеток БАС	плазма крови
Ликвидаторы		
1	250	0
2	128	32
3	100	0
4	0	48
5	269	0
6	30	0
7	118	0
8	382	0
13	20	0
Группа сравнения		
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
Донор		
14	0	0

Именно длительное облучение с малой мощностью дозы могло инициировать образование в легких и компонентах крови меланин-подобных веществ. Действительно, у ликвидаторов №4 и №6, которые находились на территории ЧАЭС в течение одного месяца (сентябрь 1986 года), сигнал ЭПР в концентрате клеток БАС либо не был зарегистрирован (у 4-го), либо был слабым по интенсивности (у 6-го). Однако у ликвидатора №4 эти центры обнаружены в плазме крови. У ликвидатора №13, который в 1989г. принимал участие в снятии грунта, загрязненного радиоактивными осадками в Брянской области, интенсивность сигнала «М» была также слабая.

В то же время, интенсивные сигналы ЭПР парамагнитных центров «М» были зарегистрированы в концентратах клеток БАС у участников ликвидации аварии на ЧАЭС, которые в течение трех месяцев 1986 г. работали на площадке ЧАЭС. Это ликвидаторы №№ 1, 2, 3, 5, 7 и 8. Кроме того, очень важно, что парамагнитные центры «М» регистрируются также в плазме крови, отражая тем самым существование системного характера реакции образования парамагнитных центров данного типа.

Таким образом, из полученных данных можно сделать следующее заключение. У участников ликвидации аварии на ЧАЭС, подвергшихся длительному облучению (три месяца и более), в легких и компонентах крови обнаружены свободнорадикальные продукты, представляющие собой меланин-подобные соединения. О возможных причинах образования такого типа соединений можно предположить следующее. При облучении происходит накопление продуктов пероксидного окисления липидов мембран клеток крови, кровеносных сосудов, тканей органов, результатом чего является изменение липидного состава мембран и накопление в них холестерина. Подобные процессы могут привести к активации ряда ферментов, которые активируются, когда сульфгидрильные группы в их каталитическом центре окисляются и образуют дисульфидные связи. К таким ферментам относятся гуанилатциклаза, липоксигеназа, тирозиназа и другие. Активация ферментов, участвующих в синтезе меланина, приводит к его накоплению в клетках организма, подвергнутых действию радиации. Индукция пероксидного окисления липидов, активация тирозиназы и синтез меланина имеют место также и при УФ-облучении. Появление меланин-подобных веществ на ранних стадиях пострадиационного периода можно рассматривать как защитную реакцию организма, направленную на подавление вторичных свободнорадикальных процессов, развивающихся при действии облучения.

Глава IV АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА МЕЛАНИНОВ

А. Ингибирующее действие меланинов на процессы перекисидации липидов, индуцированные в темновых условиях

В главе III было показано, что клетки РПЭ глаза, содержащие меланосомы, значительно устойчивее к действию прооксидантных факторов, чем клетки РПЭ, не содержащие меланосом. Установлено, что именно меланинсодержащие меланосомы придают клеткам нормально пигментированных животных высокую устойчивость к оксидантам. В этой главе будут приведены данные, доказывающие, что высокая устойчивость пигментированных клеток позвоночных животных обусловлена содержащимся в них пигментом меланином, который оказался эффективным ингибитором свободнорадикальных процессов. В наших экспериментах были использованы меланины глаз человека, крупного рогатого скота, кролика, лягушки (*Rana temporaria*), чернильного мешка каракатицы (*Sepia officinalis*), кутикулы насекомых (муха *Hermetia illucens* и жук *Tenebrionidae latreille*), а также синтетический ДОФА-меланин. Все эксперименты проводили в соответствии с международными рекомендациями (International guiding) по проведению медико-биологических исследований с использованием экспериментальных животных. Антиоксидантную активность оценивали по тушению хемилюминесценции люминола, инициированную пероксидом водорода в присутствии гемоглобина, а также по ингибированию реакции перекисидации липидов, индуцированную различными прооксидантными факторами. Было показано, что все изученные экранирующие пигменты эффективно тушили процесс хемилюминесценции люминола, индуцированный пероксидом водорода. Добавка пигментов к реакционной среде приводила как к уменьшению амплитуды хемилюминесценции, так и к возрастанию величины латентного периода достижения максимальной флуоресценции. Обработка полученных результатов в координатах Штерн-Фольмера (Смирнов и др., 2011) дает возможность оценить степень антиоксидантной (антирадикальной) активности экранирующих пигментов глаза.

На рис. IV.1 представлена зависимость уменьшения интенсивности свечения люминола от концентрации нативных меланосом, выделенных из ткани РПЭ быка, лягушки и человека. Видно, что все меланосомы эффективно ингибируют процесс хемилюминесценции. При этом меланосомы глаза быка и лягушки были значительно активнее в отношении их способности тушить хемилюминесценцию люминола, чем меланосомы человека.

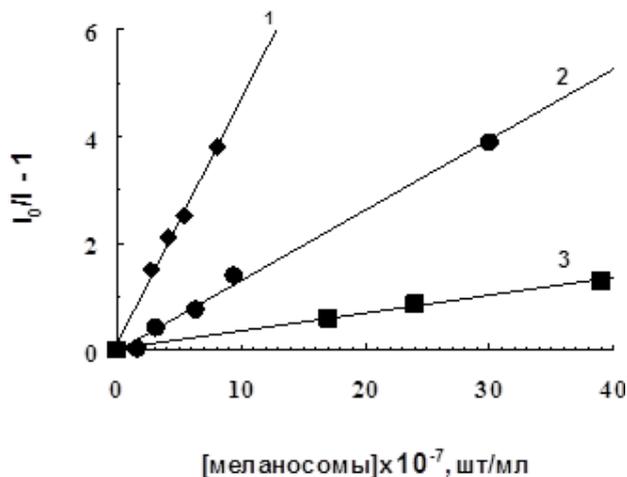


Рис. IV.1. Сравнение антирадикальной активности РПЭ меланосом из разных источников. По оси ординат – уменьшение амплитуды люминесценции люминола (I_0 – интенсивность хемилюминесценции в контроле, I – хемилюминесценция в присутствии меланосом). По оси абсцисс количество добавленных гранул. 1 – меланосомы быка, 2 – меланосомы лягушки и 3 – меланосомы человека

Это означает, что меланосомы из РПЭ человека имеют меньшую антиоксидантную активность. Вероятно, это может быть связано с двумя основными причинами – либо с более высокой плотностью упаковки пигмента меланина в меланосомах быка и лягушки, либо с особенностями в молекулярной структуре самих молекул меланина как полимера.

Экранирующие пигменты глаза позвоночных животных эффективно подавляют также процессы пероксидации липидов, индуцированные самыми различными прооксидантными системами (Донцов и др., 1980; Островский и др., 1980; Сакина и др., 1980; Сакина и др., 1986; Ostrovsky et al., 1987). В наших экспериментах были использованы следующие прооксидантные факторы – гидропероксиды, супероксидные радикалы, синглетный кислород, ионы двухвалентного железа, облучение видимым светом в присутствии сенсibilизаторов, гипероксия, ультрафиолетовое и рентгеновское облучение. На рис. IV.2 показано ингибирующее действие меланинов на пероксидацию липидов, индуцированную ионами двухвалентного железа в присутствии аскорбиновой кислоты.

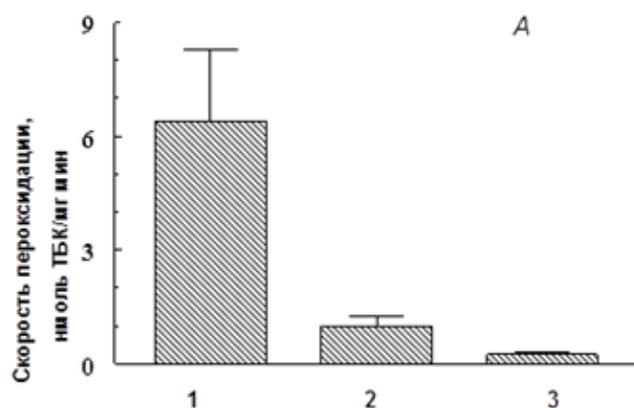


Рис. IV.2. Ингибирующее действие меланинов на процесс пероксидации липидов. Ингибирующее действие природного меланина из кутикулы жука *Tenebrionidae latreille* (2) и синтетического ДОФА-меланина (3) на процесс пероксидации наружных сегментов фоторецепторов глаза быка. Контроль (1) – средняя скорость пероксидации липидов без меланинов

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Было также исследовано ингибирующее действие меланосом, выделенных из РПЭ глаза позвоночных разных видов и синтетического ДОФА-меланина, который по своим свойствам является аналогом природных эумеланинов (Bridelli et al., 1980), на пероксидацию микросом и липосом. Микросомы из печени крысы выделяли согласно методу Арчакова и др., 1977. В экспериментах по исследованию ПОЛ, протекающего в присутствии экзогенного Fe^{2+} , использовали суспензию микросом с концентрацией белка 0,6 мг/мл, а без добавления Fe^{2+} – 2,0 мг/мл. Азолектиновые липосомы получали обработкой ультразвуком суспензии азолектина (частота ультразвука 22 кГц, сила тока 0,5А при максимальном резонансе). Обработку проводили в бане со льдом в течение 6 мин, суспензию липосом готовили из расчета 5 мг сухого веса на 1 мл. Меланосомы выделяли из ткани РПЭ глаза темноадаптированных травяных лягушек *Rana temporaria* по методу Nicotra, Livrea, 1976. Синтетический меланин получали путем окисления диоксифенилаланина (ДОФА) экстрактом картофеля, содержащего тирозиназную активность. Реакцию окисления ДОФА проводили в течение 3–4 часов при 30–40° при постоянном перемешивании. Реакционная среда содержала 0,65% NaCl, 10 mM трис-HCl, pH 7,4, насыщенный раствор ДОФА, 1 мл экстракта картофеля, отфильтрованного на воронке Бюхнера. После окончания реакции меланин осаждали центрифугированием (20 мин, 4000xg) и промывали дистиллированной водой до удаления остатков экстракта и непрореагировавшего ДОФА. Концентрацию меланина определяли по методу Das et al., 1976, восстанавливая меланин боргидридом натрия и измеряя абсорбцию при 290 нм, и выражали в мкг сухого веса на 1 мл. На рис. IV.3 представлена типичная кривая ингибирующего действия меланосом на процесс ПОЛ в микросомах печени крысы. Как видно, меланосомы в достаточно низкой концентрации эффективно ингибируют аскорбат-зависимое пероксидное окисление липидов. Уже в концентрации порядка 1 мг сухого веса на 1 мл (или 0,5 мг/мг белка микросом) меланосомы лягушки практически полностью подавляли реакцию пероксидации липидов.

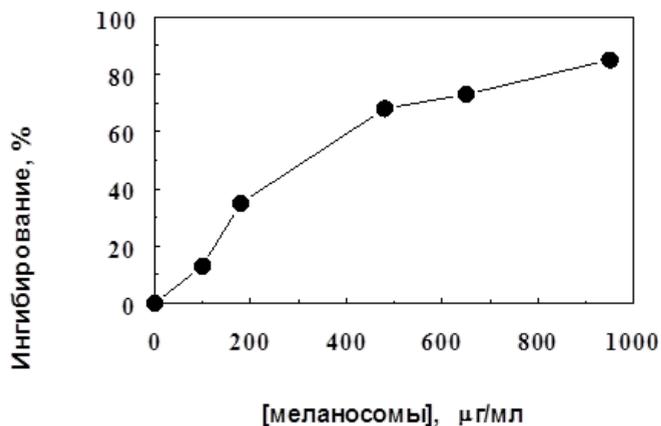


Рис. IV.3. Ингибирование процесса ПОЛ в микросомах печени различными концентрациями меланосом. Скорость реакции определяли по приросту количества ТБК-активных продуктов за 20 мин реакции

Меланосомы оказались также эффективными ингибиторами пероксидного окисления азолектиновых липосом. Это четко следует из рис. IV.4, где представлена кинетика накопления ТБК-активных продуктов в присутствии различных концентраций меланосом.

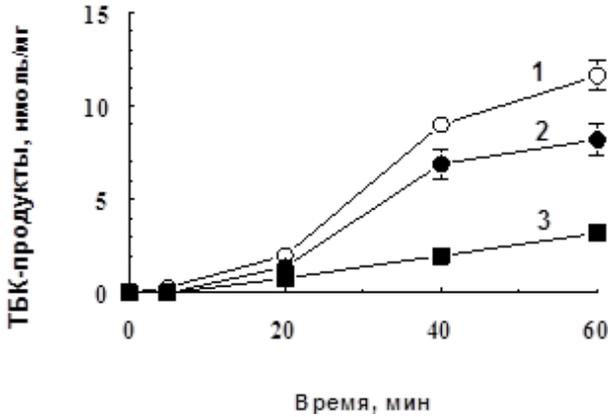


Рис. IV.4. Кинетика ПОЛ азолектиновых липосом в присутствии меланосом РПЭ лягушки. 1 – без добавления; 2 и 3 – добавлены меланосомы в количестве 0,18 мг и 1,8 мг сухого веса на пробу, соответственно

Меланосомы содержат в качестве хромофора пигмент меланин. Поэтому естественно предположить, что действующим началом в ингибирующем влиянии меланосом на процесс ПОЛ является именно меланин. Синтетический ДОФА-меланин, не содержащий в своем составе белков углеводов и липидов, действительно оказался эффективным ингибитором процесса ПОЛ (рис. IV.5).

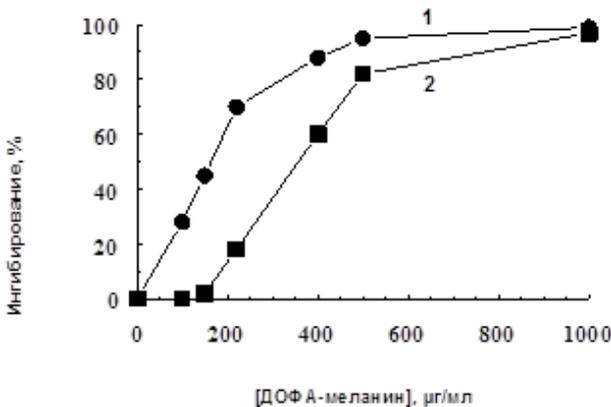


Рис. IV.5. Ингибирование ПОЛ в микросомах печени синтетическим ДОФА-меланином. Системы индукции ПОЛ: 1 – аскорбат + Fe^{2+} ; 2 – НАДФН + Fe^{2+}

В отличие от меланосом синтетический меланин ингибировал как аскорбат-зависимую пероксидацию меланосом, так и НАДФН-зависимую пероксидацию, причем степень ингибирующего действия была выражена в большей степени. Количественная оценка степени ингибирования ПОЛ меланосомами и синтетическим ДОФА-меланином во фракциях микросом и липосом представлена в табл. IV.1.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Табл. IV.1. Сравнение эффективности ингибирования темнового процесса ПОЛ ДОФА-меланином и меланосомами РПЭ глаза лягушки

Объект исследования	Условия окисления	[меланосомы]/ [белок]*	[ДОФА-меланин]/ [белок]*
микросомы	аскорбат	0,24 ± 0,08	–
	аскорбат + Fe ²⁺	2,0 ± 0,3	0,5
	НАДФН + Fe ²⁺	Не ингибировали	0,8
липосомы	аскорбат + Fe ²⁺	0,9 ± 0,2	0,69 ± 0,25

*[меланосомы]/ [белок] и [ДОФА-меланин]/ [белок] – концентрации меланосом и ДОФА-меланина, вызывающие 50% ингибирование ПОЛ в микросомах; для экспериментов с липосомами концентрации меланосом и ДОФА-меланина отнесены к сухому весу липидов.

Как следует из сравнения двух последних столбцов таблицы, во всех изученных системах индукции ПОЛ ДОФА-меланин проявлял большую ингибирующую активность, чем меланосомы. Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что меланосомы являются ингибиторами процесса ПОЛ, индуцированного в темновых условиях. Ингибирующий эффект меланосом с большой степенью вероятности обусловлен присутствием в них меланина.

Б. Ингибирующее действие меланинов и оммохромов на процессы пероксидации липидов, индуцированные видимым светом, ультрафиолетом и γ -облучением

1. Сравнение величин оптической и химической составляющей ингибирующего действия меланинов на процессы ПОЛ, индуцированные ультрафиолетом и интенсивным видимым светом

Исследована способность меланосом химически ингибировать процессы фотоокисления липидов. Поскольку в общем светозащитное действие меланосом вносят вклад как пассивное оптическое экранирование, так и активное химическое ингибирование фотоокислительных процессов, проведена оценка вкладов каждого из этих механизмов.

На рис. IV.6 показана кинетика накопления ТБК-активных продуктов, индуцированная супероксидными радикалами кислорода. Окисление фотовосстановленного рибофлавина, сопровождающееся генерацией радикалов супероксида, приводит к индукции ПОЛ липосом (контроль). Как легко видеть, ДОФА-меланин, будучи добавленным непосредственно в реакционную среду, ингибирует этот процесс. Процесс замедляется в гораздо меньшей степени, если то же количество меланина располагали между реакционной средой и источником света (экран).

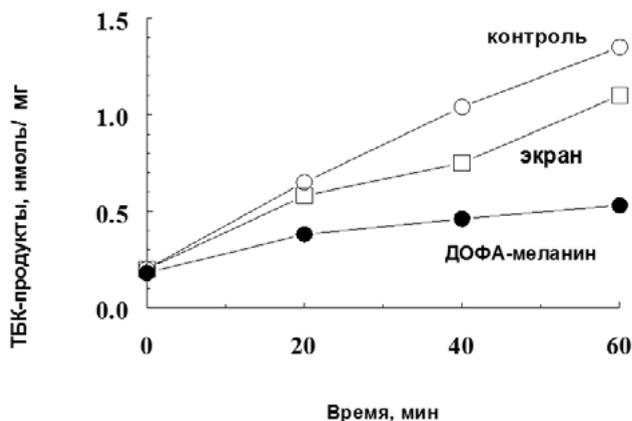


Рис. IV.6. Ингибирование ДОФА-меланином фотоиндуцированной перекисидации лецитиновых липосом. Добавка – 100 мкг/мл ДОФА-меланин. Облучение проводили лампой ДРК-120 со светофильтром ФС-1

В этом случае эффект меланина связан только с понижением освещенности реакционной среды. Скорее всего, ингибирование ПОЛ ДОФА-меланином в значительной степени обусловлено уменьшением концентрации радикалов супероксида.

При исследовании ингибирующего действия меланина и меланосом на процесс ПОЛ, индуцированный ультрафиолетом, первоначально была изучена зависимость скорости фотоокисления кардиолипидных липосом от интенсивности УФ-облучения. При небольших интенсивностях УФ-облучения эта зависимость линейна, затем кривая достигает максимума, после чего повышение интенсивности ультрафиолета уже практически не изменяет скорость накопления ТБК-активных продуктов (рис. IV.7). Такой характер зависимости скорости фотоокисления кардиолипидина от интенсивности света приводит к тому, что в большом диапазоне интенсивностей УФ-облучения (от, примерно, 25% до 100%) скорость ПОЛ практически не меняется. Следовательно, при низких концентрациях меланина, при которых эффект экранирования невелик, его можно не принимать во внимание. Наоборот, при относительно высоких концентрациях пигмента нужно учитывать экранирующее действие в общей ингибирующей активности.

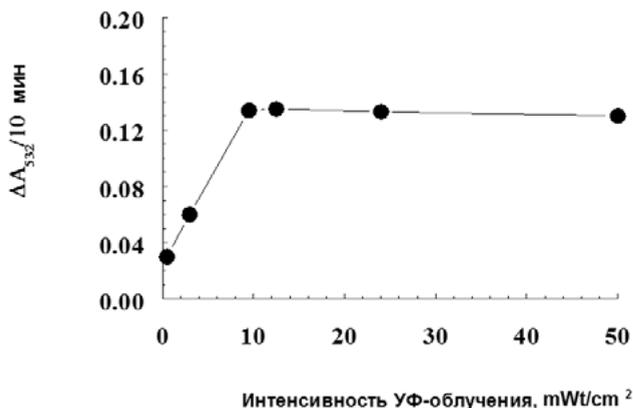


Рис. IV.7. Зависимость начальной скорости реакции фотоокисления кардиолипидина от интенсивности УФ-облучения. Липосомы облучали ртутной лампой ДРК-120 с кварцевой фокусирующей линзой

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

В следующей серии экспериментов была исследована способность меланосом и меланинов химически ингибировать процессы УФ-индуцированной перекисидации липидов. Введение меланосом в реакцию среду приводит к заметному уменьшению скорости накопления ТБК-активных продуктов (рис. IV.8а, кривая 3). Используя экспериментально найденную нами зависимость скорости фотохимической реакции окисления кардиолипина от интенсивности УФ-облучения (рис. IV.7) и зная количество света, поглощенного меланосомами, можно оценить вклад оптического экранирования в общее ингибирование меланосомами реакции фотоокисления кардиолипина. Для расчета была взята следующая формула (Шляпинтох, 1979):

$$\gamma = \frac{E_1 C_1 + E_2 C_2}{E_1 C_1} \cdot \frac{1 - \exp\{-E_1 C_1 L\}}{1 - \exp\{-(E_1 C_1 + E_2 C_2)L\}}$$

где γ – коэффициент экранирования; E_1 – коэффициент поглощения кардиолипина; E_2 – коэффициент поглощения экранирующего пигмента; C_1 – концентрация кардиолипина; C_2 – концентрация экранирующего пигмента; L – толщина поглощающего слоя. Экспериментально измерялись оптические плотности суспензии кардиолипина и смеси кардиолипина с экранирующими пигментами и рассчитывалась поправка на светорассеяние кардиолипина. Кривая 2 на рис. IV.8а представляет собой рассчитанную по формуле кинетическую зависимость фотоокисления кардиолипина в присутствии суспензии меланосом, которые «работают» только как оптический фильтр. Видно, что вклад пассивного экранирования существенно меньше суммарного эффекта ингибирования. Кривая 2 (рис. IV.8б), построенная с учетом исключения эффекта оптического экранирования, характеризует химическое подавление меланосомами процесса фотоокисления кардиолипина.

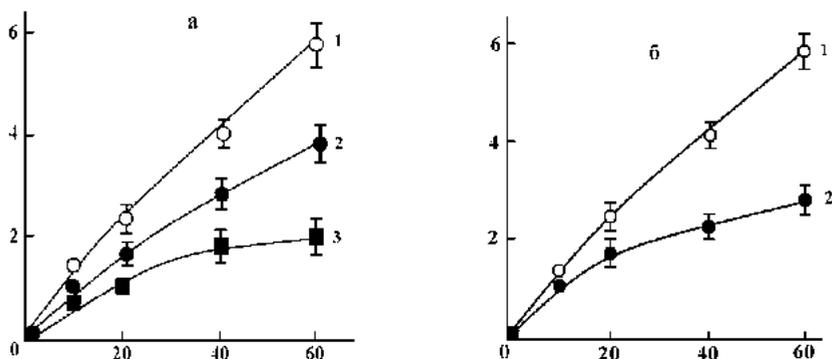


Рис. IV.8. Ингибирование меланосомами РПЭ лягушки УФ-индуцированной перекисидации кардиолипиновых липосом. По оси абсцисс – время в мин; по оси ординат – накопление ТБК-активных продуктов (нмоль/мг липида). а): 1 – кинетика окисления кардиолипина при УФ-облучении; 2 – ингибирование меланосомами за счет оптического экранирования; 3 – суммарное ингибирование (оптическое экранирование + химическое ингибирование). б): 1- кинетика окисления кардиолипина при УФ-облучении; 2 – химическое ингибирование меланосомами фотоокисления кардиолипина (с учетом поправки на экранирующий эффект). Концентрация кардиолипина была 2,5 мг/мл, а концентрация меланосом 0,4 мг/мл

В суммарном эффекте защиты от фотоокисления антиоксидантное действие меланосом превышает их вклад как оптических фильтров.

Повышение концентрации меланосом в реакционной среде увеличивает вклад химического ингибирования УФ-индуцированного пероксидного окисления липидов (рис. IV.9). Отношение скорости фотоокисления кардиолипина в отсутствие меланосом (W_0) к скорости фотоокисления кардиолипина в присутствии разных концентраций меланосом (W_n) (с поправкой на экранирующее действие) превышает единицу и растет с увеличением концентрации меланосом (в случае чистого экранирования $W_0/W_n=1$).

Меланосомы ингибируют процессы пероксидного окисления липидов, вероятно, взаимодействуя со свободнорадикальными продуктами, появляющимися при УФ-облучении кардиолипина, но не с ионами двухвалентного железа.

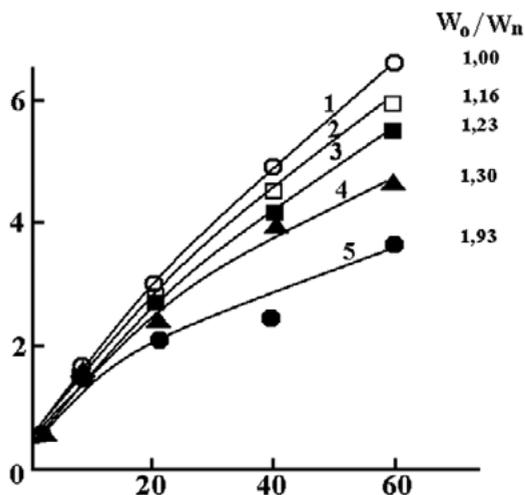


Рис. IV.9. Зависимость ингибирования фотоокисления кардиолипина от концентрации меланосом с учетом поправки на оптическое экранирование. По оси абсцисс — время в мин; по оси ординат — накопление ТБК-активных продуктов (нмоль/мг липида). Скорость окисления кардиолипина: W_0 — в контроле, W_n — в присутствии соответствующих концентраций меланосом. 1 — контроль, 2–5 — добавлены меланосомы РПЭ лягушки в концентрации 0,07; 0,2; 0,4 и 0,6 мг/мл, соответственно

Действительно, введение в реакционную систему ЭДТА, эффективно связывающего прооксидантные ионы железа, не влияет на кинетику фотоокисления кардиолипина. Это свидетельствует о том, что процесс фотоокисления кардиолипина катализируется, по-видимому, свободно-радикальными продуктами, появляющимися в ходе УФ-облучения или/и активными формами кислорода.

Не исключено, однако, что ингибирующее действие меланина связано не с подавлением образования липидных пероксидов, т.е. не с ингибированием процесса на ранних радикальных стадиях, а с замедлением реакций разветвления цепи или с ингибированием реакций деструкции пероксидов, приводящих к накоплению ТБК-активных продуктов. С другой стороны, известно, что некоторые предшественники биосинтеза меланина, такие, как ДОФА, дофахинон, и особенно 5-5-цистеинилдофа, легко подвергаются фотолизу под действием УФ-излучения с образованием радикальных продуктов распада и гидратированного электрона (Ito et al., 1983; Land et al., 1986). Показано, что УФ-фотолиз 5-S-цистеинил-ДОФА является генотоксичной реакцией. Это, возможно,

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

связано с активацией вторичных свободнорадикальных окислительных процессов, приводящих к повреждению молекулы ДНК (Mirando et al., 1984). По некоторым данным, и сам меланин, особенно феомеланинового типа, способен к УФ-индуцированной генерации свободных радикалов (Liu et al., 1982; Korytowski et al., 1987).

В связи с этим было проведено исследование влияния ДОФА-меланина на УФ-индуцированное накопление липидных гидропероксидов. В этих экспериментах генерацию реакции ПОЛ осуществляли путем облучения спиртовых растворов кардиолипина (концентрация 5 мг/мл) ртутной лампой ДРК-120 через кварцевую фокусирующую линзу при интенсивном перемешивании. ДОФА-меланин синтезировали путем окисления щелочного раствора (рН 8,4 – 8,7) ДОФА кислородом воздуха (Sarna et al., 1980). Концентрацию липидных гидропероксидов определяли энзиматически по методу, предложенному в работе Organisciak, Noell, 1976. Глутатионпероксидазу изолировали из печени крысы (Heath, Tappel, 1976) и хранили при 4°. Активность тканевой, изолированной глутатионпероксидазы измеряли по скорости окисления НАДФН при длине волны 340 нм (Paglia, Valentine, 1967). Инкубационная смесь содержала 0,05 М фосфатный буфер, рН 7,4, 1 мМ ЭДТА, 0,2 мМ НАДФН, 1 мМ восстановленный глутатион, 1,8 ед. глутатионредуктазы («Koch-Licht», Англия), 1 мМ гидропероксида *трет*-бутила. Активность фермента выражали в нмоль НАДФН, окисленного в 1 мин на 1 мг белка. При определении концентрации гидропероксидов в реакционной среде дополнительно присутствовала глутатионпероксидаза (1,0 ед. активности; гидропероксид *трет*-бутила не добавляли).

Показано, что УФ-облучение кардиолипина приводит к накоплению гидропероксидов и ТБК-активных продуктов. Сравнительные кинетики этих процессов приведены на рис. IV.10.

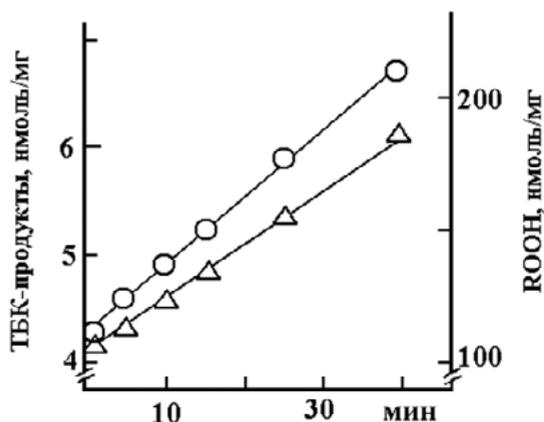


Рис. IV.10. Сравнительная кинетика накопления гидропероксидов ROOH (верхняя прямая) и ТБК-активных продуктов (нижняя прямая) при УФ-облучении кардиолипина

Видно, что в таких условиях облучения оба процесса носят линейный характер, причем на 1 моль образовавшихся гидропероксидных групп при дальнейших превращениях получается примерно 0,03 моль ТБК-активных продуктов. При уменьшении интенсивности УФ-облучения (вплоть до 6% от исход-

ного уровня) линейная зависимость накопления гидропероксидов во времени сохраняется. Совсем иной результат наблюдается при добавлении в реакционную среду исследуемых пигментов. На рис. IV.11а приведена приборная запись суммарного ингибирующего эффекта меланина.

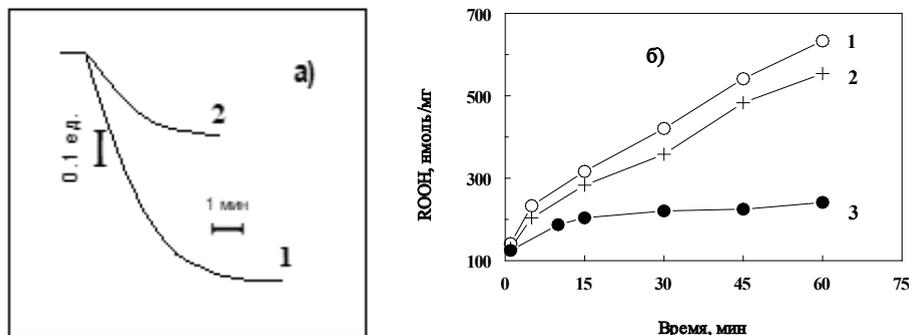


Рис. IV.11. Ингибирование УФ-индуцированного пероксидного окисления кардиолипина ДОФА-меланином. а) накопление гидропероксидов за 60 мин УФ-облучения: 1 – в отсутствие меланина, 2 – в присутствии 1 мг/мл ДОФА-меланина; б) кинетика накопления гидропероксидов: 1 – контроль, 2 – при 55% экранировании (сетка), 3 – в присутствии 1 мг/мл ДОФА-меланина

В присутствии меланина количество гидропероксидов, накопившихся за 60 мин УФ-облучения, значительно ниже, чем в контроле. Добавление меланина приводит к тому, что кривая накопления гидропероксидов быстро выходит в область насыщения (рис. IV.11б, кривая 3). Это свидетельствует о том, что ингибирующее действие ДОФА-меланина и УФ-индуцированное ПОЛ связано не только с чистым экранированием, но также и с активным химическим подавлением данного процесса.

Точная оценка степени экранирования может быть сделана путем сопоставления оптических плотностей кардиолипина и кардиолипина в смеси с экранирующим пигментом. Оценка, проведенная по этому методу, показала, что используемые в наших опытах концентрации ДОФА-меланина экранируют кардиолипин в максимуме его поглощения не более чем на 30-40%. Для сопоставления экранирующего и ингибирующего действия пигментов ставился контрольный опыт по определению скорости накопления гидропероксидов в присутствии экранирующей сетки. Была использована металлическая сетка, экранирующая УФ-излучение на 55%, что заведомо выше, чем экранирующее действие пигментов (рис. IV.11б, кривая 2). Легко видеть, что ДОФА-меланин ингибирует УФ-индуцированное накопление гидропероксидов не только оптически, но и химически – путем активного подавления процесса. Таким образом, в отличие от низкомолекулярных предшественников, сам меланин не только не усиливает УФ-индуцированные окислительные процессы, но заметно ингибирует их. Это также свидетельствует об антиоксидантных свойствах меланосом как химических ингибиторов процессов фотоокисления.

Дополнительным доказательством существования активного химического механизма ингибирования процесса ПОЛ меланинами является сопоставление активности различных меланинов, которое будет рассмотрено в следующем разделе.

2. Сравнительное исследование ингибирующей активности меланинов различного происхождения

Как известно, существует несколько типов природных меланинов, образующихся путем биосинтеза из различных низкомолекулярных предшественников. Так, например, эумеланины, которые составляют основную массу меланосом темнопигментированных животных, образуются при окислительных превращениях тирозина или диоксифенилаланина. Феомеланины, которые обнаружены в основном в пигментных клетках рыжеволосых особей, образуются при окислении цистеинил-ДОФА (Protá, 1980). Эти типы меланинов локализуются в основном в тканях глаз, волос и кожи. Существуют также нейромеланины, локализующиеся в клетках структур мозга (*substantia nigra* и *locus coeruleus*) и реомеланины, локализующиеся в плазме крови. Эти меланины образуются при окислительных превращениях катехоламинов (Hegedus, Altschule, 1970; Graham, 1979). Все типы меланинов тёмноокрашены и поглощают свет во всех диапазонах УФ и видимого спектра. В этой связи интересно сопоставить влияние различных меланинов на фотоиндуцированную пероксидацию липидов, подбирая их концентрацию таким образом, чтобы экранирующий эффект либо отсутствовал, либо был одинаковым. В этом случае можно будет прямо говорить о химической составляющей ингибирующего действия меланинов на фотоиндуцированную пероксидацию. В этом разделе будет рассмотрена сравнительная активность эумеланинов, феомеланинов и меланинов из катехоламинов в отношении УФ-индуцированной пероксидации кардиолипидов липосом (Porembska-Budny et al., 1992).

Все меланины были получены окислительной полимеризацией 5 мМ растворов в трис-НСl буфере (0,05 М, рН 7,4) следующих веществ: ДОФА, 5-S-цистеинил-ДОФА, дофамин, адреналин и адренолютин как в присутствии, так и в отсутствии ионов меди, по методике, описанной Stepien et al., 1989. Окисленный ДОФА-меланин получали путем окисления ДОФА-меланина феррицианидом калия. Облучение проводили ртутной лампой ДРК-120 с максимальной интенсивностью 50 мВт/см².

Сравнительное исследование ингибирующего действия различных меланинов на УФ-индуцированную пероксидацию кардиолипидов показало, что все исследованные меланины значительно уменьшают скорость ПОЛ. Отношение степени ингибирования от концентрации меланинов приведено на рис. IV.12.

Среди анализированных биополимеров наиболее эффективными ингибиторами были меланины, синтезированные из адреналина в присутствии Cu²⁺, из адренолютина и из ДОФА (кривые 1-3), в то время как наименее активными были меланины, синтезированные из дофамина (кривые 4,5). Как видно из рисунка, меланины, приготовленные из адреналина в присутствии ионов

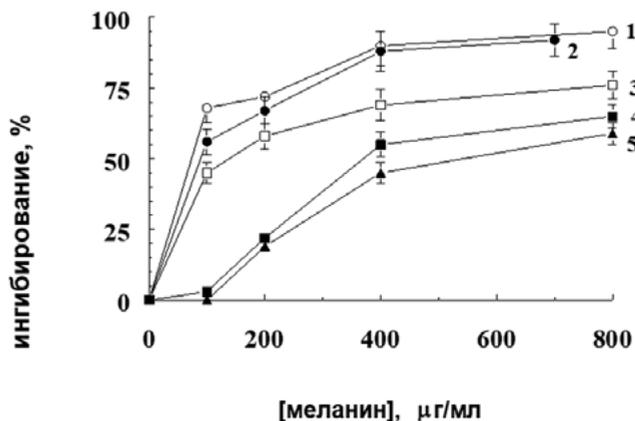


Рис. IV.12. Сравнение ингибирующего действия синтетических меланинов на УФ-индуцированную пероксидацию кардиолипина. Меланины получены из: 1 – адреналина в присутствии Cu^{2+} , 2 – адренолютина; 3 – ДОФА; 4 – дофамина в присутствии Cu^{2+} , 5 – дофамина. Концентрация кардиолипина – 2,5 мг/мл. Интенсивность облучения – 50 мВт/см²

меди и из адренолютина в концентрациях всего 100 мкг/мл в реакционной среде ингибировали пероксидацию кардиолипина приблизительно на 65% и 56%, соответственно, в то время как меланины, приготовленные из дофамина, не показывали никакого значительного эффекта.

Чтобы оценить экранирующее действие меланинов, была использована зависимость скорости УФ-индуцированной пероксидации от интенсивности облучения (см. рис. IV.7) и соответствующая формула для расчета. Полученные величины экранирования приведены в табл. IV.2.

Табл. IV.2. Экранирующий эффект синтетических меланинов

Меланин синтезирован из:	Концентрация меланина, мкг/мл	Экранирующий эффект (% ультрафиолета, поглощенный меланином)
адренолютин	100	46,7
	200	63,6
	400	77,8
	700	86,0
адреналин в присутствии ионов меди	100	43,7
	200	60,8
	400	75,6
	800	86,1
ДОФА	100	39,8
	200	57,0
	400	72,6
	800	86,1
дофамин	100	14,0
	200	24,5
	400	39,4
	800	56,5

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

Сопоставляя данные таблицы и графика (рис. IV.7) можно сделать вывод, что экранирующий эффект практически всех меланинов, взятых в концентрации меньше 400 мкг/мл, не превышает 80% и, следовательно, они уменьшают интенсивность УФ-облучения в пределах, не изменяющих начальную скорость УФ-индуцированной перекисидации кардиолипина. Иными словами, в этих концентрациях ингибирующее действие меланинов связано исключительно с химическим ингибированием свободно радикальных процессов, индуцированных УФ-облучением. Разница же в эффективности ингибирования связана с химическими особенностями меланинов.

Эти результаты подтверждаются также экспериментами, в которых сравнивали фотопротекторное действие химически различных форм меланинов, одинаковых при этом с точки зрения оптического экранирования. Данные приведены на рис. IV.13.

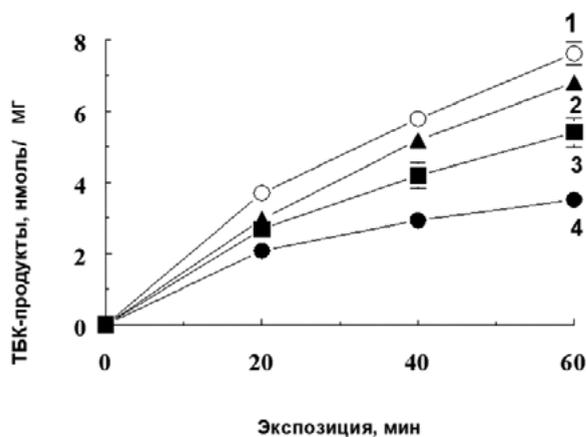


Рис. IV.13. Влияние химически различных форм меланинов на УФ-индуцированное окисление кардиолипина. 1 – контроль, 2 – добавлено 0,08 мг/мл фео меланина, 3 – добавлено 0,7 мг/мл окисленного ДОФА-меланина, 4 – добавлено 0,5 мг/мл исходного ДОФА-меланина. Оптические плотности меланинов в этих концентрациях одинаковы в области максимума поглощения кардиолипина

Из рисунка видно, что окисленная форма ДОФА-меланина в значительно меньшей степени ингибирует фотопероксидацию кардиолипина, хотя экранирующее действие обоих типов меланинов одинаково. Это может быть связано с большим содержанием гидрохинонных групп в исходной форме ДОФА-меланина по сравнению с окисленной формой. Восстановленный хинон, по-видимому, более активно взаимодействует с продуктами фотоиндуцированной перекисидации. В любом случае данные результаты подтверждают способность меланинов активно (химически), а не пассивно (экранирование) ингибировать фотоиндуцированные процессы ПОЛ.

3. Ингибирующее действие меланосом на процессы ПОЛ, индуцированные экзогенными фотосенсибилизаторами

Известно, что подавляющее большинство фотоиндуцированных процессов ПОЛ сенсibiliзируется различными химическими веществами, которые могут либо входить в состав клеток организма, либо попадать в него извне (экзогенные сенсibiliзаторы). Так, например, многие фармакологические

средства, представляющие собой светочувствительные вещества, могут проникать через гематоофтальмический барьер и накапливаться в тканях глаза в основном в виде комплексов с пигментом меланином (Aubry, 2002; Salazar-Bookaman et al., 1994). Меланин, входящий в состав пигментных гранул меланосом, способен прочно абсорбировать различные фармакологические препараты и удерживать их в течение длительного времени (Howells et al., 1994). Этот процесс, по-видимому, является одним из наиболее важных факторов, определяющих длительность побочного действия лекарственных средств. Накапливаясь в клетках глаза, светочувствительные лекарственные препараты могут в отдаленные сроки после введения пациентам привести к развитию различных фототоксических и фотоаллергических реакций (Dayhaw-Barker, 2002; Tonnesen, 1997). Аминазин (синоним хлорпромазин), традиционно применяющийся для лечения шизофрении препарат (Maguire, 2002), относится к таким светочувствительным веществам. В этом разделе будут представлены результаты исследования способности меланосом РПЭ глаза человека связывать экзогенный сенсibilизатор аминазин и влияния этого связывания на прооксидантные свойства последнего (Донцов и др., 2007).

Экспериментальный материал был предоставлен глазным банком Московского института микрохирургии глаза. Доноры органов зрения не имели каких-либо офтальмологических заболеваний. Процедура выделения меланосом проводилась по модифицированной методике, описанной в работе Boulton, Marshall, 1985. Из глазного бокала удаляли хрусталик, стекловидное тело и нейральную часть сетчатки. После этого клетки РПЭ механически отделяли от ткани в Na^+ -фосфатном буфере (рН 7,4), используя жесткую кисточку. Суспензию клеток РПЭ подвергали обработке ультразвуком на частоте 22 кГц с максимальным резонансом в течение 90 сек, при температуре 4–6°C. Крупные, неразрушенные частицы, удаляли с помощью центрифугирования при 60хg в течение 10 мин. Оставшийся супернатант был центрифугирован при 6000хg в течение 15 мин. Осадок был ресуспендирован в 0,3 М растворе сахарозы, нанесен на градиент плотности сахарозы с молярным соотношением 2,0 : 1,8 : 1,6 : 1,5 : 1,4 : 1,2 и центрифугирован при 103000хg в течение 1 часа. Меланосомы в этих условиях осаждались на дно пробирки (рис. IV.14).

Осадок меланосом ресуспендировали в фосфатном буфере и отмывали от следов сахарозы с помощью центрифугирования. Гранулы храни-

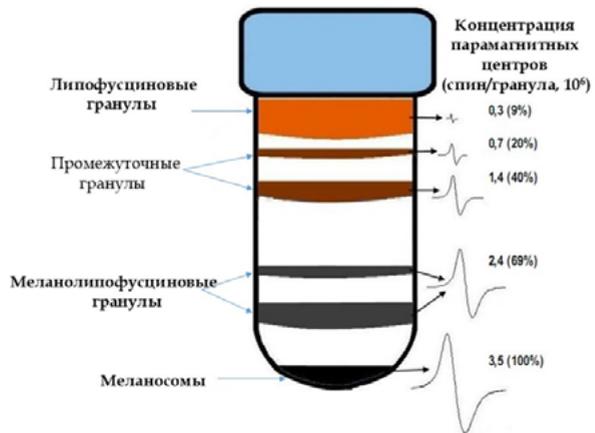


Рис. IV.14. Разделение пигментных гранул из клеток РПЭ в градиенте плотности сахарозы

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

ли в виде суспензии в фосфатном буфере при температуре -20°C . Концентрацию меланосом рассчитывали в камере Горяева и выражали как число гранул в 1 мл суспензии.

Кардиолипиновые липосомы были получены путем суспендирования кардиолипина в фосфатном буфере. В эксперименте использовали натриевую соль кардиолипина («Sigma») в метанольном растворе. Раствор кардиолипина (5 мг/мл) испаряли на роторном испарителе, липидную пленку сольбилизировали в фосфатном буфере и тщательно перемешивали на мешалке типа «Vortex». Суспензию липосом хранили при температуре $2-4^{\circ}\text{C}$.

Наружные сегменты фоторецепторов (НСФ) были получены из нейральных сетчаток глаз свиньи модифицированным методом (McDowell, 1993). 60 сетчаток помещали в 40% раствор сахарозы, приготовленный на фосфатном буфере, и интенсивно встряхивали в течение 15 мин. Полученную суспензию центрифугировали при 120000хг , в течение 1 часа при 4°C . Осадок отбрасывали, а всплывшую часть промывали в фосфатном буфере. После этого суспензию НСФ вновь заливали 40% сахарозой на фосфатном буфере и мягко встряхивали в течение 5 минут. Затем центрифугировали при 120000хг в течение 1 часа. Очищенные НСФ промывали фосфатным буфером для удаления сахарозы, осадок суспендировали в фосфатном буфере и хранили при температуре -20°C .

В экспериментах измеряли константы связывания аминазина с меланосомами РПЭ человека (Донцов и др., 2007). Препарат аминазина был получен из фирмы «Sigma». В экспериментах использовали водные растворы аминазина и его растворы в фосфатном буфере. Аминазин в концентрациях от $1\ \mu\text{M}$ до $200\ \mu\text{M}$ был инкубирован с суспензией меланосом ($3,0 - 5,0 \times 10^7$ гранул/мл) в фосфатном буфере, (рН 7,3) в течение двух часов при комнатной температуре с периодическим перемешиванием на мешалке типа «Vortex». Пигментные гранулы затем были центрифугированы при 10000хг в течение 10 мин. Концентрация оставшегося в супернатанте аминазина была определена спектрофотометрически при длине волны поглощения 305 нм на спектрофотометре UV-1601PC фирмы «Shimadzu» (Япония). Для получения констант связывания и количества связывающих мест аминазина на меланосомах была использована методика анализа в координатах Скэтчарда.

Процесс окисления инициировали облучением образца полным видимым светом (390–700 нм). Условия облучения: лампа КГМ 24–150 мощностью 150 Вт с оптической системой диапроектора «Пеленг», снабженной тепловым фильтром, комнатная температура и постоянное перемешивание.

Спектры ЭПР были записаны на приборе «РЭ-1306». Для получения комплексов аминазин в концентрации 1 мМ инкубировали с суспензией меланосом РПЭ человека в фосфатном буфере, рН 7.3, в течение двух часов при комнатной температуре. Образцами служили препараты аминазина, меланосом и комплекс аминазина с меланосомами, замороженные в виде цилиндров с диаметром 3 мм и высотой 2 см при температуре жидкого азота. Облучение образцов проводили непосредственно в резонаторе ЭПР-спектрометра, с помощью лампы ДРШ-1000, снабженной светофильтром СЗС-20 в течение 15 мин. Пара-

метры регистрации: частота 9,3 ГГц, мощность 0,5 мВт, амплитуда модуляции 5,44 Гс, постоянная времени 0,1 с.

Спектры флуоресценции были зарегистрированы на спектрофлуориметре SFM 25 фирмы «Kontron» (Швейцария).

Известно, что аминазин фоточувствителен и при действии ультрафиолета и коротковолнового видимого света проявляет выраженное мутагенное действие, повреждая молекулы ДНК (Gocke, 2001). Интересно, что фотосенсибилизирующее действие аминазин проявляет в концентрациях выше 10^{-5} М, а при меньших концентрациях может оказывать фотопротекторный эффект и проявлять антиоксидантные свойства (Макареева и др., 1998; Libera et al., 1998). Токсическое действие аминазина связано, по-видимому, с образованием свободнорадикальных продуктов при его облучении и с генерацией активных кислородных радикалов (Hall et al., 1991). В связи с этим можно было ожидать образование свободно-радикальных продуктов при облучении аминазина. На рис. IV.15(а) представлены спектры ЭПР исходного, необлученного препарата аминазина (кривая 1) и его облученных продуктов (кривая 2).

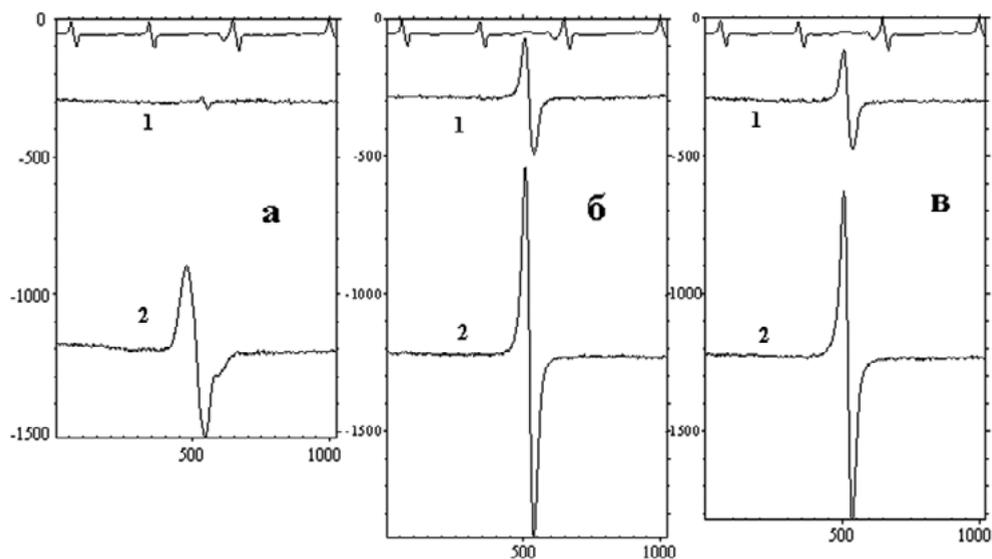


Рис. IV.15. ЭПР спектры аминазина (а), меланосом (б) и их комплекса (в) в темноте (кривая 1) и при действии света (кривая 2)

Видно, что необлученный аминазин практически не содержит свободно-радикальных продуктов, однако при его облучении синим светом наблюдается появление характерного сигнала ЭПР (кривая 2), свидетельствующего об образовании таких продуктов.

Меланосомы содержат в своем составе парамагнитный пигмент меланин. Парамагнетизм меланина связан, по-видимому, с наличием долгоживущих семихинонных групп в его структуре. При облучении меланина происходит уве-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

личение концентрации парамагнитных центров, что приводит к увеличению амплитуды сигнала ЭПР. Это хорошо видно из рис. IV.15б, где показан сигнал ЭПР меланосом РПЭ человека в темноте (кривая 1) и после облучения синим светом (кривая 2).

При связывании аминазина меланосомами человека происходит образование комплекса меланосома-аминазин. На рис. IV.16 представлены спектры флуоресценции свободного, необлученного аминазина (кривая 1, длина волны возбуждения 305 нм) с максимумом эмиссии при 450 нм и его комплекса с меланосомами (кривая 2).

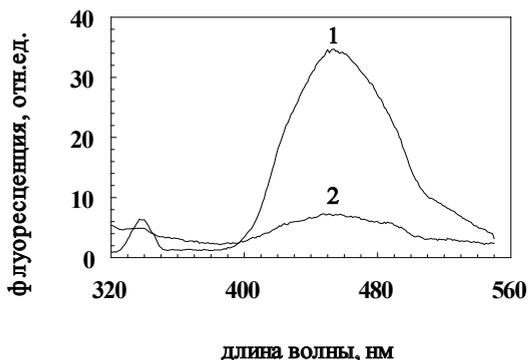


Рис. IV.16. Спектры флуоресценции аминазина и комплекса аминазин-меланосома при длине волны возбуждения 305 нм. 1 – свободный аминазин, 50 μM ; 2 – комплекс аминазина с меланосомами РПЭ человека; Концентрация меланосом составляла 4.0×10^7 гранул/мл.

Интенсивность сигнала комплекса меньше суммы сигналов меланосом и аминазина, кривая 2). Это свидетельствует о том, что при облучении комплекса аминазин либо не генерирует свободно-радикальных продуктов, либо они тушатся меланином меланосом.

Таким образом, аминазин в комплексе с меланосомами проявляет слабую способность к фотогенерации свободнорадикальных продуктов. Этот вывод подтверждают также эксперименты по измерению дифференциальных спектров поглощения аминазина и его комплекса с меланосомами при их облучении ультрафиолетом в течение 3 мин. (рис. IV.17). Видно, что при облучении свободного аминазина происходят резкие спектральные изменения (кривая 1), связанные, по-видимому, с образованием фотоокисленных продуктов, тогда как при облучении комплекса спектральные изменения минимальны (кривая 2).

Давно известно, что меланин РПЭ хорошо связывает аминазин (Basu et al., 1989). Однако параметры связывания аминазина для меланосом РПЭ глаза человека не были изучены. На рис. IV.18 показана концентрационная зависимость связывания аминазина меланосомами РПЭ человека и обработка этих результатов в координатах Скэтчарда (правый график).

При образовании комплекса происходит практически полное тушение флуоресценции аминазина, что может быть связано либо с экранированием меланосомами поглощения света аминазином, либо с тушением меланином меланосом фотовозбужденного аминазина. Из рис. IV.15 в хорошо видно, что при облучении комплекса меланосома-аминазин в тех же условиях, что и облучение аминазина и меланосом вне комплекса, наблюдается уменьшение интенсивности сигнала ЭПР (ин-

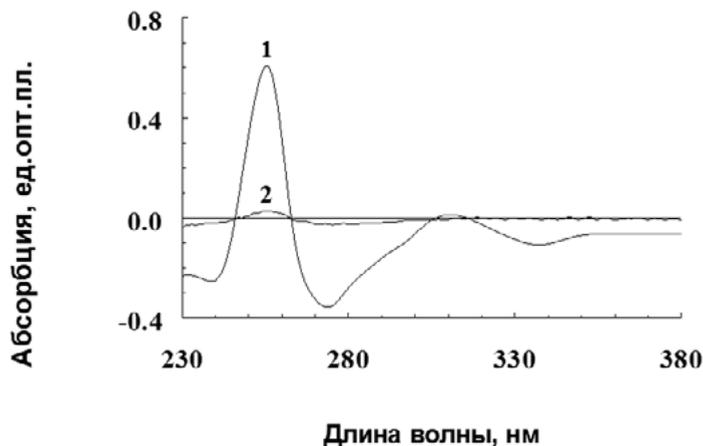


Рис. IV.17. Изменение спектральных характеристик аминазина и его комплекса с меланосомами при действии ультрафиолетового облучения. Дифференциальные спектры (спектр исходного образца минус спектр образца, облученного ультрафиолетом в течение 3 мин) свободного аминазина (кривая 1) и комплекса аминазин-меланосома (кривая 2)

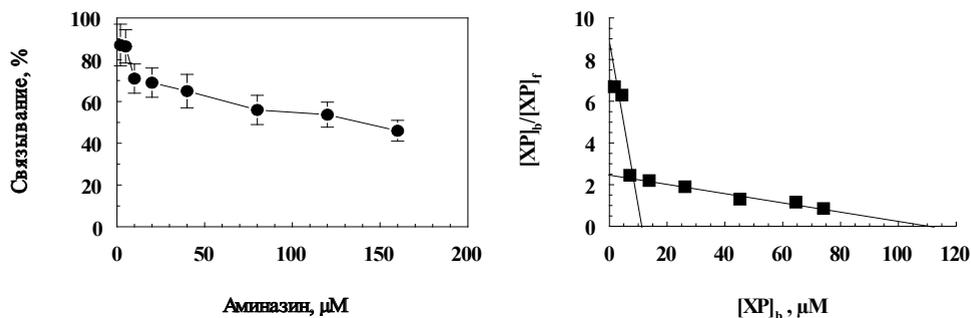


Рис. IV.18. Связывание аминазина меланосомами РПЭ человека. Зависимость степени связывания от концентрации аминазина (левый график) и график Скэтчарда для определения констант связывания (правый график; $[XP]_b$ и $[XP]_f$ концентрации хлорпромазина в связанной и свободной форме, соответственно)

Видно, что меланосомы имеют два центра связывания аминазина с константами $K_1 = 7,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $K_2 = 2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, соответственно. Максимальное связывание составляет $3,4 \text{ } \mu\text{mol}$ аминазина/ 10^6 гранул меланосом. Учитывая, что одна клетка РПЭ человека содержит в среднем 100–150 меланосом, а общее количество клеток РПЭ в глазу достигает 4–6 млн, можно подсчитать, что меланосомы РПЭ глаза могут суммарно связать в среднем до 3 ммоль или около 1 г аминазина.

Результаты показывают, что аминазин хорошо сорбируется меланосомами РПЭ человека, образуя с ними прочные комплексы, причем облучение этих комплексов ультрафиолетом и видимым светом не приводит к образованию значительных количеств свободнорадикальных продуктов. Однако важно установить, каким образом изменяется фотосенсибилизирующая активность

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

аминазина при его связывании с меланосомами человека. Мы исследовали влияние меланосом на сенсibilизированное аминазином фотоокисление кардиолипидных липосом (рис. IV.19).

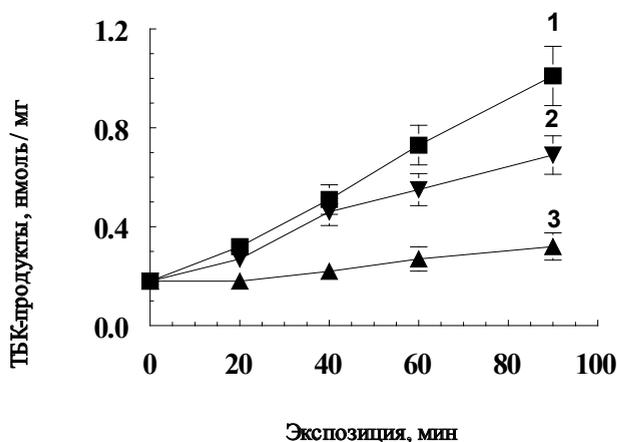


Рис. IV.19. Кинетика фотоиндуцированной аминазином перекисидации кардиолипидных липосом в присутствии различных количеств меланосом РПЭ человека. 1 – в отсутствии меланосом; 2, 3 – добавлены меланосомы в количестве $3,6 \times 10^7$ гранул/мл и $1,4 \times 10^8$ гранул/мл, соответственно. Условия освещения: полный видимый свет, лампа КГМ 24-150, мощность 150 Вт, оптическая система диапроектора «Пеленг» с тепловым фильтром, комнатная температура, постоянное перемешивание

Из рисунка видно, что аминазин стимулирует индуцированную видимым светом перекисидацию кардиолипидина (кривая 1), добавление же меланосом приводит к подавлению процесса аккумуляции ТБК-активных продуктов (кривые 2 и 3). Причем при концентрации меланосом, составляющей $1,4 \times 10^8$ гранул/мл, что более чем на два порядка ниже их концентрации в клетке РПЭ, наблюдается практически полное ингибирование процесса перекисидации липосом (рис. IV.19, кривая 3). Аналогичные результаты были получены и при исследовании фотосенсibilизированной перекисидации наружных сегментов фоторецепторных клеток. Аминазин и в этом случае ускорял накопление ТБК-активных продуктов при облучении суспензии наружных сегментов полным видимым светом (рис. IV.20, кривая 3). Однако комплекс аминазина с меланосомами в этих условиях был практически неактивен (кривая 2), не отличаясь от контрольной кривой (наружные сегменты без добавления аминазина и меланосом, кривая 1).

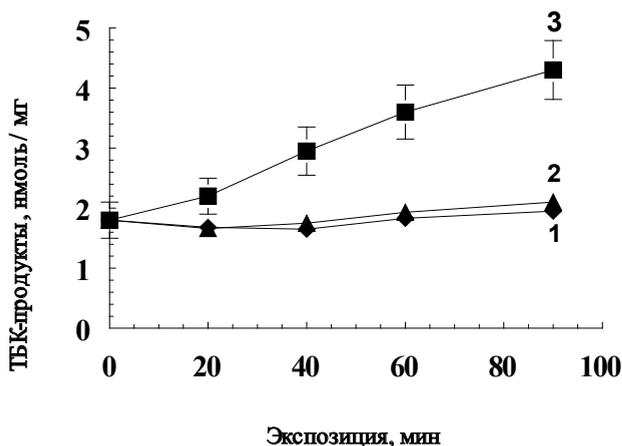


Рис. IV.20. Кинетика фотоиндуцированной перекисидации наружных сегментов фоторецепторных клеток аминазином и его комплексом с меланосомами: 1 (контроль) – отсутствуют аминазин и меланосомы; 2 – добавлен комплекс аминазин-меланосомы РПЭ человека; 3 – добавлен чистый аминазин

Таким образом, результаты показывают, что аминазин при связывании с меланосомами теряет свою способность сенсibilизировать фотоокисление липидов и образовывать свободнорадикальные продукты. Эти результаты подтверждают данные о том, что далеко не каждый фоточувствительный лекарственный препарат, проникающий в глаз и связывающийся с меланином, может оказывать токсическое действие (Leblanc et al., 1998). Однако при длительной терапии аминазином может произойти полное насыщение меланосом, что приведет к появлению его свободной формы в клетках глаза. В этих условиях могут наблюдаться отложения аминазина в тканях глаза и различные офтальмологические расстройства, связанные с его фотосенсибилизирующей активностью (Webber et al., 2001).

4. Влияние меланина на кинетику накопления долгоживущих парамагнитных центров в белке при γ -облучении

В этом разделе представлены результаты по изучению антирадикальной способности ДОФА-меланина в отношении свободнорадикальных состояний, инициированных γ -облучением белка (Юсифов и др., 1987).

ДОФА-меланин получали окислением щелочного (рН 8,2) раствора ДОФА кислородом воздуха по методу (Sarna et al., 1980). Смесь белка (лиофилизированный бычий сывороточный альбумин) с ДОФА-меланином готовили следующим образом. Смешивали слабощелочные водные растворы альбумина и ДОФА-меланина в различных соотношениях. Смесь кипятили 5 мин и осаждали 5% раствором трихлоруксусной кислоты. Затем осадок отделяли центрифугированием, промывали и высушивали над безводным CaCl_2 . Сухой осадок помещали в ампулы из стекла «Луч», откачивали воздух до 10^{-2} мм рт. ст. и облучали ^{60}Co при комнатной температуре. Измерение ЭПР проводили на установках ЭПР-21 и РЭ-1306 при мощности СВЧ поля 5МВт и амплитуде модуляции 2 Гс.

Известно, что амплитуда темного сигнала ЭПР в меланине резко возрастает при действии видимого и ультрафиолетового облучения (Sever et al., 1962; Островский, Каюшин, 1963). Аналогичный эффект наблюдается и при действии γ -квантов на ДОФА-меланин при 77 К. В этих условиях облучение приводит к индукции парамагнитных центров, дающих синглетный сигнал ЭПР с параметрами, идентичными параметрам собственного «темного» сигнала ЭПР: g фактор = 2,004, $\Delta H = 5$ Гс. При 77 К этот сигнал стабилен в течение длительного времени. При комнатной температуре амплитуда сигнала уменьшается до уровня, характерного для необлученного меланина. Облучение ДОФА-меланина при комнатной температуре приводит к другим результатам. В этом случае также возникают новые свободнорадикальные центры, но в отличие от облучения при 77К парамагнитные центры стабильны при комнатной температуре в течение длительного времени. С увеличением дозы облучения концентрация парамагнитных центров в ДОФА-меланине растет и при дозах $(1,0-1,5) \times 10^4$ Гр выходит на плато (рис. IV.21), превышая начальную концентрацию почти в 2 раза. Ширина линии и значение g -фактора спектра ЭПР γ -индуцированных и собственных свободных радикалов ДОФА-меланина одинаковы. Аналогична также зависимость амплитуды их сигналов ЭПР от мощности СВЧ-поля.

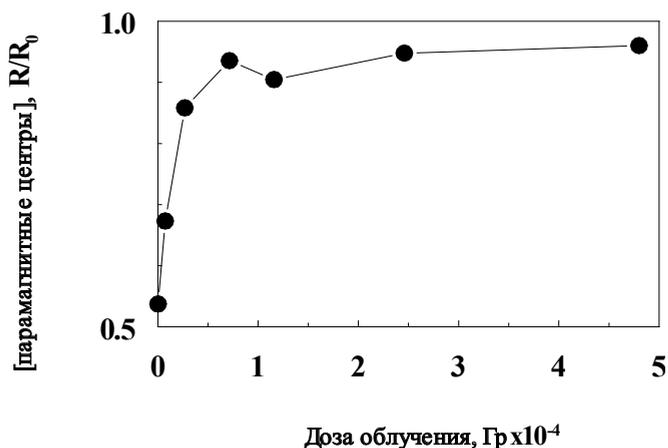


Рис. IV.21. Накопление γ -индуцированных парамагнитных центров в ДОФА-меланине при комнатной температуре. По оси абсцисс – доза облучения; по оси ординат – относительная концентрация парамагнитных центров

При допуске кислорода в ампулы с облученным меланином никаких изменений в амплитуде, ширине линии и величине g -фактора не наблюдалось, что также характерно для собственного сигнала ЭПР меланина. Эти результаты могут указывать на возможность единой природы этих свободнорадикальных центров.

Таким образом, при γ -облучении ДОФА-меланина возникают нестабильные (облучение при 77 К) и стабильные (облучение при комнатной температуре) свободные радикалы. Вероятно, облучение при 77К приводит к появлению свободных радикалов, которые из-за низкой температуры не могут мигрировать и при ее повышении рекомбинируют. При комнатной температуре индуцированные радикалы, по-видимому, мигрируют на значительные расстояния и стабилизируются в матрице меланина. Не исключено, что радикалы, регистрируемые методом ЭПР в этом случае, образуются в результате вторичных процессов. В обоих случаях мы имеем дело с радикалами, схожими по ЭПР характеристикам с собственными радикалами ДОФА-меланина и, вероятно, также имеющими семихинонную природу.

В другой серии опытов было изучено влияние ДОФА-меланина на свободные радикалы, индуцируемые в белке альбумине при γ -облучении. Известно, что в белках при облучении γ -квантами при комнатной температуре регистрируется стабильный дублетный сигнал ЭПР, который, как считается, появляется в результате вторичных реакций. Природа этого сигнала окончательно не выяснена (Каюшин и др., 1976; Милинчук и др., 1980). В наших экспериментах при γ -облучении альбумина появляется стабильный дублетный сигнал, который сохраняется и в смеси альбумина с меланином. При этом узкий и интенсивный сигнал меланина, который налагается на дублет белка, попадает примерно в центр сигнала последнего. Сигнал альбумина практически не влияет на пик-пиковое расстояние сигнала меланина, причем отношение этого расстояния к расстоянию для чистого ДОФА-меланина остается примерно одинаковым при всех дозах облучения. Таким образом, количество парамагнитных центров в чистом меланине и меланине в смеси с альбумином изменяется

примерно одинаково. Тогда, облучая одновременно чистый меланин, чистый альбумин и смесь альбумина с меланином, можно определить концентрацию парамагнитных центров альбумина в его смеси с меланином.

На рис. IV.22 показана зависимость накопления парамагнитных центров в альбумине от дозы облучения.

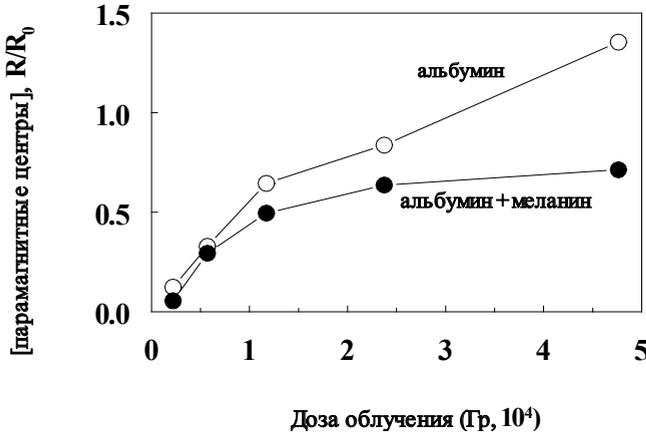


Рис. IV.22. Накопление γ -индуцированных парамагнитных центров в альбумине и смеси альбумина с ДОФА-меланином в зависимости от дозы облучения

Видно, что при низких дозах облучения концентрация парамагнитных центров растет линейно. В образцах альбумина с меланином накопление свободных радикалов идет значительно медленнее, чем в контрольных. При дозе $4,8 \times 10^4$ Гр концентрация свободных радикалов в альбумине с ДОФА-меланином почти на 50% меньше, чем в чистом альбумине. Ингибирующее действие меланина заметно проявляется уже при его 10% содержании в смеси с альбумином. Эти результаты можно объяснить антирадикальными свойствами ДОФА-меланина. Молекулы меланина могут взаимодействовать с первичными или вторичными свободными радикалами, индуцированными γ -радиацией так, что концентрация конечных (дублетный сигнал) парамагнитных центров уменьшается.

Известно, что макрорадикалы в твердой фазе могут отстоять друг от друга на значительном расстоянии, и рекомбинация их связана с взаимным сближением. Механизм сближения макрорадикалов обусловлен как подвижностью участков цепи молекулы с неспаренным электроном, так и химическими реакциями, в результате которых происходит миграция свободной валентности (Милянчук и др., 1980; Эмануэль, Бучаченко, 1982). Миграция свободной валентности может быть как внутримолекулярной, так и межмолекулярной. Предполагается, что такой механизм реализуется в большинстве твердых полимеров. Поскольку процесс возникновения и природа парамагнитных центров белков, дающих дублетный сигнал ЭПР, в настоящее время остается невыясненным, то предложить конкретный механизм взаимодействия свободных радикалов, образованных в альбумине под действием γ -радиации, с ДОФА-меланином представляется затруднительным. В целом результаты показывают, что ДОФА-меланин при комнатной температуре способен ингибировать развитие вторичных свободнорадикальных процессов в γ -облученном белке. Это связа-

но, вероятно, со способностью меланина взаимодействовать со свободными радикалами, образующимися при облучении.

5. Устойчивость меланинов к деструктивному действию ультрафио-летового облучения

Хорошо известно, что с возрастом происходит значительное уменьшение концентрации меланина в тканях и органах, в том числе и в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ). Предполагается, что это может быть связано с процессами биodeградации меланосом (Borovansky and Elleder, 2003) в результате длительного воздействия светового облучения в аэробных условиях (Meredith and Sarna, 2006). Показано, например, что продолжительное облучение меланосом в УФ-видимом диапазоне в аэробных условиях приводит к деградации структуры полимера, сопровождающейся потерей способности меланосом ингибировать железо-индуцированную пероксидацию полиненасыщенных жирных кислот (Zadlo et al., 2006). Кроме того, разрушенные фрагменты меланинового полимера сами могут оказывать цитотоксическое действие. Однако меланины чрезвычайно устойчивы к действию облучения. В наших экспериментах мы провели сравнение изменений антиоксидантных свойств ДОФА-меланина, аналога природных эумеланинов, вызванных длительным облучением УФ-видимым светом, с изменениями, вызванными действием сильных окислителей (Донцов и др., 2015; Островский, Донцов, 2018). В качестве источника УФ-видимого света использовали ртутную лампу ДРК-120 мощностью 120 Вт, световым потоком 3900 Лм и основной полосой испускания, приходящейся на область 270–320 нм. В качестве окислителя использовали 20% раствор пероксида водорода. Антиоксидантную активность (АОА) определяли по величине латентного периода тушения хемилюминесценции люминола, а скорость УФ-индуцированной пероксидации наружных сегментов фоторецепторных клеток (НСФ), по накоплению ГБК-активных продуктов в среде инкубации. Результаты показали, что облучение раствора ДОФА-меланина в концентрации 1,0 мг/мл (объем 6 мл, постоянное перемешивание) в течение 52 часов приводило к, примерно, 5-кратному уменьшению константы тушения хемилюминесценции по сравнению с необлученным препаратом. В то же время, ингибирующая способность облученного ДОФА-меланина в отношении УФ-индуцированной пероксидации НСФ уменьшалась только в 1,5 раза. При этом длительное облучение в столь жестких условиях приводило лишь к незначительному изменению оптической плотности ДОФА-меланина, примерно к 2-кратному уменьшению концентрации парамагнитных центров и к незначительному возрастанию концентрации флуоресцирующих продуктов деградации полимера. Окислительная деградация ДОФА-меланина при использовании концентрированного раствора пероксида водорода была значительно более выражена, чем вызываемая УФ-облучением. Уже 4–6 часовая инкубация полимера с пероксидом водорода приводила к практически полному обесцвечиванию раствора, более чем 10-кратному увеличению концентрации флуоресцирующих продуктов и к полной потере АОА и способности ингибировать процессы пероксидации НСФ. Из этих данных можно сделать вывод

о том, что воздействие сильных окислителей вызывает значительно большие изменения антиоксидантных свойств ДОФА-меланина, чем длительное облучение УФ-видимым светом. Предполагается, что это связано с тем, что структура ДОФА-меланина изменяется более выражено в результате деградации, вызванной сильными окислителями, по сравнению с облучением ультрафиолетом и видимым светом (подробнее см. глава VII).

В. Ингибирующее действие меланинов в отношении фототоксичности А2Е – флуорофора липофусциновых гранул клеток РПЭ

Хорошо известно, что эндогенный хромофор липофусциновых гранул, бис-ретиноид А2Е, накапливающийся в клетках глаза при старении и патологиях, усиливает повреждающее действие синего света на клетки РПЭ (Schutt et al., 2000; Sparrow et al., 1999, 2000, 2002, 2003б; Sparrow, Cai, 2001). Повреждающее действие А2Е может быть связано с усилением фотоокислительных процессов, с разрушением цитоплазматических мембран и с накоплением в клетках токсичных продуктов фотоокисления самого А2Е (De, Sakmar, 2002; Ben-Shabat et al., 2002а; Kanofsky et al., 2003; Avalle et al., 2004). Известно, что продукты окисления и фотоокисления А2Е инициируют реакции, вызывающие повреждения молекул ДНК и способны индуцировать апоптоз клеток РПЭ млекопитающих (Suter et al., 2000; Sparrow et al., 2003а; Sparrow et al., 2003в). Как сами молекулы А2Е, так и продукты их окисления были найдены во внутриклеточных органеллах РПЭ человека (липофусциновые гранулы, лизосомы, митохондрии) *in vivo*, причем их концентрация значительно возрастала при различных ретинальных патологиях (Sparrow et al., 2010). Для защиты клеток РПЭ и нейральной сетчатки от прооксидантного действия бисретиноидов липофусцина и их окисленных форм большое значение принадлежит меланину меланосом. Так, в работе Wang и других, 2006 было показано, что меланосомы, выделенные из клеток РПЭ глаза быка, оказывают защитное действие и в отношении фотоокисления молекул А2Е, и в отношении повреждения клеток РПЭ, индуцированного облучением синим светом. Возможный механизм защитного действия меланосом может быть обусловлен связыванием молекул А2Е меланином меланосом в неактивные комплексы. В наших экспериментах мы исследовали сравнительную антиоксидантную активность ДОФА-меланина, меланосом и их комплексов с различным содержанием А2Е (Донцов и др., 2012; Сакина и др., 2013). Предполагалось, что связанный с меланинами А2Е потеряет свои токсичные и фототоксичные свойства.

А2Е был синтезирован из полностью *trans*-ретинала и этаноламина по модифицированной методике, приведенной в работах (Parish et al., 1998; Ben-Shabat et al., 2002б). Комплексы А2Е и ДОФА-меланина были получены следующим способом. К 4 мл раствора, содержащего 0,5–1,5 мг ДОФА-меланина в 0,1 М К-фосфатном буфере (рН 7,5) добавляли различные объемы $3,3 \times 10^{-4}$ М раствора А2Е в метаноле. В контрольных пробах к равному количеству ДОФА-меланина

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

добавляли чистый метанол. Пробы инкубировали в течение часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании, после чего добавляли 100 мкл 6N раствора HCl для осаждения комплексов. Осаждение проводили путем центрифугирования на центрифуге “Beckman Allegra 64R” при 3000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант тщательно удаляли, а осадок ресуспендировали в 4 мл К-фосфатного буфера. Концентрацию связанного А2Е определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (Япония) при длине волны 430 нм и $\epsilon = 3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Были получены три различных комплекса ДОФА-А2Е с различным содержанием хромофора в полимере: комплекс 1 содержал 21,9 нмоль А2Е/1 мг ДОФА-меланина, комплекс 2 содержал 65,8 нмоль А2Е/1 мг ДОФА-меланина и комплекс 3 – 197,4 нмоля А2Е/мг ДОФА-меланина. Наружные сегменты фоторецепторных клеток были получены из сетчаток глаза быка модифицированным методом (Smith et al., 1975). Выделенные НСФ суспендировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,6) и хранили при температуре -20°C .

Кинетику Fe^{2+} - и УФ-индуцированной перекисидации липидов НСФ измеряли по накоплению ТБК-активных продуктов реакции (Ottolenghi, 1959; Buege and Aust, 1978). Для УФ-облучения использовали дуговую ртутно-кварцевую лампу ДРК-120, мощностью 120 Вт и световым потоком 3900 Лм. Облучение проводили при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Антиоксидантную активность измеряли хемилюминесцентным методом в системе, содержащей гемоглобин, пероксид водорода и люминол (Теселкин и др., 1999). Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301PC (Япония). Величину антиоксидантной активности оценивали по величине латентного периода хемилюминесценции, чтобы избежать возможного экранирующего действия черного ДОФА-меланина.

Эксперименты показали, что как ДОФА-меланин, так и меланосомы, выделенные из глаз человека, быка и лягушки, способны прочно связывать молекулы А2Е в неактивные комплексы (рис. IV.23).

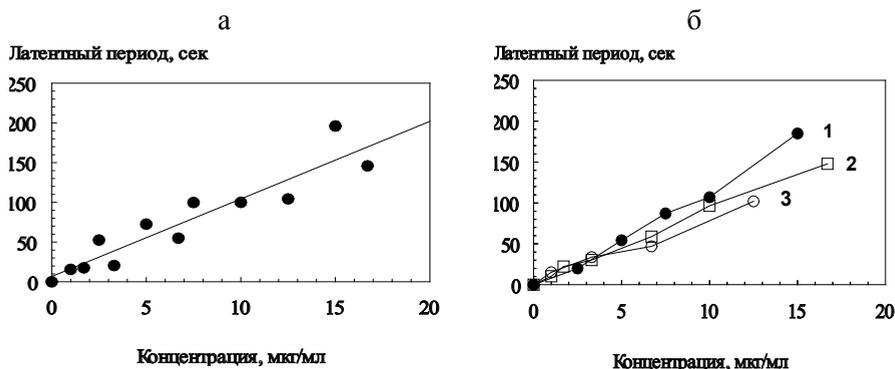


Рис. IV.23. Определение антиоксидантной активности ДОФА-меланина и его комплексов с А2Е хемилюминесцентным методом. а). Зависимость латентного периода хемилюминесценции от концентрации ДОФА-меланина; б). Зависимость латентного периода хемилюминесценции от концентрации комплексов ДОФА-меланин-А2Е. Кривые 1 – 3 соответствуют комплексам 1 – 3

Рис. IV.23 иллюстрирует зависимость латентного периода хемилюминесценции люминола от концентрации чистого ДОФА-меланина (а) и от концентрации ДОФА-меланина, связанного с хромофором А2Е (б). Латентный период хемилюминесценции ДОФА-меланина в наших условиях измерения составил, в среднем, 10 ± 2 сек/мкг ДОФА-меланина (рис. IV.23а). Латентные периоды трех комплексов (рис. IV.23б) находятся практически в том же диапазоне (11,0; 9,3 и 8,0 сек/мкг полимера, соответственно), что и свободный меланин, причем первый комплекс имеет несколько большую величину задержки хемилюминесценции, чем второй и третий комплексы. Эти результаты свидетельствуют о том, что присутствие А2Е в ДОФА-меланине практически не изменяет величину антиоксидантной активности последнего. Если принять среднюю молекулярную массу полимера меланина равной 20000 Дальтон, то расчеты показывают, что комплексы А2Е-ДОФА-меланин содержат в среднем 4, 13 и 39 молекул А2Е на 10 молекул полимера для комплексов 1, 2 и 3, соответственно. Отсюда следует, что даже связывание почти 4 молекул А2Е одной молекулой ДОФА-меланина практически не изменяет антиоксидантной активности полимера.

ТБК-активные продукты, нмоль/мин мг

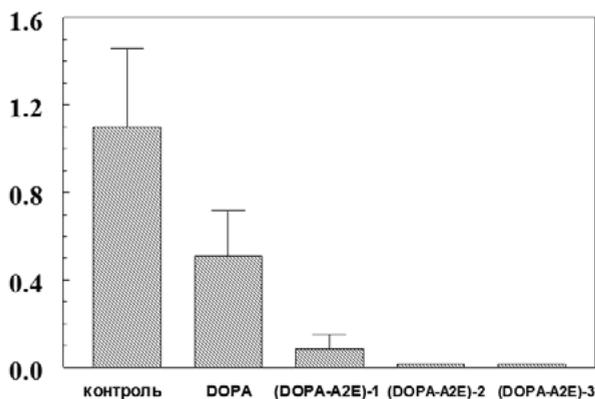


Рис. IV.24. Сравнение ингибирующего действия ДОФА-меланина и его комплексов с А2Е в отношении Fe-аскорбат-индуцированной перекисидации наружных сегментов фоторецепторных клеток. Добавки ДОФА-меланина и комплексов были одинаковыми и составляли 60 мкг/мл

Рис. IV.24 демонстрирует влияние ДОФА-меланина и его комплексов с А2Е на среднюю скорость накопления ТБК-активных продуктов в НСФ в темновых условиях. Видно, что ДОФА-меланин в концентрации 60 мкг/мл примерно в два раза ингибирует процесс перекисидации липидов, тогда как комплексы 1 – 3 в тех же концентрациях более сильные ингибиторы Fe²⁺-аскорбат-индуцированной перекисидации.

Аналогичные результаты были получены также и для комплексов А2Е с различными меланосомами, выделенными из ткани РПЭ животных. В этих экспериментах меланосомы человека и быка были изолированы из клеток РПЭ с помощью модифицированной методики, предложенной Boulton и Marshall, 1985. Полученный осадок меланосом отмывали от сахарозы К-фосфатным буфером, после чего обрабатывали 2% раствором бромиды цетилтриметиламмония в течение 15 мин для удаления избытка жиров. Окончательно полученные мелано-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

сомы отмывали от следов детергента буферным раствором, ресуспендировали в фосфатном буфере и подсчитывали концентрацию гранул, используя камеру Горяева. Меланосомы из глаз адаптированной к темноте озерной лягушки *Rana ridibunda* получали по методике, предложенной в работе (Salceda and Sanchez-Chavez, 2000). Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями нормативного документа Министерства здравоохранения РФ «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 1977 г. Отделенную от нейральной сетчатки ткань РПЭ тщательно гомогенизировали в К-фосфатном буфере и центрифугировали при 60g и 40°C в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в том же буфере и снова центрифугировали при 60g. Супернатанты объединяли и центрифугировали при 500g в течение 30 мин. Осадок меланосом ресуспендировали в фосфатном буфере и определяли их количество в камере Горяева.

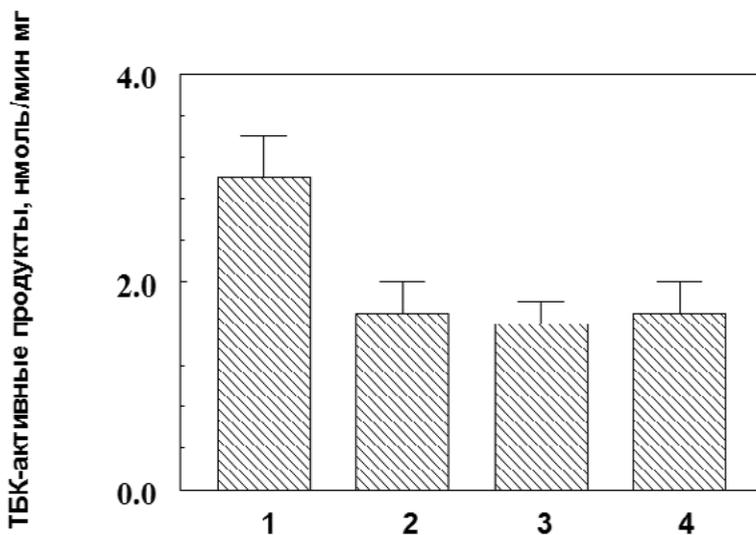


Рис. IV.25. Сравнение эффектов меланосом лягушки и их комплексов с А2Е в отношении УФ-индуцированной пероксидации наружных сегментов фоторецепторных клеток.

1 – контроль (без добавок меланосом), 2 – добавлены нативные меланосомы;
3 – добавлен комплекс 1, 4 – добавлен комплекс 2. Добавки меланосом и комплексов составляли 1.4×10^8 гранул/мл

На рис. IV.25 показаны результаты по сравнению ингибирующего действия меланосом из РПЭ глаза лягушки и их комплексов с А2Е в отношении УФ-индуцированной пероксидации НСФ. Содержание А2Е в первом комплексе было 0,01 фмоль/гранула, а содержание А2Е во втором комплексе – 0,025 фмоль/гранула. Это соответствует, примерно, 6×10^6 и $1,5 \times 10^7$ молекул А2Е на одну меланосому. Из рисунка видно, что А2Е практически не снижает исходной ингибирующей способности меланосом. Причина этого не ясна, возможно, она связана с тем, что в комплексе с меланином меланосом А2Е по каким-то причинам теряет свою сенсibiliзирующую способность.

Отсюда следует, что даже связывание более 10 миллионов молекул А2Е одной гранулой, имеющей диаметр приблизительно 1 микрон, практически не изменяет антиоксидантной активности меланосомы. Возможная структура комплекса меланина и А2Е приведена на рис. IV.26.

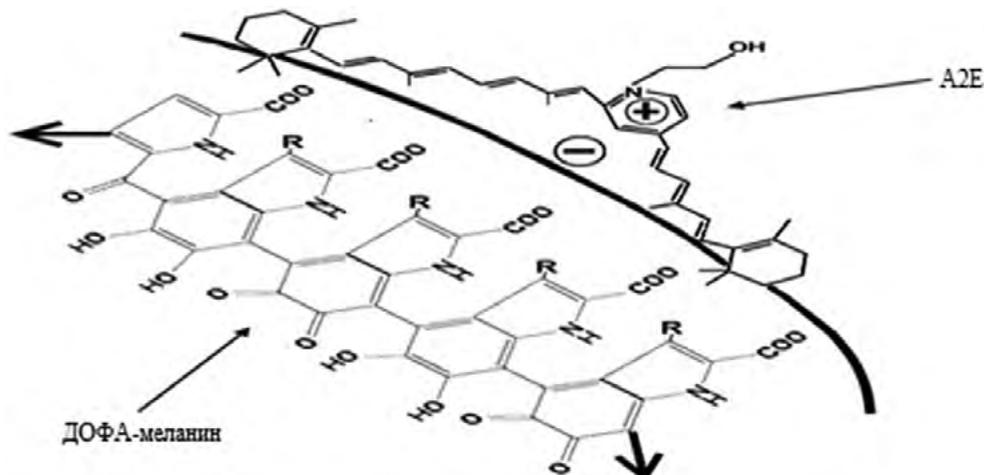


Рис. IV.26. Гипотетическая схема структуры комплекса А2Е с меланином

Таким образом, в целом результаты этого раздела свидетельствуют о том, что хромофор липофусциновых гранул А2Е способен формировать комплексы как с ДОФА-меланином, так и с меланосомами из РПЭ человека, быка и лягушки. При этом комплексы А2Е с меланосомами и с ДОФА-меланином проявляют практически такую же антиоксидантную активность, как и исходные пигменты. Можно предполагать, что избыток А2Е в клетках ретинального пигментного эпителия также может связываться меланином меланосом и терять свои токсические свойства.

Известно, что при облучении синим светом в присутствии кислорода А2Е и другие бисретиноиды липофусциновых гранул окисляются с образованием различных токсичных продуктов, а именно, эпоксидов, пероксидов, альдегидов и кетонов (Sparrow et al., 2000; Cantrell et al., 2001; Wang et al., 2006; Яковлева и др., 2006; Yoon et al., 2012; Aybush et al., 2020; Yakovleva et al., 2022). Среди карбонильных продуктов, образующихся в этих процессах, также были обнаружены продукты перекисного окисления липидов, такие как реактивные альдегиды и диальдегиды: 4-гидроксиноненаль (4-NHE) и малоновый диальдегид (MDA) (Schutt et al., 2003; Rózanowska, Rózanowski, 2022). Активные карбонилы, образующиеся при фотоиндуцированном окислении флуорофоров липофусциновых гранул клеток РПЭ, могут либо оставаться внутри гранул липофусцина (гидрофобные продукты окисления) (Wang et al., 2006; Wu et al., 2010; Yakovleva et al., 2022), либо могут диффундировать в цитоплазму клетки (гидрофильные и амфифильные продукты окисления) (Yakovleva et al.,

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

2022). Так, ранее нами было показано, что бисретиноид А2Е при фотоокислении теряет свою строгую гидрофобность (Sokolov et al., 2007), становится водорастворимым и может выходить в цитоплазму (Донцов и др., 2009). Эти результаты были подтверждены на культуре клеток ARPE19 человека (Yoon et al., 2012), в которых клетки РПЭ нагружали нативным неокисленным А2Е, после чего облучали синим светом. Продукты фотоокисления А2Е были найдены не только в свободном виде в цитоплазме клеток, но также и вне клеток. Это были чрезвычайно токсичные низкомолекулярные альдегиды – продукты окислительного фотоиндуцированного распада А2Е. Позднее было установлено, что водорастворимые продукты фотоиндуцированного окисления А2Е и других бисретиноидов липофусциновых гранул могут модифицировать водорастворимые белки, а также белки и липиды внешних сегментов фоторецепторов с образованием флуоресцентных оснований Шиффа (Yakovleva et al., 2022; Dontsov et al., 2022). Эти водорастворимые карбонилы чрезвычайно токсичны (Schleicher et al., 2001) и, как полагают, являются предшественниками для образования конечных продуктов гликирования (AGE) (Rowan et al., 2018; Kim et al., 2021). Предполагается, что эти продукты являются инициаторами развития возрастной клеточной дисфункции, поскольку они вызывают образование ковалентных белковых сшивок, что приводит к снижению подвижности и растворимости белков, снижению ферментативной активности и потере функции распознавания рецепторов (Baynes, 2001; Kohen, Nyska, 2002).

В этой связи можно предполагать, что избыток бисретиноидов липофусциновых гранул, включая А2Е, а также, возможно, продукты их фото-окислительного распада, будут поглощаться меланином меланосом в клетках РПЭ путем образования с ними прочных комплексов, не способных проникать в другие компартменты клетки и оказывать там свое токсическое действие.

Глава V

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ОММОХРОМОВ

1. Сравнение некоторых физико-химических характеристик оммохромов, выделенных из глаз различных беспозвоночных животных

Как было показано ранее, более высокая резистентность клеток глаза морской популяции креветок *M. relictus* по сравнению с озерной популяцией к действию прооксидантов, связана с более высоким содержанием экранирующих пигментов оммохромов в глазах морской популяции. Это позволяет предполагать, что оммохромы беспозвоночных животных, как и меланосомы позвоночных, проявляют антиоксидантную активность в отношении различных прооксидантных факторов. Для проверки этого предположения нами были исследованы оммохромы, выделенные из глаз различных классов беспозвоночных животных – насекомых, ракообразных и головоногих моллюсков (Сакина и др., 1987; Островский и др., 2018; Островский, Донцов, 2019; Ushakova et al., 2019; Донцов и др., 2020а; Донцов и др., 2020б; Dontsov et al., 2021). Оммохромы были изолированы, в частности, из глаз пяти видов насекомых.

Муха «черная львинка» (*Hermetia Illucens*) и ее личинки широко используются для питания сельскохозяйственных животных и для конвертации биологических отходов в доступный источник пищевого белка, жиров, хитина и меланина. Чистая культура этих мух хранится в Институте проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцева (ИПЭЭ РАН). Технология культивирования мух включает следующие стадии: содержание взрослых мух в инсектарии в контролируемых условиях; инкубация яиц и получение личинок в инкубаторе; рост личинок в контейнере с питательным субстратом; получение предкуколок, затем куколок и имаго. Взрослые мухи живут 5-8 дней. Нуклеотидная последовательность *Hermetia illucens* зарегистрирована в Генном Банке (*Hermetia illucens*, sample H-il 1 No. KY817115). После окончания жизненного цикла подмор мух замораживали и хранили при температуре -180°C .

Жук большой мучной хрущак (*Tenebrio molitor*) в настоящее время является одним из самых популярных видов кормовых насекомых, которых используют для кормления различных экзотических животных. Существуют крупные производства в Европе, Китае, США. Культура содержится в лабораторных условиях ИПЭЭ РАН.

Таракан мраморный (*Nauphoeta cinerea*) – также популярный вид кормовых насекомых для насекомоядных животных. Культура содержится в лабораторных условиях ИПЭЭ РАН.

Бабочка табачный бражник (*Manduca sexta*). Гусеницы этой бабочки служат популярным кормом для насекомоядных экзотических животных. Использо-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

ется в качестве модельного объекта в нейробиологии. Культура содержится в энтомологическом отделе Московского зоопарка.

Саранча пустынная (*Schistocerca gregaria*) – вид кормовых насекомых для насекомоядных животных. Пользуется популярностью как живой корм для насекомоядных животных. Культура содержится в энтомологическом отделе Московского зоопарка.

Изоляция оммохромов была выполнена путем экстракции абсолютным метанолом, содержащим 1% по объему хлористый водород (MeOH-HCl), при 6°C в течение 48 ч при периодическом встряхивании. После этого экстракт фильтровали через бумажный фильтр. Полученный супернатант вишневого цвета нейтрализовали 20% раствором аммиака и центрифугировали при 5000xg в течение 15 мин. Супернатант удаляли, а к осадку добавляли свежий раствор MeOH-HCl до его полного растворения. Процедуру осаждения оммохромов раствором аммиака повторяли дважды. Окончательно осадок оммохромов промывали дистиллированной водой и высушивали в эксикаторе в присутствии безводного хлорида кальция.

На рис. V.1 приведены спектры поглощения оммохромов насекомых различных семейств. Максимумы спектров поглощения оммохромов глаза насекомых в видимой области спектра находились в диапазоне от 460 нм до 520 нм. Наиболее длинноволновые максимумы были характерны для оммохромов ба-

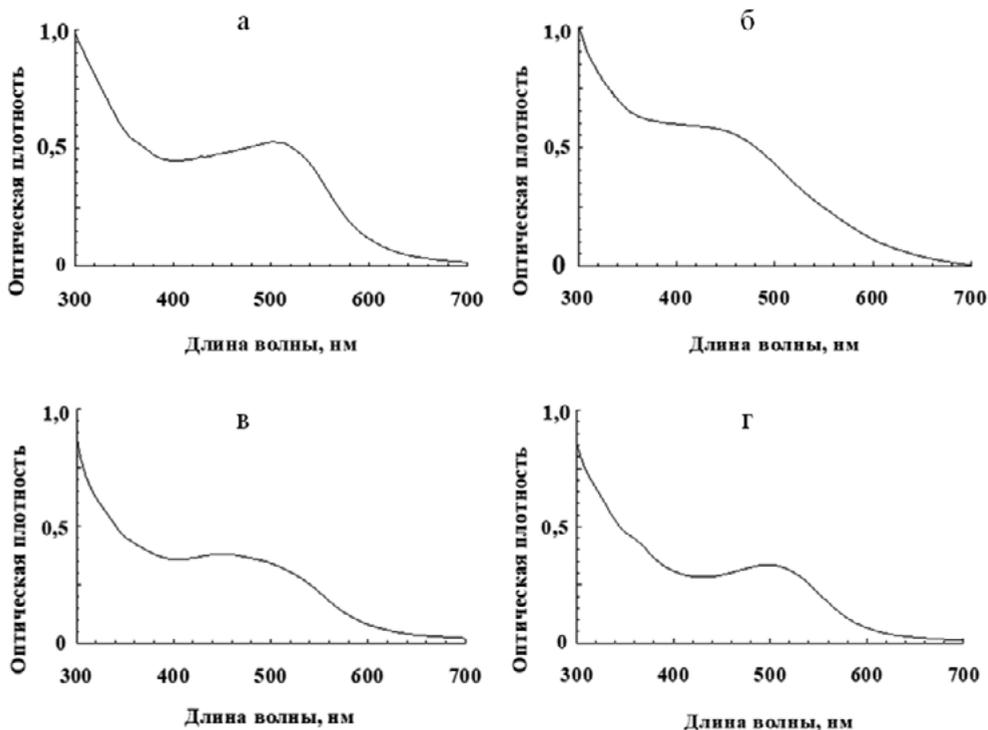


Рис. V.1. Спектры поглощения оммохромов насекомых в метанол-HCl. а – *Manduca sexta*, б – *Hermetia illucens*, в – *Tenebrio molitor*, г – *Nauphoeta cinerea*

бочки бражник табачный (510 нм, рис. V.1a) и мраморного таракана (500 нм, рис. V.1г). Оммохромы остальных насекомых имели максимум поглощения около 470 нм (рис. V.1б и 1в). Максимумы поглощения оммохромов при 430–490 нм характерны для пигментов из класса омматинов, а максимумы поглощения при 520 нм и выше характерны для омминов (Butenandt, Schafer, 1962). Абсорбционные спектры оммохромов мухи черная львинка, жука чернотелки более характерны для спектров омматинов; абсорбционные спектры мраморного таракана и бабочки бражник табачный имеют промежуточный характер, что может быть связано с наличием у них двух типов оммохромов – омматинов и омминов. Оммохромы креветки «Травяной чилим» (*Pandalus latirostris*) и оммохромы стрекозы «Девушка красавица» (*Calopteryx splendens*) имели характерный омминовый максимум поглощения при 520 нм. Такой же максимум поглощения показывали оммохромы глаза кальмара.

Все изолированные оммохромы интенсивно флуоресцировали в видимой области спектра, причем интенсивность флуоресценции сильно зависела от их редокс состояния. Наблюдалось два основных пика флуоресценции – коротковолновый с максимумом эмиссии при 440 нм и длинноволновый с максимумом эмиссии при 530 нм (рис. V.2, а и б, соответственно). Основные максимумы возбуждения коротковолновой флуоресценции оммохромов были 290 нм, 330 нм и 380 нм, а длинноволновой флуоресценции 330 нм и 460 нм.

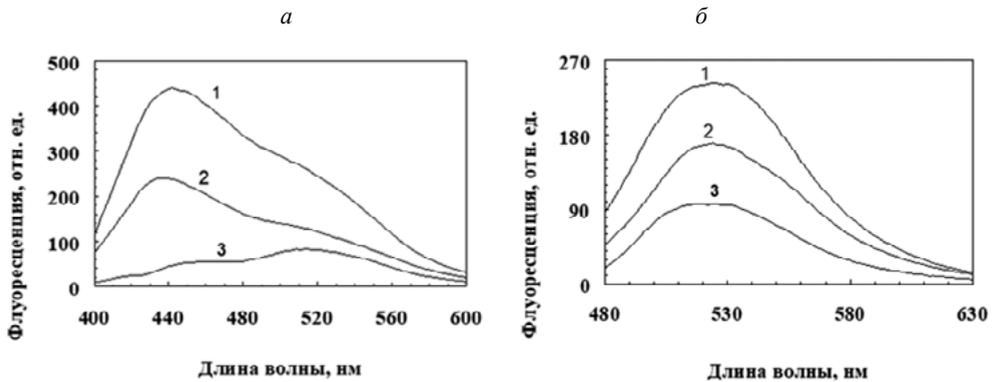


Рис. V.2. Спектры флуоресценции оммохромов пустынной саранчи (1), бабочки «бражник табачный» (2) и мраморного таракана (3) в метанол-НСl. Длина волны возбуждения составляла: а – 380 нм и б – 460 нм

Исследование качественного состава оммохромов было выполнено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). На рис. V.3 приведены хроматограммы всех изученных оммохромов, измеренных по поглощению и по интенсивности флуоресценции.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

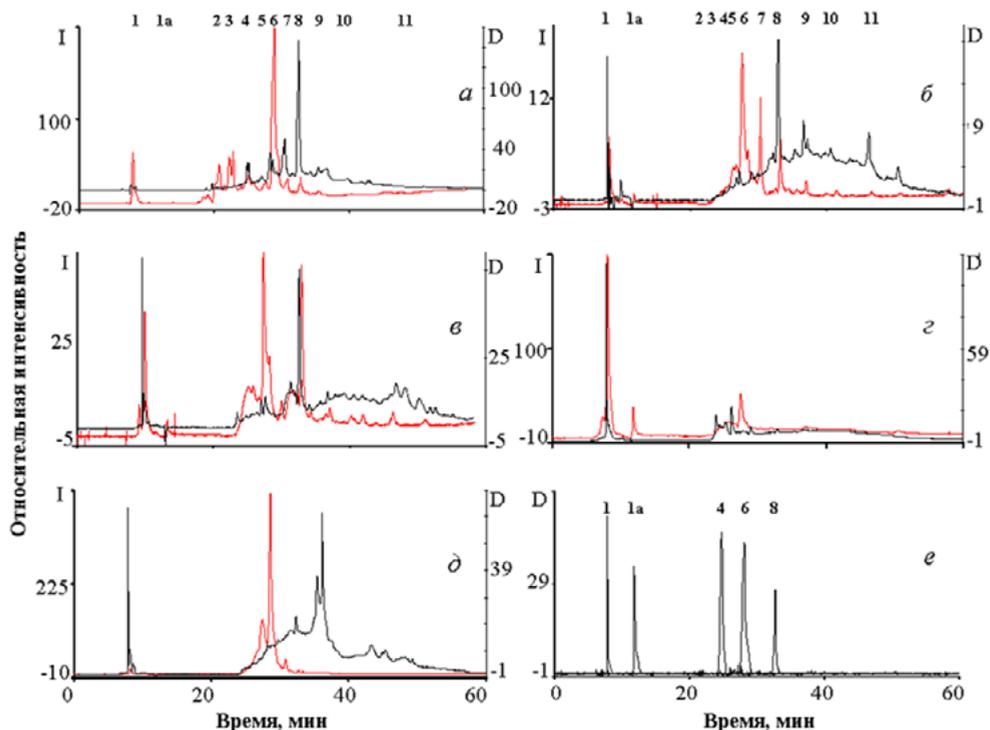


Рис. V.3. ВЭЖХ анализ экстрактов оммохромов из глаз насекомых различных видов. *а* – бабочка бражник табачный, *б* – муха черная львинка, *в* – жук чернотелка, *г* – саранча пустынная, *д* – таракан мраморный, *е* – панель разделения стандартных веществ

Детектирование веществ проводили по их поглощению при длине волны 490 нм (хроматограмма черного цвета) и по флуоресценции при длине волны 520 нм (возбуждении флуоресценции при 460 нм, хроматограмма красного цвета). Полученные пики соответствовали: 1 – 3-гидроксикинуренину, 1а – кинуренину, 4 – триптофану, 5 – предположительно дигидроксантомматину, 6 – ксантуреновой кислоте, 7 – предположительно декарбоксилированному ксантомматину, 8 – ксантомматину. Из рисунка V.3 видно, что состав оммохромов различен для разных видов. Оммохромы мраморного таракана довольно сильно отличаются по составу от остальных представителей класса насекомых (рис. V.3д). Оммохромы бабочки бражник табачный и мухи черная львинка (рис. V.3, а и б) близки между собой по составу веществ, детектируемых как по поглощающим, так и по флуоресцирующим компонентам. Однако оммохромы бабочки табачный бражник в отличие от оммохромов мухи черная львинка, возможно, содержат в своем составе омматин D с максимумом поглощения 490 нм, что согласуется с данными работы (Martel, Law, 1991), в которой омматин D в смеси с ксантомматином был найден как хромофор оммохром-связывающего белка в гемолимфе бабочки бражник табачный. Жук чернотелка по составу оммохромов скорее ближе к бабочке и мухе, чем к мраморному таракану (рис. V.3в).

Важно отметить, что оммохромы большинства изученных насекомых имеют максимум поглощения, близкий к максимуму поглощения, характерному для пигментов из класса омматинов.

Все исследованные оммохромы имели выраженный синглетный сигнал ЭПР. На рис V.4 приведены спектры ЭПР оммохромов для 4 видов насекомых. Параметры сигнала ЭПР оммохромов из всех пяти видов насекомых приведены в табл. V.1. Видно, что все оммохромы имеют g факторы, близкие к g фактору свободного электрона и довольно высокое содержание парамагнитных центров. Наибольшая концентрация спинов, отнесенная на грамм сухого веса, была у оммохромов мухи и бабочки ($>10^{18}$).

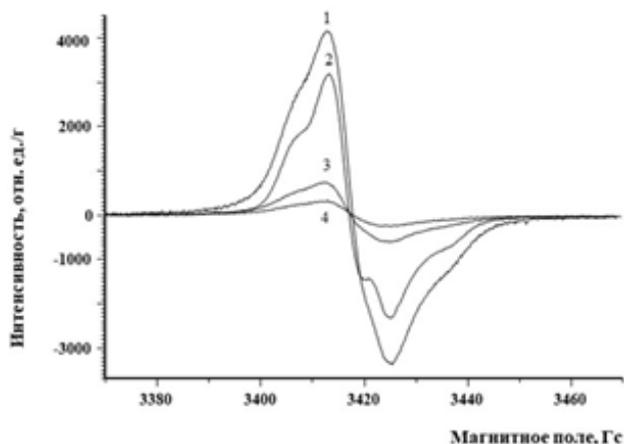


Рис. V.4. Спектры ЭПР оммохромов мухи черная львинка (1), бабочки бражник табачный (2), мраморного таракана (3) и пустынной саранчи (4). Регистрацию спектров проводили, используя сухие препараты оммохромов при комнатной температуре

Табл. V.1. Параметры сигнала ЭПР оммохромов насекомых

Образец Параметры сигнала ЭПР	Оммохромы, порошок, комнатная температура				
	<i>Manduca sexta</i> (бражник табачный)	<i>Hermetia illucens</i> (львинка черная)	<i>Schistocerca gregaria</i> (саранча пустынная)	<i>Nauphoeta cinereal</i> (таракан мраморный)	<i>Tenebrio molitor</i> (мучной хрущак)
g -фактор	2.0048	2.0045	2.0045	2.0046	2.0045
Полуширина линии, ΔH_{pp}	12.0	12.4	12.6	12.7	10.2
Концентрация парамагнитных центров, спин/г сухого веса	27.5×10^{17}	48.0×10^{17}	4.6×10^{17}	9.7×10^{17}	0.5×10^{17}

Оммохромы остальных насекомых имели концентрацию парамагнитных центров меньше, чем 10^{18} , причем концентрация спинов оммохромов пустынной саранчи и жука чернотелки была более чем на порядок ниже, чем у мухи

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

черная львинка. Высокая концентрация стабильных свободнорадикальных центров позволяет рассматривать оммохромы как сборщики («мусорщики») активных свободных радикалов. Величина g фактора оммохромов, находящаяся в интервале между 2.004 и 2.005 (табл. V.1) характерна для феноксирадикалов (Bolton, 1972). Известно, что интермедиаты феноксазина, который входит в структуру молекулы оммохромов, проявляют стабильный сигнал ЭПР (Lhoste et al., 1966; Bolognese et al., 1990) и могут, по-видимому, обуславливать сигналы ЭПР, обнаруженные нами у оммохромов насекомых. Более того, не исключено, что именно феноксазин и определяет антирадикальную активность оммохромов (Farmer et al., 2017). Сигнал ЭПР оммохромов был чувствителен к облучению как ультрафиолетовым, так и видимым светом при температуре жидкого азота. При облучении оммохромов интенсивность исходного сигнала ЭПР значительно возростала.

Оммохромы оказались чувствительными к окислению пероксидом водорода и/или надпероксида калия. Окисление пероксидом водорода приводило к исчезновению длинноволнового максимума поглощения в области 470–510 нм (рис. V.5a, кривая 1) и появлению коротковолнового максимума в области 370–390 нм (рис. V.5a, кривая 2).

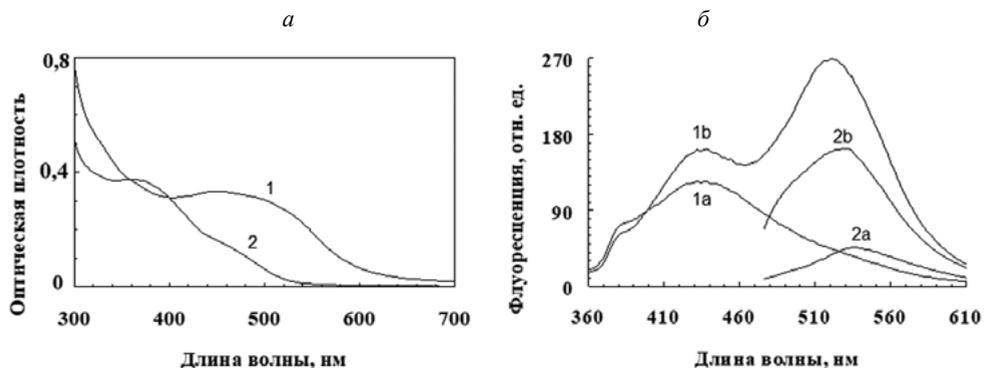


Рис. V.5 (а и б). Действие пероксида водорода на оммохромы насекомых. а) абсорбционный спектр оммохромов жука чернотелки до (1) и после (2) окисления пероксидом водорода; б) спектры флуоресценции оммохромов жука чернотелки при длине волны возбуждения 340 нм (1) и 460 нм (2). Исходный спектр (а) и спектр после действия пероксида водорода (б)

Это свидетельствует о том, что изолированные оммохромы находились, главным образом, в восстановленном состоянии. Действие пероксида водорода имеет, как минимум, двухфазный характер. Сначала наблюдается переход оммохромов в окисленную форму, а затем при длительной инкубации с окислителем, по-видимому, происходит постепенное разрушение пигмента, сопровождающееся дальнейшим уменьшением абсорбции пигментов в видимой области спектра (рис. V.5a) и значительной потерей количества парамагнитных центров. Флуоресцентные свойства оммохромов также претерпевали изменения при окислении оммохромов пероксидом водорода. На рис. V.5б видно, что при окислении происходит значительный рост интенсивности флуоресценции

исследуемых образцов, главным образом, в длинноволновой области спектра (500–600 нм).

ВЭЖХ анализ оммохромов показал заметные качественные и количественные изменения в их составе после окисления пероксидом водорода (рис. V.5в–е).

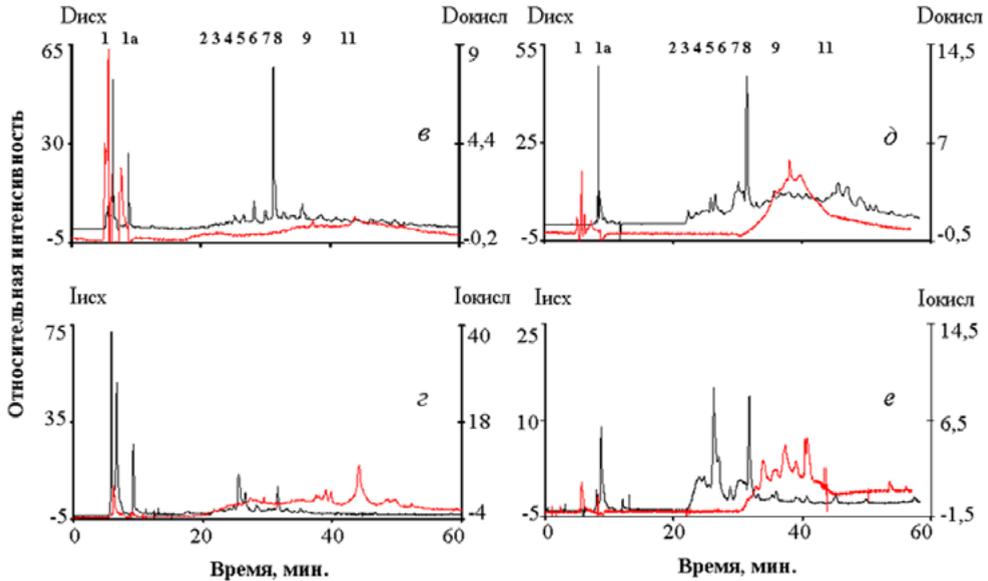


Рис. V.5 (в – е). ВЭЖХ анализ оммохромов из глаз жука чернотелки до и после воздействия на них пероксидом водорода. в – детектирование по поглощению на длине волны 380 нм, г – детектирование флуоресценции при длине волны 520 нм (возбуждении флуоресценции 380 нм), д – детектирование по поглощению при длине волны 490 нм, е – детектирование флуоресценции при длине волны 520 нм (возбуждении флуоресценции 460 нм); кривая черного цвета – исходный образец, кривая красного цвета – после воздействия на образцы пероксидом водорода. Для хроматограмм исходного образца ($D_{исх}$ или $I_{исх}$) показаны отдельные оси ординат. D – детектирование по поглощению, I – детектирование по флуоресценции

Видно, что пики 2–8, присутствующие в исходном не окисленном образце, после воздействия пероксидом водорода практически исчезают. Одновременно увеличивается содержание пиков 9–11, имеющих значительную интенсивность флуоресценции.

Сигнал ЭПР оммохромов также оказался чувствительным к действию пероксида водорода (рис. V.5ж, кривые 1 и 2). Окисление оммохромов пероксидом водорода приводило к резкому падению сигнала ЭПР и, в конечном счете, к полной потере парамагнетизма, что, вероятно, связано с разрушением феноксазинового кольца в структуре молекул оммохромов (Farmer et al., 2017), исходно проявляющего свободнорадикальные свойства. Деструкция оммохромов из глаза дрозофилы пероксидом водорода была показана ранее (Ephrussi, Herold, 1944).

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхохромы (структура, физикохимия, функции)

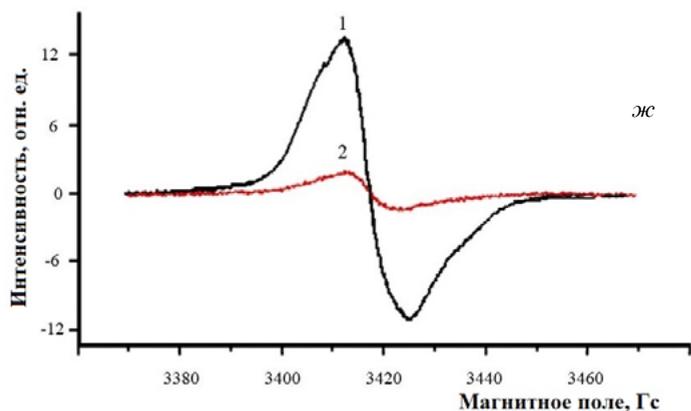


Рис. V.5 (ж). Сигнал ЭПР оммохромы бабочки бражник табачный. Исходный спектр (1); спектр после окисления пероксидом водорода (2). Измерения проведены на суспензии оммохромы в фосфатном буфере при температуре жидкого азота

Таким образом, экранирующие пигменты беспозвоночных животных проявляют, как и меланины позвоночных, парамагнитные свойства.

2. Ингибирующее действие оммохромы на процессы ПОЛ, индуцированные в темновых условиях

Оммохромы всех изученных видов беспозвоночных животных проявляют высокую антиоксидантную активность, ингибируя реакции пероксидации, индуцированные различными прооксидантными системами. Оммохромы в относительно невысоких концентрациях тушат хемилюминесценцию люминола, инициируемую пероксидом водорода. На рис. V.6а показана кинетика хемилюминесценции люминола в присутствии различных концентраций оммохромы мраморного таракана.

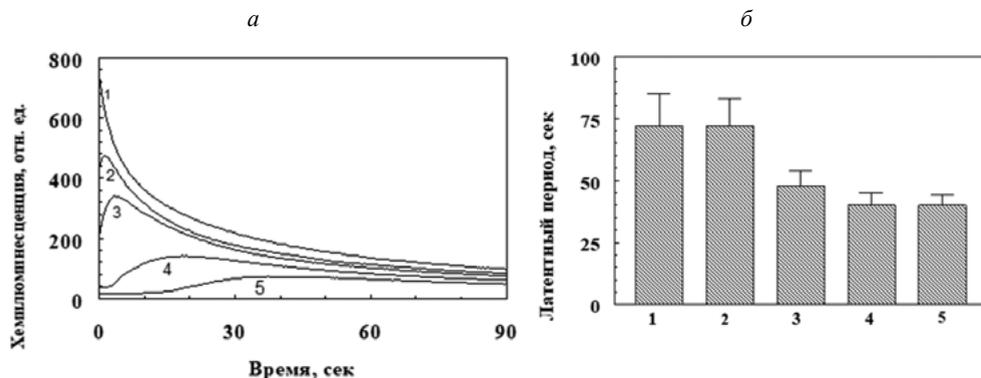


Рис. V.6. Тушение хемилюминесценции люминола оммохромами насекомых. а). Кинетика хемилюминесценции люминола в присутствии различных концентраций оммохромы *Nauphoeta cinerea*. 1 – контроль, 2–5 – добавлено 100 мкг/мл, 150 мкг/мл, 250 мкг/мл и 400 мкг/мл оммохромы, соответственно. Контрольными образцами служили пробы, содержащие буферный раствор без оммохромы. б). Латентный период возгорания хемилюминесценции люминола в присутствии различных оммохромы в концентрации 750 мкг/мл. 1 – *Hermetia illucens*, 2 – *Nauphoeta cinerea*, 3 – *Manduca sexta*, 4 – *Tenebrio molitor*, 5 – *Schistocerca gregaria*

В присутствии оммохромов наблюдается как падение амплитуды хемиллюминесценции, так и увеличение временного периода достижения максимума свечения. Концентрация оммохромов 400 мкг/мл (рис. V.6а, кривая 5) вызывала значительное ингибирование развития процесса хемиллюминесценции люминола. Для сравнения антирадикальной активности различных оммохромов были определены сравнительные величины латентного периода хемиллюминесценции люминола при одинаковой концентрации всех изучаемых оммохромов (рис. V.6б), составляющей 750 мкг/мл. Каждый столбик – среднее 3–4 измерений латентного периода развития хемиллюминесценции. В этих условиях наибольшей антирадикальной активностью обладали оммохромы мухи черная львинка и мраморного таракана (столбики 1 и 2), а оммохромы жука чернотелки и саранчи пустынной (столбики 4 и 5) проявляли наименьшую антирадикальную активность. Этот результат коррелирует с данными по концентрации стабильных свободнорадикальных центров в оммохромах. Действительно, их концентрация в оммохромах жука чернотелки и саранчи пустынной минимальна. С другой стороны, остается непонятным более высокая антирадикальная активность оммохромов мраморного таракана (столбик 2) по сравнению с таковой для оммохромов бабочки табачного бражника (столбик 3), поскольку концентрация парамагнитных центров оммохромов бабочки значительно выше, чем у мраморного таракана.

Как показали наши эксперименты, все оммохромы проявляли выраженное ингибирующее действие на процессы ПОЛ, индуцированные как в темновых условиях, так и при действии облучения. В этом разделе представлены данные по ингибирующему действию оммохромов на ПОЛ, индуцированное ионами двухвалентного железа и гипероксией. В работе использовали растворы оммохромов, выделенных из глаз ракообразных и насекомых, в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,1). В качестве объекта окисления служили гомогенат мозга костистой рыбы терпуга (*Pleuregrammus monotergerius*), гомогенаты сетчатки быка и обесцвеченная суспензия наружных сегментов фоторецепторов быка.

Результаты опытов по ингибированию процесса ПОЛ, индуцированного системой Fe^{2+} – аскорбиновая кислота показали, что с ростом концентрации оммохромов в реакционной среде происходит значительное замедление скорости ПОЛ. Уже при концентрации оммохромов равной 150 мкг/мл скорость ПОЛ ингибируется примерно в 10 раз (рис. V.7 А). Еще более выражен ингибирующий эффект оммохромов, если в системе индукции пероксидного окисления липидов отсутствует экзогенное Fe^{2+} . В этом случае десятикратное ингибирование скорости процесса пероксидации НСФ быка наблюдается уже при концентрации оммохромов всего 50 мкг/мл (рис. V.7 Б).

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

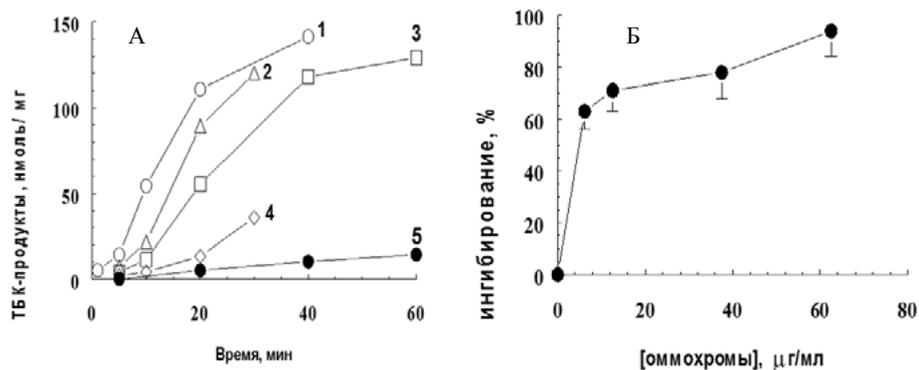


Рис. V.7. Ингибирующее действие оммохромов глаза травяного чилима *Pandalus latirostris* на процесс ПОЛ. А. Кинетика ПОЛ гомогената мозга терпуга в присутствии различных концентраций оммохромов; концентрация оммохромов составляла: 1 – 0; 2 – 36; 3 – 73; 4 – 147; 5 – 220 мкг/мл. Б. Ингибирующее действие оммохромов на аскорбат-зависимую пероксидацию липидов НСФ; скорость ПОЛ оценивали по приросту количества ТБК-активных продуктов за 12 мин реакции

В другой серии опытов реакцию ПОЛ индуцировали путем повышения концентрации кислорода в реакционной среде (рис. V.8).

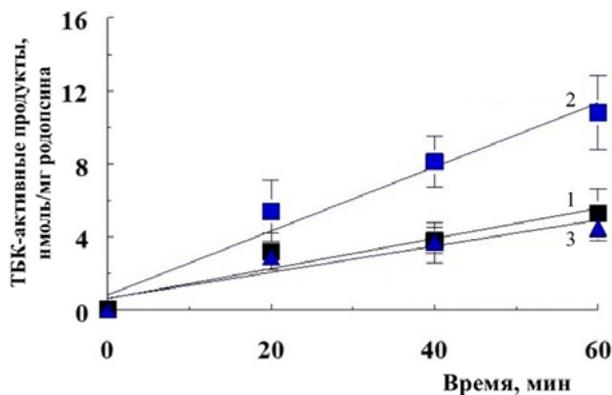


Рис. V.8. Влияние оммохромов на кинетику накопления ТБК-активных продуктов в наружных сегментах фоторецепторов быка в условиях гипероксии. Повышенная концентрация кислорода создавалась путем непрерывного пробулькивания последнего в реакционную среду; реакционная среда содержала 0,2 мг/мл родопсина НСФ. 1 – контроль; 2 – гипероксия; 3 – гипероксия в присутствии 42 мкг/мл оммохромов

Важно отметить, что в этом случае в реакционную среду не добавляли таких прооксидантных систем, как Fe^{2+} и аскорбиновая кислота. Поэтому условия окисления были больше приближены к условиям *in vivo*. Из рисунка видно, что при гипероксии наблюдается возрастание скорости накопления ТБК-активных продуктов в суспензии НСФ примерно в 2 раза. Присутствие оммохромов в концентрации 42 мкг/мл полностью подавляет этот эффект. Результаты показывают, что оммохромы, как и меланины, эффективно ингибируют реакции ПОЛ, индуцированные в темновых условиях.

Интересно, что окисленная форма оммохромов также проявляет ингибирующие свойства в отношении реакции ПОЛ, однако степень ингибирующей активности окисленных оммохромов значительно ниже, чем у исходных, восстановленных оммохромов (рис. V.9).

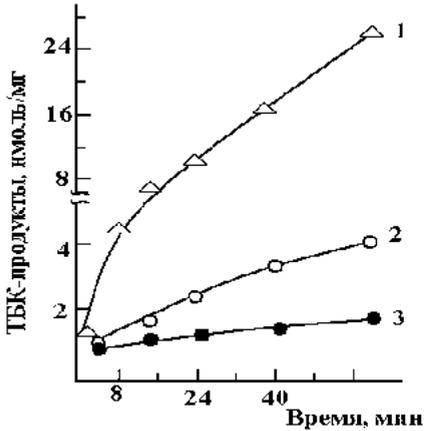


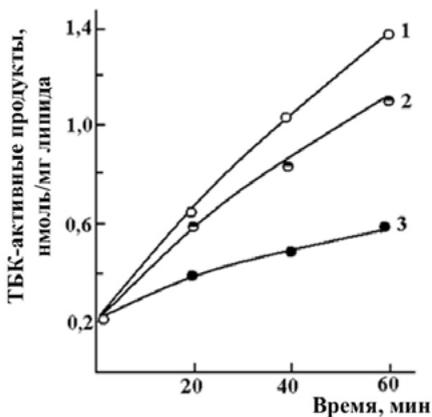
Рис. V.9. Ингибирование реакции ПОЛ оммохромами криля. 1 – без добавления оммохромов; 2 – добавлено 300 мкг/мл оммохромов в окисленной форме; 3 – добавлено 300 мкг/мл оммохромов в восстановленной форме

3. Ингибирующее действие оммохромов на фотоиндуцированную пероксидацию липидов

В этом разделе главы представлены результаты, показывающие высокую ингибирующую способность оммохромов в отношении реакции ПОЛ, индуцированной видимым светом и УФ-облучением.

В качестве субстрата окисления были использованы кардиолипиновые липосомы и наружные сегменты фоторецепторных клеток. Генерацию супероксидных радикалов кислорода осуществляли путем окисления фотовосстановленного рибофлавина (Beauchamp, Fridovich, 1971). Реакционная среда содержала 6,5 мкМ рибофлавина, 13 мМ метионина, 5 мг/мл кардиолипина, 0,09 % цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) в 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 7,4. Скорость генерации супероксида линейно зависела от интенсивности освещения.

На рис. V.10 представлены результаты ингибирующего действия оммохромов на пероксидное окисление кардиолипина, индуцированное радикалами супероксида. В этой системе генерация супероксида осуществлялась при окислении кислородом фотовосстановленного рибофлавина. Скорость генерации супероксида в этих условиях линейно зависела от интенсивности освещения.



Поэтому оммохромы, понижая интенсивность освещения рибофлавина, ингибировали процесс ПОЛ также за счет

Рис. V.10. Ингибирование оммохромами процесса ПОЛ кардиолипина, индуцированного видимым светом в присутствии рибофлавина. 1 – контроль; 2 – ингибирование оммохромами окисления кардиолипина за счет уменьшения скорости фотоиндуцированной генерации супероксида рибофлавином (эффект экранирования); 3 – суммарное ингибирование. Концентрация оммохромов – 0,75 мг/мл

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

оптического экранирования. Степень ингибирующего действия оммохромов за счет оптического экранирования оценивали, помещая раствор оммохромов в той же концентрации между источником облучения и реакционной ячейкой.

Однако такое оптическое действие оммохромов (рис. V.10, кривая 2) существенно ниже их антиоксидантной активности. Из рис. V.10, кривая 3, видно, что суммарный эффект ингибирующего действия оммохромов намного превосходит их действие как экрана, понижающего интенсивность облучения. По всей видимости, в этом случае ингибирование связано с непосредственным взаимодействием оммохромов с радикалами супероксида.

Превалирование химической составляющей над оптической в общем эффекте ингибирующей активности оммохромов подтверждается в опытах по УФ-индуцированной пероксидации кардиолипидов липосом. Точная оценка степени экранирования может быть сделана путем сопоставления оптических плотностей кардиолипидов и смеси кардиолипидов с оммохромами. Оценка показала, что концентрация оммохромов, используемая в этих опытах, экранировала кардиолипид не более чем на 40%. Для сопоставления экранирования и активного ингибирования оммохромов ставился контрольный опыт по определению скорости накопления гидропероксидов (ROOH) в присутствии экранирующей сетки. Была использована сетка, экранирующая УФ на 55%, что заведомо больше, чем экранирование оммохромами в данной концентрации.

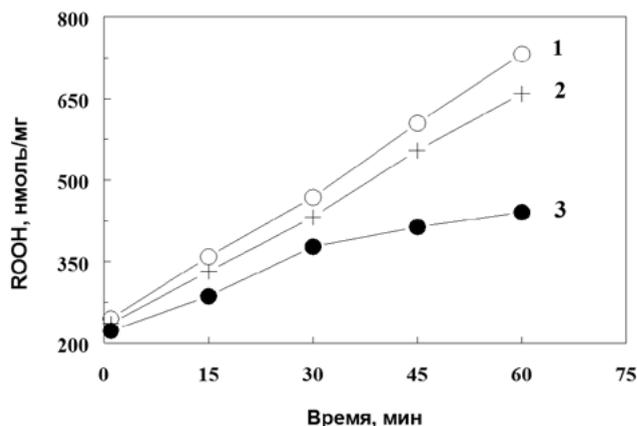


Рис. V.11. Ингибирование УФ-индуцированного пероксидного окисления кардиолипидов оммохромами креветки. 1 – контроль, 2 – 55% экранирующая сетка, 3 – добавлено 0,8 мг/мл оммохромов

Из рис. V.11 видно, что оммохромы ингибируют процесс УФ-индуцированной аккумуляции гидропероксидов в кардиолипиде в основном как активные химические антиоксиданты. Подобное действие оммохромы проявляют и в отношении накопления ТБК-активных продуктов при УФ-облучении кардиолипидов. На рис. V.12 представлены результаты опытов, свидетельствующие об ингибирующем действии оммохромов на фотоиндуцированное окисление кардиолипидов. Кривая 2 (рис. V.12а) представляет собой рассчитанную кривую фотоокисления кардиолипидов в присутствии оммохромов, которые «работают» только как оптический фильтр. Видно, что вклад оптического экранирования оммохромов в общее суммарное ингибирование (рис. V.12а, кривая 3) существенно меньше их химического антиоксидантного действия (рис. V.12б, кривая 2).

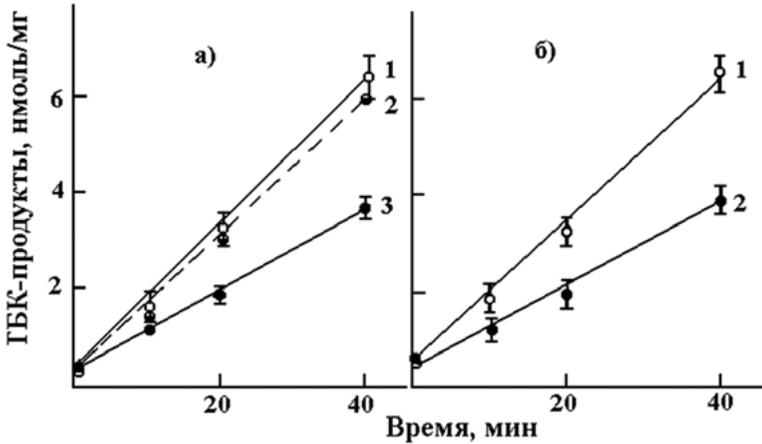


Рис. V.12. Ингибирование оммохромами фотоокисления кардиолипина.

а) 1 – кинетика окисления кардиолипина при УФ облучении (контроль), 2 – ингибирование оммохромами фотоокисления кардиолипина за счет оптического экранирования, 3 – суммарное ингибирование оммохромами фотоокисления кардиолипина; б) 1 – контроль, 2 – химическое ингибирование оммохромами процесса фотоокисления за вычетом оптической составляющей

При увеличении концентрации оммохромов в реакционной среде растет и вклад химического ингибирования в суммарное ингибирующее действие оммохромов на процесс фотоиндуцированного окисления кардиолипидных липосом (рис. V.13). Из рис. V.13 видно, что отношение скорости фотоокисления кардиолипидина без оммохромов (W_0) и в их присутствии (W_n), с учетом экранирования, увеличивается с повышением концентрации оммохромов.

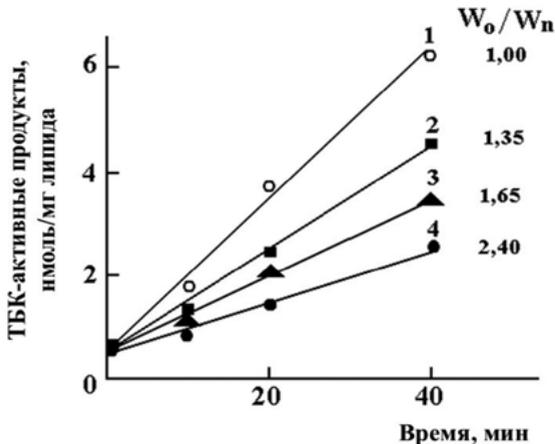


Рис. V.13. Зависимость ингибирования фотоокисления кардиолипидина от концентрации оммохромов с учетом поправки на оптическое экранирование. 1 – контроль; 2–4 – добавлено 0,58, 0,75 и 1,5 мг/мл оммохромов, соответственно

Оммохромовы проявляли также способность ингибировать процесс фотоиндуцированной перекисидации наружных сегментов фоторецепторных клеток, сенсублизированной липофусциновыми гранулами из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека (рис. V.14). В этих экспериментах использовались оммохромовы глаза саранчи пустынной.

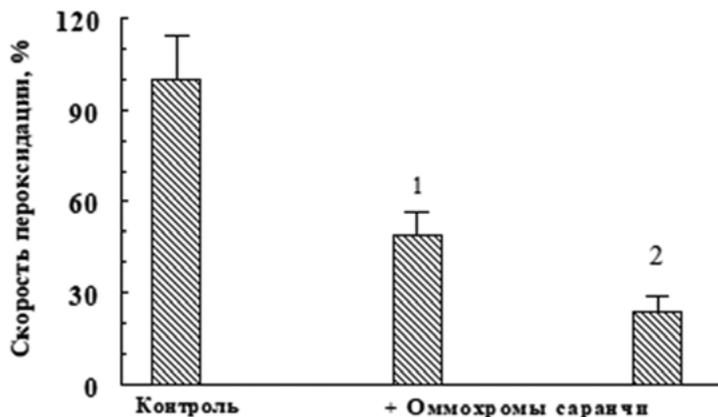


Рис. V. 14. Ингибирующее действие оммохромов пустынной саранчи на пероксидацию наружных сегментов фоторецепторных клеток, инициированную облучением видимым светом в присутствии липофусциновых гранул. Концентрация оммохромов составляла 46 и 77 мкг/мл, соответственно; контроль – скорость пероксидации НСФ в отсутствии оммохромов принята за 100%

Таким образом, все изученные оммохромы проявляли выраженную антиоксидантную активность, ингибируя процессы пероксидации и фотопероксидации уже в относительно низких концентрациях. Антиоксидантная активность оммохромов насекомых была сопоставима с таковой для природных меланинов (Ushakova et al., 2019) и для синтетических антиоксидантов оксипиридинового ряда (Смирнов и др., 2011). Так, для оммохромов мухи черная львинка была также приблизительно оценена константа тушения хемилюминесценции, коррелирующая с величиной антиоксидантной активности, в предположении, что основная масса оммохромов мухи представлена дигидроксантомматином, для которого известна молекулярная масса. Эта константа составила $(1.2 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

На основании представленных данных можно сделать вывод о том, что оммохромы глаза в физиологических концентрациях обладают антиоксидантным действием. Полученные результаты позволяют рассматривать оммохромные гранулы как органеллы, выполняющие в системе защиты структур глаза беспозвоночных от фотоповреждения, функцию химического ингибирования цитотоксических процессов фотоокисления. По всей вероятности, оммохромы служат в качестве одной из систем защиты фоторецепторных мембран беспозвоночных от повреждающего действия процесса ПОЛ. Перемещение на свету гранул оммохромов в фоторецепторных и пигментных клетках глаза членистоногих (ретиномоторный эффект в механизме световой адаптации глаза) способствует защите их внутриклеточных структур от фотоокислительной деструкции, уменьшая количество поглощенного света и ингибируя реакцию ПОЛ. Антиоксидантная функция оммохромов имеет большое значение для повышения надежности системы защиты омматида от светового повреждения.

ГЛАВА VI

МЕХАНИЗМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКРАНИРУЮЩИХ ПИГМЕНТОВ ГЛАЗА – МЕЛАНИНОВ И ОММОХРОМОВ

А. Связывание ионов двухвалентного железа меланинами и оммохромами в неактивные комплексы

1. Зависимость скорости пероксидации липидов в клетках РПЭ и нейральной сетчатки глаза от концентрации ионов двухвалентного железа

Как уже упоминалось в главе III, пигментированная ткань РПЭ чрезвычайно устойчива к окислительным процессам, индуцированным ионами двухвалентного железа. В дальнейших экспериментах нами были найдены условия, приводящие к накоплению продуктов пероксидного окисления липидов, индуцированного ионами Fe^{2+} в ткани пигментного эпителия пигментированных животных. Оказалось, что существенное повышение концентрации Fe^{2+} в инкубационной среде все же приводит к накоплению ТБК-активных продуктов. На рис. VI.1 представлена кинетика образования ТБК-активных продуктов в зависимости от концентрации добавленного Fe^{2+} . Видно, что в то время, как для ткани нейральной сетчатки оптимальная концентрация Fe^{2+} , индуцирующая максимальную скорость ПОЛ, лежит в пределах 10–20 μM , для ткани пигментного эпителия она более чем на два порядка выше (>5мМ). Fe^{2+} в концентрации до 20 μM практически не индуцирует процесс ПОЛ в ткани пигментного эпителия глаза Травяной лягушки.

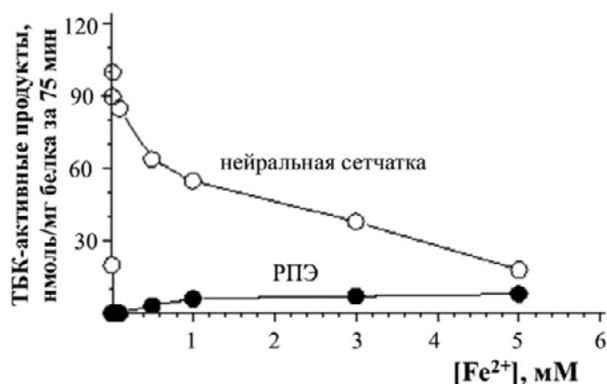


Рис. VI.1. Зависимость скорости пероксидации липидов в РПЭ и сетчатке глаза лягушки от концентрации ионов двухвалентного железа

Увеличение концентрации аскорбиновой кислоты свыше 2 мМ приводит к снижению скорости пероксидации липидов, что связано с антиоксидантными свойствами аскорбата. Так, 3 мМ аскорбиновая кислота практически полностью ингибирует пероксидацию липидов в сетчатке (рис. VI.2). В то же время,

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

интересно отметить, что изменение концентрации аскорбиновой кислоты слабо влияет на скорость индукции пероксидного окисления липидов в ткани пигментного эпителия, что отличает эту ткань от сетчатки: скорости этого окисления в пигментном эпителии в присутствии 0,5 мМ и 3,0 мМ аскорбиновой кислоты практически одинаковы.

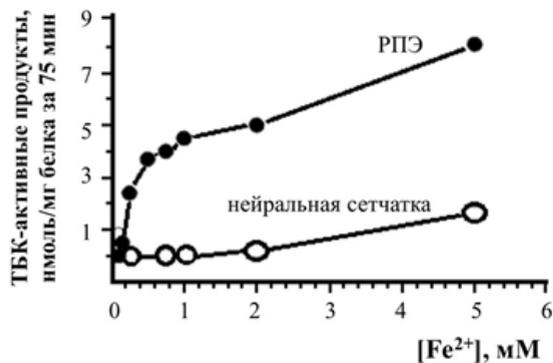


Рис. VI.2. Зависимость скорости пероксидации липидов в РПЭ и сетчатке глаза лягушки от концентрации ионов двухвалентного железа в присутствии высоких концентраций аскорбата

Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что в пигментированной ткани происходит связывание ионов железа в неактивные комплексы, что приводит к подавлению реакции пероксидации липидов, индуцируемой системой Fe^{2+} -аскорбат. Увеличение концентрации железа в пигментированной ткани приводит к насыщению железосвязывающих центров, появлению в среде инкубации свободных ионов двухвалентного железа и, как следствие, увеличению скорости пероксидации липидов. Напротив, увеличение концентрации ионов двухвалентного железа в непигментированных тканях (нейральная сетчатка) приводит к ингибированию реакции пероксидации липидов, связанной с ингибирующей активностью высоких концентраций ионов железа (Владимиров, Арчаков, 1972). Это хорошо видно из рис. VI.3, где показана зависимость скорости пероксидации смеси нейральной сетчатки и РПЭ пигментированных животных и животных-альбиносов от концентрации ионов двухвалентного железа. Видно, что скорость пероксидации липидов смеси, содержащей пигментированную ткань, проходит через максимум, тогда как скорость пероксидации липидов в смеси, не содержащей пигментированной ткани, монотонно убывает.

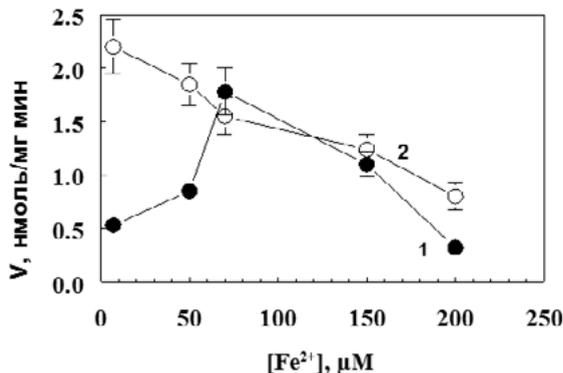


Рис. VI.3. Зависимость скорости пероксидации липидов (V) смеси гомогенатов сетчатки и пигментного эпителия пигментированных кроликов (1) и кроликов-альбиносов (2) от концентрации ионов двухвалентного железа

Оптимальная концентрация ионов двухвалентного железа, вызывающая максимальную скорость перекисидации, для альбиносов в этом случае составляла <7 $\mu\text{моль}$, а для пигментированных кроликов примерно 70 $\mu\text{моль}$, т.е. на порядок выше.

Таким образом, пигментированная ткань ретинального пигментного эпителия способна связывать значительные количества ионов двухвалентного железа в неактивные комплексы. Поскольку, во-первых, основное отличие пигментированной ткани РПЭ от непигментированной связано с наличием в первой меланосом, а во-вторых, хорошо известно, что меланин, содержащийся в меланосомах, является прекрасным хелатором ионов металлов (Potts, Au, 1976), логично предполагать, что ионы железа связываются именно меланосомами. Это подтверждается экспериментами, в которых меланосомы удаляли из гомогената ткани РПЭ с помощью дифференциального центрифугирования (рис. VI.4).

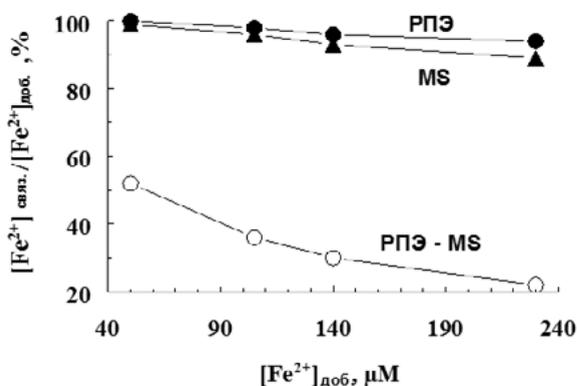


Рис. VI.4. Связывание ионов Fe^{2+} различными фракциями ретинального пигментного эпителия глаза Травяной лягушки *Rana temporaria*

Исходный гомогенат ткани РПЭ глаз лягушки был разделен на две равные части. Первую непосредственно испытывали на сорбционную способность по отношению к ионам двухвалентного железа (верхняя кривая), а вторую предварительно разделяли на фракцию меланосом и гомогенат ткани РПЭ без меланосом (кривая MS и кривая РПЭ минус MS). Удаление меланосом из клеток пигментного эпителия методом дифференциального центрифугирования приводит к существенному уменьшению сорбционной способности последних. Вместе с тем сами меланосомы, выделенные из клеток РПЭ, связывают Fe^{2+} почти с той же эффективностью, что и исходный гомогенат. Это позволяет сделать вывод, что наибольшую способность к сорбции Fe^{2+} в ткани РПЭ имеют именно меланинсодержащие меланосомы.

2. Исследование связывания ионов железа меланинами методом гамма-резонансной спектроскопии (ГРС) (спектроскопии Мессбауэра)

а. Связывание ионов железа синтетическим ДОФА-меланином

В этих экспериментах по связыванию ионов железа был применен метод ядерного гамма-резонанса с использованием стабильного изотопа железа ^{57}Fe (Багиров и др., 1985; 1986а; 1986б). Одним из возможных механизмов ингибирования меланином процессов окисления является способность меланина связывать ионы железа, которые (в особенности Fe^{2+}) катализируют процессы пероксидного окисления. Однако исследование процесса комплексообразования ионов железа меланосомами в присутствии кислорода вызывает определенные трудности. Это связано с тем, что меланосомы устойчивы только в области $\text{pH} \geq 5,0$, тогда как соли железа устойчивы по отношению к гидролизу только в сильноокислых растворах ($\text{pH} \leq 2,0$). Поэтому в первой серии экспериментов в данной работе было изучено взаимодействие Fe^{3+} и Fe^{2+} с синтетическим ДОФА меланином, устойчивым и в области низких pH . Такой подход тем более оправдан, что, как уже отмечалось выше, свойство меланосом ингибировать окисление липидов связано не с белковой частью МС, а с меланином. В свою очередь, меланин из меланосом клеток РПЭ является типичным эумеланином, который по своим физико-химическим характеристикам подобен ДОФА-меланину (Bridelli et al., 1980).

Для опытов использовали растворы FeCl_2 и FeCl_3 , обогащенные по изотопу ^{57}Fe до 90%. FeCl_2 получали восстановлением растворов FeCl_3 (pH 2,1) избытком аскорбиновой кислоты с последующим (в ряде опытов) подщелачиванием раствором NaOH до pH 5,4. Готовили суспензию из 50 мг ДОФА-меланина в 8 мл растворов солей железа с соответствующей концентрацией ($c_0 = 3,25 \times 10^{-3}$ моль/л). Суспензию инкубировали в течение 18 ч. Контрольные измерения показали, что величина pH при этом не изменяется. Полученные по такой методике комплексы железа с ДОФА-меланином выделяли из суспензии центрифугированием при $5000 \times g$ в течение 20 мин. После отделения супернатанта осадок дважды промывали раствором соляной кислоты (pH 2,1 и 5,4, соответственно) с последующим центрифугированием. Строение полученных систем изучали методом ГРС (Гольданский, Гербер, 1970). Спектры снимали на γ -резонансном спектрометре электродинамического типа с постоянным ускорением. Источник ^{67}Co в матрице хрома, площадь измерительной кюветы с образцами ДОФА составляла $0,8 \text{ см}^2$. Изомерные сдвиги (ИС) даны относительно α -Fe при комнатной температуре. Во избежание гидролиза или других изменений в составе комплексов железа с ДОФА-меланином для снятия ГР спектров использовали осадки во влажном состоянии, без высушивания, с быстрым замораживанием их до 80К. Параметры ГР-спектров изученных нами систем, а также сходных систем по данным работы (Bardani et al., 1982) представлены в табл. VI.1.

Табл. VI.1. Гамма-резонансные параметры образцов при 80 К

Соединение	Fe ²⁺		Fe ³⁺ (1)		Fe ³⁺ (2)			Fe ³⁺ (3)		
	ИС	КР	ИС	КР	ИС	КР	Н	ИС	КР	Н
FeCl₃ + ДОФА меланин, pH 2,1										
Исходный раствор FeCl ₃	–	–	0.31	0.84	–	–	–	–	–	–
Супернатант	1.40	3.17	–	–	–	–	–	–	–	–
Осадок (комплекс)			0.55	0.98	0.62	0.15	508	0.58	0.32	553
FeCl₂ + ДОФА меланин, pH 2,1										
Исходный раствор FeCl ₂	1.40	3.21	–	–	–	–	–	–	–	–
Супернатант	1.40	3.32	–	–	–	–	–	–	–	–
Осадок (комплекс)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FeCl₂ + ДОФА меланин, pH 5,4										
Исходный раствор FeCl ₂	1.35	3.01	–	–	–	–	–	–	–	–
Супернатант	1.43	2.96	–	–	–	–	–	–	–	–
Осадок (комплекс)	1.32	3.14	0.54	0.98	0.58	0.05	508	0.59	0.17	552
FeCl₃ + данным работы (Bardani et al., 1982)										
Комплекс	1.33	2.64	0.46	0.78	0.56	0.27	443	0.38	0.10	527

ИС – изомерные сдвиги (мм/с); КР – квадрупольное расщепление (мм/с); Н – магнитное сверхтонкое поле (кЭ).

На рис. VI.5 приведены ГР-спектры системы Fe³⁺ + ДОФА-меланин при pH 2,1. Исходный раствор FeCl₃ имеет сильно уширенный релаксационный спектр (рис. VI.5, а), характерный для ионов Fe³⁺ во льду (Плачинда, Макаров, 1974). Спектр супернатанта (рис. VI.5, б) резко отличается от исходного, наблюдаемый четкий дублетный ГР-спектр с параметрами, приведенными в табл. VI.1, указывает на восстановление железа, оставшегося в растворе, до Fe²⁺.

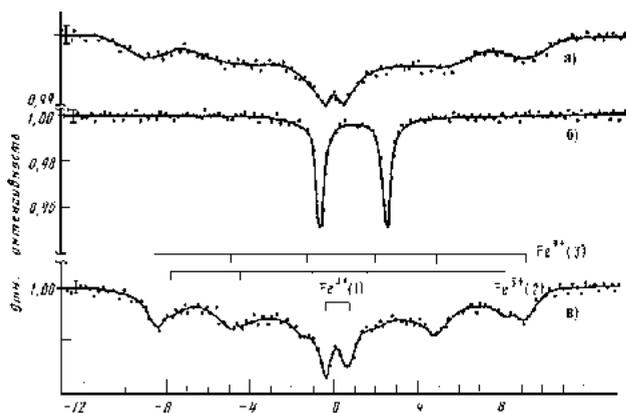


Рис. VI.5. Гамма-резонансные спектры системы FeCl₃ + ДОФА-меланин: а) исходный раствор; б) супернатант; в) осадок (комплекс). По оси ординат – относительная интенсивность, по оси абсцисс – скорость в мм/сек

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Способность ДОФА-меланина связывать железо при pH 2,1 относительно невелика: основное количество железа остается в супернатанте и промывных водах, в осадке находится лишь 10–25% железа, введенного в систему, причем эта доля растет по мере уменьшения количества железа в системе. Осадок (комплекс Fe с ДОФА-меланином) имеет весьма сложный ГР-спектр, состоящий, по крайней мере, из трех парциальных спектров: центрального парамагнитного дублета с параметрами (см. табл. VI.1), характерными для высокоспиновых соединений Fe^{3+} (Гольданский, Гербер, 1970), и двух размытых секстетных спектров с ИС $\approx 0,60$ мм/с и Нэф ≈ 550 и ≈ 510 кЭ соответственно, также характерных для соединений Fe^{3+} . Доля соединений Fe^{2+} в осадке невелика.

Раствор соли, восстановленной до Fe^{2+} аскорбиновой кислотой при pH 2,1 взаимодействует с ДОФА-меланином очень слабо: ГР-спектр супернатанта тождественен спектру исходного раствора (в том числе практически не меняется и его интенсивность), осадок же почти не обнаруживает резонансного поглощения γ -квантов.

При увеличении pH до 5,4 способность ДОФА-меланина к образованию комплексов с железом резко возрастает. Даже в случае Fe^{2+} основная доля ионов железа, в том числе и при относительно высоких концентрациях c_0 , оказывается связанной с ДОФА-меланином. В супернатанте, как и в рассмотренных выше случаях, железо по данным ГРС находится только в форме Fe^{2+} , а ГР-спектр осадка можно представить как комбинацию суммарного спектра осадка, полученного при взаимодействии Fe^{3+} с ДОФА-меланином при pH 2,1, и дублетного спектра высокоспиновой формы Fe^{2+} (рис. VI.6), т. е. и в случае системы $Fe^{2+} +$ ДОФА-меланин железо в комплексе находится в форме Fe^{3+} .

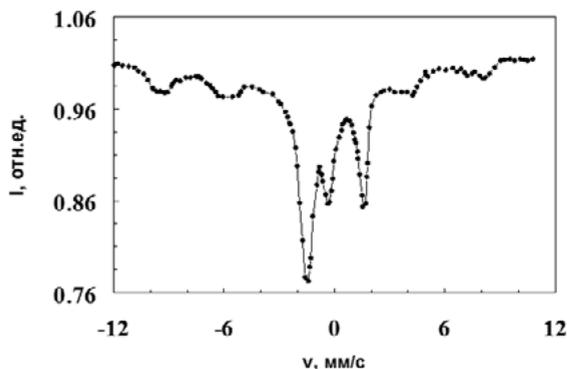


Рис. VI.6. ГР спектр при 80К осадка (комплекса) $FeCl_2 +$ ДОФА-меланин

Таким образом, ДОФА-меланин может проявлять по отношению к ионам железа либо окислительные, либо восстановительные свойства в зависимости от состава подсистемы ионов железа и pH среды. Полученные данные (наличие в осадке в основном Fe^{3+} , а в супернатанте почти исключительно Fe^{2+} , а также отсутствие комплексобразования в случае системы $Fe^{2+} +$ ДОФА-меланин при pH 2,1) указывают на то, что ионы Fe^{3+} образуют с ДОФА-меланином более прочные комплексы, чем ионы Fe^{2+} , и способность ДОФА-меланина к комплексобразованию сильно возрастает с увеличением величины pH.

Значительный интерес представляет выяснение природы структур в комплексе, дающих магнитные ГР-спектры. Спектры, качественно аналогичные рассмотренным выше, были получены в работе Bardani et al., 1982 для комплексов Fe^{3+} с меланином и его аналогами, однако величины магнитных полей на ядрах для секстетных парциальных спектров, приведенные в этой работе, заметно ниже, чем наблюдавшиеся нами (табл. VI.1), и близки к величинам, характерным для высокодисперсных оксидов и гидроксидов железа (Stevens, Stevens, 1981). В работе Bardani et al., 1982 не приводятся данных по контролю величины pH в процессе инкубирования меланинов с $FeCl_3$, однако, исходя из описания методики эксперимента, можно ожидать существенного повышения pH при смешивании кислого раствора $FeCl_3$ с водной суспензией меланинов. Кроме того, образцы высушивали при 80° . Все эти операции могли приводить к гидролизу соединений Fe^{3+} , так что нельзя исключить, что суперпарамагнитные спектры, наблюдавшиеся в работе Bardani et al., 1982, относятся не к комплексам Fe^{3+} с меланином, как утверждается в этой работе, а к суперпарамагнитным частицам оксидов и гидроксидов железа.

В наших экспериментах, во избежание гидролиза, инкубирование Fe^{3+} с ДОФА-меланином проводили при pH 2,1 и осадки исследовали во влажном состоянии. Большое из полей (550 кЭ) значительно превышает по величине поля, возможные для оксидов и гидроксидов железа (Stevens, Stevens, 1981). Это указывает на то, что магнитные парциальные спектры, наблюдавшиеся нами, не могут относиться к оксидам или гидроксидам железа и отвечают, по-видимому, комплексам Fe^{3+} с ДОФА-меланином. Близость параметров магнитных парциальных ГР-спектров, полученных для комплексов, образующихся при взаимодействии ДОФА-меланина с Fe^{2+} при pH 5,4, к рассмотренным выше указывает на то, что и в этом случае образуются комплексы Fe^{3+} с ДОФА-меланином.

ГР-спектры, состоящие из парамагнитного дублета и уширенной размытой магнитной компоненты, могут наблюдаться в принципе как в случаях наличия в образце мелких полидисперсных магнитных частиц (суперпарамагнетизм), так и в случаях медленной парамагнитной релаксации (Плачинда, Макаров, 1974; Суздаев, 1970). Характер изменения формы ГР спектра при повышении температуры (рис. VI.7) указывает на его релаксационную природу.

Наличие одновременно магнитной и дублетной парамагнитных компонент в спектрах может быть связано с неоднородным распределением ионов Fe^{3+} в комплексе с ДОФА-меланином. В случаях двух или более близко расположенных ионов Fe^{3+} из-за эффективного спин-спинового взаимодействия будет происходить быстрая релаксация электронного спина Fe^{3+} и для этих структур во всем температурном интервале будут наблюдаться дублетные ГР-спектры. Для достаточно разделенных в пространстве Fe^{3+} -ионов спин-спиновое взаимодействие резко ослабляется и при низких температурах, когда подавлена и спин-решеточная релаксация, имеют место релаксационные ГР-спектры с размытой сверхтонкой структурой (Плачинда, Макаров, 1974; Корнеев и др., 1971). Комплексы Fe^{2+} из-за сильного спин-орбитального взаимодействия при 80К, как правило, не дают магнитно-релаксационных спектров.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы
(структура, физикохимия, функции)

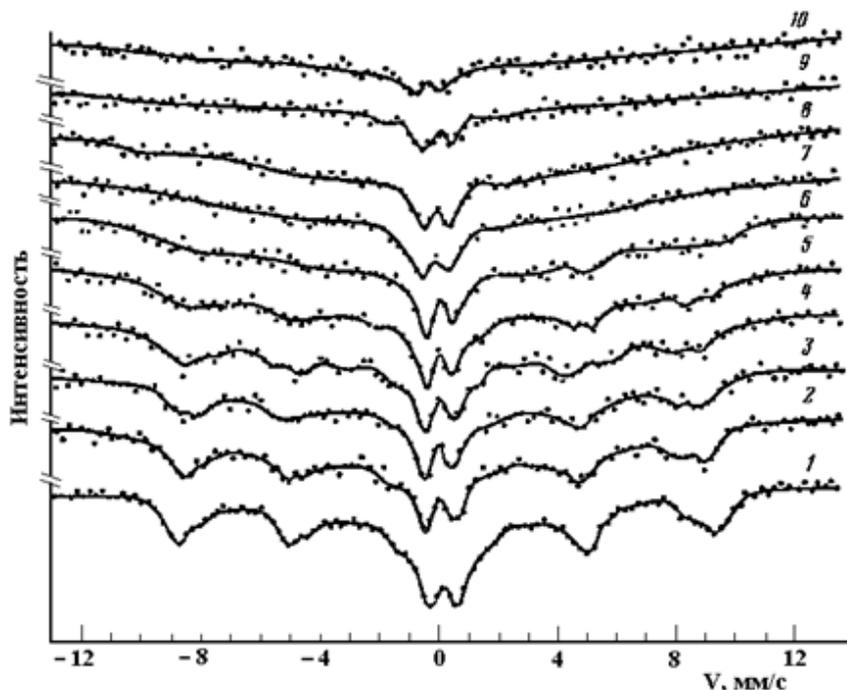


Рис. VI.7. Формы ГР-спектра комплекса FeCl_3 + ДОФА-меланин при температурах: 1 – 4,2; 2 – 80; 3 – 100; 4 – 120; 5 – 140; 6 – 160; 7 – 180; 8 – 200; 9 – 250 и 10 – 280 градусов Кельвина

В свете такой модели находит естественное объяснение наблюдаемое увеличение доли магнитной компоненты в ГР-спектрах осадка по мере уменьшения в нем содержания ионов железа (табл. VI.2).

Табл. VI.2. Распределение железа по формам по данным γ -резонансной спектроскопии

Концентрация	Супернатант, %	Осадок, %	В осадке			
			Fe^{3+} (магн.), %	Fe^{3+} (парамагн.), %	Fe^{2+} , %	Количество ионов Fe^{3+} , мг
FeCl_3 + ДОФА-меланин, pH 2,1						
$2c_0$	-		88	12	-	
c_0	90	10	92	8	-	0,1480
$1/2c_0$	85	15	95	5	-	0,1110
$1/5c_0$	75	25	97	3	-	0,0740
FeCl_2 + ДОФА-меланин, pH 2,1						
c_0	98	~2	-	-	-	-
FeCl_2 + ДОФА-меланин, pH 5,4						
c_0	40	60	60	22	18	0,7104
$1/2c_0$	20	80	74	13	13	0,5150
$1/5c_0$	<5	~100	80	10	10	0,2600

Меньшая доля магнитных компонент в спектрах комплексов, образующихся при взаимодействии ДОФА-меланина с Fe^{2+} , в основном связана с увеличением концентрации ионов Fe^{3+} , хотя нельзя исключить и вклад кросс-релаксации с участием ионов Fe^{2+} .

Синтетический ДОФА-меланин является сложным полимерным образованием, состоящим из мономерных единиц различной структуры. Он содержит орто-гидрохинонные, орто-хинонные, amino-, имино- и карбоксильные группы (Bridelli et al., 1980), каждая из которых может участвовать в связывании ионов металлов полимером (Fronczisz et al., 1980). С обратимым переходом хинон-гидрохинон через стадию семихинона, по-видимому, связаны окислительно-восстановительные свойства ДОФА-меланина. Это представление хорошо согласуется с данными ЭПР, указывающими на наличие у ДОФА-меланина сигнала ЭПР, вызванного присутствием радикалов семихинонного типа (Mason et al., 1960). Величина ИС (в первую очередь, парамагнитной компоненты спектра) указывает на октаэдрическую координацию ионов железа (Гольданский, Гербер, 1970). Величина Нэф также является функцией координатного числа и лигандного окружения (степени ионности связи). Магнитное поле величиной приблизительно 550 кЭ при 80К соответствует ионам Fe^{3+} , связанным с карбоксильными группами. Это подтверждается наблюдаемой зависимостью способности ДОФА-меланина к комплексообразованию от величины рН (падение с уменьшением величины рН). На связывание ионов Fe^{3+} в меланинах в первую очередь с COO^- группами указывается также в работе Bardani et al., 1982 на основе анализа ИК спектров. Меньшее по величине магнитное поле, по-видимому, связано со структурами, где Fe^{3+} координирует наряду с COO^- также и с amino- или иминогруппами, для которых характерно образование с железом более ковалентных связей (Friedt, Danon, 1972).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ДОФА-меланин способен эффективно связывать ионы железа, при этом он проявляет по отношению к ионам железа окислительные или восстановительные свойства в зависимости от состава подсистемы ионов железа и рН среды; ионы Fe^{3+} образуют с ДОФА-меланином более прочные комплексы, чем Fe^{2+} ; координация происходит в основном с карбоксильными группами и amino-, иминогруппами полимера. Изменение рН, по-видимому, приводит к изменению конформационного состояния полимера.

б. Связывание ионов железа меланосомами РПЭ глаза быка

Как показали наши исследования, методом гамма-резонансной спектроскопии меланосома (МС), как и ДОФА-меланин, способны связывать ионы железа. Меланосомы выделяли из ткани РПЭ глаза быка. Комплекс МС + железо получали путем инкубирования пигментных гранул в растворе $^{57}FeSO_4$. Раствор $^{57}FeSO_4$ получали растворением металлического α - ^{57}Fe в разбавленной (0,1–0,2 М) М серной кислоте в инертной среде (Карякин, Ангелов, 1974). Полученный раствор хранили под слоем гептана, добавив избыток нераство-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

ренного металлического α - ^{57}Fe . Концентрацию ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли спектрофотометрически, используя в качестве индикатора о-фенантролин и роданид, соответственно. Доля ионов Fe^{3+} в исходном растворе не превышала 3% от общего количества ионов железа. Свежевыделенные МС (18 мг сухого веса) гомогенизировали в 8 мл полученного раствора $^{57}\text{FeSO}_4$ и инкубировали при комнатной температуре при различных значениях рН среды (5,7; 6,1; 6,5). Продолжительность инкубации варьировали от 5 мин до 2 ч. Полученный комплекс осаждали из суспензии центрифугированием (5000xg, 20 мин). Погрешность: в измерении изомерных сдвигов (ИС)- $\pm 0,02$ мм/с, квадрупольных расщеплений (КР) – $\pm 0,04$ мм/с.

На рис. VI.8. приведены характерные ГР спектры образцов при 80К; параметры парциальных ГР-спектров приведены в табл. VI.3. ГР-спектры исходного раствора (рис. VI.8а) и супернатанта (не показано) идентичны по форме – это четкий дублет с параметрами, характерными для водных комплексов Fe^{2+} . Осадок МС + (^{57}Fe) (рис. VI.8б) имеет сложный ГР-спектр, состоящий, по крайней мере, из четырех парциальных спектров: двух дублетов и двух размытых секстетов.

Табл. VI.3. Гамма-резонансные параметры замороженных растворов образцов (меланосомы + $^{57}\text{FeSO}_4$) при 80 К

Соединение	Fe^{2+}		$\text{Fe}^{3+}(1)$		$\text{Fe}^{3+}(2)$			$\text{Fe}^{3+}(3)$		
	ИС	КР	ИС	КР	ИС	КР	10^{-7} Нэф, А/м	ИС	КР	10^{-7} Нэф, А/м
рН 5,7										
Исходный раствор FeSO_4	1.29	3.40	–	–	–	–	–	–	–	–
Супернатант	1.29	3.39	–	–	–	–	–	–	–	–
Осадок (комплекс)	1.35	3.15	0.53	0.84	0.69	0.19	3.98	0.53	0.38	4.37
рН 6,1										
Исходный раствор FeSO_4	1.38	3.32	–	–	–	–	–	–	–	–
Супернатант	1.36	3.34	–	–	–	–	–	–	–	–
Осадок (комплекс)	1.33	3.14	0.51	0.89	0.65	0.22	4.04	0.53	0.35	4.38
рН 6,5										
Исходный раствор FeSO_4	1.43	3.22	–	–	–	–	–	–	–	–
Супернатант	1.42	3.28	–	–	–	–	–	–	–	–
Осадок (комплекс)	1.35	3.18	0.53	0.85	0.67	0.24	4.01	0.54	0.35	4.38

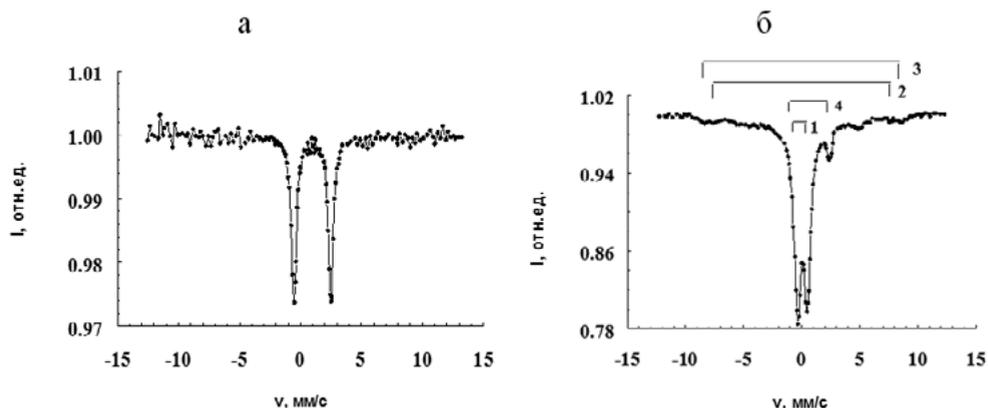


Рис. VI.8. ГР-спектры при 80К системы меланосомы + $^{57}\text{FeSO}_4$ при pH 6.1. а) исходный раствор; б) осадок (комплекс); 1 – 3 - Fe^{3+} , 4 – Fe^{2+}

Основную часть спектра осадка (~ 50% по площади) составляет узкий дублет с параметрами, характерными для парамагнитных высокоспиновых комплексов Fe^{3+} . Менее интенсивный дублет, доля которого не превышает 9–12% площади суммарного спектра, имеет параметры (ИС = 1,35 мм/с, КР = 3,15 мм/с) характерные для высоко спиновых комплексов Fe^{2+} . Отличие их, в первую очередь КР, от параметров Fe^{2+} в растворе (ИС = 1,30–1,43 мм/с, КР = 3,40–3,25 мм/с в зависимости от pH раствора) указывает на взаимодействие (комплексообразование) ионов Fe^{2+} с МС. Секстетные ГР-спектры (ИС \approx 0,5 и \approx 0,65 мм/с, Нэф \approx $4,38 \times 10^7$ и \approx $3,98 \times 10^7$ А/м) характерны для ионов Fe^{3+} в условиях медленной парамагнитной релаксации.

В табл. VI.4 приведены данные по составу систем $^{57}\text{FeSO}_4$ (раствор) + МС в зависимости от величины pH, времени инкубации и освещения.

Табл. VI.4. Распределение железа по формам в системе меланосомы + $^{57}\text{FeSO}_4$

№	pH	Образец	В системе			В растворе			В осадке				
			ΣFe	ΣFe^{2+}	ΣFe^{3+}	ΣFe	Fe^{2+}	Fe^{3+}	ΣFe	Fe^{2+}	ΣFe^{3+}	Fe^{3+} (II)	ΣFe^{3+} (M)
В темноте													
1	5.7	Исходный раствор $^{57}\text{FeSO}_4$	1,00	0,98	0,02								
2	5.7	Меланосомы + $^{57}\text{FeSO}_4$ (120 мин)	1,00	0,55	0,45	0,50	0,49	0,01	0,50	0,06	0,44	0,26	0,18
3	6.1	То же (5 мин)	1,00	0,43	0,57	0,38	0,37	0,01	0,62	0,06	0,56	0,30	0,26
4	6.1	То же (120 мин)	1,00	0,40	0,60	0,34	0,33	0,01	0,66	0,07	0,59	0,33	0,26
5	6.5	То же (120 мин)	1,00	0,36	0,64	0,30	0,29	0,01	0,70	0,07	0,63	0,35	0,28

№	рН	Образец	В системе			В растворе			В осадке				
			ΣFe	ΣFe^{2+}	ΣFe^{3+}	ΣFe	Fe^{2+}	Fe^{3+}	ΣFe	Fe^{2+}	ΣFe^{3+}	Fe^{3+} (II)	ΣFe^{3+} (M)
При освещении													
6	6.1	Исходный раствор $^{57}\text{FeSO}_4$	1,00	0,98	0,02								
7	6.1	Меланосомы + $^{57}\text{FeSO}_4$ (5 мин)	1,00	0,20	0,80	0,16	0,14	0,02	0,84	0,06	0,78	0,42	0,36
8	6.1	То же (30 мин)	1,00	0,14	0,86	0,10	0,08	0,02	0,90	0,06	0,84	0,44	0,40
9	6.1	То же (60 мин)	1,00	0,12	0,88	0,07	0,05	0,02	0,93	0,07	0,86	0,45	0,41
10	6.1	То же (90 мин)	1,00	0,11	0,89	0,05	0,04	0,01	0,95	0,07	0,88	0,47	0,41
11	6.1	То же (120 мин)	1,00	0,10	0,90	0,03	0,02	0,01	0,97	0,08	0,89	0,48	0,41
12	6.5	То же (120 мин)	1,00	0,09	0,91	0,02	0,01	0,01	0,98	0,08	0,90	0,51	0,38

Данные указывают, что МС эффективно связывают ионы железа. В зависимости от величины рН и освещения суспензии уже в первые 5 мин от 50 до 90% ионов Fe^{3+} оказываются связанными МС. Дальнейшее увеличение времени приводит лишь к небольшому дополнительному связыванию железа (см. табл. VI.4).

Другой особенностью поведения системы является окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} , которое также происходит в основном за первые 5 мин. В зависимости от величины рН и времени освещения доля Fe^{3+} в системе меняется от ~ 45 до ~ 90%, увеличиваясь по мере роста рН и времени освещения (см. табл. VI.4).

Окисление Fe^{2+} вызвано взаимодействием с меланосомами, поскольку в контроле (без МС) ни в темноте, ни при освещении за 2 часа, заметного окисления Fe^{2+} не происходит. Распределение Fe^{2+} и Fe^{3+} между раствором и осадком, содержащим МС, неодинаково; Fe^{3+} находится в осадке, тогда как количество Fe^{2+} в осадке практически не зависит от условий комплексообразования и составляет 6–7% от общего количества железа в системе. Остальное двухвалентное железо находится в растворе, где оно является доминирующей формой. Наблюдаемое увеличение окисления Fe^{2+} по мере роста рН и времени освещения суспензии происходит симбатно с увеличением связывания железа с МС.

Практически все трехвалентное железо находится в осадке с МС. Увеличение степени окисления и связывания железа с ростом рН может быть обусловлено как меньшей устойчивостью ионов Fe^{2+} с ростом рН по отношению к окислению, так и конформационными изменениями в меланине. Совокупность этих изменений может облегчить комплексообразование. Существенное увеличение степени связывания железа при освещении (примерно в 1,5 раза при рН 6,1 и времени инкубирования 2 ч) объясняется фотоокислением Fe^{2+} мела-

носомами. Действительно, освещение раствора в тех же условиях в отсутствие МС не приводит к сколько-нибудь заметному окислению Fe^{2+} .

Рассмотрим подробнее, в каком состоянии находится железо в осадке МС (МС + ^{57}Fe). Его ГР-спектр по структуре аналогичен спектру осадка в модельной системе ДОФА-меланин + $FeCl_3$. На основании этого можно полагать, что железосвязывающие центры и их пространственное расположение в модельном ДОФА-меланине и меланосомах аналогичны. Как и в случае ДОФА-меланина, МС образуют с ионами Fe^{2+} и Fe^{3+} октаэдрические комплексы. Основная часть координированных ионов Fe^{3+} расположена достаточно близко друг к другу (например, они входят в состав полиядерных, $n \geq 2$, кластеров) и благодаря быстрой релаксации вследствие спин-спинового взаимодействия дает парамагнитный дублет. Наличие магнитных релаксационных спектров указывает на то, что часть координирующих центров в МС (как и в ДОФА-меланине) обособлена. Секстет с полем $\sim 4,38 \times 10^7$ А/м соответствует ионам Fe^{3+} , связанным с карбоксильными группами, меньшее же поле $\sim 3,98 \cdot 10^7$ А/м - структурам, где в координации с Fe^{3+} наряду с COO^- -группами участвуют также амино- или иминогруппы меланина. Близость ГР-спектров систем МС (^{57}Fe) и ДОФА меланин (^{57}Fe) показывает, что белковая часть МС в связывании ионов железа, по-видимому, не участвует или участвует в гораздо меньшей степени, чем меланин.

Табл. VI.5. Распределение железа по формам в осадке МС (^{57}Fe) в зависимости от времени его экспозиции на воздухе при комнатной температуре

№	Образец	pH 5,7				pH 6,1				pH 6,5			
		ΣFe	Fe^{2+}	Fe^{3+} (II)	Fe^{3+} (M)	ΣFe	Fe^{2+}	Fe^{3+} (II)	Fe^{3+} (M)	ΣFe	Fe^{2+}	Fe^{3+} (II)	Fe^{3+} (M)
1	Исходный	1,00	0,12	0,52	0,36	1,00	0,10	0,50	0,40	1,00	0,09	0,53	0,38
2	Через 3 ч	1,00	0,07	0,51	0,42	1,00	0,08	0,51	0,41	1,00	0,07	0,53	0,40
3	Через 6 ч	1,00	0,05	0,52	0,43	1,00	0,05	0,51	0,44	1,00	0,04	0,54	0,42
4	Через 9 ч	1,00	0,03	0,50	0,47	1,00	0,02	0,52	0,46	1,00	0,02	0,51	0,47
5	Через 12 ч	1,00	0,01	0,52	0,47	1,00	>0,01	0,50	0,50	1,00	>0,01	0,52	0,48

Полученные по описанной выше методике системы МС (^{57}Fe) не устойчивы по отношению к окислению кислородом воздуха: при хранении происходит медленное окисление связанного с МС Fe^{2+} до Fe^{3+} . При этом доля парамагнитных форм Fe^{3+} , связанного с МС, практически не меняется, а увеличивается лишь доля магнитных форм (табл. VI.5).

Иными словами, ионы Fe^{2+} образуют с МС моноядерные комплексы. При этом центры связывания достаточно удалены друг от друга, так что спин-спиновое взаимодействие между образующимися при их окислении ионами Fe^{3+} мало, и они дают вклад в магнитно-релаксационный парциальный спектр.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Таким образом, из полученных результатов следует, что МС способны образовывать комплексы с железом как в его двух-, так и трехвалентном состоянии. Существенно, что МС способны непосредственно связывать ионы Fe^{2+} и окислять их до трехвалентного состояния, менее активного в отношении ускорения реакций пероксидного окисления. Активность обоих этих процессов растет при освещении.

в. Связывание ионов железа оммохромами глаза креветки

Оммохромы выделяли из глаз криля. Комплексы получали инкубированием свежевыделенных оммохромов в растворах $^{57}FeCl_3$ и $^{57}FeSO_4$ по методике, аналогичной методике получения комплексов железа с ДОФА-меланином и МС. Содержание ионов Fe^{3+} в исходных растворах $^{57}FeSO_4$ не превышало 1,5%. Суспензия содержала 20 мг оммохромов в 8 мл раствора соли железа. Образцы оммохромов в отличие от меланосом не содержат белка и устойчивы в сильноокислых растворах. Поэтому было возможно изучить их взаимодействие и с ионами Fe^{3+} , устойчивыми по отношению к гидролизу только в сильноокислых средах. Инкубирование оммохромов в растворе $^{57}FeCl_3$ проводили при pH 2,0 в темноте при комнатной температуре. Концентрация ионов Fe^{3+} составляла 0,20 мг/мл, время инкубирования 2 ч. Инкубирование оммохромов в растворе $^{57}FeSO_4$ проводили как в темноте, так и при освещении при pH 6,0. Концентрация ионов Fe^{2+} составляла 0,23 мг/мл, время инкубирования варьировали от 5 мин до 2 ч. Суспензии освещали видимым светом с водяным фильтром для предотвращения нагревания образцов, освещенность поверхности составляла 7×10^4 люкс. На всех стадиях выделения комплексов значение pH среды поддерживали постоянным. Погрешность в определении изомерных сдвигов составляет $\pm 0,02$ мм/с, квадрупольных расщеплений – $\pm 0,03$ мм/с. Содержание железа в растворе определяли как методом ГРС (анализ площадей спектров), так и спектрофотометрически; а в осадке – только методом ГРС. Погрешность в определении распределения железа по различным формам методом ГРС составляет $\pm 0,05$; относительная погрешность определения спектрофотометрическим методом содержания оставшихся в супернатанте ионов Fe^{2+} – $\pm 4\%$.

Параметры всех изученных систем приведены в табл. VI.6, а на рис. VI.9 представлен ГР-спектр комплекса $^{57}FeSO_4$ + оммохромы.

Табл. VI.6. Гамма-резонансные параметры образцов

Образцы	Fe^{3+}		Fe^{2+}	
	ИС	КР	ИС	КР
$^{57}Fe Cl_3$ + оммохромы; pH 2,0 в темноте				
Исходный раствор	–	–	0,45	–
Супернатант	–	–	0,47	–
Осадок (комплекс)	–	–	0,51	0,67

Окончание таблицы VI.6

Образцы	Fe ³⁺		Fe ²⁺	
	ИС	КР	ИС	КР
⁵⁷FeSO₄ + оммохромы; pH 6,0 в темноте				
Исходный раствор	1,30	3,30	–	–
Супернатант	1,33	3,27	–	–
Осадок (комплекс)	–	–	0,39	0,81
⁵⁷FeSO₄ + оммохромы; pH 6,0 при освещении				
Исходный раствор	1,30	3,30	–	–
Супернатант	1,32	3,23	–	–
Осадок (комплекс)	–	–	0,39	0,83

В обоих случаях ГР-спектры супернатантов и растворов соответствующих (Fe³⁺ и Fe²⁺) исходных солей аналогичны по виду и подробно описаны нами выше. Они соответствуют гидратным комплексам Fe³⁺ и Fe²⁺. ГР-спектры осадков оммохромов, связавших железо, характерны для высокоспиновых комплексов Fe³⁺. Резкое их отличие от спектров (Fe³⁺ и Fe²⁺) исходных растворов указывает на комплексообразование (и одновременное окисление в случае Fe²⁺) ионов железа с оммохромами.

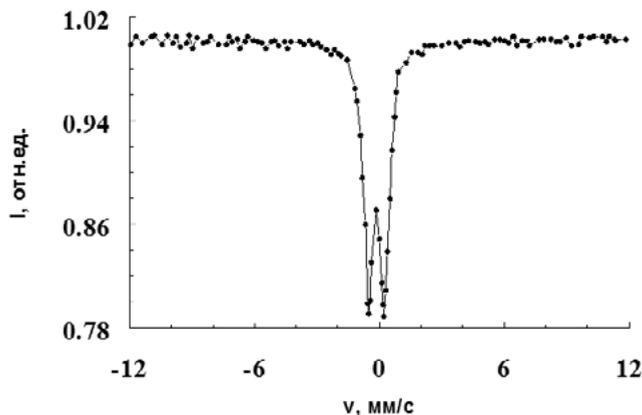


Рис. VI.9. Гамма-резонансный спектр комплекса ⁵⁷FeSO₄ + оммохромы при 80К

В табл. VI.7 приведены данные по распределению железа в системе железо-оммохромы по формам. Сравнение с соответствующими данными для систем с МС и ДОФА-меланином (Fe³⁺, pH 2,1) показывает, что оммохромы связывают ионы железа еще более эффективно, чем меланосомы и ДОФА-меланин.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Табл. VI.7. Распределение железа по формам в системе $^{57}\text{FeSO}_4$ – оммохромы, pH 6,0

Время, мин	Раствор		Осадок Fe^{3+}	Раствор		Осадок Fe^{3+}
	Fe^{2+}	Fe^{3+}		Fe^{2+}	Fe^{3+}	
	Без освещения			При освещении		
5	0,38	0,04	0,58	0,18	0,02	0,80
30	0,23	0,03	0,74	0,05	0,01	0,94
60	0,13	0,01	0,86	–	–	1,00
90	0,06	0,01	0,93	–	–	1,00
120	0,04	0,01	0,95	–	–	1,00

Действительно, например, оммохромы через 2 ч связывают 75% ионов Fe^{3+} , тогда как ДОФА-меланин связывает в тех же условиях не более 10–20% ионов железа. На рис. VI.10 приведены для сравнения зависимости степени связывания железа оммохромами и меланосомами от времени.

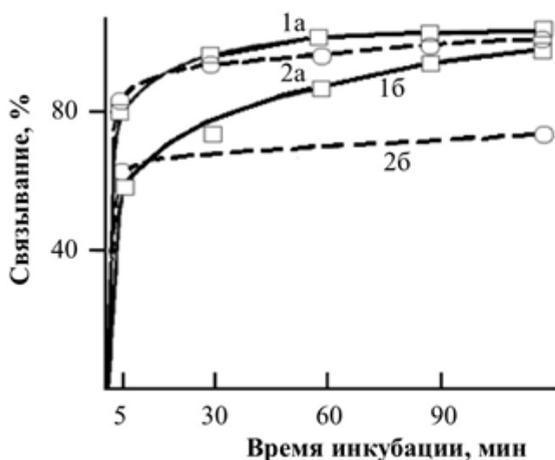


Рис. VI.10. Зависимость степени связывания ионов железа с оммохромами (1а и 1б) и меланосомами (2а и 2б) от времени инкубирования при освещении (а) и в темноте (б)

Как и в случае МС, основное количество ионов железа связывается уже в первые 5 мин. Следует отметить, что освещение ускоряет этот процесс. Видно, что оммохромы являются более сильным комплексообразующим агентом, чем МС, особенно в темноте. При освещении оммохромы уже через 1 ч связывают практически все железо, находившееся в растворе, тогда как в случае МС ~ 2–3% ионов Fe^{2+} еще остается в супернатанте не связанным даже через 2 ч. В темноте же оммохромы связывают до 95% ионов железа по сравнению с 75% в случае МС.

Интересно, что в случае оммохромов, в отличие от МС, свет влияет в основном на кинетику связывания железа (80% и 60% соответственно через 5 мин) и в меньшей мере на степень максимального связывания (100% и 95% соот-

ветственно через 2 ч). Как и в случае МС, в супернатанте железо находится в основном в форме Fe^{2+} . Спектр осадка комплекса с оммохромами существенно отличается от спектра комплекса железа с МС.

Во-первых, в случае МС 10–12% связанного железа находится в форме Fe^{2+} , а в случае оммохромов железо в комплексе находится только в форме Fe^{3+} , что указывает на более сильную окислительную способность оммохромов по отношению к связанному железу. Во-вторых, в случае МС и ДОФА-меланина половина связанных ионов железа дает релаксационный спектр, тогда как в комплексах с оммохромами железосодержащих структур, дающих релаксационный спектр, не обнаружено. Отметим также, что в кислой среде в супернатанте ионы железа остаются в основном в форме Fe^{3+} , в то время как в случае ДОФА-меланина происходит их восстановление до Fe^{2+} . Следовательно, меланины являются более сильными по сравнению с оммохромами восстанавливающими агентами для ионов Fe^{3+} в растворе.

Результаты показывают, что оммохромовы – еще более эффективные, чем меланосомы, связывающие лиганды для ионов железа и вместе с тем более сильные окисляющие агенты по отношению к соответствующему комплексу железа. С учетом совокупности полученных данных последовательность редокс-потенциалов можно представить следующим образом (записана окисленная форма): $Fe^{3+} \geq$ оммохромовы > МС (ДОФА-меланин) > Fe^{3+} – МС > Fe^{3+} – оммохромовы.

Отсутствие релаксационных спектров для комплексов Fe^{3+} -оммохромовы указывает на их кластерную природу. Координирующие центры, по-видимому, образуют группы (островки) в структуре оммохромов, так что связанные ионы Fe^{3+} оказываются расположенными достаточно близко друг к другу. Это обеспечивает эффективное спин-спиновое взаимодействие, приводящее к быстрой релаксации электронного спина и «схлопыванию» магнитной СТС. Одиночных связанных ионов Fe^{3+} , не входящих в состав таких включающих несколько ионов Fe^{3+} кластеров, мало, и они, в отличие от комплексов с МС и ДОФА-меланином в спектрах комплексов железо – оммохромовы, не проявляются.

Таким образом, оммохромовы эффективно связывают ионы железа. По отношению к связанным ионам Fe^{2+} они проявляют окислительные свойства, проявляющиеся при освещении. Основное количество ионов железа связывается за первые 5 мин. Ионы железа в комплексе Fe^{3+} -оммохромовы образуют полиядерные ($n \geq 2$) кластеры. Координация ионов железа происходит, по-видимому, с карбоксильными, амина- и имино-группами молекул оммохромов.

Как уже говорилось ранее, концентрация оммохромов в глазах беспозвоночных крайне велика и может достигать 80 мг/мл. Очевидно, что в таких концентрациях оммохромовы связывают (с последующим окислением) практически все несвязанные ионы двухвалентного железа, которые находятся как в пигментных, так и в рецепторных клетках омматидия. Это должно приводить к сильному ингибированию реакции ПОЛ. Поэтому исключительно эффективное связывание Fe^{2+} оммохромовы (с последующим окислением до Fe^{3+}) в неактивные в прооксидантном отношении комплексы может быть одним из важ-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

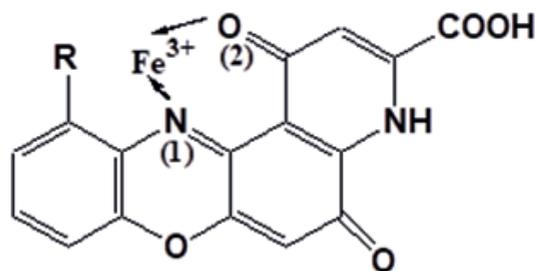
ных механизмов антиоксидантного действия экранирующих пигментов глаза беспозвоночных животных как в темноте, так и особенно на свету.

Суммарно, результаты исследования связывания ионов железа меланинами и оммохромами методом ГРС показало, что все изученные пигменты способны связывать и реагировать с ионами железа. В табл. VI.8 сопоставлены параметры парамагнитных парциальных ГР спектров комплексов Fe^{3+} с экранирующими пигментами глаз позвоночных и беспозвоночных животных.

Табл. VI.8. Сравнение ГР-параметров комплексов трехвалентного железа с пигментными гранулами при различных значениях pH среды

Лиганд	pH	ИС	КР
ДОФА-меланин	2,1	0,55	0,98
ДОФА-меланин	5,4	0,54	0,98
Меланосомы	5,7 – 6,5	0,52	0,86
Оммохромы	2,0	0,51	0,67
Оммохромы	6,0	0,39	0,83

Величины ИС первых четырех комплексов с пигментами (табл. VI.8) близки между собой (0,52–0,57 мм/с) и характерны для ВС октаэдрических координационных соединений Fe^{3+} . Наблюдаемые различия КР в этом случае связаны, по-видимому, в первую очередь с различием в степени искажения октаэдрического хелатного узла. Наиболее интересно сильное отличие ИС спектра комплекса Fe^{3+} с оммохромами, полученного при pH 6,0, от ИС спектров других комплексов данной серии, в том числе комплекса с оммохромами, полученного при pH 2,0. Это уменьшение ИС указывает на возрастание средней степени ковалентности связей Fe^{3+} с лигандами в комплексе, полученном при pH 6,0, по сравнению с другими, представленными в табл. VI.8 (Гольданский, Стукан, 1967). Возрастание ковалентности можно объяснить в рамках структуры ксантомматина (Bouthier, 1981) образованием за счет связи Fe^{3+} с иминным атомом азота (1) и атомом кислорода (2) соседнего кольца шестичленного металлоцикла с системой сопряженных связей по схеме:



В сильноокислой среде иминный азот будет протонироваться. Это должно приводить к ослаблению координации с ним иона Fe^{3+} , так что данный металлоцикл с системой сопряженных связей образоваться уже не сможет, и поэтому наблюдается ИС, характерный для обычных высокоионных комплексов Fe^{3+} .

Регулируя в клетках (пигментного эпителия глаза, кожи, мозга или других меланиносодержащих тканей, а также в пигментных и ретикулярных клетках омматиция сложного глаза) концентрацию ионов свободного двухвалентного железа, экранирующие пигменты тем самым, вероятно, способны эффективно контролировать в ней скорость процессов пероксидного окисления липидов.

3. Определение констант и максимального числа связывания ионов железа с меланинами и оммохромами

Параметры связывания ионов двухвалентного железа ДОФА-меланином, меланосомами и оммохромами были определены из графиков зависимости связывания ионов железа от их концентрации в координатах Скэтчарда (Лапина и др., 1985). В опытах использовали титрованные растворы соли Мора $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Пробы, содержавшие различные количества соли Мора и пигментов (их концентрация варьировала от 100 до 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), инкубировали в течение 30 мин при pH 7.0, после чего пигменты удаляли центрифугированием (5000xg, 15 мин), а в надосадочной жидкости измеряли концентрацию железа. Величины констант связывания Fe^{2+} с меланосомами и ДОФА-меланином показывают (рис. VI.11, а и б), что в том и другом случае существуют, по крайней мере, два типа участков связывания.

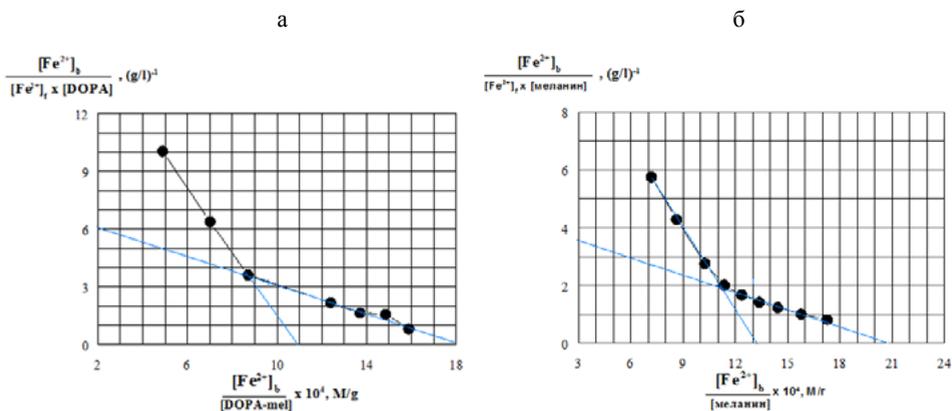


Рис. VI.11 а и б. График Скэтчарда для расчета констант связывания ионов двухвалентного железа ДОФА-меланином и меланосомами

Максимальное количество железа, связывающееся с меланосомами и ДОФА-меланином при насыщении, весьма велико (табл. VI.9). Это означает, что емкость меланосом для связывания свободного железа в клетке РПЭ высокая, так что количество железа, связанного меланосомами, почти на порядок превышает его содержание, например, в скелетных мышцах (Alexander, 1955).

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Табл. VI.9. Константы и максимальное число связывания ионов двухвалентного железа меланинами и оммохромами

Пигмент	Константы связывания		Максимальное связывание при насыщении, мг железа на 1 г сухого веса	Максимальное связывание в расчете на мономер*
	$K_1, M^{-1} \times 10^4$	$K_2, M^{-1} \times 10^3$		
ДОФА-меланин	$2,0 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,1$	100 ± 5	$0,26 \pm 0,02$
Меланосомы	$1,5 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,1$	110 ± 10	$0,30 \pm 0,04$
Оммохромы	$2,4 \pm 0,8$	–	70 ± 15	$1,00 \pm 0,15$

* молекулярная масса мономерного звена меланина принята равной 150, оммохромов – 800Да.

Рассчитаем количество железа, которое может связываться одной меланосомой. Определение количества меланосом путем подсчета в камере Горяева показало, что в 1 мг сухого веса меланосом содержится в среднем $1,2 \times 10^9$ гранул. Из этого следует, что одна гранула может максимально связать до 10^{-10} мг железа, что значительно превышает концентрацию свободного железа в клетках.

Таким образом, меланины и оммохромы могут участвовать в регуляции концентрации ионов двухвалентного железа в клетке и, следовательно, в регуляции процессов пероксидации, связанной с каталитическими свойствами ионов железа (например, реакция Фентона). Связывание меланинами и оммохромами ионов двухвалентного железа в неактивные комплексы является одним из механизмов антиоксидантного действия этих пигментов.

Б. Исследование взаимодействия меланинов и оммохромов с активными формами кислорода

1. Взаимодействие с супероксидными радикалами кислорода

Экранирующие пигменты глаза меланосомы и оммохромы, как было показано, способны ингибировать пероксидацию липидов, индуцированную супероксидными радикалами, генерируемыми при окислении ксантина ксантинооксидазой. Этот процесс может быть связан со способностью пигментов взаимодействовать с супероксидными радикалами. Способность меланинов и оммохромов взаимодействовать с радикалами O_2^- может быть одним из механизмов антиоксидантного действия этих пигментов. В этой серии экспериментов мы показали, что ДОФА-меланин, меланосомы клеток РПЭ глаза и оммохромы взаимодействуют с радикалами O_2^- , существенно ускоряя их гибель, как в водной, так и в безводной средах (Лапина и др., 1985; Ostrovsky et al., 1987).

Прямое взаимодействие пигментов с супероксидными радикалами кислорода легко наблюдать в безводных средах, например, в растворе супероксида в диметилформамиде. Радикалы O_2^- получали путем электролитического восстановления кислорода на ртутном катоде в 0,01 М растворе тетрабутиламмоний бромид в диметилформамиде (McCord, Fridovich, 1969). Концентрацию супероксида в реакционной среде измеряли с помощью реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в формазан при длине волны поглощения 560 нм, принимая коэффициент молярной экстинкции последнего равным $2,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Johnston et al., 1975). Основные результаты сводятся к следующему.

ДОФА-меланин и оммохромы глаза креветки резко ускоряют гибель супероксида в безводной среде (рис. VI.12).

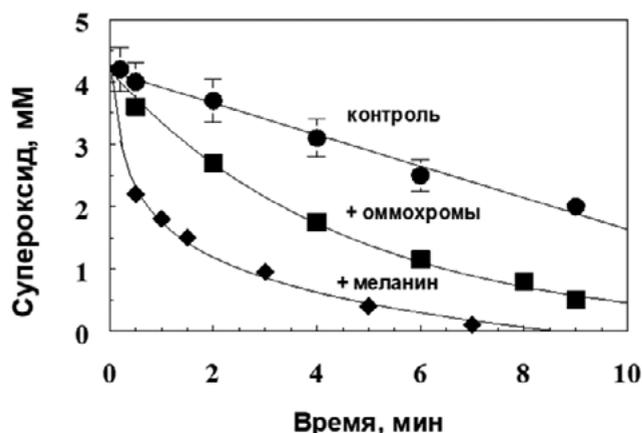


Рис. VI.12. Кинетика гибели радикалов супероксида в диметилформамиде. Контроль – без пигментов, опыт – добавлено 167 $\mu\text{g}/\text{ml}$ оммохромов и ДОФА-меланина, соответственно

В отсутствие пигментов время жизни радикалов супероксида в диметилформамиде довольно велико и в наших условиях эксперимента составляло несколько десятков минут. Добавление ДОФА-меланина в относительно низких концентрациях более чем на порядок уменьшает время жизни супероксида в этих условиях. Оммохромы в апротонных растворителях также ускоряют гибель радикалов супероксида, но в значительно меньшей степени, чем ДОФА-меланин. Поскольку белоксодержащие меланосомы нестабильны в диметилформамиде и, следовательно, наблюдать их взаимодействие в этих условиях невозможно, было исследовано взаимодействие меланосом, ДОФА-меланина и оммохромов с радикалами супероксида в водной среде методом конкурентного ингибирования. В этих опытах радикалы супероксида генерировались в ходе ксантиноксидазной реакции, а их концентрация измерялась либо с помощью нитросинего тетразолия, либо с помощью адреналина (окисление в адренохром, $\lambda_{\text{макс}} - 485 \text{ nm}$) (Asada et al., 1976), или цитохрома с (восстановление цитохрома с (Fe^{3+}) в цитохром с (Fe^{2+}), $\lambda_{\text{макс}} - 550 \text{ nm}$) (Beauchamp, Fridovich, 1971). Показано, что в водной среде меланосомы, так же, как оммохромы и ДОФА-меланин, успешно конкурируют за супероксид, генерируемый в ходе ксантиноксидазной реакции (рис. VI.13, а).

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

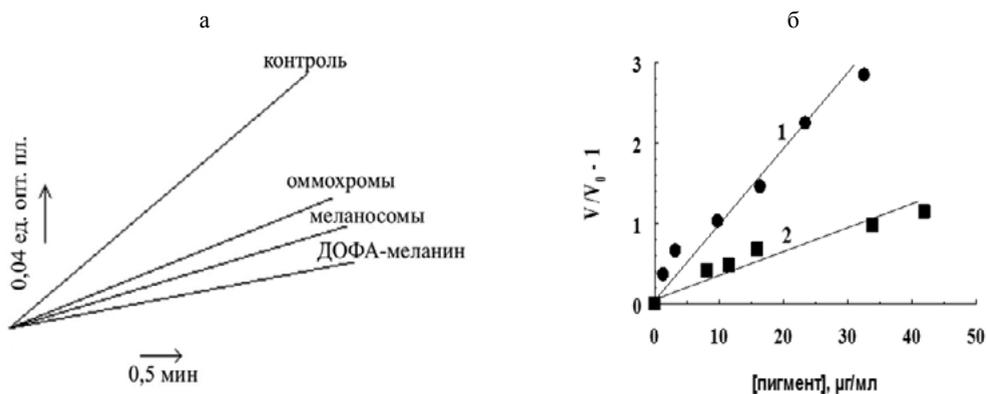


Рис. VI.13. а. Ингибирующее действие меланинов и оммохромов на реакцию окисления адреналина супероксидными радикалами; добавки: контроль – без добавок, оммохромы глаза креветки – 50 мкг/мл, меланосомы РПЭ глаза быка – 500 мкг/мл, ДОФА-меланин – 50 мкг/мл;
б. График для расчета констант скорости реакции ДОФА-меланина (кривая 1) и оммохромов (кривая 2) с супероксидными радикалами

Принимая, что скорость спонтанной дисмутации супероксидных радикалов значительно ниже, чем скорость окисления адреналина (Asada et al., 1976), получаем выражение для суммарной скорости распада (V) супероксидных радикалов:

$$V = K_a [\text{адреналин}][\dot{\text{O}}_2] + K_p [\text{пигмент}][\dot{\text{O}}_2],$$

где K_a – константа взаимодействия супероксида с адреналином, а K_p – константа взаимодействия радикалов супероксида с пигментом. Отсюда следует, что

$$\frac{V}{V_0} = 1 + \frac{K_p [\text{пигмент}]}{K_a [\text{адреналин}]}$$

где V_0 – скорость распада радикалов супероксида в реакции с адреналином в отсутствие пигментов. Поскольку скорость генерации супероксида в наших условиях эксперимента невелика, то можно пренебречь изменением концентрации адреналина в начальной стадии реакции. Следовательно, константы скорости реакции пигментов с супероксидными радикалами легко найти из экспериментальной зависимости скорости реакции от концентрации пигментов (рис. VI.13б для ДОФА-меланина и оммохромов и рис. VI.14 – для меланосом РПЭ человека).

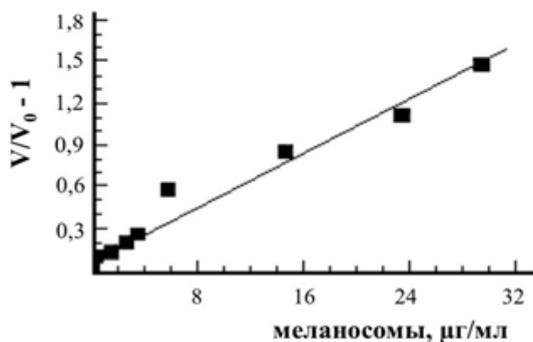


Рис. VI.14. Влияние меланосом РПЭ человека на скорость восстановления цитохрома с супероксидными радикалами, образующимися в ходе ксантиноксидазной реакции. Концентрацию меланосом варьировали от 1 до 30 мкг сухого веса на 1 мл

При расчете констант взаимодействия пигментов с супероксидными радикалами использовались следующие данные: константа взаимодействия супероксида с адреналином – $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (Asada et al., 1976), константа взаимодействия супероксида с цитохромом с – $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (Yamashita, 1982), молекулярная масса оммохромов глаза креветки – 800 Да, молекулярная масса мономерного звена ДОФА-меланина и меланина меланосом – 170 Да, примерная молекулярная масса ДОФА-меланина – 400 кДа (Bull, 1970). Полученные значения констант приведены в табл. VI.10. Результаты показывают, что меланины и оммохромы глаза позвоночных и беспозвоночных животных легко вступают в реакцию с супероксидными радикалами и могут, следовательно, функционировать в качестве достаточно эффективной ловушки этого цитотоксического радикала.

Табл. VI.10. Константы взаимодействия пигментов с радикалами супероксида

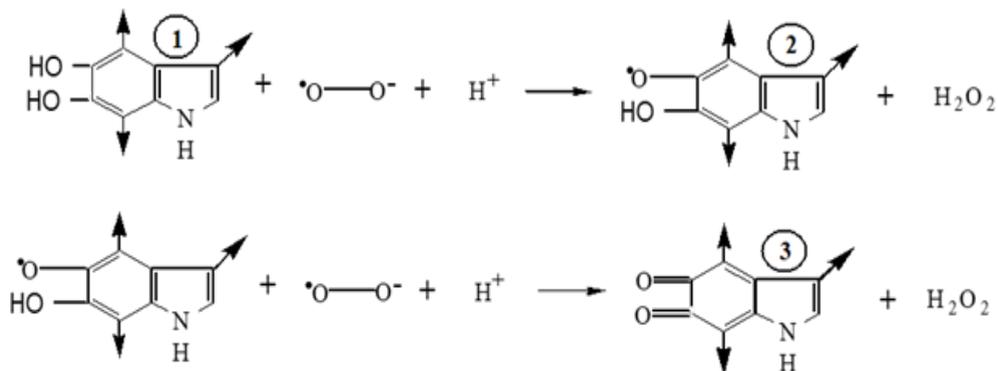
Образец	Константа взаимодействия с супероксидными радикалами, K_p	
	$\text{M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	$(\text{M мономерного звена})^{-1} \text{ c}^{-1}$
ДОФА-меланин	6×10^8	$2,5 \times 10^5$
Меланосомы	–	$9,5 \times 10^4$
Оммохромы	3×10^5	–

Следует отметить, что из данных табл. VI.10 достаточно трудно оценить эффективность взаимодействия меланосом из клеток РПЭ с радикалами супероксида, в основном из-за отсутствия точных данных о молекулярной массе гранул. Однако мы можем приблизительно оценить скорость разрушения молекул супероксида одной гранулой меланосомы. Из данных рис. VI.14 следует, что 50% ингибирование реакции восстановления цитохрома с супероксидными радикалами, образующимися в ходе ксантинооксидазной реакции, происходит при концентрации меланосом равной $\approx 20 \text{ мкг сухого веса/мл}$. Это означает, что скорость взаимодействия супероксида с меланосомами в этих условиях равна скорости их взаимодействия с цитохромом с. В наших условиях эксперимента последняя составляла $9,5 \times 10^{-7} \text{ M}$ супероксида в 1 мин (в предположении, что в начальный момент реакции изменениями в концентрации цитохрома с можно пренебречь; начальная концентрация цитохрома с была равна 50 мкM). Поскольку скорость взаимодействия супероксида с меланосомами линейна, по крайней мере, в диапазоне концентрации последних $0 - 4 \times 10^7 \text{ гранул/мл}$, можно оценить скорость разрушения супероксидных радикалов одной меланосомой. Она составляет приблизительно $5,5 \times 10^{-16}$ молей супероксида в мин или $3,3 \times 10^8$ молекул супероксида в одну минуту взаимодействует с одной меланосомой. Если учесть, что одна клетка РПЭ человека содержит примерно 100 штук меланосом, а объем клетки составляет приблизительно $2 \times 10^{-9} \text{ мл}$, получаем возможное значение скорости разрушения радикалов супероксида мелано-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

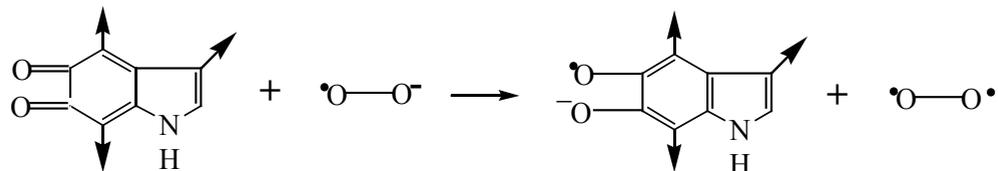
сомами в клетке РПЭ: она равна 27мМ супероксида в минуту. Отсюда ясно, что меланосомы вполне могут участвовать в регуляции внутриклеточного уровня супероксида и влиять на процессы, катализируемые этим радикалом.

Механизм взаимодействия меланосом и ДОФА-меланина с радикалами супероксида может быть обусловлен их реакцией с мономерным звеном полимерной цепи меланина – индол-5,6 хиноном. Предположительно, меланин реагирует с супероксидом в форме гидрохинона с промежуточным образованием семихинона по схеме:



где, 1 – гидрохинонная форма мономерного звена меланина, 2 – семихинон, 3 – хинонная форма (индол-5,6-хинон).

В результате супероксид переходит в пероксид водорода, который может быть инактивирован каталазой и пероксидазой. Меланин при этом переходит в окисленную форму, которая в дальнейшем может быть восстановлена в исходную с помощью различных восстановителей, например, НАДН или НАДФН. Однако наиболее интересен процесс обратного восстановления окисленной формы меланина самими же супероксидными радикалами. Хорошо известно, что супероксидные радикалы могут действовать и как окисляющие и как восстанавливающие агенты, в связи с чем в работе Korytowski et al., 1986 была предположена возможность взаимодействия меланина в форме индолхинона с супероксидом, в результате чего образуется радикал меланина и свободный кислород. Реакция может протекать по схеме:



В работе Korytowski et al., 1987 было подсчитано, что примерно 30% реакции между супероксидными анионами и ДОФА-меланином происходит по пути восстановления супероксида в пероксид водорода, а приблизительно 70% реакции идет через окисление супероксида в молекулярный кислород. В этом случае меланин будет катализировать распад супероксида, сам не изменяясь химически, по схеме: $2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$.

Таким образом, меланин, как в окисленной, так и в восстановленной формах способен взаимодействовать с радикалами супероксида переводя их в нерадикальные продукты.

Аналогичная картина наблюдается и в случае оммохромов, которые также способны реагировать с радикалами супероксида как в восстановленной (нативной), так и в окисленных формах. В этих экспериментах супероксидные радикалы были получены электрохимически на ртутном катоде. Реакционная среда для получения супероксида содержала: 35 мМ тетрабутиламмоний иодид в диметилформамиде; сила тока – 2 мА, время электрохимического восстановления кислорода – 4–6 часов, объем реакционной ячейки – 60 мл. Реакционная среда для измерения концентрации супероксида содержала 2,7 мл 240 мМ раствора нитросинего тетразолия в воде и 0,3 мл раствора тетрабутиламмоний супероксида в диметилформамиде. Как видно из рис. VI.15, восстановленная форма оммохромов креветки в значительно большей степени ускоряла гибель радикалов супероксида в безводной среде (кривая 3), чем окисленная форма оммохромов (кривая 2). Из рис. VI.15 видно также, что скорости взаимодействия оммохромов и липидов (в данном случае кардиолипина, содержащего двойные связи в своей структуре, кривая 4) с радикалами супероксида, примерно одинаковы.

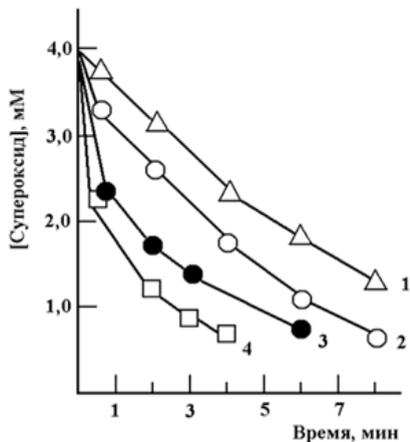


Рис. VI.15. Кинетика гибели радикалов супероксида в диметилформамиде. 1 – контроль (без добавок); 2 – добавлено 400 мкг/мл оммохромов креветки в окисленной форме; 3 – добавлено 330 мкг/мл оммохромов креветки в исходной восстановленной форме; 4 – добавлено 440 мкг/мл кардиолипина

следовательно, оммохромы, как и меланины, могут эффективно ингибировать реакцию пероксидации липидов, индуцированную радикалами супероксида, в том случае, если их концентрация сопоставима с концентрацией липидов.

2. Тушение синглетного молекулярного кислорода экранирующими пигментами

Известно, что одним из наиболее активных инициаторов фотосенсиблированного окисления в структурах глаза могут служить молекулы кислорода в синглетном $^1\Delta_g$ -состоянии, так называемый синглетный кислород (1O_2). Кислород в синглетном состоянии высоко реакционноспособен и вызывает значительные повреждения биологических структур как при непосредственном взаимодействии с ними, так и через промежуточное образование активных долгоживущих продуктов, например липидных гидропероксидов (время жизни самого синглетного кислорода в водных растворах составляет микросе-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

кунды и меньше). В связи с этим очень большое значение имеет присутствие в тканях, подверженных воздействию света, веществ - тушителей синглетного кислорода. К таким веществам в клетках глаза позвоночных и беспозвоночных животных относятся каротиноиды и α -токоферол.

Мы исследовали взаимодействие меланинов и оммохромов с $^1\text{O}_2$ в водных растворах (Егоров и др., 1987). Для исследования использовали метод тушения фотосенсибилизированной люминесценции синглетного кислорода. Люминесценцию возбуждали наносекундными импульсами азотного лазера ЛГИ-21 при длине волны 337,1 нм и регистрировали через монохроматор МДР-2 в области 1270 нм с помощью охлаждаемого фотоумножителя ФЭУ-83. Время жизни $^1\text{O}_2$ определяли путем прямого анализа кинетики затухания люминесценции кислорода после лазерной вспышки (Krasnovsky, 1998). Все растворы, включая фосфатный буфер, были приготовлены на тяжелой воде, так как в этой среде время жизни синглетного кислорода значительно выше, чем в воде и поэтому точность определения констант скоростей тушения $^1\text{O}_2$ существенно возрастает. Константы скорости определяли с помощью уравнения Штерна-Фольмера, измеряя время жизни синглетного кислорода в отсутствии ($\tau\Delta 0$) и в присутствии ($\tau\Delta t$) тушителей:

$$\tau\Delta 0 / \tau\Delta t = 1 + K_t \tau\Delta 0 C_t,$$

где C_t – молярная концентрация тушителей, а K_t – константа тушения. Такой метод позволял не учитывать экранирующее действие пигментов, так как очевидно, что экранирование может изменять лишь интенсивность люминесценции, но никак не изменяет время жизни люминесценции $^1\text{O}_2$. Для оценки величины константы взаимодействия оммохромов использовали значение молекулярной массы оммохромов равное 800, а для оценки активности ДОФА-меланина использовали значение молекулярной массы одного мономерного звена (170), с помощью которого рассчитывали молярную концентрацию этих звеньев в растворе. Полученные таким методом значения констант взаимодействия пигментов с синглетным кислородом приведены в таблице VI.11.

Табл. VI.11. Константы взаимодействия пигментов с синглетным кислородом

Пигмент	Константа тушения, $K_t \times 10^{-7}, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$
ДОФА-меланин	12 ± 6
Оммохромы	$0,3 \pm 0.1$

Из таблицы видно, что оммохромы довольно слабые тушители синглетного кислорода, тогда как ДОФА-меланин весьма активен. Константа тушения $^1\text{O}_2$ ДОФА-меланином, даже рассчитанная на молекулярный вес мономерного звена, весьма велика и, следовательно, можно ожидать, что истинное значение константы, рассчитанное на молекулярную массу полимера, будет значительно выше. Эффект тушения синглетного молекулярного кислорода также был обнаружен нами и для суспензии меланосом из РПЭ глаза быка и для щелочного экстрак-

та чернильного мешка кальмара (содержит до 70% природного меланина – се-пиомеланина). Таким образом, эти результаты свидетельствуют о способности меланинов и оммохромов тушить синглетный кислород. Высокая активность в этом отношении меланинов позволяет предполагать их участие в ингибировании процессов фотодинамического повреждения клеточных структур глаза и кожи.

3. Пути и условия процесса генерации радикалов супероксида при взаимодействии меланинов и оммохромов с кислородом

Высокая реакционная способность меланинов и оммохромов взаимодействовать с активными формами кислорода не исключает возможности противоположной реакции, в которой эти пигменты могли бы восстанавливать кислород до радикалов супероксида и проявлять вследствие этого цитотоксическое действие. Действительно, в литературе имеются многочисленные данные, что при действии света высоких интенсивностей на глаз происходит в первую очередь разрушение ткани ретинального пигментного эпителия и самих меланосом, причем именно меланосомы оказывают повреждающее действие на клетку РПЭ (Ham et al., 1978; Ham et al., 1980). Возможно, что этот эффект связан со светозависимой генерацией меланином активных форм кислорода. Так, например, способность меланинов генерировать супероксид при освещении была прямо показана в работе (Felix et al., 1978). Эти факты оставляли вопрос о биологической роли внутриклеточных пигментов открытым. В каких условиях пигменты могут оказывать защитное действие, и при каких обстоятельствах выступать в роли прооксидантов? Для выяснения этого вопроса нами были проведены исследования реакций различных синтетических меланинов, меланосом и оммохромов с кислородом, возможности образования радикалов супероксида в качестве промежуточного продукта и зависимости этого процесса от условий освещения (Лапина и др., 1984; Porembska-Budny et al., 1992). В первой серии опытов исследовали процесс фотоиндуцированного окисления различных меланинов с помощью индикаторной ловушки для супероксида, в качестве которой служил краситель нитросиний тетразолий (НСТ). Освещению подвергали три типа меланинов: ДОФА-меланин, феомеланин, полученный при окислении кислородом смеси ДОФА и цистеина, и меланосомы РПЭ. Основные результаты этих опытов показывают, что накопления формазана (увеличение оптической плотности при 560 нм) ни в одной из изученных систем не наблюдалось. Процесс генерации супероксида не удавалось зарегистрировать ни при действии видимого света, ни при действии ближнего ультрафиолета вплоть до 2-часового облучения (облучение осуществляли лампой ДРШ-250 с кварцевой фокусирующей линзой и соответствующими светофильтрами; аэрирование проводили путем пробулькивания кислорода в реакционную среду). В темновых условиях реакция также отсутствовала. Следовательно, в наших условиях эксперимента – 0,1 М калий-фосфатный буфер, рН 7,4 повышенная концентрация кислорода и концентрация меланина, составляющая 400 мкг/мл – фотоиндуцированной генерации супероксида не происходило.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

Такой же результат был получен в опытах, при которых для регистрации супероксида использовался метод спинового зонда. В качестве такого зонда был применен тайрон (Miller, Rapp, 1973). Освещение системы тайрон-ДОФА-меланин или тайрон-меланосомы приводило к генерации сигнала ЭПР. Однако в контрольных экспериментах регистрировался такой же сигнал при действии света только на раствор самого тайрона.

Во второй серии опытов была предпринята попытка подобрать условия, при которых наблюдалась бы генерация супероксида. Было установлено, что в присутствии в системе детергента цетилтриметиламмония (ЦТАБ) наблюдается восстановление НСТ в формазан.

На рис. VI.16а представлена типичная кинетика восстановления НСТ для различных меланинов. Наиболее эффективным восстановителем оказался феомеланин (кривая 1), что, возможно, связано с большим количеством в нем сульфгидрильных групп. Меланосомы проявляли низкую восстанавливающую способность (рис. VI.16а, кривая 3). ЦТАБ, в отсутствие меланинов, не вызывал никакого восстановления НСТ, как в темноте, так и на свету. Скорость восстановления НСТ линейно зависела от концентрации меланинов, как это показано, например, для ДОФА-меланина (рис. VI.16б).

При освещении скорость обнаруженной реакции возрастает. В табл. VI.12 сведены результаты опытов, проведенных в различных условиях и с разными концентрациями меланинов.

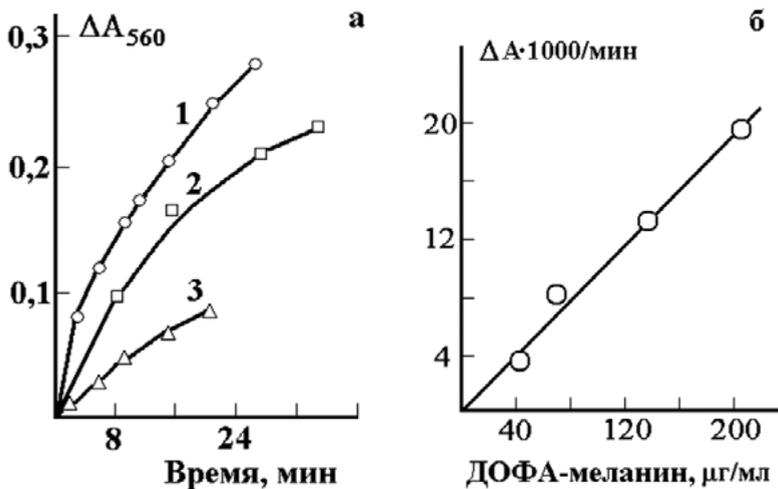


Рис. VI.16. Восстановление НСТ различными меланинами; а – типичная кинетика восстановления НСТ феомеланином (кривая 1), ДОФА-меланином (кривая 2) и меланосомами РПЭ быка (кривая 3). б – зависимость скорости восстановления НСТ от концентрации ДОФА-меланина

Табл. VI.12. Влияние освещения на процесс восстановления НСТ ДОФА-меланином в присутствии ЦТАБ

Скорость реакции, ΔA /мин при 560 нм		Отношение скоростей светового и темнового процессов
свет	темнота	
0,053	0,040	1,32
0,033	0,017	1,94
0,037	0,028	1,32

Видно, что свет стимулирует эту реакцию, но эффект не очень велик (в среднем в 1,5 раза).

Окисленный ДОФА-меланин восстанавливал НСТ в формазан со значительно меньшей скоростью. На рис. VI.17 показаны сравнительные скорости восстановления НСТ исходным и окисленным ДОФА-меланинами. Результаты показывают, что окисленный ДОФА-меланин восстанавливает НСТ с значительно меньшей скоростью чем исходный, восстановленный ДОФА-меланин (кривая 2).

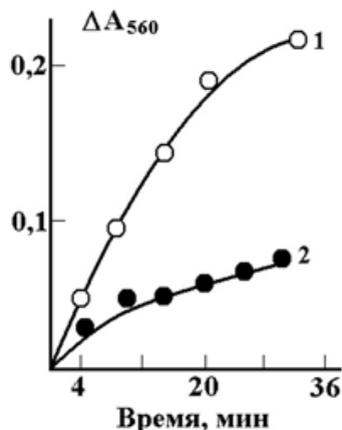


Рис. VI.17. Сравнительная кинетика восстановления НСТ ДОФА-меланином (кривая 1) и его окисленной формой (кривая 2); окисленный меланин получали путем окисления ДОФА-меланина 5 мМ феррицианидом калия в течение 42 часов

Процесс восстановления НСТ оказался чувствительным к супероксиддисмутазе. Концентрация фермента, вызывающая 50% ингибирование процесса, составляла для препарата, выделенного из эритроцитов быка, 56 $\mu\text{г}/\text{мл}$ (рис. VI.18) и 13 $\mu\text{г}/\text{мл}$ для коммерческого препарата супероксиддисмутазы.

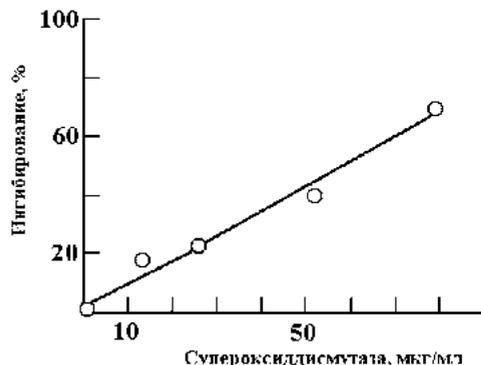


Рис. VI.18. Степень ингибирования реакции восстановления НСТ ДОФА-меланином в зависимости от концентрации супероксиддисмутазы

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

В тех же условиях бычий сывороточный альбумин в концентрациях до 400 $\mu\text{г}/\text{мл}$ не оказывал ингибирующего действия. Инактивированный нагреванием раствор фермента также не ингибировал реакцию генерации супероксида. Таким образом, в присутствии ЦТАБ окисление меланина сопровождается генерацией супероксидных радикалов. Механизм действия ЦТАБ до конца неясен. Действие детергента может быть обусловлено, по крайней мере, тремя причинами:

– поскольку продукт реакции восстановления НСТ формазан нерастворим в воде, ЦТАБ может действовать в качестве стабилизатора, образуя формазан-содержащие мицеллы. Подобный эффект наблюдался также в работе (Nishikimi, 1975), где было показано возрастание скорости восстановления НСТ при окислении тетрагидроптеридина в присутствии тритона X-100. В наших опытах тритон X-100, подобно ЦТАБ, также сильно ускорял процесс восстановления НСТ при окислении меланина. Однако, по нашим данным, подобный механизм действия ЦТАБ не может полностью объяснить увеличение скорости восстановления НСТ (табл. VI.13).

Табл. VI.13. Влияние ЦТАБ на реакцию восстановления НСТ

Реакционная система	ΔA за 20 мин реакции без детергента	ΔA , добавлен 0,3% ЦТАБ на 20-й мин реакции
Восстановление НСТ при окислении ДОФА-меланина (система 1)	0	0,002
Фотовосстановление НСТ (система 2)	0,57	1,35

Условия реакции: ЦТАБ добавляли в конце реакции и через 0,5 мин после его добавления измеряли изменение оптической плотности при 560 нм.

Так, при добавлении детергента в конце реакции, проводимой в его отсутствие, не происходит сколько-нибудь заметного увеличения степени поглощения при 560 нм. Если бы процесс протекал и без детергента, то образовались бы гранулы формазана, которые в присутствии ЦТАБ должны были бы сольбуилизоваться, что сопровождалось бы увеличением абсорбции при 560 нм. Но этого в отличие от процесса фотовосстановления НСТ не происходит.

– Детергент может действовать путем увеличения степени дисперсности нерастворимого меланина, т. е. путем увеличения контактируемой реакционной поверхности. Однако этот механизм маловероятен, поскольку растворимый феомеланин, подобно ДОФА-меланину, не генерирует супероксид в отсутствие детергента.

– Возрастание времени жизни супероксидных радикалов. Супероксид анион может взаимодействовать с катионом цетилтриметиламмония, образуя относительно долгоживущий продукт, как это имеет место, например, при взаимодействии супероксида с тетрабутиламмонием бромидом (McCord, Fridovich, 1969).

Как показали наши дальнейшие опыты, образование супероксида при окислении меланина наблюдается и в отсутствие ЦТАБ. Это происходит в тех случаях, когда время жизни супероксидных радикалов заведомо больше, чем в воде при нейтральном pH среды – в апротонных растворителях (например, в диметилформамиде) и при щелочных значениях pH среды ($\text{pH} \geq 9,0$). Схема возможного механизма генерации супероксида при окислении меланина приведена на рис. VI.19.

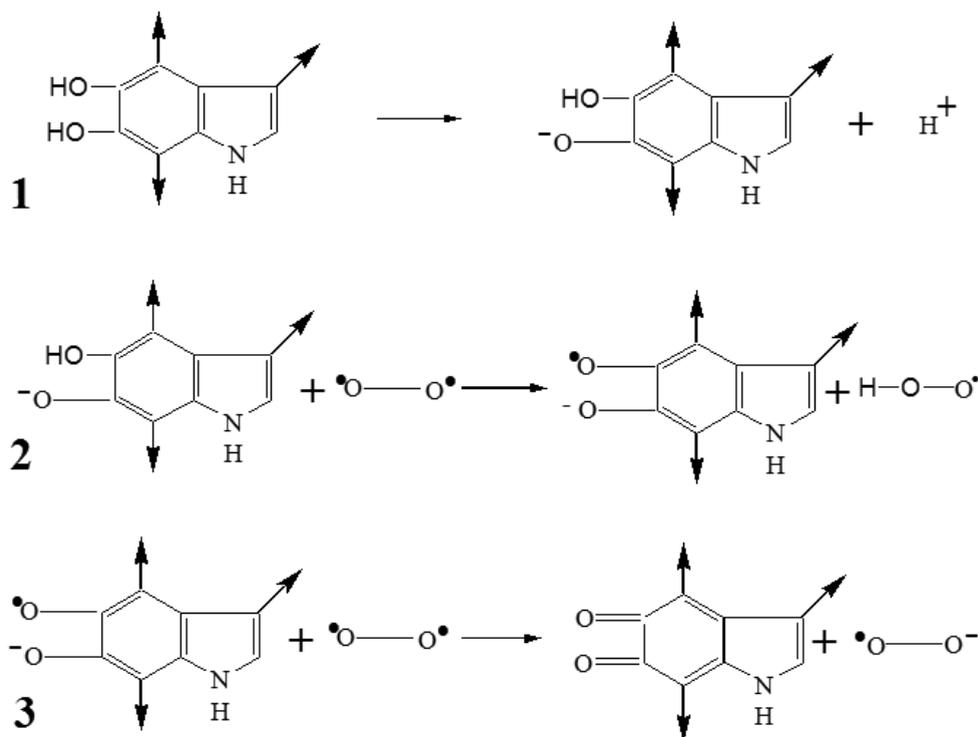


Рис. VI.19. Схема возможного механизма генерации супероксида при окислении меланина

В предложенном механизме реакции приняты следующие, обнаруженные нами и известные ранее факты:

1) восстановленная форма меланина генерирует супероксид с гораздо большей скоростью, чем окисленная;

2) скорость реакции окисления возрастает при смещении равновесия реакции (1) вправо (образование фенолят-аниона) при щелочных величинах pH или в апротонных растворителях;

3) хиноны способны к обратимому восстановлению супероксидными радикалами до семихинонов (Афанасьев, 1979).

Мономерное звено меланина – индол-5,6-гидрохинон (1) активируется (например, при щелочных значениях pH среды), образуя фенолят-анион, который атакуется бирадикалом кислорода (2). В результате реакции (2) образуются гидропероксидный радикал и семихинонная форма меланина; предполагается,

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

что меланин в виде анион-радикала взаимодействует еще с одной молекулой кислорода (3). Это приводит к образованию супероксидных радикалов и меланина с индол-5,6-хинонными мономерными звеньями.

Таким образом, природные и синтетические меланины в определенных условиях способны генерировать супероксидные радикалы при взаимодействии с молекулярным кислородом. Этот процесс в незначительной степени зависит от освещенности системы и наблюдается, как правило, лишь в условиях, далеких от физиологических (детергенты, апротонные растворители, щелочные значения pH среды). Генерацию супероксида в основном удается зарегистрировать только потому, что константа их взаимодействия с такими акцепторами, как цитохром с, НСТ, адреналин или спиновые ловушки значительно превышает константу собственной дисмутации супероксидных радикалов. Поэтому даже при незначительной скорости образования супероксида удается наблюдать их генерацию. По-видимому, константа прямой реакции 3 (см. рис. VI.19) значительно меньше константы обратной реакции взаимодействия хинонной формы меланина с радикалами супероксида.

Это предположение подтверждается экспериментами по генерации супероксида меланосомами из РПЭ человека. На рис. VI.20 показана кинетика фотоиндуцированной генерации супероксида меланосомами РПЭ человека.

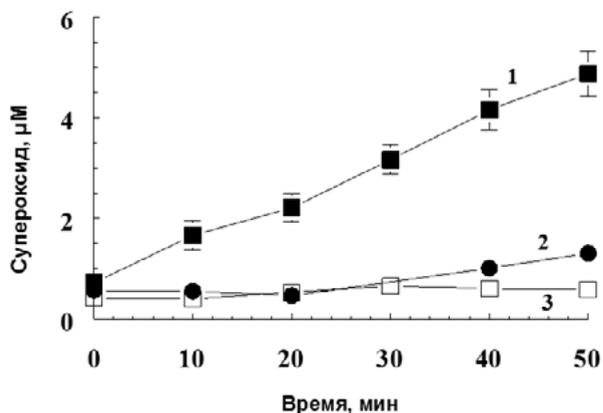


Рис. VI.20. Фотоиндуцированная генерация супероксидных радикалов меланосомами из РПЭ глаза человека. Концентрация меланосом была 5×10^8 гранул/мл (кривая 1); супероксиддисмутазы – 25 мкг/мл (кривая 2); контроль – без меланосом (кривая 3). Облучение проводили белым светом с энергией 300 мВт/см²

В этих условиях скорость генерации супероксида меланосомами была 74 нМ супероксида/мин при концентрации меланосом 5×10^8 гранул/мл. Пересчет на одну меланосому показывает, что скорость генерации составляет приблизительно $1,5 \times 10^{-19}$ моль/гранула мин или 9×10^4 молекул супероксида генерируется одной меланосомой в минуту. Как было показано в этой главе ранее, примерно в этих же условиях меланосомы РПЭ человека взаимодействуют с супероксидными радикалами со скоростью $5,5 \times 10^{-16}$ моля/гранула мин, т. е. скорость генерации супероксидных радикалов меланосомами в $3,7 \times 10^3$ раз ниже скорости их разрушения. Поэтому можно полагать, что даже если радикалы супероксида и образуются при окислении меланина в физиологических условиях, то время их жизни короткое, так как они тут же рекомбинируют на меланиновой матрице и не успевают вызвать цитотоксические реакции.

Оммохромы, как и меланины, также оказались способными генерировать образование радикалов супероксида, однако в этом случае процесс был зависим от света в гораздо большей степени. При освещении оммохромов наблюдается генерация супероксида и, как следствие, восстановление НСТ в формазан (рис. VI.21).

В присутствии детергента (ЦТАБ) скорость процесса существенно выше. Активирующее влияние детергентов на реакцию восстановления НСТ супероксидными радикалами в этой системе также, по-видимому, связано с увеличением времени жизни радикалов супероксида. В наших опытах с оммохромами креветки и крылья процесс фотовосстановления НСТ наблюдался и в отсутствие ЦТАБ. Оммохромы же насекомых оказались активными только в присутствии детергента. Освещение систем, содержащих только НСТ + ЦТАБ или только оммохромы + ЦТАБ в контрольных опытах, не приводило к каким-либо спектральным изменениям. В темноте, в отсутствие ЦТАБ НСТ не восстанавливался. В присутствии детергента и оммохромов образование формазана происходило и в темноте, причем скорость его была на порядок меньше, чем при освещении. Фотогенерация радикалов супероксида наблюдалась как при освещении ультрафиолетовым, так и видимым светом.

Процесс фотогенерации супероксида ингибировался супероксиддисмутазой (рис. VI.22). Концентрация СОД, вызывающая 50% ингибирование, составляла 25 $\mu\text{г}/\text{мл}$ (рис. VI.22, б).

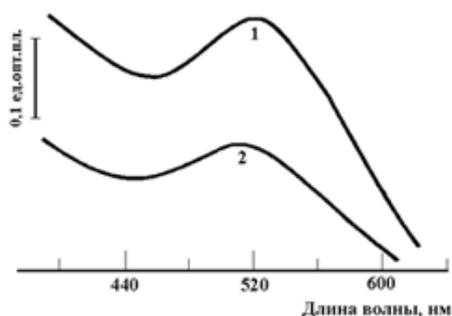


Рис. VI.21. Фотовосстановление НСТ оммохромами глаза стрекозы *Calopteryx splendens*. Кривая 1 – спектр после освещения неодимовым лазером (532 нм, мощность излучения 1,1 Вт/см²) в течение 20 мин; кривая 2 – спектр системы до освещения

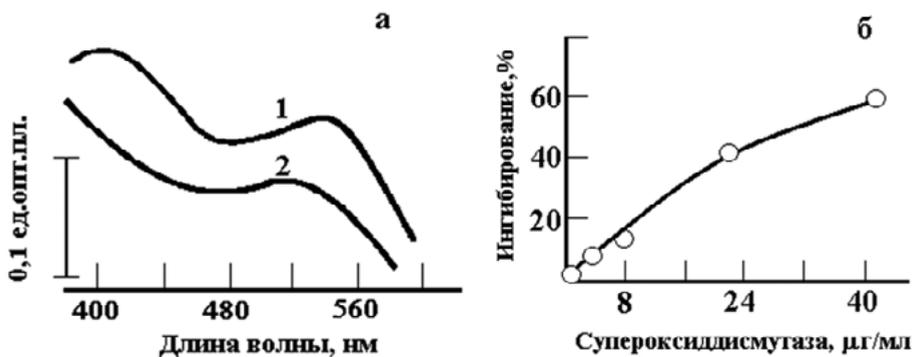


Рис. VI.22. Влияние супероксиддисмутазы на реакцию фотовосстановления НСТ оммохромами бабочки *Pieris brassicae*. а). предотвращение супероксиддисмутазой реакции фотовосстановления НСТ. Кривая 1 – без супероксиддисмутазы; кривая 2 – в присутствии 20 $\mu\text{г}/\text{мл}$ СОД. б). зависимость скорости фотовосстановления НСТ от концентрации супероксиддисмутазы. Время освещения – 20 мин лампой ДРК-120 со светофильтром ЖС-1

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Таким образом, оммохромы различных беспозвоночных способны к фотогенерации супероксидного радикала кислорода. Этот процесс, по-видимому, присущ только восстановленной форме оммохромов, поскольку окисленные оммохромы при освещении восстанавливают НСТ с гораздо меньшей скоростью (рис. VI.23).

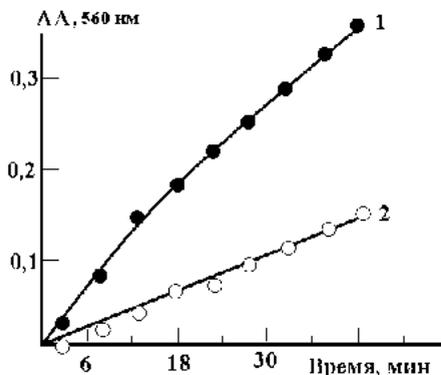


Рис. VI.23. Фотогенерация супероксида восстановленной и окисленной формами оммохромов криля. Освещение проводили лампой ДРК-120 без светофильтра. Кривая 1 – исходные оммохромы глаз криля (370 мкг/мл); кривая 2 – оммохромы в окисленной форме (740 мкг/мл)

При освещении оммохромы способны восстановить кислород до его анион-радикальной формы. Физиологическое значение этого процесса неясно. Вероятно, этот процесс протекает *in vivo* с незначительной скоростью и не создает опасности для фотоповреждения клетки.

Исходя из структурного сходства оммохромов с производными феноксазина, можно предположить, что они также могут восстанавливаться на свету. При этом оммохромы в восстановленной форме могут катализировать этот процесс. Такой механизм в тканях глаз беспозвоночных животных будет особенно эффективен, поскольку окисленные оммохромы, образовавшиеся в процессе взаимодействия, например с супероксидом, постоянно регенерируются на свету. Не исключена также возможность ферментативного восстановления окисленных оммохромов в темновых условиях.

Глава VII

РОЛЬ ЭКРАНИРУЮЩИХ ПИГМЕНТОВ ПОЗВОНОЧНЫХ МЕЛАНОСОМ В ПРОЦЕССАХ СТАРЕНИЯ И РАЗВИТИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЙ

1. Уменьшение содержания меланосом в клетках РПЭ при старении и развитии различных патологий

Меланосомы являются функциональными гранулами, активно участвующими в жизни клетки. Известно, что меланосомы диффундируют вдоль апикальных микровилл клеток РПЭ в процессе фагоцитоза отработанных дисков фоторецепторных клеток, как бы сопровождая процесс передвижения фагоцитированного материала вглубь клетки. Процесс старения приводит к значительным изменениям в клетках ретинального пигментного эпителия человека (Boulton, 1991; Boulton et al., 1990). Кроме различных биохимических и морфологических изменений, в этих неделящихся, пост митотических клетках с возрастом накапливаются липофусциновые гранулы (ЛГ) или «пигмент старости», а также сложные меланолипофусциновые гранулы (МЛГ) и при этом одновременно падает количество меланинсодержащих меланосом (МС) (Feeney-Burns, 1980). Если в возрастной группе до 20 лет меланосомы занимают примерно до 15% объема клетки РПЭ, то в возрастной группе 61-90 лет этот объем постепенно уменьшается до 3,5% (Feeney-Burns et al., 1984), а в возрастной группе 90-101 год меланосомы практически полностью исчезают (Feeney-Burns et al., 1990). Наоборот, общее количество липофусциновых и меланолипофусциновых гранул непрерывно возрастает. Концентрация меланосом в клетке РПЭ человека молодого возраста обычно составляет порядка 100 гранул/клетка (Boulton, 1998).

Количество меланосом в клетках РПЭ значительно уменьшается и при различных патологиях. Уменьшение содержания меланосом было выявлено при таких патологиях как, например, возрастная макулярная дегенерация сетчатки (Feeney, et al., 1965; Hуman et al., 1983; Weiter et al., 1985) и болезнь Штаргардта (Mellepat et al., 2021). Так, в работе Mellepat и др. было показано, что у мышей дефектных по гену *Abca4* (АТФ-binding cassette 4), отвечающему за функционирование АТФ-связывающего кассетного транспортера, обеспечивающего удаление из клетки полностью *транс*-ретиная, образующегося в ходе зрительного цикла, происходит значительное уменьшение количества меланосом в клетках РПЭ (рис. VII.1).

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

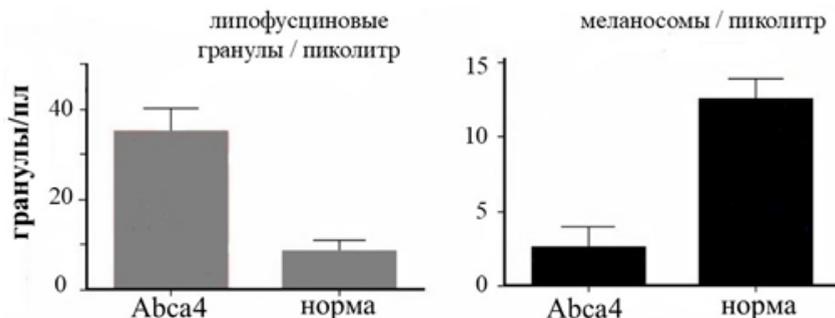


Рис. VII.1. Изменение концентрации МС и ЛГ в клетках РПЭ мышей мутантных по гену Abca4

Одновременно с падением содержания меланосом в клетке происходит значительное нарастание содержания липофусциновых гранул (болезнь Штаргардта). Уменьшение количества меланосом в клетке РПЭ с возрастом и при патологиях объясняет известный факт исчезновения меланина в клетках РПЭ. Так, показано, что с возрастом (после 40 лет) в клетках РПЭ происходит почти трехкратное уменьшение концентрации меланина (Feeney-Burns et al., 1984; Weiter et al., 1986; Sarna et al., 2003). Морфологические и ЭПР измерения показали, что в РПЭ человека в возрастной группе 20-30 лет содержится на 36% больше меланина, чем в возрастной группе 60-90 лет (Rozanowski et al., 2008). Это свидетельствует о процессах возрастной биodeградации меланина в клетках РПЭ. Однако этот процесс, вероятно, не связан с уменьшением концентрации меланина, содержащегося в меланосомах, а обусловлен биodeградацией самих меланосом. Так, путем измерения концентрации меланина методом ЭПР нами было показано (Гуляев и др., 1993; Сакина и др., 2018), что в меланосомах клеток РПЭ глаза человека она практически не меняется с возрастом (рис. VII.2).

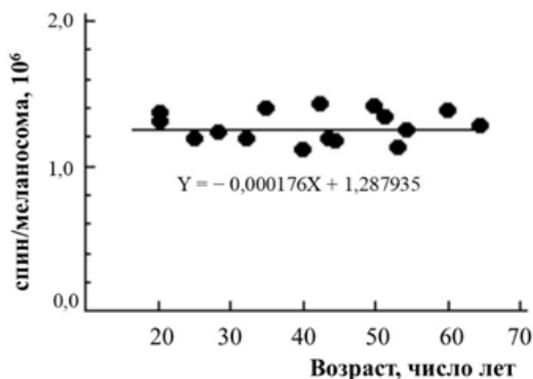


Рис. VII.2. Возрастная зависимость концентрации парамагнитных центров в меланосомах из клеток РПЭ человека

Видно, что концентрация меланина в меланосомах практически не меняется с возрастом. Эти данные были подтверждены позднее в работе Сакиной и др., 2018 по измерению концентрации меланина в двух видах гранул – в меланосомах и в меланолипофусциновых гранулах (табл. VII.1).

Табл. VII.1. Сравнение количества парамагнитных центров в меланосоме (МС) и меланолипофусциновой грануле (МЛГ) РПЭ доноров разных возрастных категорий

Образец	Возрастная категория (средний возраст, число глаз)	Концентрация парамагнитных центров в одной грануле, спин/гранула, 10^6		Отношение концентрации парамагнитных центров, [МС]/[МЛГ]
		МС	МЛГ	
1	35,4 ± 1,2; 18 глаз	3,0	2,0	1,50
	53,5 ± 1,0; 21 глаз	2,8	2,2	1,27
	63,6 ± 0,6; 19 глаз	3,0	2,3	1,30
2	48,4 ± 1,4; 15 глаз	3,2	1,1	2,91
	61,7 ± 1,2; 14 глаз	2,8	1,8	1,56
3	54,0 ± 0,9; 16 глаз	3,5	2,4	1,46
4	44,1 ± 0,6; 28 глаз	1,4	0,9	1,56
	59,1 ± 1,1; 13 глаз	0,8	0,9	0,89
	67,9 ± 0,6; 16 глаз	0,8	0,8	1,0

Концентрации спинов была определена с помощью эталона УДА № 5, сертификат о калибровке № 905/910-2012. В среднем, по всем изученным глазам (160 глаз, $p < 0,05$) концентрация парамагнитных центров, отнесенная на одну гранулу, составляла $(2,37 \pm 0,36) \times 10^6$ и $(1,60 \pm 0,22) \times 10^6$ для меланосом и меланолипофусциновых гранул соответственно.

В целом результаты свидетельствуют о том, что значительных изменений в содержании меланина в меланосоме с возрастом не происходит. Это означает, что падение концентрации меланина с возрастом вероятнее всего связано с уменьшением содержания меланосом в клетке РПЭ. Однако конкретные механизмы деградации меланосом в клетках РПЭ не известны. Обсуждаются, по крайней мере, три возможных механизма, которые могли бы объяснить возрастное исчезновение содержания меланина в клетке РПЭ. Предполагается, во-первых, что меланосомы подвергаются экзоцитозу из клетки РПЭ, во-вторых, меланосомы подвергаются разрушению в клетке РПЭ лизосомальными ферментами и, в-третьих, меланосомы подвергаются химической деградации в окислительных или фотоиндуцированных реакциях. Однако первое предположение не нашло экспериментального подтверждения, поскольку меланосомы никогда не находили ни в мембране Бруха, ни в межфоторецепторном матриксе. Второе предположение подтверждается известными фактами возрастания числа меланолизосомальных гранул в клетках РПЭ с возрастом (Novikoff et al., 1979; Schraermeyer, 1993; Schraermeyer, Stieve, 1994; Schraermeyer, Dohms, 1996; Schraermeyer et al., 1999). Однако слияние меланосомы и лизосомы, по-видимому, может привести только к деградации белковой части гранулы протеолитическими ферментами. Сам же меланин будет оставаться неповрежденным, так как лизосомы не содержат ферменты, способные расщеплять полимер меланина (Ohtaki, 1970; Saito, Seiji, 1973; Saito, Seiji, 1976). Третье предположение – химическая деградация меланосом в окислительных и фотоокислительных

процессах, по-видимому, наиболее вероятна. Так, хорошо известно, что эумеланины подвергаются окислительному распаду под действием ультрафиолета и/или пероксида водорода (Коржова и др., 1989; Wakamatsu et al., 2012; Донцов и др., 2015). Действительно, было показано, что с возрастом происходит окислительная деструкция меланина в меланосомах, которая выявляется по увеличению флуоресценции и по возрастанию поглощения кислорода меланосомами у людей пожилого и старого возрастов (Rozanowska et al., 2002; Sarna et al., 2003). Однако если этот процесс распада будет интенсивно проходить в самих меланосомах, то в клетке РПЭ будут накапливаться гранулы, содержащие различное количество меланина, имеющие разную плотность и дающие множество полос при их разделении в градиенте плотности сахарозы, что не подтверждается экспериментальными данными. С другой стороны, меланин меланосом может подвергаться распаду в составе других гранул. Так, было предположено, что меланин может подвергаться окислительной деструкции в составе меланолипофусциновых гранул (Warburton et al., 2007). В этом случае будут образовываться смешанные гранулы с различным содержанием меланина. Однако в данной работе (Warburton et al., 2007) и в их последующих публикациях не были приведены никакие доказательства этого предположения.

2. Возможные механизмы, приводящие к разрушению меланосом в клетках РПЭ

2.1. Разрушение меланосом под действием УФ-облучения и интенсивного видимого света

Сравнительно недавно было показано, что дигидроксииндолкарбоновые мономерные звенья эумеланина подвергаются под действием ультрафиолета окислительному распаду с образованием свободных пиррол-3-карбоновых кислот (Wakamatsu et al., 2012). В ходе деструкции меланина образуются флуоресцирующие продукты распада (Kayatz et al., 2001; Elleder, Borovansky, 2001; Borovansky, Elleder, 2003). Процесс деструкции меланина может быть вызван также облучением интенсивным видимым светом. Так, в работе (Zadlo et al., 2006) показано, что длительное (в течение, приблизительно, 984 часов) облучение меланосом из РПЭ быка в присутствии кислорода интенсивным светом в области 348-591 нм (УФА-видимый свет) приводит к падению вдвое концентрации меланина, определяемой по интенсивности сигнала ЭПР. Однако облучение меланосом в тех же условиях в течение меньшего, но все же значительного по величине времени (500 часов), уже не приводило к уменьшению в них концентрации меланина (Zadlo et al., 2006). Это свидетельствует о высокой устойчивости меланосом к действию интенсивного УФА-видимого облучения. Действительно, как показали дальнейшие эксперименты, для разрушения пигмента при облучении меланина интенсивным видимым светом и ультрафиолетом необходимо чрезвычайно длительные времена об-

лучения (Донцов и др., 2015; Островский, Донцов, 2018). При относительно небольших временах экспозиции (часы) меланин не разрушается и не теряет своей антиоксидантной активности. На рис. VII.3 показано изменение антиоксидантной активности ДОФА-меланина, аскорбата и глутатиона при их облучении УФ-видимым светом.

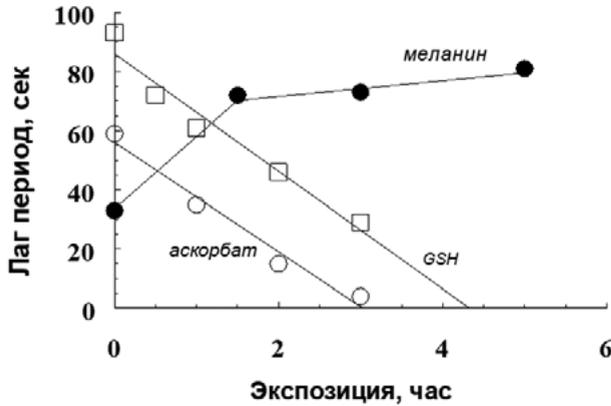


Рис. VII.3. Уменьшение антиоксидантных свойств аскорбата и глутатиона, но не меланина при действии ультрафиолетового облучения. По ординате – латентный период задержки хемилюминесценции люминола; по абсциссе – время облучения дуговой ртутно-кварцевой лампой

Видно, что антиоксидантная активность аскорбата и глутатиона резко падает, в то время как способность меланина тушить хемилюминесценцию люминола даже несколько возрастает. Эти результаты свидетельствуют о том, что не слишком длительное (до 5 часов) УФ-облучение меланина не приводит к сколько-нибудь значительным разрушениям полимера. Подтверждением этому служат результаты экспериментов по сравнительному измерению антиоксидантной активности нативных и УФ-облученных меланинов. На рис. VII.4 приведена кинетика накопления ТБК-активных продуктов при Fe^{2+} -индуцированной пероксидации кардиолипидных липосом (контроль). Меланосомы, выделенные из РПЭ глаза быка, эффективно ингибировали этот процесс. При этом меланосомы, подвергнутые УФ-облучению в течение 3,5 часов, оказались столь же эффективными ингибиторами, что и нативные, необлученные меланосомы (кривые 2 и 3).

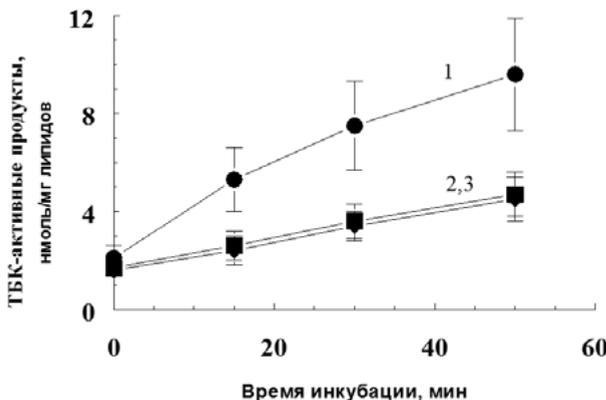


Рис. VII.4. Влияние меланосом из клеток РПЭ глаза быка на кинетику накопления продуктов пероксидации кардиолипидных липосом. Облученные (2) и необлученные (3) меланосомы добавлены в равных концентрациях – 3×10^7 гранул/мл. Контроль – накопление ТБК-активных продуктов в отсутствие меланосом

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

И только намного более длительное облучение ДОФА-меланина и меланосом УФ-видимым светом приводит к уменьшению их антирадикальной активности, определяемой по степени тушения хемилюминесценции люминола (рис. VII.5). Видно, что если 7-часовое облучение вызывает лишь небольшое уменьшение способности тушить хемилюминесценцию люминола, то 32-часовое облучение приводило к значительному, хотя не катастрофическому, падению антирадикальной активности ДОФА-меланина. Эксперименты, таким образом, подтверждают высокую устойчивость меланинов к деструктивному действию света. Даже жесткое и длительное УФ-облучение (длина волн от 190 нм и выше) ДОФА-меланина не приводило к значительному уменьшению способности пигмента проявлять антиоксидантное действие.

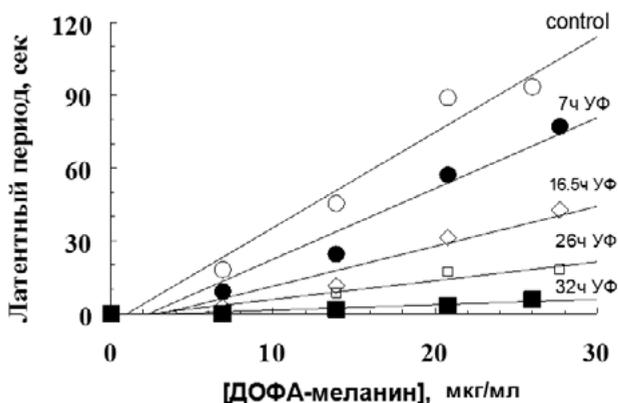


Рис. VII.5. Зависимость продолжительности латентного периода инициации хемилюминесценции люминола от концентрации темного (контроль) и подвергнутого УФ-облучению в течение 7 – 32 часов ДОФА-меланина

Таким образом, разрушение меланина ультрафиолетом или интенсивным видимым светом требует больших энергий облучения и длительных экспозиций. Следует отметить, что структуры глаза – роговица, хрусталик и стекловидное тело – практически не пропускают коротковолновый ультрафиолет к клеткам РПЭ, содержащим меланин. Маловероятно также, чтобы видимый свет такой большой интенсивности и длительности, который используется для разрушения меланина в эксперименте, когда-либо воздействовал на сетчатку глаза в условиях *in vivo*. Поэтому разрушение меланина РПЭ меланосом по этим причинам, как правило, исключено для глаза, но может иметь место для меланина волос и кожных покровов, подвергающихся непосредственному воздействию солнечного света.

2.2. Разрушение меланосом под действием окислителей – пероксида водорода и супероксидных радикалов

Нами было показано, что, несмотря на то, что как ДОФА-меланин, так и меланосомы РПЭ глаза быка чрезвычайно резистентны к действию ультрафиолетового и интенсивного видимого света, они сравнительно легко разрушаются в темноте в присутствии миллимолярных количеств пероксида водорода (Донцов и др., 2015). В связи с этим можно полагать, что деструкция меланина ме-

ланосом в процессе старения обусловлена неким окислителем, регулярно образующимся в этих клетках в ходе нормальной жизнедеятельности. Более того, концентрация этого окислителя в клетках РПЭ должна нарастать с возрастом, и он должен быть способен вызвать полную деградацию меланосомы. Такими активными молекулами, способными вызвать деструкцию меланина, могут быть супероксидные радикалы. Супероксидные радикалы могут генерироваться в значительных количествах как в ходе темновых процессов, например, в дыхательной цепи митохондрий, так и при действии видимого света. Источник постоянной фотоиндуцированной генерации супероксидных радикалов в клетке РПЭ давно известен. Это липофусциновые гранулы, которые при облучении видимым светом, особенно в синем спектральном диапазоне, восстанавливают кислород до супероксидных радикалов (Островский и др., 1992; Boulton et al., 1993). При этом интенсивность генерации супероксида липофусциновыми гранулами должна усиливаться с возрастом, поскольку количество этих гранул резко возрастает при старении.

Действительно, как нами было показано, супероксидные радикалы приводят одновременно как к уменьшению численности меланосом, так и к падению в них концентрации парамагнитных центров. Работа была выполнена на меланосомах, выделенных из клеток РПЭ кадаверных глаз человека, любезно предоставленных глазным банком МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова, а также на меланосомах клеток РПЭ глаза быка и меланине чернильного мешка каракатицы. Продукты деградации меланинов при действии света и супероксидных радикалов регистрировали по накоплению низкомолекулярных флуоресцирующих соединений, которые измеряли при длине волны возбуждающего света 440–470 нм (Kayatz et al., 2001). Для этого низкомолекулярные продукты деградации были отделены от неразрушенной части полимера с помощью центрифугирования образцов (6000xg) в пробирках, содержащих фильтрующий элемент “Amicon Ultra-0,5 ml, 3K (Millipore). Интенсивность эмиссии была измерена на спектрофлуорофотометре «Shimadzu RF5301PC» (Япония). Концентрация продуктов фотодеструкции меланина была оценена путем сопоставления спектров флуоресценции облученных образцов, содержащих флуорофоры, с темновым контролем. В качестве второго контроля использовали облученные образцы, содержащие меланин и не содержащие флуорофор. Реакцию меланинов с супероксидными радикалами проводили в 0,1 М К-фосфатном буфере при интенсивном перемешивании. В качестве источника супероксида использовали продажный надпероксид калия либо в виде порошка, либо как однородную суспензию в диметилсульфоксиде. После окончания реакции продукты деградации отделяли от оставшегося меланина с помощью центрифугирования. Для облучения образцов использовали синюю светодиодную лампу (длина волны облучения 450 нм) на расстоянии 5 см от объекта при постоянном перемешивании.

Регистрацию спектров ЭПР образцов проводили при 77°K на радиоспектрометре ЭПР «Bruker EMX (Germany) в цилиндрическом резонаторе. Условия записи спектров ЭПР: ΔH развертка – 50 Гс; H центр – 3440 Гс; амплитуда

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

модуляции – 3 Гс, мощность СВЧ – 20 мкВт. Эталон для определения концентрации спинов – УДА №5, сертификат о калибровке № 905/910-2012.

Эксперименты показали, что супероксидные радикалы могут вызвать полную деградацию меланосом, что приводит к образованию прозрачного раствора, содержащего водорастворимые флуоресцирующие продукты распада меланина, исчезновению сигнала ЭПР и полной потере антиоксидантных свойств пигмента (Донцов и др., 2017). Инкубация суспензии меланосом РПЭ человека с относительно невысокими концентрациями супероксида калия приводит к просветлению суспензии и значительному уменьшению величины поглощения в длинноволновой области спектра. При этом происходит усиление поглощения в коротковолновой области спектра (при длине волн менее 400 нм), что, вероятно, связано с накоплением в среде инкубации водорастворимых продуктов деструкции меланина. Действительно, как видно из рис. VII.6а, добавление надпероксида калия к суспензии меланосом РПЭ человека приводит к появлению водорастворимых продуктов (с эмиссионным максимумом при 520 нм), которые могут быть легко отделены от неразрушенной части меланосом центрифугированием или фильтрацией.

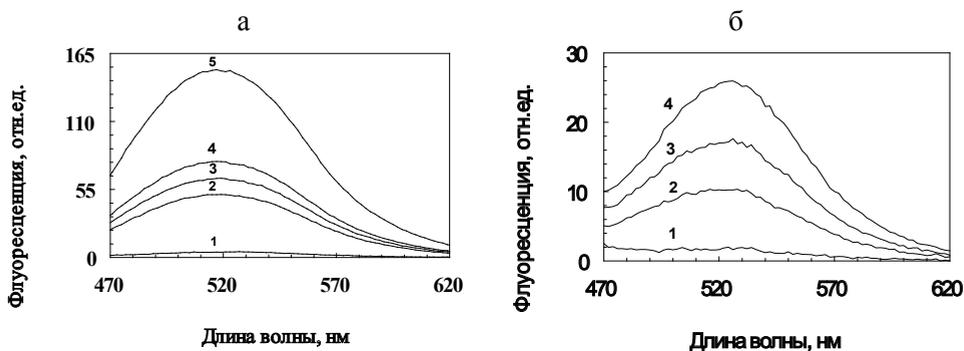


Рис. VII.6. Накопление флуоресцирующих продуктов деструкции меланосом. а. Накопление продуктов деструкции меланосом РПЭ человека в зависимости от продолжительности инкубации в присутствии супероксидных радикалов. Реакционная среда содержала 0,1 М К-фосфатный буфер (рН 7,4), $1,4 \times 10^8$ гранул/мл меланосом, 60 мМ K_2O_2 ; кривые 1 – 5 это 0 мин, 30 мин, 60 мин, 90 мин и 180 мин инкубации, соответственно. Длина волны возбуждения – 450 нм. б. Накопление продуктов деструкции меланосом РПЭ быка в зависимости от концентрации супероксида. Реакционная среда содержала 0,1 М К-фосфатный буфер (рН 7,4), 10^8 гранул/мл меланосом быка и различные концентрации супероксида (1 – 0; 2 – 35 мМ; 3 – 70 мМ; 4 – 210 мМ). Время инкубации меланосом с супероксидом – 30 мин, длина волны возбуждения – 450 нм

Эти водорастворимые продукты имеют максимум эмиссии в области 520–525 нм (при длине волны возбуждающего света 450–470 нм) в зависимости от природы исходного меланинового пигмента. Инкубация меланосом или меланинов различного происхождения с надпероксидом калия также приводит к появлению водорастворимых флуоресцирующих продуктов с таким же максимумом эмиссии, как и в случае с меланосомами РПЭ человека. На рис. VII.6б

показаны эмиссионные спектры продуктов деструкции меланина меланосом из РПЭ глаза быка. Хорошо видно, что 30-минутная инкубация меланинсодержащего образца с надпероксидом калия приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции водорастворимой фракции, тем более выраженной, чем выше концентрация добавленного супероксида. Важно заметить, что процесс деструкции меланина супероксидными радикалами, сопровождающийся появлением флуоресцирующих продуктов, происходит в нормальных физиологических условиях среды – водная среда без добавления органических растворителей, физиологическое значение pH (7,4), комнатная температура.

Процесс накопления продуктов деструкции меланосом при их взаимодействии с надпероксидом калия имеет линейный характер при больших временах реакции. На рис. VII.7а показана приборная запись нарастания интенсивности эмиссии при 520 нм (возбуждение 450 нм) суспензии меланосом РПЭ человека при добавлении 37 мМ надпероксида калия.

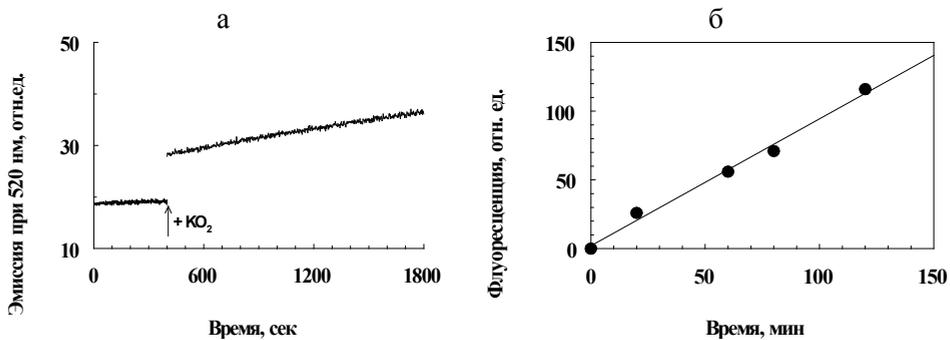


Рис. VII.7. Кинетика деструкции меланосом РПЭ человека а. Начальная кинетика нарастания эмиссии при 520 нм после добавления супероксида калия к суспензии меланосом. Среда инкубации содержала 0,1 М К-фосфатный буфер, 7×10^7 гранул/мл меланосом и 37 мМ KO_2 . б. Кинетика накопления флуоресцирующих продуктов деструкции меланосом человека. Среда инкубации содержала 0,1 М К-фосфатный буфер (pH 7,4), $1,3 \times 10^8$ гранул /мл меланосом и 60 мМ KO_2

В этих опытах флуоресцирующие продукты деструкции меланина не отделяли от неразрушенной части пигмента. Поэтому для минимизации эффекта тушения флуоресценции продуктов распада черным меланином использовали суспензии меланосом, имеющих небольшие показатели абсорбции при 450 нм. Видно, что непосредственно после добавления KO_2 к суспензии меланосом наблюдается постепенное увеличение интенсивности флуоресценции, которое имеет строго линейный характер. На рис. VII.7б представлена кинетика накопления продуктов деструкции меланосом РПЭ человека при действии 60 мМ концентрации надпероксида. Хорошо видно, что процесс имеет линейный характер, а скорость накопления продуктов деструкции в этом случае составляет примерно 1 относительную единицу за 1 минуту инкубации.

Реакция меланосом с супероксидом приводит не только к деструкции меланина меланосом, сопровождающейся накоплением флуоресцирующих про-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

дуктов, но и к деградации и исчезновению самих меланосом как органелл. Это хорошо видно из рис. VII.8а, где показана зависимость количества меланосом в образце от концентрации надпероксида калия.

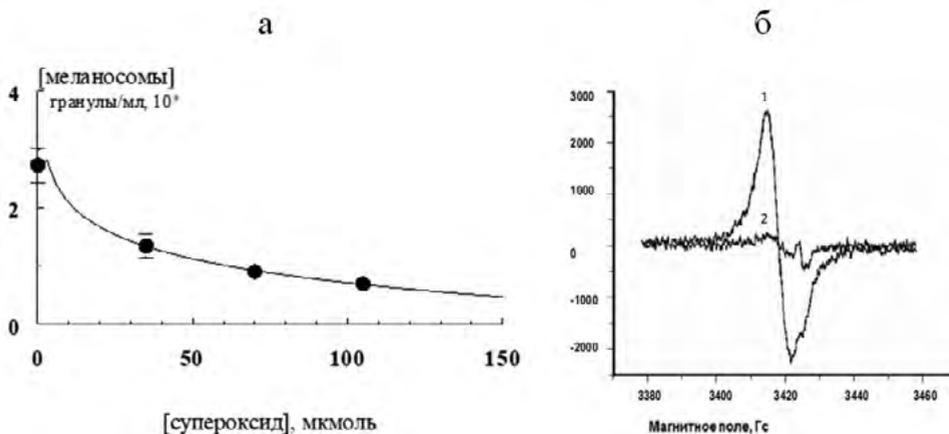


Рис. VII.8. Дегградация меланосом РПЭ человека супероксидом калия. а) Супероксид вызывает уменьшение концентрации меланосом. Начальная концентрация меланосом составляла $2,7 \times 10^8$ гранул/мл; время инкубации – 2 часа. б. Потеря парамагнитных свойств меланосом после их инкубации в присутствии надпероксида калия

В этих экспериментах к одинаковой начальной концентрации суспензии меланосом добавляли надпероксид калия в различных концентрациях и после двухчасовой инкубации микроскопически снова определяли количество меланосом в образце. Для измерения сигнала ЭПР образцы, содержащие 2×10^7 гранул/мл меланосом, были разделены на две одинаковые пробы. Первая проба служила контролем, а во второй пробе был добавлен KO_2 . Обе пробы инкубировали в течение 2 часов, после чего замораживали в жидком азоте и измеряли интенсивность сигнала ЭПР.

Показано, что при концентрации супероксида 100 мМ через два часа инкубации наблюдается почти трехкратное падение численности меланосом в образце. Повышая концентрацию супероксида до 170–180 мМ, можно добиться полной дегградации всех изначально присутствующих в суспензии меланосом. При этом суспензия становится прозрачной, а микроскопический контроль показывает полное отсутствие видимых гранул. В этих условиях наблюдается также исчезновение первоначального сигнала ЭПР меланина, что свидетельствует о практически полном разрушении полимера (рис. VII.8б, кривые 1 и 2, соответственно).

Таким образом, супероксидные радикалы вызывают как уменьшение содержания меланина в пределах одной меланосомы, так и приводят к общему падению концентрации самих меланосом. Полученные результаты свидетельствуют о том, что независимо от природы меланина, будь то меланин меланосом РПЭ глаза человека или быка или синтетический ДОФА-меланин, супероксидные радикалы при физиологических рН и в отсутствии органических раство-

рителей вызывают химическую деструкцию структуры меланина с образованием флуоресцирующих метаболитов с максимумом эмиссии при 520–525 нм, завершающуюся полной деградацией меланосомы как внутриклеточной органеллы. Идентичность спектров флуоресценции продуктов распада меланина различного происхождения свидетельствует, по-видимому, о схожей структуре этих молекул и позволяет по их спектрам флуоресценции качественно и количественно идентифицировать меланины.

Механизм деструкции меланина супероксидом неясен. Он может быть связан как с непосредственным взаимодействием молекулы супероксида с мономерными звеньями меланинового полимера, так и с формированием других активных молекул, например, гидроксильных радикалов, способных разорвать связи в полимере. Известно, что супероксидные радикалы в определенных условиях способны формировать как пероксид водорода, так и высоко активные гидроксильные радикалы (Chedekel et al., 1978). Вопрос о том, участвуют ли гидроксильные радикалы и/или пероксид водорода в процессе деструкции меланина меланосом надпероксидом калия, требует отдельной проверки. Однако, супероксид, который может вырабатываться в клетках РПЭ в больших количествах, является, по-видимому, ключевой молекулой, инициирующей весь процесс деградации меланина.

Кинетика деструкции меланина супероксидом калия имеет линейный характер и при достаточном количестве молекул супероксида наблюдается полная деградация меланосомы. Об этом свидетельствуют данные о падении интенсивности сигнала ЭПР и об уменьшении количества гранул меланосом при их взаимодействии с супероксидом (рис. VII.8). Деструкция меланина в меланосоме приводит к уменьшению концентрации парамагнитных центров в пересчете на одну гранулу. После разрушения меланина микроскопически наблюдается исчезновение меланосомы, как отдельной гранулы и образование прозрачного раствора, имеющего максимум абсорбции при 280 нм. Обработка этого раствора 10% трихлоруксусной кислотой приводит к выпадению осадка и исчезновению максимума абсорбции при 280 нм в супернатанте. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что белковая часть меланосомы, ранее связанная с меланином в прочный комплекс, освобождается и переходит в растворенное состояние. Полученные данные о зависимости уменьшения количества меланосом РПЭ человека от концентрации супероксида позволяют оценить количество молекул супероксида, необходимое для полной деградации одной меланосомы. В наших экспериментах для полного разрушения $2,7 \times 10^8$ меланосом требовалось в среднем 175 ± 25 μ молей супероксида. Для полной деградации одной меланосомы необходимо, таким образом, 650 ± 100 фемтомолей супероксида. Известно (Boulton et al., 1993), что в клетке РПЭ человека, содержащей примерно 700 липофусциновых гранул, при относительно слабом облучении синим светом ($1,5$ мВт/см²) образуется 0,56 фемтомолей супероксида в одну минуту. Отсюда следует, что при такой активности требуется менее суток (приблизительно 19 часов) для генерации 650 фемтомолей супероксида, необходимых для полной деструкции одной меланосомы.

Совершенно очевидно, что образовавшиеся в клетке свободные супероксидные радикалы могут вступать в реакцию не с одной меланосомой, а сразу с несколькими меланосомами, как вероятно и с другими компонентами клетки. Это будет приводить к накоплению в клетке РПЭ меланосом с различным количественным содержанием меланина. Однако, как уже упоминалось (раздел 1, главы VII), наблюдающееся при старении уменьшение концентрации меланина в клетках РПЭ связано не с общим падением его содержания в меланосомах, а с уменьшением их числа, поскольку концентрация меланина, отнесенная на одну меланосому, с возрастом не изменяется (Гуляев и др., 1993; Сакина и др., 2018). Уменьшение числа меланосом и их деструкция супероксидными радикалами может происходить в случае слияния меланосомы и липофусциновой гранулы с образованием промежуточной меланолипофусциновой гранулы. В этих промежуточных гранулах и может происходить деструкция меланина под действием супероксидных радикалов, образующихся при действии света на флуорофоры липофусциновой гранулы. В этом случае количество меланина, отнесенное к одной грануле, должно быть меньше в меланолипофусциновой грануле, чем в меланосоме. Это подтверждается нашими данными по измерению интенсивности сигнала ЭПР в меланосомах и меланолипофусциновых гранулах (табл. VII.1). В среднем по всем опытам концентрация меланина в пересчете на одну гранулу была в меланолипофусциновой грануле на $32,5 \pm 10,4\%$ ниже, чем в меланосоме. Это свидетельствует о том, что возможной причиной возрастного уменьшения содержания меланина в клетках РПЭ человека является уменьшение количества меланосом, вследствие их слияния с липофусциновыми гранулами и дальнейшей фотоиндуцированной деструкции пигмента супероксидными радикалами, образующимися при поглощении света флуорофорами липофусцина (см. раздел 4, главы VII).

3. Токсичность продуктов окислительного распада меланосом для клеток РПЭ

Известно, что окислительная деструкция меланосом приводит к уменьшению их антиоксидантных и антирадикальных свойств и, напротив, к появлению прооксидантной активности (Zadlo et al., 2007; Rozanowski et al., 2008; Zadlo et al., 2009; Островский, Донцов, 2018; Olchawa et al., 2020). Так, показано, что меланосомы, подвергнутые сильному облучению сверхмощным видимым светом или длительному УФ-облучению, уменьшают свою антиоксидантную активность (рис. VII.9, а и б).

Потеря антиоксидантных свойств меланином связана с деструкцией полимерной молекулы и особенно выражена при деградации пигмента такими оксидантами, как пероксид водорода и супероксид анион-радикал. Процесс деструкции меланосом приводит к уменьшению антиоксидантной защиты в клетках РПЭ не только из-за ослабления защитной роли меланина, но и, что более существенно, из-за образования водорастворимых продуктов распада, которые, как показали наши исследования, токсичны для клеток РПЭ. Это связа-

но с тем, что продукты окислительного распада меланосом содержат активные карбонилы и являются фотоактивными, вызывая генерацию активных форм кислорода при облучении видимым светом синего спектрального диапазона.

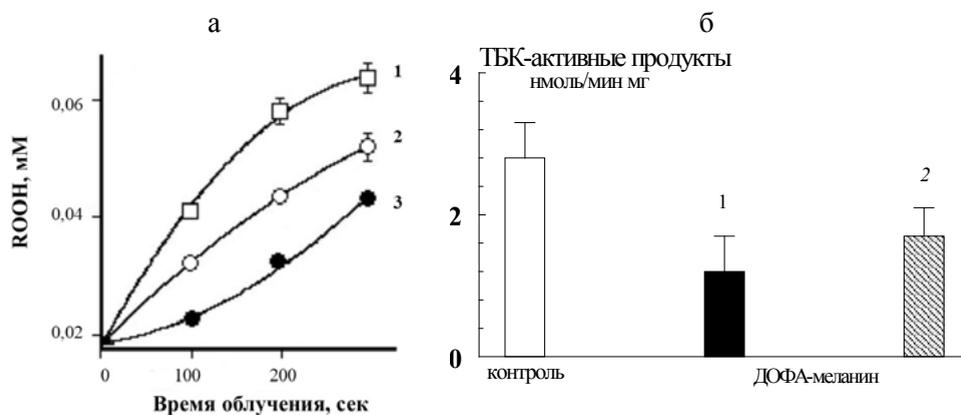


Рис. VII.9. Уменьшение антиоксидантных свойств меланина при его деструкции. а. Сравнение ингибирующей активности нативных и частично фото обесцвеченных меланосом РПЭ быка в отношении накопления гидроперекисей липидов сетчатки (ROOH) при фотоиндуцированной перекисидации. 1 – контроль; 2 – добавлено 10^9 гранул/мл разрушенных на 50% (по уменьшению сигнала ЭПР) меланосом; 3 – добавлено 10^9 гранул/мл исходных меланосом (Zadlo et al., 2009). б. Сравнение ингибирующей активности ДОФА-меланина на скорость УФ-индуцированной перекисидации кардиолипиновых липосом. Столбик черного цвета – добавлено 25 $\mu\text{г}/\text{мл}$ исходного ДОФА-меланина, полосатый столбик – добавлено 25 $\mu\text{г}/\text{мл}$ ДОФА-меланина, предварительно облученного УФ в течение 32 часов (Островский, Донцов, 2018)

3.1. Образование реактивных карбониллов при деструкции меланосом супероксидными радикалами

Нами было впервые обнаружено (Гулин и др., 2022; Dontsov et al., 2023), что окислительная деструкция РПЭ пигментных гранул – меланосом и меланолипофусциновых гранул, так же, как и других меланинсодержащих природных и синтетических продуктов, а именно меланосом из клеток РПЭ глаза быка, меланина чернильного мешка кальмара (сепиомеланина), меланина антарктических дрожжей и ДОФА-меланина, приводит к образованию ТБК-активных продуктов, содержащих высокоактивные дикарбонильные соединения. В этих экспериментах продукты, накапливающиеся в результате фотоокислительной деструкции в образцах супернатантов, полученных из различных меланинов, оценивали на содержание реактивных карбониллов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты), концентрацию которых определяли спектрофотометрически при длине волны 532 нм. Контролем служили исходные, не окисленные образцы супернатантов из меланинов.

Эксперименты показали, что окислительная деструкция всех исследованных меланинов и меланинсодержащих органелл приводит к образованию

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

водорастворимых продуктов, содержащих карбонильные соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (рис. VII.10а). Степень окислительной деструкция меланина зависела от соотношения меланин/супероксид. Повышение концентрации супероксида приводило к усилению аккумуляции ТБК-активных продуктов (рис. VII.10б). Концентрация этих продуктов, конечно, значительно ниже концентрации ТБК-активных продуктов, образующихся при окислительном распаде липофусциновых гранул и флуорофора А2Е, но все же вполне достаточная для инициации процессов модификации белков. Расчеты показывают, что 1 мг ДОФА-меланина при полной окислительной деструкции приводит к образованию 20 пикомолей ТБК-активных продуктов.

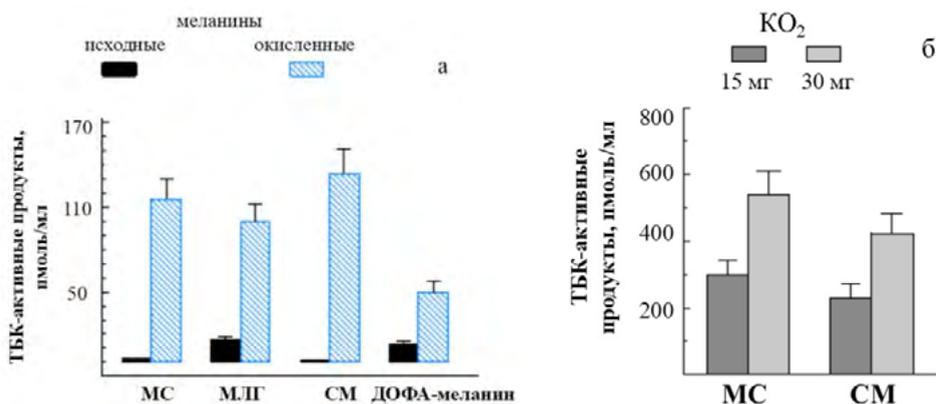


Рис. VII.10. Образование ТБК-активных продуктов в водорастворимых фракциях, полученных при действии супероксида на различные меланины. а. Сравнение содержания карбониллов в исходных и окисленных меланинах. МС – меланосомы клеток РПЭ глаза человека, МЛГ – меланолипофусциновые гранулы из клеток РПЭ глаза человека, СМ – сепиомеланин. б. Повышение степени окисленности меланинов радикалами супероксида приводит к увеличению образования ТБК-активных продуктов (для окисления добавляли 15 мг и 30 мг надпероксида калия)

Если учесть, что одна клетка РПЭ человека содержит 10–20 пикограмм меланина, а объем этой клетки составляет 2×10^{-9} мл, можно подсчитать, что полная деструкция меланина приведет к образованию в клетке РПЭ примерно 0,3 нмоля ТБК-активных продуктов. Это достаточно много для проявления токсического действия активных карбониллов. Было также установлено, что эти альдегиды и кетоны достаточно стабильны, так как при хранении образцов в течение 5 дней при 40°С содержание в них ТБК-активных продуктов практически не менялось. Т.е. эти соединения стабильны, если в смеси с ними нет веществ, с которыми они могли бы прореагировать. Появление таких долгоживущих и химически активных веществ при окислительной деструкции меланина может вносить свой вклад в развитие различных старческих патологий глаза.

Образование альдегидов при окислительной деструкции меланосом клеток РПЭ глаза человека было показано также масс-спектрометрическими измерениями (Dontsov et al., 2023). Масс-спектры были получены на времяпролет-

ном масс-спектрометре вторичных ионов TOF.SIMS.5 (ION-TOF, Германия) с висмутовым кластерным пучком, который регулярно используется для биологических исследований. Область анализа 300×300 мкм (64×64 пикселя) зондировали первичными ионами Bi^{3+} с энергией 30 кэВ с плотностью дозы первичных ионов $\sim 4 \times 10^{11}$ ионов/см² в каждом измерении. Было зарегистрировано не менее 10 измерений для каждого образца, как в режиме положительных, так и в режиме отрицательных ионов. Во время анализа была активирована электронная пушка. Из-за высокой энергии первичных ионов на масс-спектре биологических образцов, как правило, преобладают пики характерных фрагментарных ионов. Масс-спектры обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения SurfaceLab 7. Для количественной оценки изменений, связанных с фотоокислением, рассчитывали выходы вторичных ионов, как количество ионов с определенной массой, деленное на общее количество ионов. Как видно из диаграммы (рис. VII.11), наблюдается значительное увеличение карбонильных ионов ($m/z = 29$ – ион CHO^+ , $m/z = 60$ – ион $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2^+$, $m/z = 69$ – ион $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}^+$) после воздействия супероксида. Ион с $m/z = 60$ показывает наибольший рост (примерно в 1,5 раза).

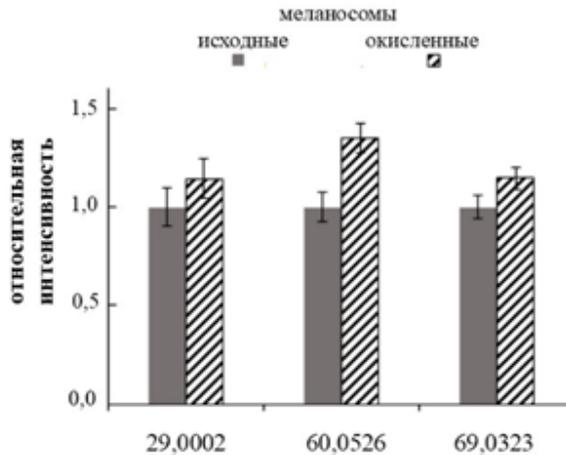


Рис. VII.11. Гистограмма сигналов карбонильных ионов в образцах меланосом из РПЭ человека при деструктивном воздействии KO_2

Полученные результаты свидетельствуют о наличии альдегидов в водорастворимых продуктах деградации, образующихся при окислении меланосом супероксидными радикалами.

Водорастворимые продукты, образующиеся при окислении меланосом из РПЭ глаза человека, меланина чернильного мешка кальмара и ДОФА-меланина вызывают модификацию сывороточного альбумина с образованием флуоресцирующих оснований Шиффа. Процесс модификации белков водорастворимыми фракциями окислительного распада меланинов оценивали по образованию флуоресцирующих оснований Шиффа в реакции между свободными аминокруппами белков и альдегидами. В качестве белкового субстрата исполь-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

зовали бычий сывороточный альбумин (БСА). Среда инкубации содержала: 0,1 М стерильный калий-фосфатный буфер, pH 7,4; 2–4 мг/мл БСА, 3–4 мМ азид натрия и 0,4–0,7 мл водорастворимых фракций из облученных и необлученных (контроль) меланинов. В качестве дополнительных контрольных образцов использовали пробы, не содержащие водорастворимых фракций. Образцы инкубировали при 37° С в темноте при постоянном перемешивании в течение 1–2 суток. После инкубации аликвоты образцов диализировали против фосфатного буфера для удаления непрореагировавших низкомолекулярных молекул. Для диализа использовали целлюлозно-эфирную мембрану Float-A-Lyser (“SPECTRUM Labs”, США), пропускающую молекулы с молекулярной массой менее 3,5 кДа. Диализ проводили в течение 25 ч при 6° С. После диализа измеряли спектр флуоресценции модифицированных белков при длине волны возбуждающего света 365 нм. Содержание модифицированных белков оценивали по величине амплитуды флуоресценции образовавшихся продуктов, измеряемой в максимуме эмиссии при 435–445 нм.

Инкубация БСА при 37° С в течение 48 часов в присутствии водорастворимых продуктов деструкции меланосом РПЭ человека (рис. VII.12а, кривая 2) и синтетического ДОФА-меланина (кривая 3) приводит к значительному увеличению интенсивности флуоресценции альбумина по сравнению с контрольными образцами (кривая 1), в которых наблюдается лишь незначительное нарастание интенсивности флуоресценции.

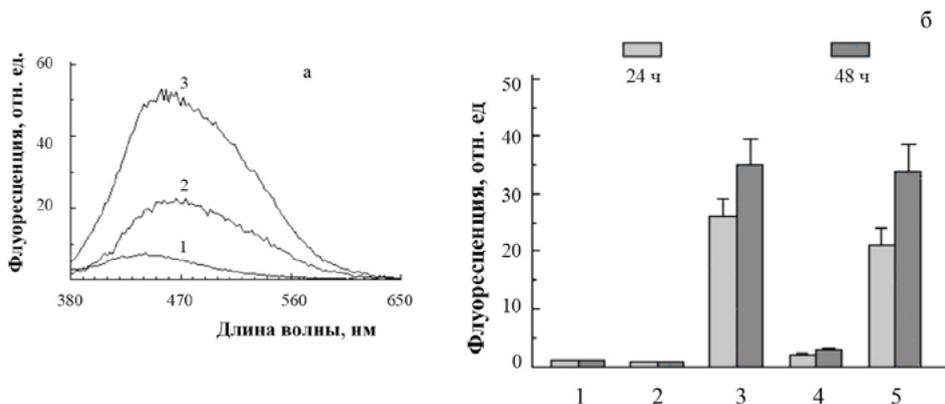


Рис. VII.12. Модификация БСА водорастворимыми продуктами окисления меланинов. а. Спектр флуоресценции альбумина, модифицированного водорастворимыми продуктами деструкции меланосом из клеток РПЭ человека (кривая 2) и синтетического ДОФА-меланина (кривая 3). Инкубирование 48 часов при 37° С. Кривая 1 (контроль) – чистый альбумин без добавок. б. Кинетика накопления модифицированного альбумина в реакции с водорастворимыми фракциями меланинов. 1 – контроль, 2 – нативные РПЭ меланосомы, 3 – окисленные РПЭ меланосомы, 4 – исходный сепиомеланин, 5 – окисленный сепиомеланин

Это свидетельствует об образовании оснований Шиффа при реакции между аминокруппами альбумина и альдегидами, содержащимися в водорастворимых фракциях окисленных меланосом и ДОФА-меланина. Процесс модифика-

ции БСА зависел от времени инкубации и практически отсутствовал в случае инкубации БСА с водорастворимыми продуктами не окисленных меланинов (рис. VII.12б).

Появление таких долгоживущих и активных химических веществ в результате окислительного распада РПЭ меланосом может вносить свой вклад в развитие различных патологий глаз при старении и при патологиях, связанных с развитием оксидативного стресса.

3.2. Фототоксичность продуктов окислительного распада меланосом

Продукты окислительной деградации РПЭ меланосом глаза человека проявляли способность к светоиндуцированной генерации супероксидных радикалов. При облучении водорастворимых продуктов деградации меланосом они катализировали восстановление нитросинего тетразолия (НСТ) в формазан (рис. VII.13) и цитохрома *c* (Fe^{3+} в Fe^{2+} форму) (рис. VII.14).

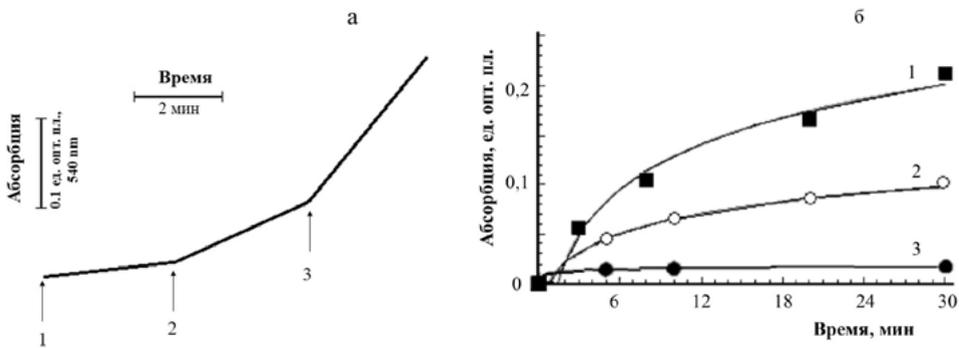


Рис. VII.13. Кинетика фотовосстановления нитросинего тетразолия при облучении синей светодиодной лампой (макс 450 нм.) в присутствии супернатанта, полученного обработкой меланосом человека супероксидом калия. а. Восстановление нитросинего тетразолия (НСТ) при разных уровнях освещенности. 1 – исходная кинетика, 2–3 – облучение синим светом с энергией 1,0 Дж/см² и 4,0 Дж/см², соответственно. б. Зависимость восстановления НСТ от концентрации водорастворимых продуктов деструкции. 1–100 мкл продуктов деструкции; 2–50 мкл продуктов деструкции; 3–100 мкл продуктов деструкции без освещения. Среда инкубации содержала 0,1 М К-фосфатный буфер, 0,05 % ЦТАБ 10 мМ метионин, 0,2 мМ НСТ

Супероксиддисмутаза ингибирует процессы восстановления НСТ и цитохрома *c*, что подтверждает супероксидный механизм этой реакции (рис. VII.14а). Скорость генерации супероксида продуктами деструкции меланосом при их облучении синим светом практически линейно зависела от энергии освещения (рис. VII.14б). Впервые обнаруженная нами (Dontsov et al., 2023) способность продуктов окислительной деструкции меланосом к светозависимой генерации супероксидных радикалов свидетельствует о их потенциальной фототоксичности.

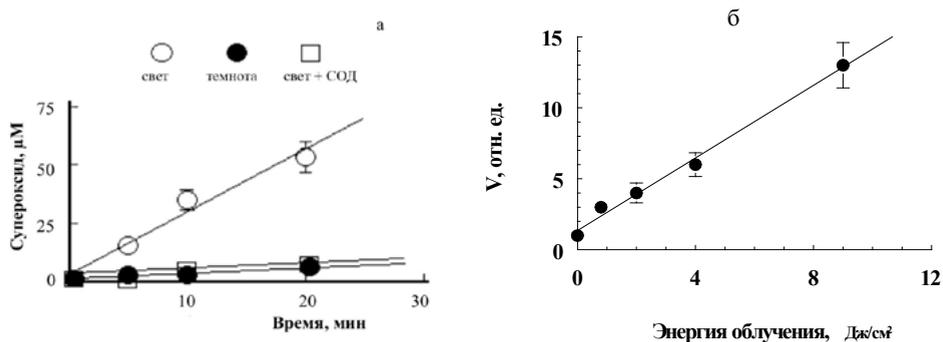


Рис. VII.14. Генерация супероксидных радикалов при облучении продуктов окислительной дегградации РПЭ меланосом синим светом (450 нм). а. Влияние супероксиддисмутазы (СОД, 10 $\mu\text{г}/\text{мл}$) на скорость генерации супероксидных радикалов. б. Зависимость скорости генерации супероксидных радикалов (V, относительные единицы) от энергии облучения ($\text{Дж}/\text{см}^2$). Среда инкубации содержала 0,1 М К-фосфатный буфер, рН, 7,6, 0,05 % ЦТАБ и 100 μM цитохром *c*

В целом результаты свидетельствуют о том, что продукты окислительной деструкции меланосом, в отличие от самих меланосом, являются токсичными для клетки РПЭ, так как генерируют активные формы кислорода при облучении видимым светом и способны повреждать белки путем образования поперечных сшивок в реакции между альдегидами продуктов деструкции и свободными аминокгруппами белков.

4. Пути исчезновения меланосом в клетках РПЭ

4.1. Слияние меланосом и липофусциновых гранул – основная причина понижения количества меланосом в клетке РПЭ

В процессе старения меланосомы могут сливаться с липофусциновыми гранулами (Feeney, 1978; Taubitz et al., 2018) или с частично деградировавшими фагосомами (Schraermeyer, Stieve, 1994; Wavre-Shapton et al., 2014; Lyu et al., 2022) с образованием смешанных меланолипофусцин-подобных гранул (рис. VII.15). В ходе старения наблюдаются изменения в плотности всех пигментных гранул. Подобные процессы происходят и при возникновении различных патологий сетчатки, таких, например, как болезнь Штаргардта и возрастная макулярная дегенерация (Meleppat et al., 2021).

При этом происходит уменьшение численности меланосом, которое сопровождается одновременным увеличением численности ЛГ и МЛГ (Feeney-Burns et al., 1990). Суммарное количество липофусцинсодержащих гранул может занимать до трети объема клетки РПЭ у людей старше 70 лет (Feeney-Burns et al., 1984). Меланосомы могут находиться внутри гранул липофусцина, образуя

меланолипофусциновые гранулы, концентрация которых увеличивается при старении (Feeny, 1965; Feeny-Burns et al., 1980). На рис VII.15 показана электронная микроскопия клетки РПЭ пожилого человека. Видно, что клетка содержит многочисленные смешанные меланолипофусциновые гранулы. Известно, что количество меланосом с возрастом уменьшается, что приводит к понижению общей концентрации меланина в клетке. Уменьшение количества меланосом происходит в результате их слияния с липофусциновыми гранулами, причем этот процесс активируется в условиях усиления окислительного стресса.

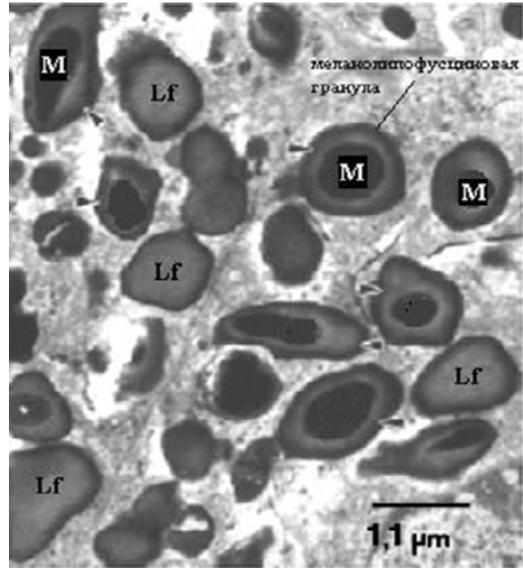


Рис. VII.15. Электронная микроскопия ЛГ (Lf – липофусцин) и слившихся меланолипофусциновых гранул (M – меланин) (из Schraermeyr and Heimann, 1999)

В наших исследованиях процесс образования смешанных меланолипофусциновых гранул был изучен

на половозрелых особях японского перепела возрастом от двух до семнадцати месяцев. Исследование процесса меланолипофусциногенеза при старении и при световом воздействии в лабораторных условиях представляется удобным и возможным при использовании в качестве экспериментальной модели японского перепела *Coturnix japonica*. Преимущества этой модели обусловлены короткой продолжительностью жизни птиц, сходным с человеком строением сетчатки и обмена каротиноидов. На этой модели можно наблюдать в ускоренной временной шкале сходные с человеческими патологические и возрастные изменения, возникающие в РПЭ и макулярной области сетчатки. Кроме того, японский перепел, как объект, достаточно хорошо изучен и широко используется в экспериментальных исследованиях (Fite et al., 1989; Fite et al., 1993). Процесс старения японского перепела сопровождается многократным накоплением в клетках РПЭ пигмента старости липофусцина. Такое накопление (к концу жизни перепела количество ЛГ в клетках РПЭ увеличивается в 5–8 раз) происходит, примерно, в 50 раз быстрее, чем в клетках РПЭ человека.

Эксперименты проводили на самках, которые стареют быстрее самцов и проявляют более высокую чувствительность к фотоповреждению (Fite, Bengston, 1989; Fite et al., 1993). На основании данных о яйценоскости птиц и содержании липофусцина в клетках РПЭ в зависимости от возраста, были выделены следующие возрастные группы: молодые (9–25 недель), средние (35–40 недель), и старые (52–78 недель). В каждой возрастной группе было исследовано по 3–6 птиц. Контроль жизнеобеспечения птиц и их вывод из эксперимента путем де-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

капитации выполнялся согласно «Правилам лабораторной практики», утвержденным Приказом Министерства Здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 года № 199н. Для светового облучения использовался синий светодиодный источник ($\lambda_{\text{макс}} = 450 \text{ нм}$) (LED450) в фотоповреждающей (сублетальной) для сетчатки дозе (4 Дж/см² поверхности роговицы при облучении в течение 40 мин) (Van Norgren, Gorgels, 2011). Облучение глаз выполняли на интактных животных. Эффекты фотоповреждающего действия света оценивали спустя 24 часа после облучения. Образцы тканей фиксировали в смеси 2,5% глутарового альдегида с 2% формальдегидом в течение 6-8 часов при +4° С. Затем материал повторно фиксировали 1% OsO₄, контрастировали 70% спиртом с 2% уранилацетатом, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и в ацетоне и заливали смесью эпоксидных смол. Ультратонкие поперечные срезы сетчатки дополнительно контрастировали 2% уранилацетатом и лимоннокислым свинцом по Рейнольдсу, а затем просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при увеличениях 8000х–25000х. На электронно-микроскопических фотографиях в клетках РПЭ были измерены численность и площадь липофусциновых и меланолипофусциновых гранул разных типов с использованием программного обеспечения ImageJ (Wayne Rasband, USA). Для каждого животного было проанализировано не менее 10 клеток РПЭ.

В результате было показано, что облучение глаза перепела синим светом в сублетальной дозе приводит к ускоренному образованию смешанных меланолипофусциновых гранул различного размера. На рис. VII.16 показано увеличение площадей одиночных гранул меланолипофусцина в результате фотоокислительного стресса. Действие света вызывает генерацию липофусциновыми гранулами токсичных для клетки РПЭ активных форм кислорода (АФК), запускаются каскады внутриклеточных сигнальных механизмов, способствующих передвижению меланосом к липофусциновым гранулам и их слиянию с образованием меланолипофусциновых гранул и предотвращению, тем самым, выхода АФК в цитоплазму клетки. Если окислительный стресс не прекращается, то меланин постепенно под действием супероксидных радикалов начинает деградировать и уже его водорастворимые продукты способствуют его дальнейшему разрушению, что приводит к понижению концентрации меланина в МЛГ.

При дальнейшей взаимной деградации ЛГ и меланина в составе МЛГ происходит постепенное исчезновение меланина в составе клеток РПЭ. Механизм ускоренного формирования сложных меланолипофусциновых гранул при фотоокислительном стрессе может быть обусловлен активацией транспорта меланосом по направлению к источнику генерации супероксидных радикалов, т.е. по направлению к липофусциновым гранулам. Известно, что внутриклеточные органеллы не перемещаются путем свободной диффузии (Reits, Neefjes, 2001). Для этой цели в клетке задействованы моторные белки (кинезины, динеины и миозины), которые двигаются либо по микротрубочкам, либо по актиновым филаментам (Cabukusta, Neefjes, 2018; Hazim, Williams, 2022). Взаимодействие органелл с моторными белками опосредуется маленькими ГТФ-азами, которые

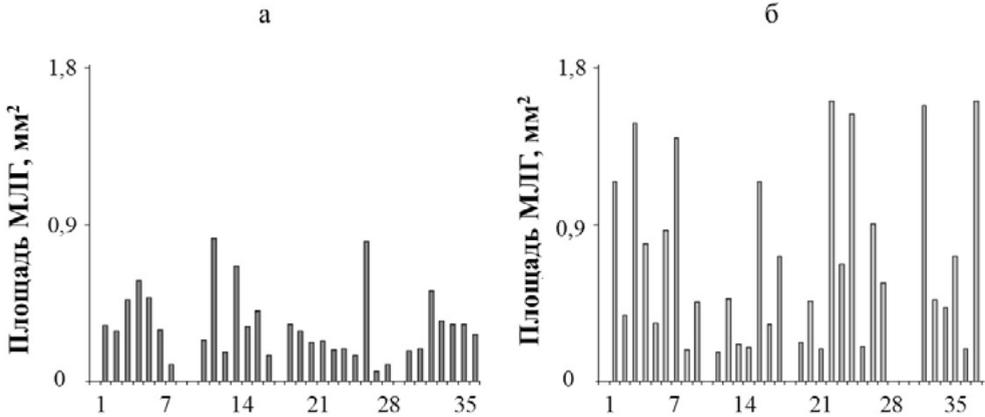


Рис. VII.16. Распределение площадей (мкм²) отдельных гранул меланолипофусцина в клетках РПЭ птиц среднего возраста в норме (а) и после светового воздействия (б)

участвуют в выборе перемещаемых органелл, а также в их внутриклеточном транспорте, стыковке (docking) и слиянии (Hazim, Williams, 2022, Homma et al., 2020; Sastre et al., 2021). В клетках РПЭ такие функции выполняют белки семейства Rab (Hazim, Williams, 2022; Futter; 2006; Fukuda, 2020). Известно, что анион-радикалы супероксида могут усиливать диссоциацию ГДФ от молекулы Rab белка с последующим присоединением к нему молекулы ГТФ, что приводит к активации Rab GTPase (Heo, Campbell, 2005, 2006). Можно предположить, что активация комплекса Rab-меланосома в клетках РПЭ вызывает перемещение меланосомы и ее слияние с липофусциновой гранулой, что приводит к увеличению накопления гранул меланолипофусцина. Одновременно происходит блокировка выхода АФК в цитоплазму клетки, так как образовавшиеся радикалы утилизируются на меланиновой матрице. Таким образом, этот процесс является защитной реакцией, уменьшающей токсичное действие липофусциновых гранул. Однако при продолжительном действии фотоокислительного стресса, может происходить постепенная деградация меланина в гранулах МЛГ под действием супероксидных радикалов, генерируемых липофусцином. Это приводит к образованию различных типов меланолипофусциновых гранул, в том числе, гигантских МЛГ.

4.2. Сравнительное исследование продуктов, образующихся при действии света на МЛГ и действии супероксида на МС. Возможный механизм разрушения меланина меланосом в клетках РПЭ

Как было показано в разделе 2.1 главы VII, меланосомы оказались резистентными к видимому свету умеренной интенсивности. В связи с этим можно предположить, что облучение видимым светом меланосом не приводит к заметному накоплению продуктов деструкции меланина из-за его

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

высокой устойчивости к облучению и отсутствию в меланосомах бисретиноидов и других фотосенсибилизаторов. Напротив, гранулы меланолипофусцина, содержащие и меланин, и фотосенсибилизаторы, как можно предположить, будут разрушаться под действием видимого света. Эксперименты по сравнительному облучению этих двух типов РПЭ гранул интенсивным видимым светом показали, что только при облучении меланолипофусциновых гранул наблюдалось достоверное превышение интенсивности флуоресценции водорастворимых продуктов деструкции меланина по сравнению с не облученными гранулами (Донцов и др. 2017; Dontsov et al., 2023). Это эффект наблюдался при всех длинах возбуждающего света, но особенно был выражен для более коротковолнового возбуждения флуоресценции (365 нм) (рис. VII.17).

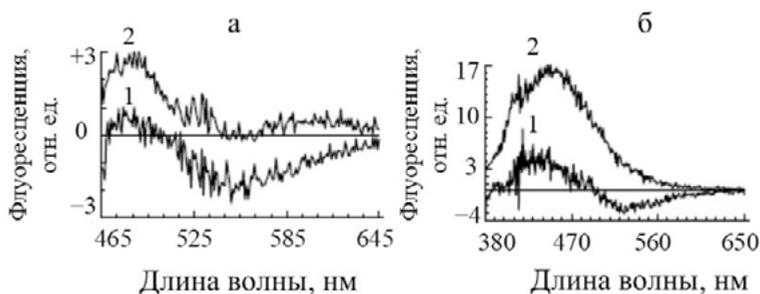


Рис. VII.17. Дифференциальные спектры флуоресценции водорастворимых продуктов, полученных из облученных и не облученных видимым светом РПЭ пигментных гранул. Длина волны возбуждения: а – 450 нм, б – 365 нм. Кривые 1, 2 – флуоресценция водорастворимых продуктов, полученных при облучении меланосом и меланолипофусциновых гранул, соответственно. Среднее значение интенсивности флуоресценции при длине 525 нм для МЛГ было + 1,20; для МС это значение достоверно отрицательное. Среднее значение интенсивности флуоресценции при длине 460 нм для МЛГ было + 16,1, а для МС +3,0

Результаты показывают, что при облучении МЛГ появляются флуоресцирующие продукты деструкции меланина. В отличие от МЛГ, облучение меланосом в тех же условиях приводило к уменьшению интенсивности флуоресценции образующихся продуктов, так что дифференциальные спектры находились в отрицательной области (рис. VII.17а, кривая 1) за исключением длины волны возбуждения 365 нм (VII.17б, кривая 2). При этой длине волны возбуждения флуоресценции наблюдалось появление продуктов деструкции меланина (примерно в 5 раз меньше, чем в случае облучения МЛГ), что может быть связано либо с присутствием незначительной примеси липофусцина в меланосомах, либо с примесью продуктов распада самого меланина, которые также способны генерировать супероксид под действием света (раздел 3.2 главы VII).

Однако при облучении меланосом РПЭ высокоинтенсивным видимым светом удается зафиксировать появление продуктов деградации меланина, что отчетливо видно на хроматограмме (рис. VII.18).

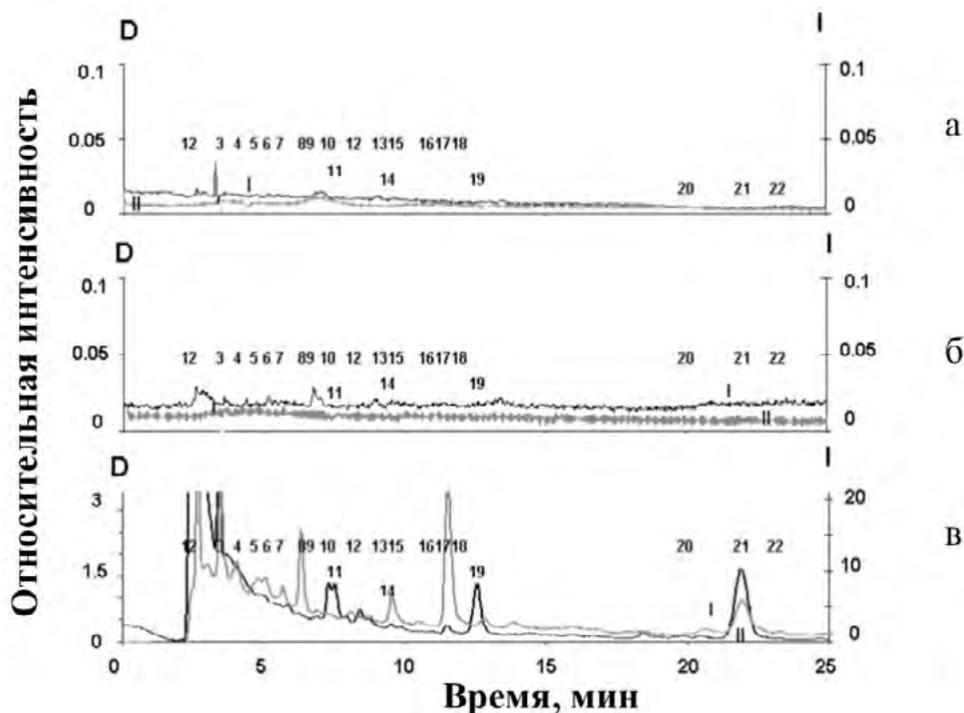


Рис. VII.18. Сравнительные хроматограммы продуктов деструкции меланосом РПЭ, облученных светом разной интенсивности. а. исходные, не облученные меланосомы; б. меланосомы, облученные синим светом от светодиодного источника с энергией 4 мВт/см^2 в течение 1,5 часов; в. меланосомы, облученные видимым светом галогенной лампы с энергией 100 мВт/см^2 в течение 2,5 часов. Шкала D – детекция по поглощению при 270 нм (кривые 1); шкала I – детекция флуоресценции (длина волны возбуждения 270 нм, эмиссии 380 нм (кривые 2)). Цифрами (1–22) обозначены пики на хроматограммах

Результаты показывают, что низкоэнергетический свет не вызывает деструкции меланина в меланосомах, тогда как высокоинтенсивное и длительное облучение, которое практически не встречается в условиях *in vivo*, способно вызвать деструкцию меланина в меланосомах. В условиях умеренного освещения структур глаза деградация меланосом, скорее всего, может происходить при сенсibilизированном фотоокислении. Поэтому нами был предложен механизм фотоокислительной деградации меланина, находящегося внутри меланолипофусциновых гранул, содержащих такие сенсibilизаторы – бисретиноиды, способные генерировать активные формы кислорода при действии света. Тогда в составе МЛГ меланин будет разрушаться в естественных условиях жизнедеятельности сетчатки в результате взаимодействия с супероксидными радикалами, генерируемыми бисретиноидами липофусцина. Чтобы это доказать, надо экспериментально показать, что продукты деградации меланина меланосом супероксидными радикалами идентичны продуктам деградации меланолипофусциновых гранул, образующихся под действи-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

ем света. Такие эксперименты были выполнены методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (Dontsov et al., 2023; Dontsov, Ostrovsky, 2024).

Хроматографическое разделение продуктов деградации, полученных при действии супероксидных радикалов на РПЭ меланосомы и продуктов деградации, полученных при облучении меланолипофусциновых гранул РПЭ глаза человека глазу проводилось на хроматографе Knauer (Берлин, Германия) с колонкой Diasfer 120 C18 (4 250 мм, размер сорбента 5 мкм). Стандарты специфических продуктов деградации меланина – пиролл-2,2-дикарбоновая кислота (PDCA) и пиролл-2,3,5-трикарбоновая кислота (PTCA) были любезно предоставлены проф. Казумаса Вакамацу из Института химии меланина, Университета здравоохранения Фудзита, Тоёаке, Япония. В качестве элюента использовалась смесь 1% раствора муравьиной кислоты в воде (рН 2,8) и метанола в соотношении 97:3 по объему. Скорость потока элюента составляла 0,8 мл/мин. Продукты хроматографического разделения измеряли с использованием фотометрического детектора Knauer K-2501 и флуориметрического детектора (RF-10A-x1, Shimadzu, Киото, Япония). Детектирование проводилось при 270 нм по поглощению, а также по флуоресценции при различных длинах волн возбуждения и детектирования. Точность для каждого образца определялась из трех независимо измеренных хроматограмм для каждого отдельного образца.

Масс-спектры были получены на времяпролетном вторично-ионном масс-спектрометре TOF.SIMS.5 (ION-TOF, Мюнстер, Германия) с кластерным пучком висмута, который регулярно используется в биологических исследованиях (Shimolina et al., 2021). Зона анализа 300x300 μm^2 (64x64 пикселей) была зондирована первичными ионами Vi^{3+} с энергией 30 кэВ и с плотностью дозы первичных ионов $\sim 4 \cdot 10^{11}$ ионов/ cm^2 в каждом измерении. Для каждого образца было записано не менее 10 измерений, как для положительных, так и для отрицательных ионных режимов. Обработка и идентификация ионов проводились с использованием программного обеспечения SurfaceLab7.

Для обнаружения продуктов деградации меланина в водорастворимой фракции меланолипофусциновых гранул, облученных видимым светом, были проанализированы хроматограммы супернатантов для трех типов пигментных гранул РПЭ: меланосом, меланолипофусциновых гранул и липофусциновых гранул. Важно было показать, что при облучении меланолипофусциновых гранул видимым светом образуются продукты, характерные для окислительной деградации меланина под действием супероксидных радикалов. Для этой цели хроматограммы продуктов, образующихся при окислительной деградации меланосом РПЭ супероксидом калия, были сопоставлены с хроматограммами водорастворимых продуктов, образующихся при светоиндуцированной деградации меланолипофусциновых и липофусциновых РПЭ гранул.

На рис. VII.19 показаны типичные хроматограммы продуктов, образующихся при реакции надпероксида калия с меланосомами РПЭ человека (а), а также продуктов, образующихся после облучения меланолипофусциновых гранул (б) и гранул липофусцина синим светодиодным светом.

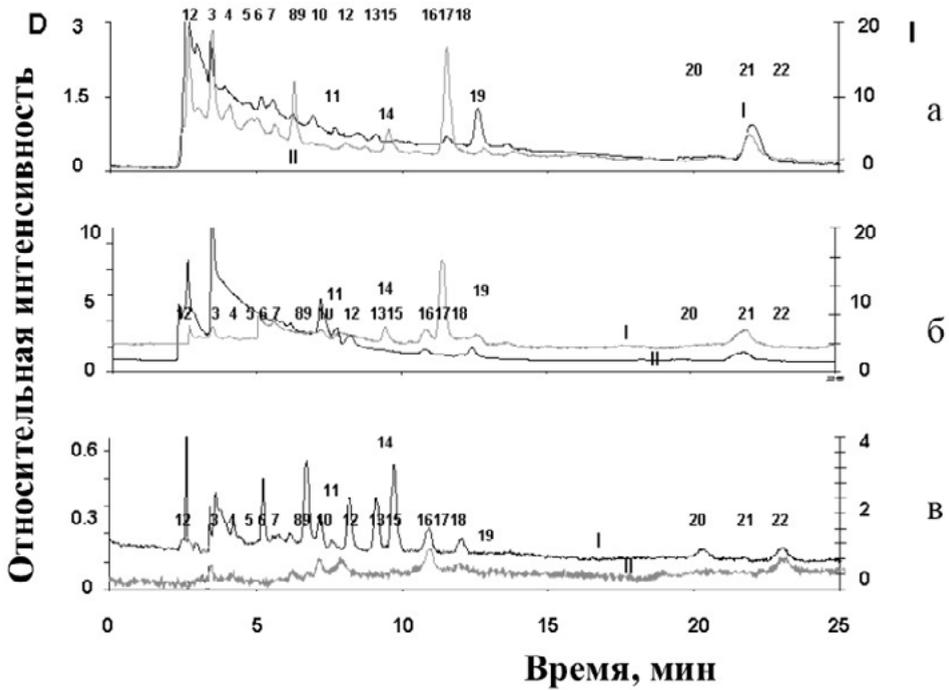


Рис. VII.19. Хроматограммы водорастворимых фракций из пигментных гранул РПЭ. а – продукты деградации меланосом, окисленных супероксидом; б и в – продукты деградации меланолипофусциновых и липофусциновых гранул, соответственно, образовавшиеся при облучении гранул синим ветом светодиодной лампы. Ось ординат, D (кривые I) – детекция по поглощению при 270 нм; ось ординат, I (кривые II) – детекция флуоресценции при длине волны возбуждения 270 нм и длине волны испускания 380 нм. Цифры (1–22) обозначают пики на хроматограммах. Хроматограмма для каждого вида образца была получена в трех независимых экспериментах

На рис. VII.19в показано, что водорастворимые продукты, образующиеся при облучении гранул РПЭ липофусцина, характеризуются пиками, обозначенными номерами 6, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 20 и 22. Напротив, водорастворимые продукты деградации меланосом РПЭ, образующиеся при окислении гранул супероксидом, характеризуются пиками, обозначенными номерами 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 14, 17, 19 и 21 (рис. VII.19а). Стандарты для специфических продуктов деградации меланина, пиррол-2,2-дикарбоновая кислота (PDCA, пик № 17) и пиррол-2,3,5-трикарбоновая кислота (PTCA, пик № 21), высвобождаются на 11,5 мин и на 22,1 мин, соответственно. Водорастворимая фракция, полученная из облученных меланолипофусциновых гранул, показывает наличие пиков, характерных для продуктов деградации как меланосом, так и гранул липофусцина (VII.19б). Таким образом, в отличие от гранул РПЭ липофусцина, водорастворимые продукты светоиндуцированной деградации меланолипофусциновых гранул РПЭ, облученных синим светом светодиодной лампы (450 нм, 4 мВт/см²), содержат продукты, характерные для окислительной деградации меланина, вызванной супероксидными радикалами.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Результаты подтверждают предположение о том, что бисретиноидные флуорофоры, присутствующие в гранулах меланолипофусцина, которые генерируют супероксидные радикалы под действием синего света, вызывают окислительную деградацию меланина, содержащегося в этих гранулах. Это предположение подтверждается также данными масс спектрометрии. Для сопоставления продуктов, образующихся при деструкции МС, МЛГ и ЛГ был применен статистический анализ методом главных компонент (PCA) для масс-спектрометрических данных, полученных методом ToF-SIMS. Метод главных компонент позволяет сгруппировать образцы по степени их вариаций друг относительно друга и выявить, какие ионы отвечают за эти отличия. Масс-спектры образцов из меланосом, меланолипофусциновых и липофусциновых гранул были получены до и после их облучения видимым светом. Пики, относящиеся к продуктам деградации меланина, были идентифицированы как в составе меланосом, так и в составе гранул меланолипофусцина. PCA обычно применяется для данных ToF-SIMS, чтобы выявить различия в составе образцов (Zhang et al., 2020). График оценок PCA выявил значительную разницу между образцами меланолипофусцина и гранул липофусцина (рис. VII.20).

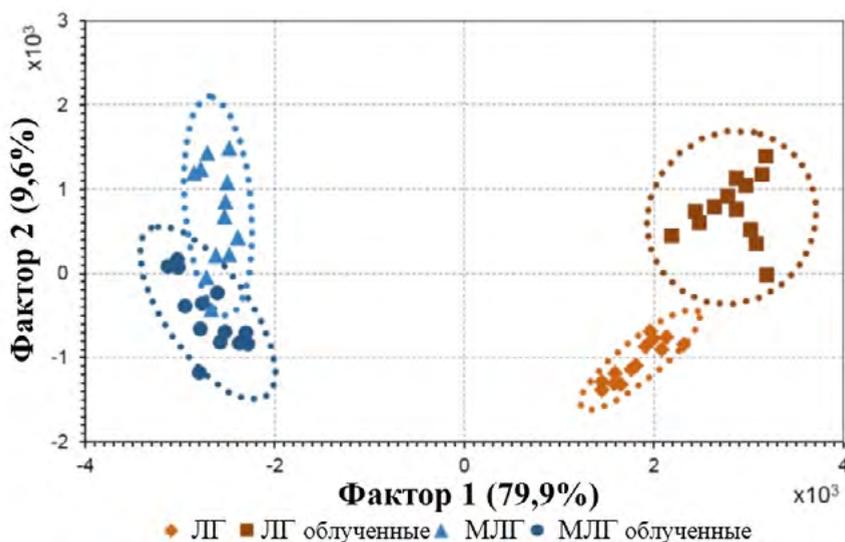


Рис. VII.20. PCA анализ пигментных гранул RPE. Суспензия гранул липофусцина (ЛГ) и меланолипофусцина (МЛГ) облучалась источником белого света с энергией 20 мВт/см² в течение 2,5 ч. Эллипс обозначает 95% доверительный интервал. Каждый символ представляет собой один эксперимент

Основной компонент 1 (фактор 1) был связан, главным образом, с разницей между меланолипофусциновыми и липофусциновыми гранулами, тогда как PCA2 (фактор 2) можно было бы отнести к разнице между необлученными и облученными состояниями гранул РПЭ. Анализ загрузки PCA был применен для составления списка фрагментов фотодеградации, которые увеличили выход ионов в гранулах меланолипофусцина.

Однако источник фрагментов фотодеградации остается неясным. Это может быть либо супернатант, либо структура полимера меланина. Чтобы понять источник продуктов фотодеградации, суспензия меланосом, содержащая продукты деградации меланина, была подвергнута центрифугированию. Были получены два образца: осадок, содержащий меланосомы с неповрежденной структурой полимера меланина, и супернатант, где низкомолекулярные молекулы из продуктов деградации меланина присутствовали в водном растворе. Масс-спектры были проанализированы с помощью РСА таким же образом. В результате фрагменты в супернатантах, соответствующие продуктам деградации меланина из меланосом, окисленных супероксидом, были выявлены и сравнены с ионами, обнаруженными в продуктах фотоиндуцированной деградации меланолипофусциновых гранул.

Табл. VII.1. Наиболее характерные для меланолипофусциновых гранул значения m/z по данным масс-спектрометрии

Ион	m/z	Ион	m/z	Ион	m/z
CH_2N^+	28,02	$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}^+$	55,02	$\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_3^+$	72,05
C_2H_4^+	28,03	$\text{C}_3\text{H}_6\text{N}^+$	56,05	$\text{C}_2\text{H}_7\text{N}_3^+$	73,06
CH_4N^+	30,04	CH_6N_3^+	60,06	$\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}^+$	84,04
$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^+$	43,02	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}^+$	68,05	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}^+$	84,08
CH_2NO^+	44,01	$\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^+$	69,03	$\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_2^+$	85,04
$\text{C}_2\text{H}_6\text{N}^+$	44,05	$\text{C}_5\text{H}_{10}^+$	70,07		

Полученные данные свидетельствуют о присутствии продуктов окислительной деградации меланина в водорастворимой фракции меланолипофусциновых гранул, облученных синим светом.

Таким образом, с большой долей вероятности можно полагать, что снижение концентрации меланина с возрастом в клетках РПЭ обусловлено не его разрушением в меланосомах, а его деградацией супероксидными радикалами, генерируемыми бисретиноидами липофусцина, присутствующими в меланолипофусциновых гранулах. В этом процессе могут также участвовать образующиеся светочувствительные продукты деградации меланина, которые также являются генераторами супероксидных радикалов.

Учитывая эти факты, механизм деградации меланина, объясняющий причины снижения его концентрации с возрастом, может быть представлен в виде следующей схемы (рис. VII.21).

Свет в присутствии кислорода активизирует генерацию супероксида, опосредованную флуорофорами липофусцина (рис. VII.21). Супероксид реагирует с меланином в грануле меланолипофусцина, вызывая его деградацию и образование светочувствительных продуктов деградации. Последние могут частично покидать гранулу, а частично оставаться в ней, что, в свою очередь, вызывает дополнительное образование супероксида под действием света. Это приводит

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

к дальнейшей деградации меланина и окислению липофусцина. Карбонилы, являющиеся токсичными продуктами окисления липофусцина (Yakovleva et al., 2022), могут выходить из гранулы в клетку и повреждать цитоплазматические белки уже без действия света, в темноте.

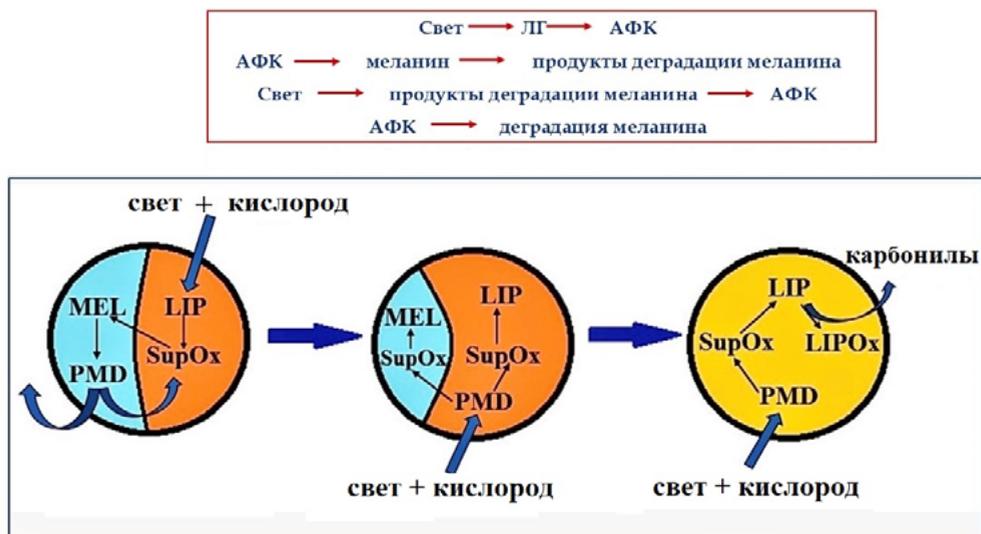


Рис. VII.21. Схема возможного механизма фотоокислительной деструкции меланина в меланолипофусциновой грануле. АФК – активные формы кислорода, MEL – меланин, LIP – липофусцин, SupOx – супероксидные радикалы, PMD – продукты деградации меланина

Полученные результаты позволяют считать, что возрастное исчезновение меланина в клетке РПЭ в значительной степени обусловлено деструкцией пигмента, находящегося в составе меланолипофусциновых гранул, супероксидными радикалами, генерируемыми флуорофорами липофусцина при действии видимого света. Исчезновение в клетках РПЭ с возрастом и при патологиях меланосом, выполняющих в них экранирующую и антиокислительную функции, и одновременное накопление в этих клетках меланолипофусциновых и липофусциновых гранул может привести к возникновению в клетке РПЭ фотоокислительного стресса, который прямо связан с развитием таких серьезных патологий глаза, как возрастная макулярная дегенерация сетчатки и пигментный ретинит (Olchawa et al., 2017).

Глава VIII

ВОЗМОЖНОЕ ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЭКРАНИРУЮЩИХ ПИГМЕНТОВ. СОЗДАНИЕ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ И УСТРОЙСТВ

Обнаруженные нами и известные из литературы замечательные свойства экранирующих пигментов, особенно такие, как антиоксидантные, ионно-обменные и сорбционные, могут найти свое применение в практике. В этой главе представлены результаты исследований физико-химических характеристик разработанных нами новых материалов – меланинсодержащего фитосорбента многофункционального использования, меланинсодержащей мембраны для концентрирования водных растворов солей и оммохромсодержащих наноразмерных алмазов, проявляющих антибактериальную и антигрибковую активность.

А. Меланинсодержащий фитосорбент из лужги черных семян подсолнечника

1. Получение и физико-химические характеристики фитосорбента

Известно, что многие растительные структуры содержат в своем составе меланин. Характерным отличием растительных меланинов от животных является отсутствие или незначительное содержание в них азота, так как они синтезируются в результате окислительной полимеризации фенолов. Относительно высокие концентрации меланинов сосредоточены в семенах растений, особенно в покровных тканях и выполняют там, вероятно, функции защиты генетического материала от вредного действия облучения. Мы использовали в качестве сырья для получения фитосорбента черную лужгу вызревших семян подсолнечника. Она содержит меланин в пленке, покрывающей оболочку семечка. В качестве метода концентрирования меланина был использован метод кислотного гидролиза, в результате которого можно удалить практически весь белок и часть целлюлозы. Меланин же при кислотном гидролизе даже при температурах 150-160°C не разрушается. Процедура получения фитосорбента в лабораторных условиях включает измельчение сырья, гидролиз 30-35% серной кислотой при температуре 120-130°C в течение 3-4 часов, отмывку от гидролизата и сушку. Кроме того, нами был разработан и утвержден опытно-промышленный регламент получения нового фитосорбента в заводских условиях. Согласно Регламенту, была проведена наработка опытной партии фитосорбента в количестве 1,5 тонны.

Фитосорбент, полученный промышленным способом, представляет собой мелкие листовидные частицы или порошок темно-коричневого (в сухом виде) или черного (во влажном состоянии) цвета, со слабым специфическим запахом (Донцов, Островский, 1996; Донцов и др., 1996; Лапина и др., 1999;

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

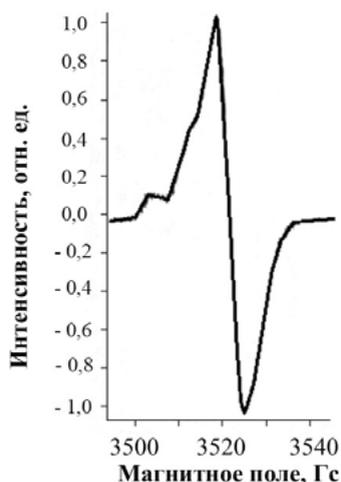
Островский и др., 2004). Фитосорбент нерастворим в воде, маслах, кислотах и в большинстве органических растворителях. При обработке фитосорбента сильными щелочами наблюдается его частичное растворение с образованием коричнево-красного раствора. Удельный вес фитосорбента варьировал от 0,12 до 0,15 г/см³. Зольность фитосорбента не превышала 1,0% – 1,5%. Содержание воды в готовом продукте не превышало 14%. При добавлении избытка влаги к фитосорбенту происходит ее поглощение и набухание фитосорбента.

Элементный состав фитосорбента (масс. %): углерод от 54,65 до 55,63; водород 5,26 – 5,36; азот 0,82 – 1,48; кислород 37,23 – 39,00; сера не более 0,3.

Инфракрасная спектроскопия фитосорбента выявила наличие следующих выраженных пиков поглощения: при длине волны в области 3400 обратных сантиметров (обр. см.) – валентные колебания группы ОН, включенных в водородную связь; 3007 обр. см. – валентные колебания С–Н, ненасыщенная ароматика; 2927–2853 обр. см. – валентные алифатические С–Н; 1707 обр. см. – валентное С=О несопряженных кетонов и СООН групп; 1600 обр. см. – скелетное колебание ароматического кольца; 1510 обр. см. – скелетное колебание ароматического кольца; 1467 обр. см. – деформационное колебание С–Н связи; 1420 обр. см. – скелетное колебание ароматического кольца; 1373 обр. см. – деформационное колебание С–Н связей; 1267–1213 обр. см. – колебания С–О в фенокси структурах; 1120 обр. см. – плоскостные колебания (деформационные) С–Н связей; 1027 обр. см. – деформационные плоскостные колебания С–Н связей в ароматическом кольце гваяцильного типа + С–О (деформационные) в первичных спиртах; 800 обр. см. – вне плоскостные деформационные колебания С–Н связи в ароматическом кольце.

Спектроскопические исследования показывали, что сорбционная способность фитосорбента, вероятно, связана с наличием в нем карбоксильных, карбонильных и гидроксильных групп.

1.1. Свободнорадикальные свойства фитосорбента



Фитосорбент имеет синглетный спектр ЭПР с полушириной сигнала 6Gs, g-фактором равным 2.0032–2.0050 в зависимости от условий получения (рис. VIII.1). Фитосорбент имеет высокую концентрацию неспаренных электронов при комнатной температуре, т.е. представляет собой стабильный свободный радикал. Концентрация парамагнитных центров составляет

Рис. VIII.1. Спектр ЭПР одной из модификаций промышленного образца фитосорбента. Условия регистрации: радиоспектрометр Bruker EMX, Н центр 3520 Гс, развертка 50 Гс, амплитуда модуляции 3 Гс, постоянная времени 20 мс, частота модуляции 100 кГц

$(1,5 \pm 0,7) \times 10^{18}$ спин/г сухого веса. Высокая концентрация парамагнитных центров дает основания предполагать возможную антирадикальную и антиоксидантную активность фитосорбента.

1.2. Антиоксидантная активность фитосорбента

Облучение кардиолипиновых липосом ультрафиолетовым светом вызывает их окисление и накопление ТБК-активных продуктов. Присутствие фитосорбента в этой системе приводит к следующему:

– при добавлении фитосорбента в небольших количествах (1,5 мг/мл) происходит поглощение эндогенных продуктов липидной перекисидации, которые имеются в липосомах еще до облучения ультрафиолетом, однако скорость УФ-индуцированной перекисидации практически не изменяется. При этом уровень накопления продуктов ПОЛ значительно ниже, чем в контроле;

– при добавлении более высоких концентраций фитосорбента (от 6 мг/мл) происходит не только снижение общего уровня накопления продуктов ПОЛ, но также наблюдается и значительное уменьшение скорости их аккумуляции при УФ-облучении. Последний эффект может быть связан как с экранированием липидов от ультрафиолета, так и с антиоксидантной активностью фитосорбента, либо с тем и другим одновременно.

Антиоксидантное действие фитосорбента обусловлено, главным образом, содержащимся в нем меланином. Для доказательства этого было проведено сравнительное исследование ингибирующего действия различных компонентов фитосорбента (целлюлозы, лигнина и меланина) на индуцированную ионами двухвалентного железа в присутствии аскорбата перекисидацию наружных сегментов фоторецепторных клеток. Реакционная среда содержала 0,1 М К-фосфатный буфер (рН 7,2), 15 μ М двухвалентное железо, 0,6 мМ аскорбат натрия, 0,9 мг/мл белка НСФ и 3 мг/мл сухого веса препаратов компонентов фитосорбента. В контроле препараты фитосорбента отсутствовали. Препараты фитосорбента предварительно солибилизировали буферным раствором в течение одного часа, затем добавляли наружные сегменты фоторецепторных клеток и аскорбат натрия; реакцию начинали добавлением двухвалентного железа.

На рис. VIII.2 приведены данные по ингибирующему действию препаратов, полученных из фитосорбента, на перекисидацию НСФ.

Скорость перекисидации рассчитывали как количество накопленных ТБК-активных продуктов за один час реакции на единицу концентрации наружных сегментов (по белку). Концентрация компонентов фитосорбента была во всех случаях одинакова и составляла 3 мг сухого веса на 1 мл реакционной смеси, или 3,3 мг сухого веса компонента на 1 мг белка наружных сегментов фоторецепторных клеток. Процент ингибирования был подсчитан по уменьшению скорости перекисидации липидов наружных сегментов фоторецепторных клеток быка (за 30 мин реакции). На рис. VIII.2 приведены средние значения трех различных измерений. Из рисунка видно, что при данной концентрации ком-

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

понентов меланин во всех случаях полностью ингибировал процесс пероксидации, лигнин был значительно менее активен, а целлюлоза была, по крайней мере, в 5 раз менее активна, чем меланин.

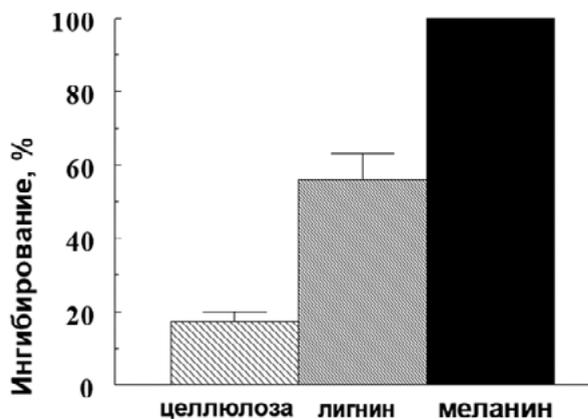


Рис. VIII.2. Сравнение ингибирующей активности компонентов фитосорбента – целлюлозы, лигнина и меланина на скорость пероксидации наружных сегментов фоторецепторов, индуцированную ионами двухвалентного железа в присутствии аскорбата

Проведено также исследование зависимости ингибирующего действия меланина из фитосорбента на железо-аскорбат-индуцированную пероксидацию НСФ быка от концентрации меланина. Результаты показаны на рис. VII.3.

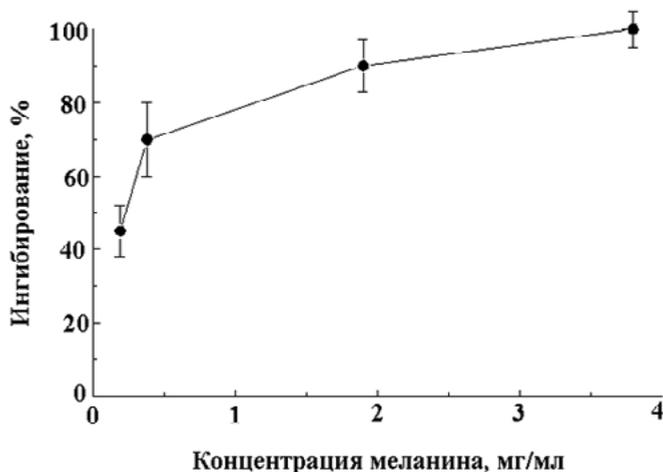


Рис. VIII.3. Зависимость ингибирования процесса пероксидации наружных сегментов фоторецепторных клеток от концентрации меланина

Из рисунка видно, что 50% ингибирование происходит при концентрации меланина из сорбента равной примерно 0,25 мг/мл или 1 мг меланина/1 мг белка. Учитывая, что общее количество меланина в фитосорбенте составляет по весу примерно 6%, получаем, что фитосорбент будет вызывать 50% ингибирование этого процесса при концентрации 5 мг/мл или 5 г/литр только за счет содержащегося в нем меланина.

Дополнительные доказательства основной роли меланина, определяющей антиоксидантную активность фитосорбента, были получены при сравнительном исследовании антиоксидантной активности фитосорбента и меланина, выделенного из лузги семечек, методом тушения хемилюминесценции люминола. Использовали хемилюминесцентную модельную систему, состоящую из гемоглобина, пероксида водорода и люминола (Теселкин и др., 1997). В качестве измеряемого параметра служило время от момента введения инициатора (H_2O_2) до начала развития свечения (латентный период). Реакционная среда (общий объем 3 мл) содержала 50 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,4, 100 μ М ЭДТА, 2 μ М гемоглобин человека, 90 μ М люминол и различные концентрации суспензии меланина или фитосорбента. В контрольных экспериментах вместо меланина и/или фитосорбента использовали 0,1М К-фосфатный буфер. Процесс хемилюминесценции запускали добавлением 130 μ М перекиси водорода в реакционную среду. Для количественной оценки способности ингибиторов взаимодействовать с радикалами, локализованными в водной фазе данной модельной системы, результаты тушения хемилюминесценции пересчитывали в координатах уравнения Штерн-Фольмера.

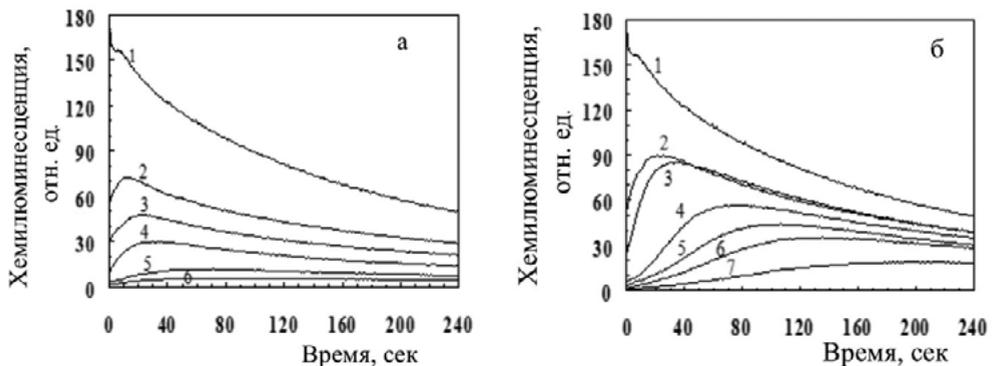


Рис. VIII.4. а. Тушение хемилюминесценции люминола фитосорбентом. 1 – контроль, 2 – 6 – добавлена однородная суспензия фитосорбента в фосфатном буфере в концентрациях: 170, 250, 410, 610 и 810 μ г/мл, соответственно. б. Тушение хемилюминесценции люминола меланином, выделенным из оболочки семечки. 1 – контроль, 2 – 7 – добавлена суспензия меланина в фосфатном буфере в концентрациях: 12, 24, 46, 69, 92 и 115 μ г/мл, соответственно

На рис. VIII.4а показана типичная картина тушения хемилюминесценции фитосорбентом, а на рис. VIII.4б – меланином. Результаты, полученные в этих исследованиях и обчисленные в координатах Штерн-Фольмера, приведены на рис. VIII.5. Из рисунков видно, что меланин значительно более эффективно ингибирует развитие процесса, по сравнению с целым фитосорбентом.

Для практического представления о величине антиоксидантной активности меланина семечек и фитосорбента было приведено сравнение этих активностей с антиоксидантной активностью аскорбата. Расчет антиоксидантной активности фитосорбента и меланина из лузги семечек подсолнечника относительно аскорбата дал следующие результаты: антиоксидантная активность

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

меланина – $0,60 \pm 0,08$ ммоль аскорбата/грамм сухого веса меланина; антиоксидантная активность фитосорбента – $0,04 \pm 0,01$ ммоль аскорбата/грамм сухого веса фитосорбента.

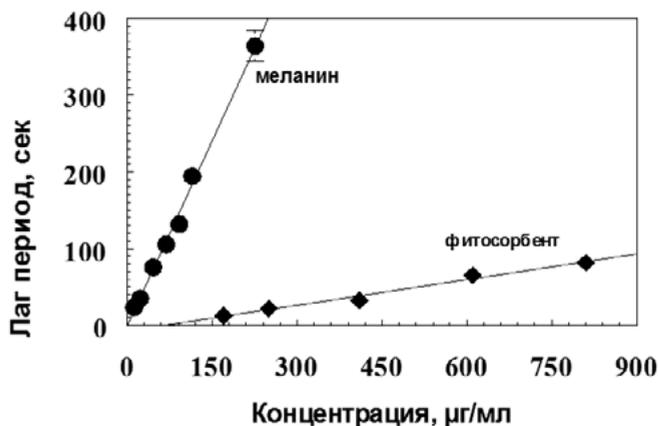


Рис. VIII.5. Зависимость времени задержки развития процесса хемилюминесценции люминола от концентрации меланина и фитосорбента

Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что АОА меланина, выделенного из покровной оболочки семечки подсолнечника, весьма высока (примерно всего в 9 раз ниже, чем у такого сильного антиоксиданта как аскорбиновая кислота) и в 15 раз превышает АОА исходного фитосорбента. Таким образом, основная доля антиоксидантного действия фитосорбента обусловлена содержащимся в нем меланином и лишь незначительная остальными компонентами фитосорбента.

2. Сорбционные свойства фитосорбента

2.1. Связывание фитосорбентом тяжелых металлов и радионуклидов из воды и водных растворов

Сорбционные свойства фитосорбента, полученного в промышленных условиях, оказались в значительной степени аналогичны сорбционным свойствам лабораторных образцов в отношении связывания радионуклидов и тяжелых металлов. Область рН, при которой фитосорбент эффективно работает, составляет 3-8,5. Однако в некоторых случаях фитосорбент достаточно эффективно связывает ионы тяжелых металлов и при более кислых значениях рН. Так, например, емкость фитосорбента по отношению к трехвалентному железу достигает 0,7-0,8 мг. экв. /г сорбента при величине рН 2,6. В табл. VIII.1 приведены данные по сорбции различных радионуклидов и тяжелых металлов из дистиллированной и технической воды фитосорбентом.

Табл. VIII.1. Абсорбционные характеристики фитосорбента в отношении различных радионуклидов и тяжелых металлов

Элемент	Параметры связывания			
	$C_{исх}$, мг/мл	$C_{кон}$, мг/мл	Абсорбция (S), мг/г сорбента	Относительная абсорбция (%)
Бериллий	1,0	0,55	0,04	45
Европий (плутоний)	10,0	0,44	0,96	96
Кадмий	5,0	4,27	0,07	15
Магний	17,0	6,0	1,1	65
Никель	7,0	3,0	0,4	57
Свинец	10,6	3,9	0,67	63
Стронций	5,0	2,3	0,27	53
Уран	500	250	25	50
Уран	1000	400	60	60
Цезий	10,0	1,85	0,81	82
Концентрация фитосорбента составляла 10 г/литр				

Эффективность связывания радионуклидов и тяжелых металлов фитосорбентом сопоставима, а в ряде случаев и превосходит связывающую способность таких известных сорбентов, как активированные угли и хитозаны.

2.2. Связывание токсичных органических веществ

Фитосорбент оказался эффективным в отношении связывания не только ионов, но также различных токсических органических соединений (Lapina et al., 2000; Лапина и др., 2004; Донцов и др., 2008; Горшенев и др., 2021). В табл. VIII.2 приведена сорбционная способность фитосорбента в отношении такого рода веществ.

Табл. VIII.2. Сорбция органических веществ из воды фитосорбентом

Вещество	Начальная концентрация, мг/л	Конечная концентрация, мг/л	Степень экстракции, (%)
Фенол	740	650	12
Хлороформ	2,2	0,24	89
Четыреххлористый углерод	550	26	95
3,4-бензпирен	0,5	0,25	50
Концентрация фитосорбента составляла 20 г/литр			

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Как видно из таблицы, фитосорбент имеет хорошую связывающую способность в отношении хлороганики, но слабо связывает фенол.

2.3. Связывание гидрофобных жидкостей (нефть и нефтепродукты, масла, жиры)

Фитосорбент способен связывать различные гидрофобные жидкости (Донцов, Лапина, 1996). Так, лабораторные испытания показали, что фитосорбент связывает от 3,7 до 5,0 грамм нефти на 1 грамм сухого фитосорбента. Коэффициент связывания зависит от сорта нефти. Было испытано пять образцов Нижневартовской нефти из разных скважин. Фитосорбент со связанной нефтью способен длительное время удерживаться на поверхности воды (вплоть до 2-х суток). Фитосорбент со связанной гидрофобной жидкостью может быть легко удален с поверхности воды, например, с помощью тонко ячеистой сети; чистая вода при этом стекает через ячейки. Связанная нефть или другая гидрофобная жидкость может быть затем удалена от сорбента путем отжима, либо сожжена вместе с фитосорбентом, так как он горюч и имеет низкую зольность. В табл. VIII.3 приведены данные о связывании различных гидрофобных жидкостей фитосорбентом.

Табл. VIII.3. Связывание гидрофобных жидкостей фитосорбентом

Гидрофобная жидкость	Количество граммов гидрофобной жидкости, удерживаемой 1 граммом сухого фитосорбента
нефть (Нижневартовск)	4,6 ± 0,4
н-декан	1,5 ± 0,15
о-ксилол	2,2 ± 0,3

3. Выведение тяжелых металлов из организма животных с помощью фитосорбента

Наиболее интересно было выяснить возможность связывания токсичных веществ фитосорбентом в условиях *in vivo*, так как это свойство может быть использовано в медицине, животноводстве и птицеводстве. В наших исследованиях было установлено (Lapina et al., 2000), что введением максимально возможного для белых мышей количества фитосорбента как однократно, так и в течение 30 дней непосредственно в желудок, вызвать гибель или болезнь животного не удастся. На протяжении всего эксперимента мыши опытной и контрольной групп по поведению и внешнему виду не имели видимых различий, но аппетит у животных, получавших фитосорбент, был выше и к концу опыта они имели на 1,5–2,0 г большую массу, чем контрольные. После убоя, морфологическими исследованиями у мышей обеих групп изменений во внутренних органах

и тканях не обнаружено, что указывает на отсутствие как острой, так и хронической токсичности фитосорбента для белых мышей при пероральном введении. Скармливание фитосорбента кроликам на фоне значительного содержания солей стронция, кадмия, ртути и свинца в рационе способствовало повышению аппетита у этих животных по сравнению с кроликами контрольной группы, в рацион которых фитосорбент не входил. Кроме того, до конца эксперимента кролики опытной группы сохраняли хороший аппетит и имели клинически здоровый внешний вид. Кролики контрольной группы к концу опыта выглядели вялыми, малоподвижными, корм принимали небольшими порциями, потребляли значительно большее количество воды. После убоя у всех кроликов морфологически установлено увеличение размеров печени, причем гораздо более сильно выраженное у контрольной группы животных. Кроме того, у контрольных животных выявлены точечные кровоизлияния на поверхности почек и перикарде. У кроликов опытной группы, получавших фитосорбент, изменений во внутренних органах не обнаружено. При определении концентраций Sr, Cd, Hg и Pb во внутренних органах и мышечной ткани был установлен значительно более низкий, по сравнению с контрольной группой, уровень кадмия во всех исследуемых органах и ртути в мышечной и почечной тканях (табл. VIII.4).

Табл. VIII.4. Кратность снижения концентрации кадмия, стронция, ртути и свинца в органах и тканях кролика

Ткань	Содержание ртути, $\mu\text{г/г}$ ткани		Кратность снижения концентрации ртути в разных тканях
	Контрольная группа (не получала фитосорбент после введения HgCl_2)	Экспериментальная группа (получала фитосорбент общим количеством 10 г на одного кролика)	
Почки	$14,67 \pm 0,33$	$0,57 \pm 0,03$	25,73
Печень	следы	следы	–
Мышцы	$2,23 \pm 0,19$	$0,48 \pm 0,02$	4,67

Как видно из таблицы, фитосорбент в условиях *in vivo* особенно эффективно выводит такие токсические металлы, как кадмий и ртуть. Эти результаты указывают на возможность применения фитосорбента в животноводстве для детоксикации кормов, которые часто содержат токсичные примеси, и для выведения токсичных продуктов из организма животных, что должно способствовать улучшению продуктов животноводства. Таким образом, приведенные результаты показывают, что фитосорбент может быть использован:

- для очистки питьевой и промышленной воды от экологически опасных элементов и веществ;
- для очистки воды от белковых и жировых примесей в пищевой промышленности;

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

- в качестве антиоксиданта;
- для связывания и удаления нефти и нефтепродуктов;
- в качестве пищевой добавки к кормам животных для нейтрализации токсического действия радионуклидов и тяжелых металлов.

Б. Меланинсодержащие мембраны для разделения водных растворов солей

Жидкие мембраны на пористой полимерной основе, представляющие собой нитроцеллюлозные микрофильтры, импрегнированные жидкими аналогами липидов, могут рассматриваться и использоваться как модель биологической мембраны для изучения механизмов прямой диффузии газов, воды и неэлектролитов (Kocherginsky et al., 1987). Встраивание в такие биомиметические мембраны свободных жирных кислот позволяет осуществлять процессы сопряженного электронейтрального транспорта катионов щелочных металлов в обмен на ионы H^+ с участием жирных кислот в качестве подвижных переносчиков (Kocherginsky et al., 1987). Наличие в этих мембранах тонких водных слоев с локализованными в них и фиксированными на полимерной матрице катионнообменными группами позволяет также моделировать некоторые свойства водных каналов биологических мембран (Кочергинский и др., 1987).

Такие жидкие мембраны также очень важны для практического использования, так как позволяют выделять из водных растворов и концентрировать ионы металлов. Это особенно важно для регенерации в целях дальнейшего использования дорогостоящих металлов. Кроме того, такие технологии позволяют извлекать из отходов промышленного производства ионы металлов, загрязняющие окружающую среду.

Нами разработан новый тип жидкой мембраны на пористой полимерной основе, которая содержит меланин в качестве переносчика ионов металлов (Кочергинский и др., 1990; Демочкин и др., 1991; Демочкин и др., 1992). Известно, что меланины обладают высокой связывающей способностью по отношению к различным ионам. При этом сорбция ионов носит обратимый характер в зависимости от условий среды, что позволяет использовать меланины в качестве переносчиков через водонепроницаемые среды. В этом разделе главы VIII продемонстрирована возможность реализации активного транспорта ионов меди в обмен на протоны с помощью мембраны, содержащей меланин.

Для изготовления мембран использованы нитроцеллюлозные микрофильтры «Millipore» (США) и «Сынпор» (Чехия) со средним диаметром пор 0,45 и 2,5 мкм, соответственно. Толщина фильтра составляла ~100 мкм и общий объем пор 60–85%, от объема фильтра. Суспензию ДОФА-меланина в 0,05 М фосфатном буфере (рН 9) наносили на фильтр, после чего мембрану сушили в потоке теплого воздуха и пропитывали метилолеатом. Мембрану закрепляли в термостатированной тefлоновой ячейке с рабочей поверхностью 3 см². Ячейка разделялась мембраной на две равные части, заполненные водными растворами, объемом 15 мл каждая. Перемешивание осуществляли механической

мешалкой. Концентрацию ионов Cu^{2+} в донорном (1) и акцепторном (2) растворах определяли на спектрофотометре DU-8 фирмы «Beckman» (США) по поглощению при длине волны 795 нм ($\epsilon = 12 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Отбираемые для анализа пробы объемом 2 мл после измерений вводили обратно в ячейку. При одинаковом содержании меланина в мембране разброс значений начальных скоростей транспорта меди не превышал 5–10%.

Микрофильтры, импрегнированные метилолеатом, практически непроницаемы для ионов двухвалентных металлов, в частности для Cu^{2+} . Удельное сопротивление таких нитроцеллюлозных импрегнированных микрофильтров составляло около 60, 10 и 2 Мом cm^2 при постоянном и переменном токе частотой 100 и 1000 Гц соответственно (в донорном растворе $[\text{Cu}^{2+}]_1 = 0.08 \text{ M}$, $\text{pH} = 3,9$, акцепторный раствор представлял собой 1 М H_2SO_4 , $\text{pH} < 1$).

Иммобилизация меланина в количестве 0,13 mg/cm^2 фильтра перед его пропиткой метилолеатом приводила примерно к двукратному уменьшению электрического сопротивления мембран. Одновременно мембрана становилась проницаемой по ионам Cu^{2+} . При введении CuSO_4 (0,03 М) в донорный раствор начальная скорость (v_0) транспорта меди при $\text{pH}_1 = \text{pH}_2 = 4$ была равна $1,5 \times 10^{-9}$ моль/ cm^2c и увеличивалась в 4–5 раз при понижении pH акцепторного раствора до нуля.

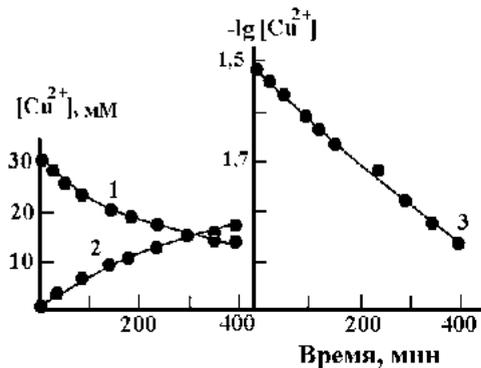


Рис. VIII.6. Транспорт ионов Cu^{2+} через мембрану, импрегнированную метилолеатом и содержащую меланин (донорный раствор $0,031 \times 10^{-2} \text{ M CuSO}_4$; $\text{pH}_1 = 4,4$, акцепторный раствор содержал 1 М H_2SO_4 ; содержание меланина $0,13 \text{ mg}/\text{cm}^2$, температура 20°C ; рабочая площадь мембран $S = 3,14 \text{ cm}^2$): 1, 2 – кинетика изменения концентрации ионов Cu^{2+} в донорном и акцепторном растворах соответственно, 3 – полулогарифмическая анаморфоза кривой 1

На рис. VIII.6 для таких мембран показаны кинетические зависимости изменения концентрации ионов Cu^{2+} в донорном растворе с начальным значением pH 4,4 и в более кислом акцепторном растворе, $\text{pH}_2 \approx 0$. Отметим, что транспорт ионов Cu^{2+} начинался практически без времени запаздывания, и его начальная скорость равнялась $7,2 \times 10^{-9}$ моль/ $(\text{cm}^2 \text{c})$. Масса меди, ушедшей из донорного раствора, практически была равна массе меди, пришедшей в акцепторный раствор, и, следовательно, можно было пренебречь сорбцией ионов Cu^{2+} в мембране.

Кинетика транспорта ионов меди через мембрану удовлетворительно спрямлялась в полулогарифмических координатах вплоть до 150 мин (рис. VIII.6, кривая 3) и описывалась следующим уравнением:

$$[\text{Cu}]_1(t) = [\text{Cu}]_1(t=0) e^{-kt},$$

где k – константа скорости первого порядка, которая в данном случае равнялась $0,4 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$. Через 150 мин наклон полулогарифмической анаморфозы незначительно уменьшался, что, вероятно, связано с понижением величины pH

Экранирующие пигменты глаза – меланины и омхромы (структура, физикохимия, функции)

донорного раствора во время опыта и конкуренцией ионов H^+ и Cu^{2+} при связывании с ионообменными группами меланина.

Существенно, что спустя 300 мин концентрации Cu^{2+} с обеих сторон мембраны становились равными друг другу, и наблюдался транспорт ионов Cu^{2+} против их градиента концентрации за счет разности электрохимических потенциалов ионов H^+ в растворах с обеих сторон мембраны. Транспорт ионов Cu^{2+} сопровождался уменьшением значения рН донорного раствора спустя несколько часов до 2,0. При этом значение рН акцепторного раствора практически не изменялось. Увеличение содержания меланина в мембране приводило к линейному росту V_0 (рис. VIII.7а).

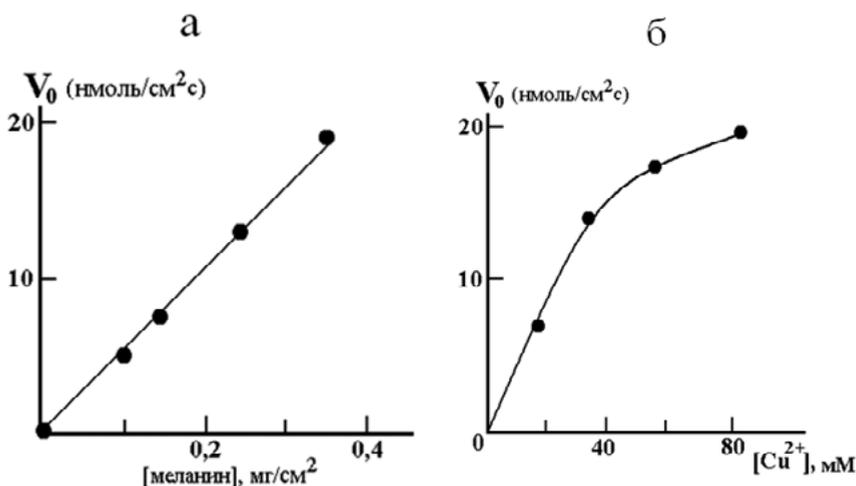


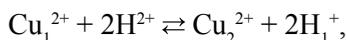
Рис. VIII.7. а. Зависимость начальной скорости транспорта ионов Cu^{2+} (V_0 , нмоль/см²с) от содержания меланина (мг/см²) в мембране (донорный раствор 0,08 М $CuSO_4$, рН 3,9; б. Зависимость V_0 от начальной концентрации ионов Cu^{2+} в донорном растворе (мембрана содержала 0,35 мг/см² меланина, рН₁ 3,9, рН₂ <1)

Полученные кинетические и концентрационные зависимости можно объяснить, если учесть, что меланин связывает металлы благодаря наличию в его структуре различных функциональных групп. Ионы металлов могут образовывать хелатные комплексы, а также вступать в реакции ионного обмена с соответствующими кислотными группами. Как было показано методом гамма-резонансной спектроскопии, при увеличении рН от 2,1 до 5,4 способность ДОФА-меланина к образованию комплексов с ионами Fe^{2+} и Fe^{3+} резко возрастает. На основании анализа спектров ГРС и ИК было показано, что ионы железа в меланинах связываются, в первую очередь, с COO^- группами. В кислых растворах, по-видимому, реализуется дополнительный механизм транспорта ионов меди, не связанный с конкуренцией с ионами H^+ . Об этом свидетельствуют опыты по изучению транспорта ионов H^+ по градиенту их концентрации (рис. VIII.8). Этот процесс можно было наблюдать в отсутствие ионов Cu^{2+} , причем его скорость при рН₁ = 6,8 и рН₂ = 7,55 достигала $2,0 \times 10^{-9}$ моль/см² с (в рас-

четах использовали значение буферной емкости, равное $1,3 \times 10^{-3}$ г-экв/л). Иными словами, мембраны со встроенным меланином обладали значительной проницаемостью для H^+ .

Существенно, что введение солей меди в акцепторный раствор приводило, как и следовало ожидать, к ускорению транспорта ионов H^+ . Можно полагать, что в этом случае осуществляется как механизм однонаправленной диффузии ионов H^+ и соответствующих противоионов, так и механизм электронейтрального сопряженного обмена ионов H^+ не только на Cu^{2+} , но и другие катионы. Существенно, что в отсутствие ионов Cu^{2+} увеличение концентрации ионов H^+ на шесть порядков приводит лишь к незначительному увеличению скорости процесса, т. е. и в этих опытах существенными являются процессы ионного обмена при транспорте через мембрану, предположительно, по карбоксильным группам иммобилизованного ДОФА-меланина.

В условиях электронейтрального транспорта ионов Cu^{2+} в обмен на $2H^+$ можно получить транспорт меди против градиента ее концентрации (рис. VIII.6). В процессе транспорта медь за счет разности электрохимических потенциалов ионов H^+ практически полностью может перейти в акцепторный раствор. В соответствии с реакцией



в условиях равновесия должно быть справедливо следующее уравнение, связывающее химические потенциалы исходных и конечных веществ:

$$\mu(Cu_1^{2+}) + 2\mu(H_2^+) = \mu(Cu_2^{2+}) + 2\mu(H_1^+)$$

и учитывая, что

$$\mu(Cu^{2+}) = \mu_0^{Cu^{2+}} + RT \ln[Cu^{2+}],$$

$$\mu(H^+) = \mu^{0H^+} + RT \ln[H^+],$$

получим:

$$[Cu_1^{2+}]/[Cu_2^{2+}] = ([H_1^+]/[H_2^+])^2 \text{ при } t = \infty.$$

Следовательно, отношение активностей ионов Cu^{2+} в обоих растворах при равновесии равно второй степени отношения активностей ионов H^+ . Если, кро-

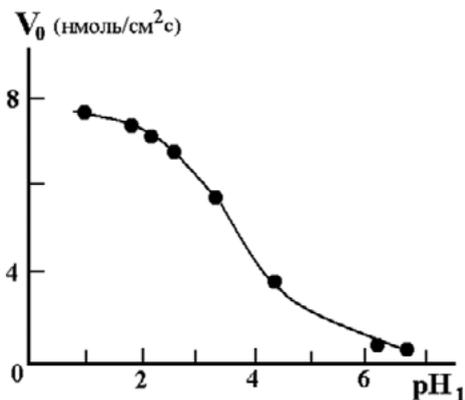


Рис. VIII.8. Зависимость скорости транспорта ионов H^+ через мембрану, содержащую $0,35$ мг/см² меланина, от pH_1 в отсутствие ионов Cu^{2+} (начальное значение $pH_2 = 7,55$)

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

ме того, объемы донорного и акцепторного растворов не равны, то степень концентрирования при достаточно высокой разности рН может достигать

$$[\text{Cu}_2^{2+}] (t = \infty) / [\text{Cu}_1^{2+}] (t = 0) = v_1 / v_2.$$

Таким образом, предложенная мембрана, содержащая меланин, может быть применена в установках для концентрирования или извлечения ионов металлов из различных растворов.

В. Антимикробная и антигрибковая активность оммохромов и их комплексов с наноразмерными алмазами

Мы показали, что оммохромы проявляют антибактериальную и антигрибковую активность (Донцов и др., 2019; Донцов и др., 2020). Установлено новое, ранее неизвестное свойство оммохромов глаза мухи черная львинка подавлять рост некоторых бактерий и грибов. Интересно, что антимикробная активность оммохромов черной львинки как и концентрация ее парамагнитных центров существенно возрастают в комплексе с наноразмерными алмазами. Для определения антимикробной активности получали мелкодисперсную смесь оммохромов в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Конечная концентрация оммохромов составила 1,0 мг/мл. Спектр антимикотической активности оммохромов определяли на тест-культурах условно патогенных грибов и бактерий из коллекции культур Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе (Москва, Россия). Условно-патогенные грибы принадлежали к роду *Aspergillus*: *A. fumigatus* 5K, *A. Niger* INA 00760; дрожжевые условно-патогенные грибы: *Candida albicans* ATCC 2091, *C. tropicalis* INA 00763. Спектр антибактериального действия определяли с использованием тест-культур штаммов грамположительных – *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. coagulans* 429 и грамотрицательных бактерий – *E. coli* ATCC 25922. Антимикробную активность определяли диско-диффузионным способом при двукратном разведении исходного раствора в диапазоне концентраций от 0,25 до 1,0 мг/диск с использованием стерильных бумажных дисков (“НИИ Пастера”, Россия), смоченных в соответствующих растворах и высушенных в стерильных условиях. Контролем чувствительности тест-организма служили стандартные диски с амфотерицином В для грибов (80 мкг/мл, “НИИ Пастера”, Россия) и оксациллином для бактерий (“НИИ Пастера”, 10 мкг/мл).

В табл. VIII.5 и VIII.6 показаны антибактериальная и антифунгальная активности оммохромов мухи черная львинка, соответственно.

Табл. VIII.5. Антибактериальная активность оммохромов глаз мухи черная львинка *Hermetia illucens* в отношении условно-патогенных бактерий (диаметр зоны подавления роста, мм)

Тест-организм	Концентрация оммохромов мг/диск			Оксациллин, 10 мкг/мл
	1	0.5	0.25	
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	18 ± 0.2	9 ± 0.1	0	27 ± 0.4
<i>B. coagulans</i> 429	0	0	0	25 ± 0.6
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209 P	0	0	0	23 ± 0.6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	27 ± 0.2

Табл. VIII.6. Антифунгальная активность оммохромов глаз мухи черная львинка *H. Illucens* в отношении условно-патогенных грибов (диаметр зоны подавления роста, мм)

Тест-организм	Концентрация оммохромов, мг/диск			Амфотерицин В, 80 мкг/мл
	1	0.5	0.25	
<i>C. albicans</i> ATCC 2091	12 ± 0.1	0	0	18 ± 0.6
<i>C. tropicalis</i> INA 00763	0	0	0	18 ± 0.6
<i>A. fumigatus</i> 5K	0	0	0	12 ± 0.6
<i>A. niger</i> INA 00760	9 ± 0.1	0	0	10 ± 0.6

А в табл. VIII.7 и VIII.8 аналогичные активности для комплексов этих же оммохромов с наноразмерными алмазами.

Табл. VIII.7. Антибактериальная активность оммохромов глаз мухи черная львинка *H. Illucens* в комплексе с наноалмазами в отношении условно-патогенных бактерий (диаметр зоны подавления роста, мм)

Тест-организм	Концентрация оммохромов мг/диск				Оксациллин, 10 мкг/мл
	10	1	0.5	0.25	
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	24 ± 0.2	12 ± 0.1	9 ± 0.1	0	27 ± 0.4
<i>B. coagulans</i> 429	19 ± 0.2	11 ± 0.3	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209 P	0	0	0	0	23 ± 0.6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	27 ± 0.2

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Табл. VIII.8. Антифунгальная активность оммохромов глаз мухи черная львинка *H. Illucens* в комплексе с наноалмазами в отношении условно-патогенных грибов (диаметр зоны подавления роста, мм)

Тест-организм	Концентрация оммохромов, мг/диск				Амфотерицин В, 80 мкг/мл
	10	1	0.5	0.25	
<i>C. albicans</i> ATCC 2091	20 ± 0.1	16 ± 0.3	8 ± 0.3	0	21 ± 0.6
<i>C. tropicalis</i> INA 00763	0	0	0	0	18 ± 0.6
<i>A. fumigatus</i> 5K	0	0	0	0	12 ± 0.6
<i>A. niger</i> INA 00760	29 ± 0.1	15 ± 0.1	0	0	10 ± 0.6

Результаты показывают, что оммохромы могут быть использованы как природные агенты с антибактериальными и антифунгальными свойствами. Антибактериальная активность оммохромов, вероятно, связана с наличием в их структуре феноксазинового кольца, которое также присутствует в антибиотиках актиномицинового ряда.

Глава IX

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

ЭКРАНИРУЮЩИХ ПИГМЕНТОВ

В наших экспериментах было обнаружено, что скорость пероксидного окисления липидов, индуцированного такими экзогенными и эндогенными оксидантами как ультрафиолет, интенсивный видимый свет, ионы двухвалентного железа в присутствии аскорбата или НАДФН, гидропероксиды, гипероксия, супероксидные радикалы кислорода, значительно ниже в тканях глаза нормально пигментированных животных, чем в тканях глаза с недостаточной пигментацией или у животных-альбиносов. Защитное действие пигментированной ткани на развитие ПОЛ, индуцированное УФ и видимым облучением, было значительно выше, чем это можно было ожидать от эффекта простого экранирования. Эффект низкой чувствительности пигментированных тканей глаза к действию оксидантов не связан с более высоким содержанием в них низкомолекулярных антиоксидантов и антиоксидантных ферментов, а обусловлен наличием органелл, содержащих экранирующие пигменты меланины и оммохромы. Меланосомы, синтетические меланины и оммохромы являются сильными ингибиторами свободнорадикальных процессов перекисаии липидов. Защитное действие экранирующих пигментов объясняется способностью меланинов и оммохромов, входящих в состав экранирующих гранул, тормозить развитие окислительного стресса путем связывания различных оксидантов (ионы металлов переменной валентности, фотосенсибилизаторы) в неактивные комплексы, а также путем инактивации свободных радикалов и активных форм кислорода. Факты, полученные нами на меланинах и оммохромах различного происхождения, позволяют сделать вывод о антиоксидантной функции экранирующих пигментов в пигментированных тканях позвоночных и беспозвоночных животных. В частности, обнаруженное нами ингибирующее действие меланосом на процессы перекисаии, вызванные как в результате действия излучения, так и в результате действия химических прооксидантов, объяснили многие известные факты высокой устойчивости пигментированной ткани РПЭ к экстремальным воздействиям. Антиоксидантная и антирадикальная активность экранирующих пигментов глаза позвоночных и беспозвоночных животных, а также их способность защищать клетки от повреждающего действия оксидантов, были подтверждены в многочисленных исследованиях других авторов. Ниже кратко изложены некоторые из них.

Показано, что экранирующие пигменты беспозвоночных животных оммохромы и вещества-предшественники биосинтеза оммохромов проявляют высокую антирадикальную и антиоксидантную активности (Wadano et al., 1993;

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

Lugo-Huitrón et al., 2011; Colín-González et al., 2013; Romero, Martínez, 2015; Farmer et al., 2017) и способны защищать клетки от окислительного стресса (Insausti et al., 2013; Higuera et al., 2019; Figon, Casas, 2019; Lewis et al., 2022).

Но, конечно, в литературе существует значительно больше исследований, доказывающих антиоксидантную активность экранирующих пигментов позвоночных животных меланинов. Так, было подтверждено, что меланины взаимодействуют со свободнорадикальными продуктами, такими как гидроксильные радикалы, радикалы супероксида и гидропероксидов и другими, ингибируя при этом развитие процесса пероксидации (Geremia et al., 1984; Korytowski et al., 1986; Sarna et al., 1986; Scalia et al., 1990; Korytowski et al., 1995; Zareba et al., 1995; Corsaro et al., 1995; Kayatz et al., 1998; Sarna et al., 2001). Интересно, что эндогенные гидропероксиды были обнаружены исключительно в клетках РПЭ непигментированных мышей-альбиносов, в то время как у пигментированных мышей в клетках РПЭ они полностью отсутствовали в пределах погрешности измерения (Kayatz et al., 1999).

Меланосомы и синтетический меланин ингибируют хемилюминесценцию, индуцированную пероксидными радикалами (Slawinska et al., 1983). Меланин, благодаря своей способности связывать ионы металлов переменной валентности и, в частности, прооксидантные ионы двухвалентного железа, может предотвращать окислительные повреждения мембран фагосом и лизосом и связанные с этим повреждения нитей миозина и актина цитоскелета (Akeo et al., 2002; Hahn et al., 2003).

Меланины могут предотвращать инактивацию лизосомальных протеаз, вызванную 4-гидрокси-2-нонеалем, который образуется при окислении липопротеинов низкой плотности (Stepień et al., 2000; Crabb et al., 2002).

Меланосомы нейтрализуют токсическое действие мономерного предшественника синтеза меланина – ДОФА на клетки РПЭ (Akeo et al., 2000).

Антиоксидантная активность была показана также для нейромеланинов. Нейромеланины ингибируют пероксидацию линоленовой кислоты и лецитиновых липосом (Wilczok et al., 1999) и механизм их антиоксидантного действия также, по всей видимости, связан с комплексованием ионов железа и антирадикального действия в отношении активных форм кислорода (Korytowski et al., 1995). Нейромеланины, вероятно, выполняют защитные функции в мозгу человека, блокируя токсичные молекулы (Zucca et al., 2004).

Все эти факты, доказывающие антиоксидантную активность меланинов, объясняют и факты более высокой устойчивости глаза пигментированных животных к действию прооксидантных факторов. Так, было показано, что при экспериментально вызванных воспалительных процессах (увеитах) в глазах пигментированных и непигментированных морских свинок происходит накопление ТБК-активных продуктов пероксидации в сетчатке. Однако при этом (Bilgihan et al., 1995), у пигментированных животных концентрация продуктов пероксидации возрастает всего на 40%, тогда как у альбиносов на 200%, т.е. в 5 раз выше. Это различие не связано с активностью антиоксидантных ферментов и, как полагают авторы, обусловлено ингибирующим действием меланина на

свободнорадикальные реакции, происходящие при воспалительных процессах (Bilgihan et al., 1995).

Аналогичные результаты были получены при повреждении сетчатки гентамицином (Zemel et al., 1995). Авторы показали, что введение прооксиданта гентамицина вызывает повреждения в сетчатке и приводит к уменьшению b-волны ЭРГ, причем эти изменения значительно более выражены у кроликов-альбиносов, чем у пигментированных животных. Животные-альбиносы проявляли значительно большую чувствительность к ишемии сетчатки. Так, было показано, что при перфузионной ишемии сетчатки происходят стойкие нарушения b-волны электроретинограммы (ЭРГ) у крыс альбиносов, не возвращающиеся к норме в течение, по меньшей мере, 3 суток. В то же время, пигментированные животные в условиях ишемии сетчатки показывали лишь слабые, быстро возвращающиеся к норме, изменения ЭРГ (Safa, Osborne, 2000).

Меланосомы защищают пигментированные клетки глаза от окислительного стресса у Шпорцевых лягушек (Corsaro et al., 1995).

Меланин оказывает защитное действие и в отношении окислительных процессов, развивающихся при старении организма. Это особенно важно, так как с возрастом происходит резкое уменьшение содержания меланина в глазах нормально пигментированных животных и человека. Так показано, что в присутствии меланина замедляется возрастное формирование липофусциновых гранул в клетках РПЭ кроликов (Sundelin et al., 2001). У крыс, содержащихся на диете, дефицитной по витамину Е, наблюдается усиленное накопление липофусциновых гранул в клетках РПЭ, однако животные, содержащие меньше меланина, накапливали большее количество липофусцина (Katz et al., 1978). Степень развития старческой (возрастной) макулярной дегенерации (ВМД) сетчатки также зависит от содержания меланина в клетке РПЭ: чем меньше меланина, тем больше вероятность развития макулярной дегенерации (Нуман et al., 1983; Weiter et al., 1985), а само развитие ВМД сопровождается уменьшением содержания меланина в клетках РПЭ (Feeney et al., 1965).

Таким образом, эти и другие многочисленные факты, подтверждающие наши результаты, свидетельствуют о антиоксидантной активности меланинов и о более высокой резистентности меланизированных клеток к действию оксидантов.

Механизм защитного действия пигментных гранул.

Конкретный механизм ингибирования пигментными гранулами – меланосомами и оммохромасомами свободнорадикальных процессов, индуцированных различными оксидантами, до конца неясен. Действительно, всегда возникает вопрос, каким образом такие большие гранулы могут реально перехватывать свободные радикалы, образующиеся в других компартментах клетки. Особенно это касается короткоживущих молекул, которые реагируют, как правило, в месте своего формирования. Как нам представляется, ингибирующее действие пигментных гранул может осуществляться, по крайней мере, двумя путями:

1. Регуляция внутриклеточной концентрации оксидантов. Меланины и оммохромы проявляют свойства необычные в биологии. Они выполняют свою

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

физиологическую роль, будучи частицами – меланосомой и оммохромасомой. Молекулы эндогенных и экзогенных оксидантов, такие как ионы многовалентных металлов (особенно двухвалентного железа) или различных фотосенсибилизаторов взаимодействуют с поверхностью гранул, сорбируясь на них, как это было показано, например, для полимерных частиц меланина (Zeise et al., 1992a; 1992b; Bridelli, et al., 2006). Такие гетерогенные реакции характерны для частиц, имеющих поры. Важно, как это было показано в экспериментах по связыванию многих экзогенных фотосенсибилизаторов меланинами, что их адсорбция является физической по природе и что химические свойства связанных молекул радикально меняются (Stippa et al., 2004). С помощью такого механизма, при котором меланины и оммохромы практически функционируют в качестве *внутриклеточных сорбентов*, способных связывать оксиданты в неактивные комплексы, экранирующие пигментные гранулы могут регулировать как темновые процессы ПОЛ, так и фотоиндуцированные процессы, сенсibilизированные эндогенными и экзогенными фотосенсибилизаторами замедляя при этом развитие окислительного стресса.

2. Пигментные гранулы, как, например, меланосомы в клетках РПЭ, могут сближаться и сливаться с «проблемными» органеллами (гранулами), в которых велика вероятность развития свободно-радикальных процессов и распространения их на всю клетку. Такими «проблемными» органеллами в клетках РПЭ являются, например, фагосомы, содержащие огромное количество материала, легко подверженного процессу перекисидации как в темноте, так и при освещении, и липофусциновые гранулы, оказывающие цитотоксическое действие на клетку. Так, показано (Schraermeyer et al., 1999), что меланосомы в клетках РПЭ сливаются практически с любым фагоцитируемым материалом, как естественным (обломки НСФ, лизосомы, фагосомы), так искусственным (латекс, НСФ, меченные золотом, и т.п.). По мнению Schraermeyer et al., 1999, слияние фагосом с меланосомами есть скорее общее правило, нежели исключение. Слияние же меланосом с липофусциновыми гранулами и образование меланолипифусциновых гранул, количество которых увеличивается с возрастом, является давно установленным фактом (Feeneu-Burns et al., 1980, 1984). Находясь в непосредственном контакте с объектом, в котором протекают реакции свободнорадикального окисления, меланин может легко ингибировать их, например, путем взаимодействия с радикалами супероксида, гидропероксидов и др. и с нерадикальными активными продуктами процесса перекисидации (например, с альдегидами), ингибируя процесс в самих частицах и предотвращая его развитие в других компартментах клетки.

Таким образом, можно констатировать, что внутриклеточные органеллы – меланосомы и оммохромасомы, как экранирующие пигменты глаза позвоночных и беспозвоночных животных и глаза человека, выполняют одновременно две важные физиологические функции. Во-первых, они служат отсекающими светофильтрами, защищающими фоточувствительные клетки от опасности повреждения слишком ярким светом и улучшающими зрительные характеристики, повышая, например, разрешающую способность глаза. В

случае сетчатки позвоночных и человека, содержащие множество меланосом апикальные отростки клеток РПЭ, плотно окружают наружные сегменты фоторецепторов, выполняя роль экранирующих “прокладок”. Тем самым они поглощают рассеянный свет внутри глазного бокала и повышают разрешающую способность глаза. Во-вторых, экранирующие пигменты, обладая выраженной антиоксидантной активностью, эффективно защищают клетку от опасности окислительного стресса, в том числе и в первую очередь фотоокислительного стресса.

Роль меланосом в клетках ретинального пигментного эпителия глаза человека трудно переоценить. Их исчезновение в процессе старения с одновременным накоплением в клетке РПЭ «пигмента старости» – липофусциновых гранул как источника фотоиндуцированных активных форм кислорода повышает опасность окислительного стресса. Действительно, избыточное накопление в клетках РПЭ липофусциновых гранул, приводящее, в том числе, к их ускоренному слиянию с меланосомами и образованию смешанных меланолипофусциновых гранул, рассматривается как существенный патогенетический фактор (дегенеративные заболевания сетчатки, например, болезнь Штаргардта). Деградация же меланина в составе меланолипофусциновых гранул, приводящая, в конечном счёте, к исчезновению меланосом как экранирующих светофильтров и антиоксидантов существенно повышает опасность развития окислительного и, особенно, фотоокислительного стресса в структурах глаза.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

А2Е – бис-ретинилиден этаноламин
АОА – антиоксидантная активность
АФК – активные формы кислорода
БАС – бронхоальвеолярный смыв
ВМД – возрастная макулярная дегенерация
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
Гр – грей
ГРС – гамма-резонансная спектроскопия
ДОФА – диоксифенилаланин
ИК – инфракрасный
ИС – изомерные сдвиги
КР – квадрупольное расщепление
МДА – малоновый диальдегид
МС – меланосомы
МЛФ – меланолипофусциновые гранулы
ЛФ – липофусциновые гранулы
НС – нейральная сетчатка
НСТ – нитросиний тетразолий
НСФ – наружные сегменты фоторецепторов
ПОЛ – пероксидное окисление липидов
РПЭ – ретинальный пигментный эпителий
СОД – супероксиддисмутаза
СОХ – циклооксигеназа
СТС – сверхтонкая структура
ТБК – тиобарбитуровая кислота
УФ – ультрафиолет
ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
ЭРГ – электроретинограмма
AGE – конечные продукты гликирования
CRALBP – клеточный ретинальдегид связывающий белок
CRBP – клеточный ретинол связывающий белок
IPM – межфоторецепторный матрикс
IRBP – межфоторецепторный ретинол связывающий белок
NHE – гидроксиноненаль

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абу Хамидах А.Е., Демчук Ю.В., Зак П.П., Линдстрем М., Островский М.А. (2010). Коротковолновая световая фильтрация в формировании спектральной чувствительности двух популяций креветок *M. relictus* (Mysida). Вестник Московского университета// Биология. № 2. С. 9 – 14.
2. Аверьянов А.А., Лапикова В.П., Петелина Г.Г., Джавахия В.Г. (1989). Повышенная чувствительность пигментных мутантов *Pyricularia oryzae* к токсичным выделениям листьев риса// Физиология растений. Т. 36. № 6. С. 48-55.
3. Арлашенко Н.И., Громов В.А., Сейдаметов М.А. (1979), Изменение проницаемости гематофтальмического барьера в зависимости от дозы и природы радиационной экспозиции// Радиобиология. Т. 19. Вып. 4. С. 566-571.
4. Арчаков А.И., Бачманова Г.И., Блиндер Л.В., Жихарева В.О., Канаева И.П., Карякин А.В., Карузина И.И., Хайкина С.З., Боровягин В.Л., Галущенко И.В. (1977). Изоляция, анализ и характеристика микросомальных фракций// Биохимия. Т. 42. № 1. С. 100-112.
5. Афанасьев И.Б. (1979). Анион-радикал кислорода в химических и биохимических процессах// Успехи химии. Т. 48. С. 977-1014.
6. Багиров Р.М., Стукан Р.А., Лапина В.А., Донцов А.Е., Островский М.А. (1985). Изучение методом ГРС взаимодействия ионов железа с синтетическим L-ДОФА меланином// Координационная химия. Т. 11. С. 1234-1239.
7. Багиров Р.М., Стукан Р.А., Донцов А.Е., Островский М.А., Лапина В.А. (1986а). Исследование связывания ионов железа меланопротеиновыми гранулами пигментного эпителия глаза методом гамма-резонансной спектроскопии// Биофизика. Т. 31. №3. С. 469-474.
8. Багиров Р.М., Стукан Р.А., Донцов А.Е., Островский М.А., Лапина В.А. (1986б). Исследование методом гамма-резонансной спектроскопии связывания ионов железа оммохромами глаза беспозвоночных// Биофизика. Т. 31. № 6. С. 1017-1022.
9. Бердышев Г.Д. (1964). О защитном действии меланина у облученных мышей// Радиобиология. Т. 4. Вып.4. С. 644-645.
10. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. (1972). Перекисное окисление липидов в биологических мембранах., М., Наука.
11. Воинова Т.М., Вавилова Н.А., Деблова З.Н., Терехова В.А., Джавахия В.Г., Дьяков Ю.Т. (1984). Изменчивость фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav.// Биологические науки. № 1. С. 78-94. DOI: http://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=79018.
12. Гольданский В.И., Гербер Р.Г. (под редакцией). Химические применения Мессбауэровской спектроскопии. 1970, М., Мир.
13. Гольданский В.И., Стукан Р.А. (1967). Работы советских ученых по применению гамма-резонансной спектроскопии в структурной химии// Журн. структур. Химии. Т. 8. № 5. С. 875-890.

14. Горшенев В.Н., Донцов А.Е., Яковлева М.А. (2021). Управляемые внешним магнитным полем сорбционные материалы для очистки водных сред от загрязнений// Химическая безопасность (Chemical safety science). Т. 5. С. 78 – 95, DOI: 10.25514/CHS.2021.2.20004.

15. Грибакин Ф. Г., Чеснокова Е. Г. (1984). Использование глазных мутантов для исследования физиологии зрения насекомых// Успехи совр. биол. Т. 97. № 1. С. 69-82.

16. Грибакин Ф.Г. (1981). Механизмы фоторецепции насекомых. Л: Наука, 213 с.

17. Гулин А. А., Донцов А. Е., Яковлева М. А., Трофимова Н. Н., Айбуш А. В., Васин А. А., Островский М. А. (2022). Окислительная деструкция меланосом из клеток РПЭ человека, индуцированная супероксидными радикалами, приводит к образованию реакционно-способных альдегидов и кетонов. Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. Т. 3.2. № 15. С. 311–316. DOI <https://doi.org/10.18721/JPM.153.257>.

18. Гуляев А.Б., Донцов А.Е., Ильясова В.Б., Островский М.А. (1993). Определение содержания меланина в меланосомах пигментного эпителия глаза в зависимости от возраста человека // Доклады Академии Наук. Т. 333. С.257-259.

19. Дервиз Г.В. (1973). Применение фотоэлектроколориметров «ФЭК-М» и «ФЭК-56» для определения концентрации гемоглобина в крови// Лабораторное дело. № 2. С. 67-72.

20. Демочкин В.В., Донцов А.Е., Кочергинский Н.М., Маслов С.А., Островский М.А., Рубайло В.Л. (1991). Жидкая мембрана для разделения водных растворов солей. Авторское свидетельство СССР. № 1699557. Бюл. № 47.

21. Демочкин В.В. Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Рубайло В.Л., Островский М.А. (1992). Способ переноса электронов через искусственную мембрану. Авторское свидетельство СССР. № 1717198. Бюлл. № 9.

22. Деревянченко Т.Г., Федорович И.Б., Островский М.А. (1985). Распределение сульфгидрильных групп вдоль оси наружного сегмента палочки лягушки// Цитология. Т. 27. № 10. С. 1197-1199.

23. Донцов А.Е. (1981). Антиоксидантная функция оммохромов креветки *Pandalus latirostris*// Журнал эволюционной биохимии и физиологии. Т. 17. С. 53-56.

24. Донцов А.Е., Иванина Т.А., Сакина Н.Л. (1992). Сравнительное исследование УФ- и Fe²⁺ - индуцированного перекисного окисления липидов в интактной и отслоенной сетчатке лягушки// Сенсорные Системы. Т. 6. С. 30-33.

25. Донцов А.Е., Коромылова А.Д., Сакина Н.Л. (2012), Компонент липофусцина А2Е не уменьшает антиоксидантную активность ДОФА-меланина. Бюлл. Эксп. Биол. Мед., Т. 11. С.579-585.

26. Донцов А.Е., Лапина В.А., Островский М.А., Рубанов А.С., Рудак Э.А. (1996). Способ удаления радионуклидов из водных растворов. Патент РФ № 2067328. Бюлл. № 27.

27. Донцов А.Е., Лапина В.А. (1996). Способ удаления гидрофобных жидкостей с поверхности воды. Патент РФ, № 94004129.

28. Донцов А.Е., Лапина В.А., Островский М.А. (1984). Фотогенерация супероксида оммохромами и их роль в системе антиоксидантной защиты клеток глаза беспозвоночных// Биофизика. Т. 29. № 5. С. 878-882.
29. Донцов А.Е., Мордвинцев П.И., Лапина В.А. (1985). Темновой и светоиндуцированный сигналы ЭПР оммохромов глаза беспозвоночных животных// Биофизика. Т. 30. № 1. С. 6-8.
30. Донцов А.Е., Насонов И.В., Лапина В.А. (2008). Меланинсодержащий фитосорбент для профилактики и лечения заболеваний животных, вызванных микотоксинами, пестицидами, вирусными и бактериальными инфекциями. Патент Беларуси, № 11471.
31. Донцов А.Е., Островский М.А. (1996). Способ получения меланинсодержащего фитосорбента и меланинсодержащий фитосорбент. Патент РФ, № 2060818. Бюлл. № 15.
32. Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Голубков А.М., Островский М.А. (2009). Светоиндуцированное высвобождение из липофусциновых гранул ретинального пигментного эпителия глаза человека токсичных продуктов фотоокисления флуорофора А2Е// Доклады РАН. Т. 425. № 5. С. 683-687.
33. Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Коромылова А.Д., Островский М.А. (2015). Эффект УФ-облучения и пероксида водорода на антирадикальную и антиоксидантную активность ДОФА-меланина и меланосом из клеток ретинального пигментного эпителия// Известия РАН. Сер. Химическая. № 7. С. 1623-1628.
34. Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Островский М.А. (1980). Сравнительное исследование перекисного окисления липидов в пигментном эпителии глаза пигментированных животных и альбиносов// Биохимия. Т. 45. № 5. С. 923-928.
35. Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Островский М.А. (1999). Разнонаправленность действия липофусциновых гранул и меланосом из ретинального пигментного эпителия глаза человека при фотоокислении кардиолипина// Биофизика. Т. 44. № 5. С. 880-886.
36. Донцов А.Е., Лапина В.А., Островский М.А., Фельдман Т.Б., Конечных А.В., Билиньска Б., Завада З. (2007). Ингибирование индуцированной аминазином фотопероксидации липидов меланосомами из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека// Молекулярная медицина. № 4. С. 59-64.
37. Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Островский М.А. (2017). Потеря меланина клетками ретинального пигментного эпителия глаза связано с его окислительной деструкцией в составе меланолипофусциновых гранул// Биохимия. Т. 82. №8. С. 916-924.
38. Донцов А.Е., Садыкова В.С., Ушакова Н.А. (2019). Антимикробная активность оммохромов глаза мухи черная львинка *Hermetia illucens*. Сб-к научных трудов VI съезда биофизиков России. С. 281.
39. Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Яковлева М.А., Бастраков А.И., Бастракова И.Г., Загоринский А.А., Ушакова Н.А., Фельдман Т.Б., Островский М.А. (2020а). Оммохромы сложного глаза насекомых: физико-химические свойства и антиоксидантная активность// Биохимия. Т. 85. С. 783-795.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

40. Донцов А.Е., Ушакова Н.А., Садыкова В.С., Бастраков А.И. (2020б). Оммохромы *Hermetia illucens*: получение, исследование антиоксидантных характеристик и антимикробной активности// Прикладная биохимия и микробиология. Т. 56. С. 90-95.

41. Егоров С.Ю., Донцов А.Е., Красновский А.А., Островский М.А. (1987). Тушение синглетного молекулярного кислорода экранирующими пигментами – меланинами и оммохромами// Биофизика. Т. 32. С. 685-686.

42. Карякин Ю.В., Ангелов И.И. (1974). Чистые химические реактивы. М., Химия. С.104.

43. Каюшин Л.П., Пулатова М.К., Кривенко В.Г. (1976). Свободные радикалы и их превращения в облученных белках. М.: Атомиздат, 272 с.

44. Коржова Л.П., Фролова Е.В., Романов Ю.А., Кузнецова И.А. (1989). Фотоиндуцированная деструкция ДОФА-меланина// Биохимия. Т. 54. С. 992-998.

45. Корнеев В.П., Суздаев И.П., Гольданский В.И., Куренева Т.Я., Макаров Е.Ф., Плачинда А.С. (1971). Исследование спин-спиновой релаксации с помощью эффекта Мессбауэра// Физика твердого тела. Т. 13. № 2. С. 354-360.

46. Кочергинский Н.М., Бромберг Л.Е., Лескин Г.С. (1987). Проницаемость импрегнированных фильтров для кислорода и углекислого газа// Журн. физ. хим. Т. 61. № 6. С. 1609-1615.

47. Кочергинский Н.М., Демочкин В.В., Маслов С.А., Донцов А.Е., Рубайло В.Л., Островский М.А. (1990). Транспорт катионов через меланинсодержащие биомиметические мембраны// Журнал физической химии. Т. 64. С. 2479-2484.

48. Лапина В.А., Донцов А.Е., Островский М.А. (1985). Связывание ионов железа экранирующими пигментами глаза позвоночных и беспозвоночных животных - меланосомами и оммохромами// Украинский биохимический журнал. Т. 57. С. 12-15.

49. Лапина В.А., Рубанов А.С., Донцов А.Е., Островский М.А. (1999). Фитосорбент «Виктория» - новый перспективный сорбент, полученный из отходов сельскохозяйственного сырья, «Конверсия научных исследований в Беларуси в рамках деятельности МНТЦ», 38-41, Минск, Беларусь.

50. Лапина В.А., Донцов А.Е., Островский М.А. (1984а). Генерация супероксида при взаимодействии меланина с кислородом// Биохимия. Т. 49. № 10. С. 1712-1718.

51. Лапина В.А., Донцов А.Е., Островский М.А., Эмануэль Н.М. (1984б). Взаимодействие анион-радикалов кислорода с меланинами и оммохромами глаз// Доклады АН СССР. Т. 280. № 6. С. 1463-1465.

52. Лапина В.А., Якубовский С.М., Насонов И.В., Донцов А.Е. (2004). Влияние энтеросорбента на систему антиокислительной защиты эритроцитов цыплят-бройлеров при скармливании корма с высоким содержанием перекисленных липидов. Сборник «Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных», 225-229, Воронеж.

53. Латыпов И.Ф., Всеволодов Э.Б., Голиченков В.Н. (1979). Снижение выхода индуцированных рентгеновским облучением долгоживущих парамагнит-

ных центров в шерсти при наличии в ней меланина// Радиобиология. Т. 19. № 2. С. 189-193.

54. Лях С.П. (1981). Микробный меланогенез и его функции. М.: «Наука», 274 с.

55. Макареева Е.Н., Лозовская Е.Л., Сапежинский И.И. (1998). Фенотиацины как фотосенсибилизаторы и фотопротекторы// Биофизика. Т. 43. №2. С. 181-185.

56. Милинчук В.К., Клишпонт Э.Р., Пшежецкий С.Я. (1980). Макрорадикалы. М.: Химия, 264с.

57. Моссэ И.Б., Савченко В.П., Лях С.П. (1986). Генетический мониторинг экспериментальных популяций дрозофилы при облучении и воздействии антимутагеном меланином. Динамика мутационного процесса// Радиобиология. Т. 26. Вып.1. С. 47-51.

58. Островский М.А., Каюшин, Л.П. (1963). Изучение электронного парамагнитного резонанса в сетчатке при действии света// Доклады АН СССР. Т. 151. № 4. С. 986 – 988.

59. Островский, М.А. (1966). Обратимое изменение сигналов ЭПР пигментного эпителия глаза под действием видимого света. Свободно- радикальные процессы в биологических системах. Труды МОИП. М.: Наука, С. 275 – 279.

60. Островский М.А., Сакина Н.Л., Донцов А.Е. (1980). Антиоксидантная функция экранирующих пигментов глаза// Доклады АН СССР. Т. 255. № 3. С. 749-751.

61. Островский М.А., Сакина Н.Л., Донцов А.Е. (1987). Система защиты структур глаза от фотоповреждения. Экранирующие пигменты позвоночных – меланосомы как ингибиторы процессов фотоокисления// Журнал Эволюц. Биохим. Физиол. Т. 23.№ 5. С. 575-581.

62. Островский М.А., Говардовский В.Н. (1992). Механизмы фоторецепции позвоночных. В кн.: «Физиология зрения». «Наука», М., глава 1. С. 5-59.

63. Островский М.А. (2005). Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения// Успехи биологической химии. Т. 45. С. 173—204.

64. Островский М.А., Зак П.П., Донцов А.Е. (2018). Меланосомы глаза позвоночных и оммохромы глаза беспозвоночных как экранирующие клеточные органеллы// Известия РАН. Серия биологическая. № 6. С. 658-668. DOI: 10.1134/S0002332918060103.

65. Островский М.А., Донцов А.Е. (2019). Меланосомы глаза позвоночных и оммохромы глаза беспозвоночных как антиоксидантные клеточные органеллы// Известия Российской академии наук. Серия биологическая. Т. 1. № 1. С. 1-13.

66. Островский, М.А., Донцов, А.Е., Сакина, Н.Л., Боултон, М., Джарвис-Эванс, Дж. (1992). Способность липофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека фотосенсибилизировать окисление липидов при действии видимого света// Сенсорные Системы. Т. 6. С. 51–54.

Экранирующие пигменты глаза – меланины и оммохромы (структура, физикохимия, функции)

67. Петрухин А.Н., Астафьев А.А., Золотавин П.Н., Фельдман Т.Б., Донцов А.Е., Саркисов О.М., Островский М.А. (2005). Гетерогенность структуры и флуоресценция одиночной липофусциновой гранулы из ретиального пигментного эпителия глаза человека: исследование методами атомно-силовой микроскопии и микроскопии ближнего поля// Доклады Академии наук. Т. 405. № 6. С. 445-449.

68. Плачинда А.С., Макаров Е.Ф. (1974). Исследование хлоркомплексов железа в водных растворах с помощью гамма-резонансной спектроскопии// Журнал неорган. химии. Т. 19. № 5. С. 1308-1317.

69. Погожева И.Д., Федорович И.Б. Островский М.А., Эмануэль Н.М. (1981). Фотоповреждение молекулы родопсина. Окисление SH-групп// Биофизика. Т. 26. С. 398-403.

70. Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Афанасьев Г.Г., Островский М.А., Пелевина И.И. (1990). Аккумуляция продуктов перекисного окисления липидов в структурах глаза мышей, подвергнутых рентгеновскому облучению// Радиобиология. Т. 30. № 1. С. 28-31.

71. Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Кузнецова Г.П., Островский М.А., Арчаков А.И. (1980). Ингибирование перекисного окисления липидов меланопротеиновыми гранулами // Биохимия. Т. 45. № 8. С. 1476-1480.

72. Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Лапина В.А., Островский М.А. (1987). Система защиты структур глаза от фотоповреждения. Экранирующие пигменты членистоногих оммохромы как ингибиторы процесса фотоокисления. // Журнал Эволюц. Биохим. Физиол. Т. 23. № 6. С. 702-706.

73. Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Островский М.А. (1986). Ингибирование меланином процесса фотоокисления липидов// Биохимия. Т. 51. № 5. С. 864-868.

74. Сакина Н.Л., Коромыслова А.Д., Донцов А.Е., Островский М.А. (2013). РПЭ меланосомы связывают флуорофор липофусциновых гранул А2Е и продукты его фотоокисления// Российский Физиол. Журнал им. И.Н. Сеченова. Т. 99. № 5. С. 642-653.

75. Сакина Н.Л., Пулатова М.К., Островский М.А., Смирнов Л.Д. (1979). Действие ингибиторов свободнорадикальных процессов на “темновые” парамагнитные центры меланопротеиновых гранул пигментного эпителия глаза// Биофизика. Т. 24. № 4. С. 646-650.

76. Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Дегтярев Е.Н., Коварский А.Л., Арбуханова П.М., Борзенко С.А., Островский М.А. (2018). Сравнительная оценка содержания меланина в составе меланосом и меланолипофусциновых гранул клеток ретиального пигментного эпителия глаза человека// Офтальмохирургия. № 1. С. 78-82. DOI: <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2018-1-78-82>).

77. Смирнов Л.Д., Кузнецов Ю.В., Проскуряков С.Я., Скворцов В.Г., Носко Т.Н., Донцов А.Е. (2011). Антирадикальная и NO-ингибирующая активность β-гидрокси(этоксид) производных азотистых гетероциклов// Биофизика. Т. 56. № 2. С. 316-321.

78. Суздаев И.П. (1970). О суперпарамагнетизме ультрамалых частиц антиферромагнетиков// Физика твердого тела. Т. 12. № 4. С. 988-990.

79. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. (1997). Измерение антиоксидантной активности плазмы крови

в системе гемоглобин - пероксид водорода – люминол// Вопросы мед. химии. Т. 43. С. 87-92.

80. Шляпинтох В.Я. (1979). Фотохимические превращения и стабилизация полимеров. М.: Наука, 344 с.

81. Фельдман Т.Б., Донцов А.Е., Яковлева М.А., Федорович И.Б., Линдстрем М., Доннер К., Островский М.А. (2008). Сравнение антиоксидантных систем в глазах двух популяций *Mysis relicta* (Crustacea: Mysidacea) с различной устойчивостью к световому повреждению// Сенсорные Системы. Т. 22. № 4. С. 309-316.

82. Чучалин А.Г., Грובהва О.М., Байдер Л.М., Шарыгин В.Л., Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Кудрявцев М.Е., Пулатова М.К. (1993). Выявление радиационно-индуцированных биохимических изменений в клетках крови и бронхоальвеолярного смыва у людей, подвергнутых облучению с малой мощностью дозы в результате аварии на Чернобыльской АЭС, с помощью электронного парамагнитного резонанса// Пульмонология. Т. 3. С. 32-50.

83. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. (1982). Химическая физика старения и стабилизация полимеров. М.: Наука, 360с.

84. Юсифов Э.Ю., Донцов А.Е., Островский М.А. (1987). Влияние меланина на свободно радикальные состояния γ -облученных белков и липидов// Радиобиология. Т. 27. С. 8-11.

85. Яковлева М.А., Сакина Н.Л., Кононихин А.С., Фельдман Т.Б., Николаев Е.Н., Донцов А.Е., Островский М.А. (2006). Обнаружение и исследование продуктов фотоокисления флуорофора липофусциновых гранул из клеток пигментного эпителия глаза человека - N-ретинилиден-N-ретирилэтанолламин (A2E)// Доклады РАН. Т.409. № 3. С.411-414.

86. Acharya S., Rayborn M.E., Hollyfield J.G. (1998). Characterization of SPACR, a sialoprotein associated with cones and rods present in the interphotoreceptor matrix of the human retina: Immunological and lectin binding analysis. *Glycobiology*, v. 8, p. 997–1006. <https://doi.org/10.1093/glycob/8.10.997>.

87. Akeo K., Amaki S., Suzuki T., Hiramitsu T. (2000). Melanin granules prevent the cytotoxic effects of L-DOPA on retinal pigment epithelial cells in vitro by regulation of NO and superoxide radicals. *Pigment Cell Res.*, v. 13, p. 80-88.

88. Akeo K., Hiramitsu T., Yorifuji H., Okisaka S. (2002). Membranes of retinal pigment epithelial cells in vitro are damaged in the phagocytotic process of the photoreceptor outer segment discs peroxidized by ferrous ions. *Pigment Cell Res.*, v. 15, p. 341-347.

89. Alexander K.M. (1955). A comparative study of the ash and iron in vertebrates. *J. Zool. Soc. India*, v. 7, № 2, p. 163-169.

90. Anderson D.H., Guerin C.J., Erickson P.A., Stern W.H., Fisher S.K. (1986). Morphological recovery in the reattached retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 27, p. 168-183.

91. Aroca P, Garcia-Borron J.C., Solano F, Lozano J.A. (1990). Regulation of mammalian melanogenesis I. Partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: Dopachrome tautomerase. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1035, p. 266-275.

92. Asada K., Takahashi M., Nagate M. (1976). Reactivity of thiols with superoxide radicals. *Agr. Biol. Chem.*, v. 40, № 9, p. 1891-1892.
93. Aubry A-F. (2002). Applications of affinity chromatography to the study of drug-melanin binding interactions. *J. of Chromatography B*, v. 768, p. 67-74.
94. Avallé LB, Wang Z, Dillon JP, Gaillard ER. (2004). Observation of A2E oxidation products in human retinal lipofuscin. *Exp. Eye Res.*, v. 78, № 4, p. 895-898.
95. Aybush A.V., Gulin A.A., Vasin A.A., Dontsov A.E., Nadtochenko V.A., Ostrovsky M.A. (2020). Multimodal approach to reveal the effect of light irradiation on chemical composition of lipofuscin granules of human RPE tissues. *J. Phys. Conf. Ser.*, v. 1695, p. 012063. doi:10.1088/1742-6596/1695/1/012063.
96. Back I., Donner K.O., Reuter T. (1965). The screening effect of the pigment epithelium of the retinal rods in the frog. *Vision Res.*, v. 5, № 1, p. 101-111.
97. Baehr W., Wu S.M., Bird A.C., Palczewski K. (2003). The retinoid cycle and retina disease. *Vis. Res.*, v. 43, p. 2957–2958.
98. Bardani L., Bridelli M.G., Carbuicchio M., Crippa P.R. (1982). Comparative Mössbauer and infrared analysis of iron-containing melanin. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 716, p. 8-15.
99. Barnstable C.J., Tombran-Tink, J. (2006). Molecular mechanisms of neuroprotection in the eye. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 572, p. 291–295.
100. Basu P.K., Menon I.A., Persad S.D., Wiltshire J.D. (1989). Binding of chlorpromazine to cultured retinal pigment epithelial cells loaded with melanin. *Lens Eye Toxic. Res.*, v. 6. № 1-2, p. 229-240.
101. Baynes Y.W. (2001). The role of AGEs in aging: Causation or correlation. *Exp. Gerontol.*, v. 36, p. 1527–1537.
102. Bazan N.G. (2007). Homeostatic regulation of photoreceptor cell integrity: significance of the potent mediator neuroprotectin D1 biosynthesized from docosahexaenoic acid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 48, p. 4866-4881.
103. Bazan N.G. (2008). Neurotrophins induce neuroprotective signaling in the retinal pigment epithelial cell by activating the synthesis of the anti-apoptotic neuroprotectin D1. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 613, p. 39-44.
104. Beauchamp C., Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, v. 44, № 1, p. 276-287.
105. Becker E. Die pigmente der ommin- und ommatingruppe, eine neue klasse von naturfarbstoffen. *Naturwissenschaften*, 1941, v. 29, p. 237–238.
106. Belozerskaya T.A., Gessler N.N., Aver'yanov A.A. (2017). Melanin Pigments of Fungi. In *Fungal Metabolites*, eds. J.-M. Mérillon & K. G. Ramawat, p. 263-291. Cham: Springer International Publishing.
107. Besch D., Jagle H., Scholl H.P.N., Seeliger M.W., Zrenner E. (2003). Inherited multifocal RPE-diseases: mechanisms for local dysfunction in global retinoid cycle defects. *Vis. Res.*, v. 43, p. 3095–3108.
108. Ben-Shabat S., Itagaki Y., Jockusch S., Sparrow J.R., Turro N.J., Nakanishi K. (2002a). Formation of a nonaoxirane from A2E, a lipofuscin fluorophore related to macular degeneration, and evidence of singlet oxygen involvement. *Angew. Chem. Int. Edition*, v.41, p. 814-817.

109. Ben-Shabat S., Parish C.A., Volmer H.R., Itagaki Y., Fishkin N., Nakanishi K., Sparrow J.R. (2002b). Biosynthetic studies of A2E, a major fluorophore of RPE lipofuscin. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 7183-7190.
110. Bergersen L., Johannsson E., Veruki M.L., Nagelhus E.A., Halestrap A., Sejersted O.M., Ottersen O.P. (1999). Cellular and subcellular expression of monocarboxylate transporters in the pigment epithelium and retina of the rat. *Neuroscience*, v. 90, p. 319-331.
111. Bertrand G. (1896). Sur une nouvelle oxidase on ferment soluble oxydant d'origine vegetale. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, v. 15, p. 793-795.
112. Bilgihan A., Bilgihan M.K., Akata R.F., Aricioğlu A., Hasanreisoglu B. (1995). Antioxidative role of ocular melanin pigment in the model of lens induced uveitis. *Free Radic Biol. Med.* V. 19, p. 883-885. Doi: 10.1016/0891-5849(95)00093-d. PMID: 8582663.
113. Bito L.Z., Klein E.M. (1981). The unique sensitivity of the rabbit eye to x-ray-induced ocular inflammation. *Exp. Eye Res.*, v.33, № 4, p. 403-412.
114. Blanks J.C., Hageman G.S., Johnson L.V., Spee C. (1988). Ultrastructural visualization of primate cone photoreceptor matrix sheaths. *J Comp Neurol.*, v. 270, p. 288-300. Doi: 10.1002/cne.902700209.
115. Bok D. (1982). Autoradiographic studies on the polarity of plasma membrane receptors in retinal pigment epithelial cells. In: "The structure of the eye", (Hollyfield J.G. ed), Elsevier, Amsterdam, p. 247-256.
116. Bok D. (1993). The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J. of Cell Science*, v. 17, p.189-195.
117. Bolognese A, Scherillo G. (1974). Occurrence and characterization of a labile xanthommatin precursor in some invertebrates. *Experientia*, v. 30, p. 225-226. Doi: 10.1007/BF01934793.
118. Bolognese A., Bonomo R.P., Chillemi R., Sciuto S. (1990) Oxidation of 3-hydroxykynurewnine. An EPR investigation. *J. Heterocyclic Chem.*, v. 27, p. 2207-2208.
119. Bolton J.R. (1972) Experimental aspects of biological electron spin resonance studies, in *Biological Application of Electron Spin Resonance* (Swartz H.M., Bolton J.R., Borg D.C., Eds.); Wiley (Interscience), NY, USA, p. 11.
120. Bonilha V.L., Finnemann S.C., Rodrigues-Boulan E. (1999). Ezrin promotes morphogenesis of apical microvilli and basal infoldings in retinal pigment epithelium. *J. Cell Biol.*, v. 147, p. 1533-1548.
121. Bonilha V.L., Bhattacharya S.K., West K.A., Sun J., Crabb J.W., Rayborn M.E., Hollyfield J.G. (2004). Proteomic characterization of isolated retinal pigment epithelium microvilli. *Mol. Cell Proteomics*, v.3, p.1119-1127.
122. Bonner J., Gribble S.L., Veien E.S., Nikolaus O.B., Weidinger G., Dorsky R.I. (2008). Proliferation and patterning are mediated independently in the dorsal spinal cord downstream of canonical Wnt signaling. *Developmental Biology*, v. 313, p. 398-407.
123. Booij J.C., van Soest S., Swagemakers S.M.A., Essing A.H.W., Verkerk A.J.M.H., van der Spek P.J., Gorgels T.G.M.F., Bergen A.A.B. (2009). Functional

annotation of the human retinal pigment epithelium Transcriptome. *Genomics*, v. 10, p.164 -182.

124. Borovansky J., Elleder M. (2003) Melanosomes degradation: fact or fiction. *Pigment Cell Res.*, v. 16, p. 280–286.

125. Boulton M., Marshall J. (1985). Re-pigmentation of human retinal pigment epithelial cells in vitro // *Exp. Eye Res.*, v. 41, p. 209-218.

126. Boulton M, Docchio F, Dayhaw-Barker P, Ramponi R, Cubeddu R. (1990). Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanosomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium. *Vision Res.*, v. 30, p. 1291–1303.

127. Boulton M.E. (1991). Ageing of the retinal pigment epithelium. In: *Progress in retinal research* (Ed's N. Osborne and G. Chader), v. 11, p. 125-151.

128. Boulton M.E. (1998). The role of melanin in the RPE. In: *The retinal pigment epithelium*. Eds: Marmor M.F., Wolfensberger T.J., Oxford, UK; Oxford Univ. Press, p. 68-85.

129. Boulton M., Dontsov A., Jarvis-Evans J., Ostrovsky M., Svistunenko D. (1993) *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, v. 19, p. 201-204.

130. Bouthier A (1981) Les ommochromes, pigments absorbantes des yeux des Arthropodes. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, v. 122, p. 237–252.

131. Bridelli M.G., Capeletti R., Crippa P.R. (1980). Infrared spectroscopy of eye and synthetic melanins at various values of pH and hydration. *Physiol. Chem. Phys.*, v. 12, № 3, p. 233-240.

132. Bridelli M.G., Ciati A., Crippa P.R. (2006). Binding of chemicals to melanins reexamined: adsorption of some drugs to the surface of melanin particles. *Biophys. Chem.*, v. 119, p. 137-145.

133. Britton G. (1983). *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge: Cambridge University Press, 422 p.

134. Buege J.A., Aust S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v. 52, p. 302-310.

135. Bull A.T. (1970). Kinetics of cellulase inactivation by melanin. *Enzymologia*, v. 39, p.333-347.

136. Burns C.J., Zhang J., Brown E.C., Van Bibber A.M., Van Es J., Clevers H., Ishikawa T., Taketo M.M., Vetter M.L., Fuhrmann S. (2008). Investigation of Frizzled-5 during embryonic neural development in mouse. *Developmental Dynamics*, v. 237, p. 1614-1626. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21565>.

137. Butenandt A., Schiedt U., Biekert E. (1954). Uber ommochrome. I. Mitteilung: Isolierung von xanthommatin, rhodommatin und ommatin C aus den schlupfsekreten von *Vanessa urticae*, *Eur. J. Org. Chem.*, v. 586, p. 217–228.

138. Butenandt A., Schafer W. (1962). Ommochromes. In: «Recent progress in the chemistry of natural and synthetic colouring matters and related fields». Ed. by T.S. Gore et al., p. 13-62, Acad. Press, N.-Y.

139. Cabukusta B.; Neefjes J. (2018). Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic*, v. 19, p. 761–769. <https://doi.org/10.1111/tra.12587>.

140. Campochiaro P.A., Jerdon J.A., Glaser B.M. (1986). The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 27, p. 1615–1621.
141. Cantrell A, McGarvey DJ, Roberts J, Sarna T, Truscott TG. (2001). Photochemical studies of A2E. *J. Photochem. Photobiol B. Biol.*, v.64, p. 162–165.
142. Cao W., Tombran-Tink J., Elias R., Sezate S., Mrazek D., McGinnis J.F. (2001). In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 42, p.1646-1652.
143. Cao, W., Zhou X., McCallum N.C, Hu Z., Ni Q.Z., Kapoor U., Heil C.M., Cay K.S., Zand T., Mantanona A.J., Jayaraman A., Dhinojwala A., Deheyn D.D., Shawkey M.D., Burkart M.D., Rinehart J.D., Gianneschi N.C. (2021) Unraveling the Structure and Function of Melanin through Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, v. 143, p. 2622-2637.
144. Capece L., Lewis-Ballester A., Batabyal D., Di Russo N., Yeh S.R., Estrin D.A., Marti M.A. (2010). The first step of the deoxygenation reaction carried out by tryptophan dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase as revealed by quantum mechanical/molecular mechanical studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 15, p. 811–823. Doi: 10.1007/s00775-010-0646-x.
145. Chedekel M.R., Smith S.K., Post P.W., Pokora A., Vessell D.L. (1978). Photodestruction of pheomelanin: role of oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 75, p. 5395-5399. Doi: 10.1073/pnas.75.11.5395.
146. Cho S-H., Cepko C.L. (2006) Wnt2b/beta-catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development*, v. 133, p. 3167-3177. Doi: 10.1242/dev.02474.
147. Chow R.L., Lang R.A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, v. 17, p. 255-296. Doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.255.
148. Colín-González A.L., Maldonado P.D., Santamaría A. (2013). 3-Hydroxykynurenine: an intriguing molecule exerting dual actions in the central nervous system. *Neurotoxicology*, v. 34, p. 189-204. Doi: 10.1016/j.neuro.2012.11.007.
149. Commoner B., Townsend J., Pake G. (1954). Free radicals in biological materials, *Nature*, v. 174, p. 689–691.
150. Cordero R.Jb., Casadevall A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biol Rev.*, v. 31, p. 99-112. Doi: 10.1016/j.fbr.2016.12.003.
151. Corsaro C., Scalia M., Blanco A.R., Aiello I., Sichel G. (1995). Melanins in physiological conditions protect against lipoperoxidation. A study on albino and pigmented *Xenopus*. *Pigment Cell Res.*, v. 8, p. 279-282.
152. Crabb J.W., O’Neil J., Miyagi M., West K., Hoff H.F. (2002). Hydroxynonenal inactivates cathepsin B by forming Michael adducts with active site residues. *Protein Sci.*, v. 11, p. 831- 840.
153. Crippa P.R., Fornes J.A., Ito A.S. (2004). Photophysical properties of pyrene in interaction with the surface of melanin particles. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*, v. 35, p. 137-141.
154. Cronin T.W., Bok M.J., Marshall N.J., Caldwell R.L. (2014). Filtering and polychromatic vision in mantis shrimps: themes in visible and ultraviolet vision. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, v. 369, p. 20130032. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0032>.

155. Dadachova E., Bryan R.A., Howell R.C., Schweitzer A.D., Aisen P., Nosanchuk J. D., Casadevall A. (2008) The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. *Pigment Cell Melanoma Res*, v. 21, p. 192-199.

156. Das K.C., Abramson M.B., Katzman R. (1976). A new chemical method for quantifying melanin. *J. Neurochem.*, v. 26, p. 695-699.

157. Dayhaw-Barker P. (2002). Retinal pigment epithelium melanin and ocular toxicity. *Int. J. Toxicol.*, v. 21, № 6, p. 451-454.

158. De S, Sakmar TP. (2002). Interaction of A2E with model membranes. Implications to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *J. Gen. Physiol.*, v.120, p. 147–157.

159. Decanini, A., Nordgaard C.L., Feng X., Ferrington D.A., Olsen T.W. (2007). Changes in Select Redox Proteins of the Retinal Pigment Epithelium in Age-related Macular Degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 143, p. 607–615. Doi: 10.1016/j.ajo.2006.12.006.

160. Dell'Angelica E.C. (2003). Melanosome biogenesis: shedding light on the origin of an obscure organelle. *Trends Cell Biol.*, v. 13, p. 503-506.

161. Dighton J., Tugay T., Zhdanova N. (2008) Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 281, p. 109-120.

162. Dillard C.J., Tappel A.L. Fluorescent damage products of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 1984, v. 105, p. 337-341.

163. D'Ischia M., Prota G. Biosynthesis, structure, and function of neuromelanin and its relation to Parkinson's disease: a critical update. *Pigment Cell Res.*, 1997, v. 10, p. 370-376.

164. Donner K., Zak P., Viljanen M., Lindström M., Feldman T., Ostrovsky M. (2016). Eye spectral sensitivity in fresh- and brackish-water populations of three glacial-relict *Mysis* species (*Crustacea*): Physiology and genetics of differential tuning. *J. Comparat. Physiol. A: Neuroethol. Sensory Neural. Behav. Physiol.*, v. 202, p. 297–312.

165. Dontsov A.E., Fedorovich I.B., Lindstrom M., Ostrovsky M.A. (1999). Comparative study of spectral and antioxidant properties of pigments from the eyes of two *Mysis relicta* (*Crustacea, Mysidacea*) populations, with different light damage resistance. *J. Comp. Physiol. B.*, v. 169, p. 157-164.

166. Dontsov A.E., Yakovleva M.A., Ostrovsky M.A. (2021). Ommochromes of Insect Compound Eyes: Antiglycation Action. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, v. 51, p. 837-841. Doi 10.1007/s11055-021-01141-y.

167. Dontsov A., Yakovleva M., Trofimova N., Sakina N., Gulin A., Aybush A., Gostev F., Vasin A., Feldman T., Ostrovsky M. (2022). Water-soluble products of photooxidative destruction of the bisretinoid A2E cause proteins modification in the dark. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 23, p. 1534.

168. Dontsov, A.E.; Yakovleva, M.A.; Vasin, A.A.; Gulin, A.A.; Aybush, A.V.; Nadtochenko, V.A.; Ostrovsky, M.A. (2023). Understanding the Mechanism of Light-Induced Age-Related Decrease in Melanin Concentration in Retinal Pigment Epithelium Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 24, p. 13099. [https://doi.org/ 10.3390/ijms241713099](https://doi.org/10.3390/ijms241713099).

169. Dontsov A., Ostrovsky M. (2024). Retinal Pigment Epithelium Pigment Granules: Norms, Age Relations and Pathology. *Int. J. Mol. Sci.* v. 25, p. 3609. <https://doi.org/10.3390/ijms25073609>.
170. Dorey C.K., Wu G., Ebenstein D., Garsd A., Weiter J.J. (1989). Cell loss in the aging retina: relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 30, p. 1691-1699.
171. Duchon J., Borovanski J., Hach P. (1973) Chemical composition of ten kinds of various melanosomes. In: *Mechanisms of pigmentation*, 1, 165-17
172. Elleder, M.; Borovansky, J. (2001). Autofluorescence of melanin induced by ultraviolet radiation and near ultraviolet light. A histochemical and biochemical study. *Histochem. J.*, v. 33, p. 273–281.
173. Elofsson R., Hallberg E. (1973). Correlation of ultrastructure and chemical composition of crustacean chromatophore pigment. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 44, p 421-429. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(73\)90008-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(73)90008-7).
174. Enochs W.S., Sarna T., Zecca L., Riley P.A., Swartz H.M. (1994). The role of neuromelanin, binding of metal ions, and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis. *J. Neural. Trans. Park. Dis. Dement. Sect.*, v. 7, p. 83-100.
175. Ephrussi B., Herold J.L. (1944). Studies of eye pigments of *Drosophila*. Methods of extraction and quantitative estimation of the pigment components, *Genetics*. vol. 29, p. 148–175.
176. Fahn S., Cohen G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.*, v. 32, p. 804-812.
177. Farmer L.A., Haidasz E.A., Griesser M., Pratt D.A. (2017) Phenoxazine: a privileged scaffold for radical-trapping antioxidants, *J. Org. Chem.*, v. 82, p. 10523-10536. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02025>.
178. Feeney L., Grieshaber J.A., Hogan M.J. (1965). Studies on human ocular pigment. In: Cohen J.W. (ed.). *The structure of the eye*. Schattauer, Stuttgart, p. 535-548.
179. Feeney, L. (1978). Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium: fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 17, p. 583–600.
180. Feeney-Burns L. (1980). The pigments of the retinal pigment epithelium. *Curr. Top. Eye Res.*, v. 2, p.119-178.
181. Feeney-Burns L., Berman E.R., Rothman H. (1980). Lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 90, p. 783-791.
182. Feeney-Burns L., Hilderbrand E.S., Eldridge S. (1984). Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.25, p. 195-200.
183. Feliciello A., Gottesman M.E., Avvedimento E.V. (2001). The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J. Mol. Biol.*, v. 308, p. 99–114.
184. Felix C.C., Hyde J.S., Sarna T., Sealy R.C. (1978). Melanin photoreactions in aerated media: Electron spin resonance evidence for production of superoxide and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, v. 84, p 335-341. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)90175-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)90175-4).

185. Figue F.H.J. (1939). Melanin: a natural reversible oxidation–reduction system and indicator. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 41, p. 127. Doi:10.3181/00379727-41-10593P.

186. Figon F., Casas J. (2019). Ommochromes in invertebrates: biochemistry and cell biology. *Biol. Rev.*, v. 94, p. 156–183. Doi: 10.1111/brv.12441.

187. Figon F., Munsch T., Croix C., Viaud-Massuard M-C., Lanoue A., Casas J. (2020). Uncyclized xanthommatin is a key ommochrome intermediate in invertebrate coloration. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 124, p. 103403. Doi: 10.1016/j.ibmb.2020.103403.

188. Finnemann S.C., Bonilha V.L., Marmorstein A.D., Rodriguez-Boulan E. (1997). Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 12932-12937.

189. Finnemann S.C., Rodriguez-Boulan E. (1999). Macrophage and retinal pigment epithelium phagocytosis: apoptotic cells and photoreceptors compete for $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ integrins, and protein kinase C regulates $\alpha V\beta 5$ binding and cytoskeletal linkage. *J. Exp. Med.*, v. 190, pp. 861-874.

190. Fite, K.V.; Bengston, L. (1989). Aging and sex-related changes in the outer retina of Japanese quail *Current Eye Research.*, v. 8, p. 1039-1048.

191. Fite, K.V.; Bengston, L.; Donaghey, B. (1993). Experimental Light Damage Increases Lipofuscin in the Retinal Pigment Epithelium of Japanese Quail (*Coturnix coturnix Japonica*). *Exp. Eye Res.*, v. 57, p. 449-460.

192. Fokina V.M., Frolova E.I. (2006). Expression patterns of Wnt genes during development of an anterior part of the chicken eye. *Dev Dyn.*, v. 235, p. 496-505. Doi: 10.1002/dvdy.20621.

193. Folch J., Lees L.M., Sloane-Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, v. 226, p. 497-509.

194. Forrester J.V., Dick A., McMenamin P., Lee W. (2001). *The Eye: Basic Sciences in Practice*. London, Saunders.

195. Froncisz W., Sarna T., Hyde J.S. (1980). Cu^{2+} probe of metal-ion binding sites in melanin using electron paramagnetic resonance spectroscopy. I. Synthetic melanins. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.202, p. 289-303.

196. Friedt J.M., Danon J. (1972). Applications of the Mössbauer effect in radiochemistry. *Radiochim. Acta*, v. 17, p. 173-190.

197. Fukuda M. (2020). Rab GTPases: key players in melanosome biogenesis, transport, and transfer. *Pigment Cell and Melanoma Research.*, v. 34, p. 222-235.

198. Fuhrmann S. (2010). Eye Morphogenesis and Patterning of the Optic Vesicle. *Curr Top Dev Biol.*; v. 93, p. 61–84. doi:10.1016/B978-0-12-385044-7.00003-5.

199. Funayama N., Nagafuchi A., Sato N., Tsukita Sa., Tsukita Sh. (1991). Radixin is a novel member of the band 4.1 family. *J. Cell Biol.*, v. 115, p. 1039-1048.

200. Furth V., Schneider, O., and Schneider, H., (1902). Über tierischen tyrosinase und ihre beziehungen zur pigmentbildung. *Beitr. Chem. Physiol. Pathol.*, v. 1, p. 229–242.

201. Futahashi R, Kurita R, Mano H, Fukatsu T. (2012). Redox alters yellow dragonflies into red. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, p. 12626–12631. Doi: 10.1073/pnas.1207114109.
202. Futter C.E. (2006). The molecular regulation of organelle transport in mammalian retinal pigment epithelial cells. *Pigment Cell Res.*, v. 19, p. 104–111.
203. Gan E.V., Haberman H.F., Menon, I.A. (1976). Electron transfer properties of melanin. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 173, p. 666–669.
204. Gan E.V., Lam K.M., Haberman H.F., Menon I.A. (1977). Electron transfer properties of melanins, *Brit. J. Dermatol.*, v. 96, p. 25–28.
205. Gao H., Hollyfield J.G. (1992). Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* v. 33, p. 1-17.
206. Garron L.K. (1963). The ultrastructure of the retinal pigment epithelium with observations on the choriocapillaris and Bruch's membrane. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, v. 61, p. 545–588.
207. Gary R., Bretscher A. (1993). Heterotypic and homotypic associations between ezrin and moesin, two putative membrane-cytoskeletal linking proteins. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 90, p. 10846-10850. Doi: 10.1073/pnas.90.22.10846.
208. Gaur V.P., Liu Y., Turner J.E. (1992). RPE conditioned medium stimulates photoreceptor cell survival, neurite outgrowth and differentiation in vitro. *Exp. Eye Res.*, v. 54, p. 645-659.
209. Gelineau-van Waes J., Smith L., van Waesc M., Wilberding J., Eudy J.D., Bauer L.K., Maddox J. (2008). Altered expression of the iron transporter Nramp1 (Slc11a1) during fetal development of the retinal pigment epithelium in microphthalmia-associated transcription factor $Mitf_{mi}$ and $Mitf_{vitiligo}$ mouse mutants. *Exp. Eye Res.*, v. 86, p. 419–433.
210. Geremia E., Corsaro C., Bonomo R., Giardinelli R., Pappalardo P., Vanella A., Sichel G. (1984). Eumelanins as free radical trap and superoxide dismutase activity in Amphibia. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, v. 79, p. 67-69.
211. Gery I. (1980). Inhibition of DNA and RNA synthesis in lymphocyte cultures by rod outer segments and its counteraction vitamin E and other antioxidants. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 19, № 7, p.751-759.
212. Gocke E. (2001). Photochemical mutagenesis: examples and toxicological relevance. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, v. 20, № 4, p. 285-292.
213. Goodchild N.T., Kwock L., Lin, P.S. (1981). Melanin: a possible cellular superoxide scavenger, in *Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biology*, Rodgers, M.A.J. and Powers, E.L., Eds., New York: Acad. Press, p. 645–648.
214. Graham D.G. (1979). On the origin and significance of neuromelanin. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 103, № 7, p. 359-362.
215. Gribakin F.G., Ukhanov K.Y. (1993). Light scattering in the eye of the blow-fly chalky mutant: the effect on spectral sensitivity of photoreceptors R1-6. *Vis. Res.*, v. 33, p. 1185–1191.
216. Guerin C.J., Anderson D.H., Fariss R.N., Fisher S.K. (1989). Retinal reattachment of the primate macula. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 30, p. 1708-1725.

217. Guerin C.J., Levis G.P., Fisher S.K., Anderson D.H. (1993). Recovery of photoreceptor outer segment length and analysis of membrane assembly rates in regenerating primate photoreceptor outer segments. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 34, p. 175-183.

218. Gundersen D., Orłowski J., Rodriguez-Boulan E. (1991). Apical polarity of Na, K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J Cell Biol.*, v. 112, p. 863-72. Doi: 10.1083/jcb.112.5.863.

219. Hahn P., Milam A.H., Dunaief J.L. (2003). Maculas affected by age-related macular degeneration contain increased chelatable iron in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Arch. Ophthalmol.*, v. 121, p. 1099-1105.

220. Hall R.D., Buettner G.R., Chignell C.F. (1991). The biphotonic photoionization of chlorpromazine during conventional flash photolysis: spin trapping results with 5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide. *Photochem. Photobiol.*, v. 54, № 2, p. 167-172.

221. Hallsson J.H., Hafliðadóttir B.S., Stivers C., Odenwald W., Arnheiter H., Pignoni F., Steingrímsson E. (2004). The basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor Mitf is conserved in *Drosophila* and functions in eye development. *Genetics*. v. 167, p. 233-241. Doi: 10.1534/genetics.167.1.233.

222. Ham W.T., Ruffolo J.J., Mueller H.A., Clarke A.M., Moon M.E. (1978). Histological analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short wavelength light. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, v. 17, p. 1029-1035.

223. Ham W.T., Ruffolo J.J., Mueller H.A., Du Pont Guerry I.I. (1980). The nature of retinal radiation damage: dependence on wavelength, power level and exposure time. *Vision Res.*, v. 20, № 12, p. 1105-1111.

224. Hamann S. (2002). Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int. Rev. Cytol.*, v. 215, p. 395-431.

225. Hanono A., Garbett D., Reczek D., Chambers D.N., Bretscher A. (2006). EPI64 regulates microvillar subdomains and structure. *J. Cell Biol.*, v. 175, p. 803-813.

226. Harik S.I., Kalaria R.N., Whitney P.M., Andersson L., Lundahl P., Ledbetter S.R., Perry G. (1990). Glucose transporters are abundant in cells with "occluding" junctions at the blood-eye barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 87, p. 4261-4264.

227. Hata F. (1979). Effects of infrared rays to the rabbit retina. 1. Electron microscopic studies of the retinal pigment epithelium. *Folia Ophthalmol. Jap.*, v. 30, p. 26-34.

228. Hatta S., Mishima Y., Ichihashi M., Ito S. (1988). Melanin monomers within coated vesicles and premelanosomes in melanin synthesizing cells. *J. Invest. Dermatol.*, v. 91, p. 181-184. Doi: 10.1111/1523-1747.ep12464454.

229. Hazim R.A., Williams D.S. (2022). Microtubule Motor Transport of Organelles in a Specialized Epithelium: The RPE. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 852468.

230. Hearing V.J. (1998). The regulation of melanin production. In: Nordlund J.J., Boissy R.E., Hearing V.J., King R.A., Ortonne J.P. *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. New York: Oxford University Press, p. 423-438.

231. Heath R. L., Tappel A. L. (1976). A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. *Anal. Biochem.*, v. 76, № 1, p. 184-191.
232. Hegedus Z.L., Altschule, M.D. (1970). Studies on rheomelanins. I. The formation of rheomelanins in human blood plasma from catecholamines, from L-dopa and from some of their derivatives. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, v. 78, № 3, p. 443-459.
233. Heo J., Campbell S.L. (2005). Superoxide anion radical modulates the activity of Ras and Ras-related GTPases by a radical-based mechanism similar to that of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, v. 280, p. 12438-12445.
234. Heo, J.; Campbell, S.L. (2006). Ras Regulation by Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Biochemistry*, v. 45, p. 2200-2210.
235. Higuera J.E., Santacruz-Ortega H.C., Carbonell-Barrachina A.A., Burgos-Hernández A., Robles-Sánchez R.M., Cruz-Ramírez S.G., Ezquerro-Brauer J.M. (2019). Xanthommatin is Behind the Antioxidant Activity of the Skin of *Drosophila gigas*. *Molecules*, v. 24, p. 3420. Doi:10.3390/molecules24193420.
236. Hodgkinson C.A., Moore K.J., Nakayama A., Steingrimsson E., Copeland N.G., Jenkins N.A., Arnheiter H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, v.74, p. 395-404.
237. Hogan M.J., Alvarado J.A., Weddell J.E. (1971). *Histology of the human eye*. Philadelphia, chap. 9, p. 393-522.
238. Hollyfield J.G., Witkovsky P. (1974). Pigmented retinal epithelium involvement in photoreceptor development and function. *J. Exp. Zool.*, v. 189, p. 357-378.
239. Hollyfield, J.G., Rayborn, M.E., Landers, R.A., Myers, K.A. (1990). Insoluble interphotoreceptor domains surround rod photoreceptors in the human retina. *Exp. Eye Res.*, v. 50, p. 107-110.
240. Hollyfield J.G. (1999). Hyaluronan and the functional organization of the interphotoreceptor matrix. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 40, p. 2767-2769.
241. Holz F.G., Bellmann C., Margaritidis M., Schütt F., Otto T.P., Völcker H.E. (1999). Patterns of increased in vivo autofluorescence in the junctional zone of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium associated with age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, v. 237, p. 145-152.
242. Homma Y., Hiragi S., Fukuda M. (2020). Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *The FEBS Journal*, v. 288, p. 36-55.
243. Honda O, Ohira A, Ishigooka H, Ueno S, Honda Y. (1997). Detached retina affects morphologic and biochemical changes in the retina adjacent to bullous retinal detachment in rabbits. *Curr. Eye Res.* v. 16, p. 56-63. Doi: 10.1076/ceyr.16.1.56.5115.
244. Howells L., Godfrey M., Sauer M.J. (1994). Melanin as an adsorbent for drug residues. *Analyst.*, v. 119, № 12, p. 2691-2693.
245. Huang W, Gong Z, Li J, Ding J. (2013). Crystal structure of *Drosophila melanogaster* tryptophan 2,3-dioxygenase reveals insights into substrate recognition and catalytic mechanism. *Journal of Structural Biology*, v. 181, p 291-299. Doi: 10.1016/j.jsb.2013.01.002.
246. Huang J., Possin D.E., Saari J.C. (2009). Localizations of visual cycle components in retinal pigment epithelium. *Molecular Vision*, v. 15, pp. 223-234.

247. Hyman L.G., Lilienfeld A.M., Ferris F.L.I., Fine S.L. (1983). Senile macular degeneration: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.*, v. 118, p. 213-227. Doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a113629.

248. Ille F., Atanasoski S., Falk S., Ittner L.M., Marki D., Buchmann-Moller S., Wurdak H., Suter U., Taketo M.M., Sommer L. (2007). Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Dev. Biol.* v. 304, p. 394–408.

249. Insausti T.C., Le Gall M., Lazzari C.R. (2013). Oxidative stress, photodamage and role of screening pigment in insect eyes. *J. Exp. Biol.*, v. 216, p. 3200-3207.

250. Iozzo R.V. (1999). The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 18843-18846.

251. Ito S., Inoue S., Fujite K. (1983). The mechanism of toxicity of 5-S-cysteinyl-dopa to tumor cells. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, v. 32, №13, p. 2079-2081.

252. Ito S. (1998). Advances in chemical analysis of melanins. In: Nordlund J.J., Boissy R.E., Hearing V.J., King R.A., Ortonne J.P. *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. New York: Oxford University Press, p. 439-450.

253. Iwahashi H, Ishii T. (1997). Detection of the oxidative products of 3-hydroxykynurenine using high-performance liquid chromatography–electrochemical detection–ultraviolet absorption detection–electron spin resonance spectrometry and high-performance liquid chromatography–electrochemical detection–ultraviolet absorption detection–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*; v. 773, p. 23–31 [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00271-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00271-9).

254. Jablonski M.M., Tombran-Tink J., Mrazek D.A., Iannaccone A. (2000). Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J. Neuroscience*, v. 20, p. 7149-7157.

255. Jimbow K., Park J.S., Kato F., Hirotsuki K., Toyofuku K., Hua C., Yamashita T. (2000). Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res.*, v. 13, p. 222-229. Doi: 10.1034/j.1600-0749.2000.130403.x.

256. Jimenez-Cervantes C., Solano F., Kobayashi T., Urabe K., Hearing V.J., Lozano J.A., Garcia-Borron J.C. (1994). A new enzymatic function in the melanogenic pathway: the DHICA oxidase activity of tyrosinase related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 17993-18001.

257. Johannsen A.O. (1924). Eye structure in normal and eye-mutant *Drosophila*. *J. Morphol.*, v. 39, p. 337–350.

258. Johnston R.B., Keele B.B., Misra H.P., Lehmeier J.E., Wess L.S., Baehner R.L., Rajagopalan K.V. (1975). The mechanism of toxicity of 5-S-cysteinyl-dopa to tumour cells. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. *J. Clin. Invest.*, v. 55, № 6, p. 1357-1372.

259. Jokela-Määttä M., Pahlberg J., Lindström M., Zak P.P., Porter M., Ostrovsky M.A., Cronin T.W., Donner K. (2005). Visual pigment absorbance and spectral sensitivity of the *Mysis relicta* species group (*Crustacea, Mysida*) in different light environments. *J. Comp. Physiol. A.*, v. 191, p. 1087–1097.

260. Kang K.H., Lemke G., Kim J.W. (2009). The PI3K-PTEN tug-of-war, oxidative stress and retinal degeneration. *Trends in Mol. Med.*, v. 15, p. 191-198.
261. Kanofsky J. R., Sima P.D., Richter C. (2003). Singlet-oxygen generation from A2E. *Photochem. Photobiol.*, v.77, № 3, p. 235-242.
262. Kaplan M.W., Iwata R.T., Sterrett C.B. (1990). Retinal detachment prevents normal assembly of disk membranes in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 31, p. 1-8.
263. Katz M.L., Stone W.L., Dratz E.A. (1978). Fluorescent pigment accumulation in retinal pigment epithelium of antioxidant-deficient rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 17, № 11, p. 1049-1058.
264. Kayatz P., Esser P., Peters S., Schraermeyer U. (1998). Ultrastructural localization of lipid peroxides in the choroid of the albino mouse. 96th Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft Annual Meeting, Berlin, Germany.
265. Kayatz P., Heiman K., Esser P., Peters S., Schraermeyer U. (1999). Ultrastructural localization of lipid peroxides as benzidine-reactive substances in the albino mouse eye. *Graefes Arch. Exp. Ophthalmol.*, v. 237, p. 685-690.
266. Kayatz P., Thumann G., Luther T.T., Jordan J.F., Bartz-Schmidt K.U., Esser P.J., Schraermeyer U. (2001). Oxidation causes melanin fluorescence. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 42, p. 241-246.
267. Kayser H. (1985). Pigments. In: Kerkut G.A., Gilbert L.I., editors. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. New York: Pergamon Press, v. 10, p. 368-415.
268. Keefe J.R. (1973). An analysis of urodelian retinal regeneration. I. Studies of the cellular source of retinal regeneration in *Notophthalmus viridescens* utilizing 3H-thymidine and colchicine. *J. Exp. Zool.*, v. 184, p. 185-206.
269. Kim H.J., Montenegro D., Zhao J., Sparrow J.R. (2021). Bisretinoids of the retina: Photo-oxidation, iron-catalyzed oxidation, and disease consequences. *Antioxidants*, v. 10, p. 1382.
270. Kim E., Panzella L., Napolitano A., Payne G.F. (2020) Redox Activities of Melanins Investigated by Electrochemical Reverse Engineering: Implications for their Roles in Oxidative Stress. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 140, p. 537-543.
271. Kobayashi T., Urabe K., Winder A.J., Jimenez-Cervantes C., Imokawa G., Brewington T., Solano F., Garcia-Borron J.C., Hearing V.J. (1994). Tyrosinase-related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.*, v. 13, p. 5818-5825.
272. Kobayashi T., Vieira W.D., Potterf B., Sakai C., Imokawa G., Hearing V.J. (1995). Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J. Cell. Sci.*, v. 108, p. 2301-2309.
273. Kocherginsky N.M., Osak I.S., Bromberg L.E., Karyagin V.A., Moshkovsky Yu. Sh., Leskin G.S. (1987). The modeling of biological membrane properties by means of filters impregnated with lipid-like substances. *J. of Membr. Sci.*, v 30, p. 39-46. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)83339-6](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)83339-6).
274. Kohen R., Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*, v. 30, p. 620-650.

275. Korenbrot J.I., Fernald R.D. (1989). Circadian rhythm and light regulate opsin mRNA in rod photoreceptors. *Nature*, v. 337, № 6206, p. 454-457.

276. Korytowski W., Kalyanaraman I.A., Menon I.A., Sarna T., Sealy R.C. (1986). Reaction of superoxide anions with melanins: electron spin resonance and spin trapping studies. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 882, p. 145-153.

277. Korytowski W., Pilas B., Sarna T., Kalyanaraman I.A. Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. *Photochem. Photobiol.*, 1987, v. 45, № 2, p. 185-190.

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

279. Krasnovsky A.A., Jr. (1998). Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies. *Membr. Cell Biol.*, v.12, № 5, p. 665-690.

280. Krohn D.L., Jacobson J.H., Najac H.W., Newton M.C., Robertson J.S. (1970). Toxic effect of thermal neutrons on the rabbit electroretinogram. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 70, № 5, p. 814-821.

281. Land E.J., Thompson A., Truscott T.G., Subbarao K.V., Chedekel M.R. (1986). Photochemistry of melanin precursors: dopa, 5-S-cysteinyl-dopa and 2,5-S,S'-dicysteinyl-dopa. *Photochem. Photobiol.*, v. 44, № 6, p. 697-702.

282. Lall A.B., Strother G.K., Cronin T.W., Seliger H.H. (1988). Modification of spectral sensitivities by screening pigments in the compound eyes of twilight-active fireflies (*Coleoptera: Lampyridae*). *J. Comp. Physiol. A.*, v. 162, p. 23-33.

283. Langer H. (1975). Properties and functions of screening pigments in insect eyes. In: Snyder AW, Menzel R, editors. *Photoreceptor Optics* Berlin: Springer, p. 429-455.

284. Lapina V.A., Dontsov A.E. (1994). The action of UV-A and blue light on enzymes activity and accumulation of lipid peroxidation products in the attached and detached frog retinas. *SPIE Proceed.*, v. 2134B, p. 75-83.

285. Lapina V.A., Sheshko P.M., Pankovets E.A., Dontsov A.E. (2000). Phytosorbent prepared from sunflower seed husks prevents mercuric chloride accumulation in kidney and muscle of adult rabbits, *Archives of Environmental Health*, v. 55, p. 48-50.

286. Leblanc B., Jezequel S., Davies T., Hanton G., Taradach C. (1998). Binding of drugs to eye melanin is not predictive of ocular toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v. 28, № 2, p. 124-132.

287. Levis G.P., Erickson P.A., Anderson D.H., Fisher S.K. (1991). Opsin distribution and protein incorporation in photoreceptors after experimental retinal detachment. *Exp. Eye Res.*, v. 53, p. 629-640.

288. Lewis L.L.M, Dörschmann P., Seeba C., Thalendorst T., Roider J., Iloki As-sanga S.B., Ruiz J.C.G., Del Castillo Castro T., Rosas-Burgos E.C., Plascencia-Jatomea M., Ezquerro Brauer J.M., Klettner A. (2022). Properties of Cephalopod Skin Ommochromes to Inhibit Free Radicals, and the Maillard Reaction and Retino-Protective Mechanisms in Cellular Models Concerning Oxidative Stress, Angiogenesis, and Inflammation. *Antioxidants*, v. 11, p. 1574. Doi: 10.3390/antiox11081574.

289. Lhoste J.-M., Haug A., Ptak M. (1966) Electron paramagnetic resonance studies of photoselected triplet molecules. I. Phenoxazine. *J. Chem. Phys.*, v. 44, p. 648–654.
290. Libera D.A., Scutari G., Boscolo R., Rigobello M.P., Bindoli A. (1998). Antioxidant properties of clozapine and related neuroleptics. *Free Radic. Res.*, v. 29, № 2, p. 151-157.
291. Lindstrom M., Nilsson H.L. (1988). Eye function of *Mysis relicta* Loven (Crustacea) from two photic environments. Spectral sensitivity and light tolerance. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 120, p. 23-37.
292. Liu C.T., Chedekel M.R. (1982). Pheomelanin photochemistry: photolysis of model compounds. *Photochem. Photobiol.*, v. 36, № 2, p. 251-254.
293. Linzen B. (1966). Über Ommochrome, XXIII. Ommidine – ein neuer typus von ommochromen aus orthopteran. *Z. Naturforschung B.*, v. 21, p. 1038-1047. <https://doi.org/10.1515/znb-1966-1107>.
294. Linzen B. (1974). The Tryptophan → Ommochrome pathway in insects. In: Treherne J.E., Berridge M.J., Wigglesworth V.B., editors. *Advances in Insect Physiology* New York: Acad. Press, v. 10, p. 117–246.
295. Liu X., Vansant G., Udovichenko I.P., Wolfrum U., Williams D.S. (1997). Myosin VIIa, the product of the usher 1B syndrome gene, is concentrated in the connecting cilia of photoreceptor cells. *Cell Motil. Cytoskeleton*, v. 37, p. 240-252.
296. Loew A., Gonzalez-Fernandez F. (2002). Crystal structure of the functional unit of interphotoreceptor retinoid binding protein. *Structure*, v. 10, p. 43-49. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00698-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00698-0).
297. Lyu, Y.; Tschulakow, A.V.; Schraermeyer, U. (2022). Melanosomes degrade lipofuscin and precursors that are derived from photoreceptor membrane turnover in the retinal pigment epithelium – an explanation for the origin of the melanolipofuscin granule. *BioRxiv*. 02.16.480523. <https://doi.org/10.1101/2022.02.16.480523>.
298. Lukiewicz S. (1972). The biological role of melanin. I. New concepts and methodical approaches. *Folia Histochem. Cytochem.*, v. 10, p. 93–108.
299. Lugo-Huitrón R., Blanco-Ayala T., Ugalde-Muñiz P., Carrillo-Mora P., Pedraza-Chaverrí J., Silva-Adaya D., Maldonado P.D., Torres I., Pinzón E., Ortiz-Islas E., López T., García E., Pineda B., Torres-Ramos M., Santamaría A., La Cruz V.P. (2011). On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol. Teratol.*, v. 33, p. 538-547. Doi: 10.1016/j.ntt.2011.07.002.
300. Mackenzie S.M., Howells A.J., Cox G.B., Ewart G.D. (2000). Sub-cellular localisation of the white/scarlet ABC transporter to pigment granule membranes within the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, v. 108, p. 239–252. Doi:10.1023/a:1004115718597.
301. Maguire G.A. (2002). Comprehensive understanding of schizophrenia and its treatment. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, v. 59, № 17, p. 4-11.
302. Mangeat P., Roy C., Martin M. (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol.*, v. 9, p. 187-192.

303. Malo M.E., Bryan R.A., Shuryak I., Dadachova E. (2018) Morphological changes in melanized and non-melanized *Cryptococcus neoformans* cells post exposure to sparsely and densely ionizing radiation demonstrate protective effect of melanin. *Fungal Biol.*, v. 122, p. 449-456. Doi: 10.1016/j.funbio.2017.08.010.

304. Malo, M.E., Frank C., Dadachova E. (2020) Radioadapted *Wangiella dermatitidis* senses radiation in its environment in a melanin-dependent fashion. *Fungal Biol.*, v. 124, p. 368-375.

305. Malo M.E., Schultzhau Z., Frank C., Romsdahl J., Wang Z., Dadachova E. (2021) Transcriptomic and genomic changes associated with radioadaptation in *Exophiala dermatitidis*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 19, p. 196-205.

306. Malo M.E., Frank C., Khokhlov E., Gorbunov A., Dontsov A., Garg R., Dadachova E. (2022). Mitigating effects of sublethal and lethal whole-body gamma irradiation in a mouse model with soluble melanin. *J. Radiol. Prot.* v. 42, p. 011508. Doi 10.1088/1361-6498/ac3dcf).

307. Marmorstein A.D. (2001). The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic*, v. 2, p. 867–872.

308. Marshall J. (1970). Acid phosphatase activity in the retinal pigment epithelium. *Vision Res.*, v. 10, p. 821- 824.

309. Martel R.R., Law J.H. (1991) Purification and properties of an omochrome-binding protein from the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 21392-21398.

310. Martinez-Morales J.R., Rodrigo I., Bovolenta P. (2004). Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *BioEssays*, v. 26, p. 766-777.

311. Mason H.S. (1948). The chemistry of melanin. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, v. 172, p. 83-99.

312. Mason H.S., Ingram D.J.E., Allen B. (1960). The free radical property of melanins, *Arch. Biochem.*, v. 86, p. 225–230.

313. McCord J.M., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) *J. Biol. Chem.*, v. 244, № 22, p. 6049-6055.

314. McDowell J.H. (1993). Preparing rod outer segment membranes, regenerating rhodopsin, and determining rhodopsin concentration. *Methods in Neurosciences* Ed. Hargrave P.A., N.Y., Academ. Press., v. 15, p. 123-130.

315. Meleppat R.K., Ronning K.E., Karlen S.J., Burns M.E., Pugh E.N., Jr., Zawadzki R.J. (2021). In Vivo multimodal retinal imaging of disease-related pigmentary changes in retinal pigment epithelium. *Sci. Rep.*, v. 11, p. 16252.

316. Meredith P., Sarna T. (2006). The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment Cell Research*, v. 19, p. 572-590.

317. Miceli M.V., Newsome D.A., Tate D.J. Jr. (1997). Vitronectin is responsible for serum-stimulated uptake of rod outer segments by cultured RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 38, p. 1588-1597.

318. Miller S.S., Edelman J.L. (1990). Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *J. Physiol.*, v. 424, p. 283–300.

319. Miller R.W., Rapp U.J. (1973). The oxidation of catechols by reduced flavins and dehydrogenases. An electron spin resonance study of the kinetics and initial products of oxidation. *J. Biol. Chem.*, v. 248, № 17, p. 6084-6090.
320. Mirando M., Botti D., DiCola M. (1984). Possible genotoxicity of melanin synthesis intermediates: tyrosinase reaction products interact with DNA in vitro. *Mol. Gen. Genet.*, v. 193, № 3, p. 395-399.
321. Mironenko, N.V., Alekhina I.A., Zhdanova N.N., Bulat S.A. (2000). Intra-specific variation in gamma-radiation resistance and genomic structure in the filamentous fungus *Alternaria alternata*: a case study of strains inhabiting Chernobyl reactor no. 4. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 45, p. 177-87.
322. Mizukawa Y., Nishizawa T., Nagao T., Kitamura K., Urushidani T. (2002). Cellular distribution of parchorin, a chloride intracellular channel-related protein, in various tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v. 282, p. C786-C795.
323. Moore GP, Sullivan DT. (1978). Biochemical and genetic characterization of kynurenine formamidase from *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Genetics.*, v. 16, p. 619-634. Doi: 10.1007/BF00484718.
324. Mukherjee P.K., Marcheselli V.L., Serhan C.N., Bazan N.G. (2004). Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 101, p. 8491-8496.
325. Mukherjee P.K., Marcheselli V.L., Barreiro S., Hu J., Bok D., Bazan N.G. (2007). Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 104, p. 13152-13157.
326. Nakayama A., Nguyen M.T., Chen C.C., Opdecamp K., Hodgkin-son C.A., Arnheiter H. (1998). Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene *MITF*, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. *Mech. Dev.*, v.70, p.155-166.
327. Nawrot M., West K., Huang J., Possin D.E., Bretscher A., Crabb J.W., Saari J.C. (2004). Cellular retinaldehyde-binding protein interacts with ERM-binding phosphoprotein 50 in retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 45, p. 393-401.
328. Nigasawa K., Ishikawa H., Obazawa H., Minamoto T., Nagai Y., Tanaka Y. (1998). Collagen production by cultured human retinal pigment epithelial cells. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, v. 23, p. 147-151.
329. Newton J.C., Barsa-Newton M.C., Wardly J. (1980). The effect of X radiation on the retina of the albino rabbit as viewed with scanning electron microscope. *Radiat. Res.*, v.81, № 2, p. 311-318.
330. Nicotra C., Livrea M.A. (1976). Alcohol dehydrogenase and retinal dehydrogenase in bovine retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.*, v. 22, p. 367-377.
331. Needham AE. (1974). The significance of zoochromes (*Zoophysiology and ecology* 3). Berlin-Heidelberg: Springer, 429p.
332. Nishikimi M. (1975). The generation of superoxide anion in the reaction of tetrahydropteridines with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 166, № 1, p. 273-279.

333. Noell W.K., Walker V.S., Kang B.S., Berman S. (1966). Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 5, p. 450-473.

334. Nordlund J.J. (1989). The lives of pigment cells. *Clin. Geriat. Med.*, v. 5, № 1, p. 91-108.

335. Novikoff A.B., Leuenberger P.M., Novikoff P.M., Quintana N. (1979). Retinal pigment epithelium. Interrelations of endoplasmic reticulum and melanolysosomes in the black mouse and its beige mutant. *Lab. Invest.*, v. 40, p. 155-165.

336. Oguni M., Tanaka O., Shinohara H., Yoshioka T., Setogawa T. (1991). Ultrastructural study on the retinal pigment epithelium of human embryos, with special reference to quantitative study on the development of melanin granules. *Acta Anat. (Basel)*, v. 140, p. 335-342.

337. Okada T.S. (1981). Phenotypic expression of embryonic neural retinal cells in cell culture. *Vision Res.*, v. 21, p. 83-86.

338. Olchawa M.M., Furso J.A., Szewczyk G.M., Sarna T.J. (2017). Lipofuscin-mediated photic stress inhibits phagocytic activity of ARPE-19 cells; effect of donors' age and antioxidants. *Free Radic. Res.*, v. 51, p. 799-811.

339. Olchawa M.M., Szewczyk G.M., Zadlo A.C., Krzysztynska-Kuleta O.I., Sarna T.J. (2020). The effect of aging and antioxidants on photoreactivity and phototoxicity of human melanosomes: in vitro study. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 34, p. 670-682.

340. Onofri S., de Vera J.P., Zucconi L., Selbmann L., Scalzi G., Venkateswaran K.J., Rabbow E., de la Torre R., Horneck G. (2015). Survival of Antarctic Cryptotendolithic Fungi in Simulated Martian Conditions on Board the International Space Station. *Astrobiology*, v. 15, p. 1052-1059.

341. Organisciak D.T., Noell W.K. (1976). Hereditary retinal dystrophy in the rat: lipid composition of debris. *Exp. Eye Res.*, v. 22, № 2, p. 101-113.

342. Orlow S.J. (1995). Melanosomes are specialized members of lysosomal lineage of organelles. *J. Invest. Dermatol.*, v. 105, p. 3-7.

343. Ostrovsky M.A., Sakina N.L., Dontsov A.E. (1987). An antioxidative role of ocular screening pigments. *Vis. Res.*, v. 27, p. 893-899.

344. Ohtaki N. (1970). Melanosome and lysosome. II. Digestion of melanosome with mouse liver lysosome. *Bull Tokyo Med. Dent. Univ.*, v. 17, p. 170-186.

345. Ottolenghi A. (1959). Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Archs Biochem. Biophys.*, v. 79, p. 355-363.

346. Pacelli C., Bryan R.A., Onofri S., Selbmann L., Zucconi L., Shuryak I., Dadachova E. (2018). Survival and redox activity of *Friedmanniomyces endolithicus*, an Antarctic endemic black meristematic fungus, after gamma rays' exposure. *Fungal Biol.*, v. 122, p. 1222-1227.

347. Paglia D.E., Valentine W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 70, № 1, p. 158-169.

348. Panettieri S, Gjinaj E, John G, Lohman DJ. (2018). Different ommochrome pigment mixtures enable sexual dimorphic Batesian mimicry in disjunct populations of the common palm fly butterfly, *Elymnias hypermnestra*. *PLoS ONE*, v. 13, e0202465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202465>.

349. Panzella L., Gentile G., D'Errico G., Della Vecchia N.F., Errico M.E., Napolitano A., Carfagna C., d'Ischia M. (2013) Atypical Structural and π -Electron Features of a Melanin Polymer That Lead to Superior Free-Radical-Scavenging Properties. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 52, p. 12684-12687.
350. Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K., Dillon J., Sparrow J.R. (1998). Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p. 14609-14613.
351. Park C.M., Hollenberg M.J. (1989). Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Dev. Biol.*, v. 134, p. 201-205.
352. Pestonjamas K., Amieva M.R., Strassel C.P., Nauseef W.M., Furthmayr H., Luna E.J. (1995). Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Mol. Biol. Cell*, v. 6, p. 247-259.
353. Phillips J.P., Forrest H.S. (1970). Terminal synthesis of xanthommatin in *Drosophila melanogaster*. II. Enzymatic formation of the phenoxazinone nucleus. *Biochemical Genetics*, v. 4, p. 489-498. Doi: 10.1007/BF00486599.
354. Phillips J.P., Forrest H.S., Kulkarni A.D. (1973). Terminal synthesis of xanthommatin in *Drosophila melanogaster*. III. Mutational pleiotropy and pigment granule association of phenoxazinone synthetase. *Genetics*, v. 73, p. 45-56. Doi: 10.1093/genetics/73.1.45.
355. Pinamonti S, Chiarelli-Alvisi G, Colombo G. (1973). The Ommochromes of the Eyes and the Integument of Albino and Pigmented Locusts, *Schistocerca Gregaria* Forsk (Orthoptera). *Italian Journal of Zoology*, v. 40, p. 41-54. Doi: 10.1080/11250007309427480.
356. Pittack C., Jones M., Reh T.A. (1991). Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina in vitro. *Development*, v. 113, p. 577-588.
357. Poremska-Budny M., Sakina N.L., Stepien K.B., Dontsov A.E., Wilczok T. (1992). Antioxidative activity of synthetic melanins. Cardiolipin liposome model. *Biochim. et Biophys. Acta*, v. 1116, p. 11-16.
358. Porter M.L., Zhang Y., Desai S., Caldwell R.L., Cronin T.W. (2010). Evolution of anatomical and physiological specialization in the compound eyes of stomatopod crustaceans. *J. Exp. Biol.*, v. 213, p. 3473-3486.
359. Potts A.M., Au P.C. (1976). The affinity of melanin for inorganic ions. *Exp. Eye Res.*, v. 22, p. 487-491.
360. Proctor P., McGinnes J., Corry P.A. (1974). A hypothesis on the preferential destruction of melanized tissue. *J. Theor. Biol.*, v. 48, p. 19-22.
361. Prota G. (1980). Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.*, v. 75, № 1, p. 122-127.
362. Prota G. (1992). *Melanins and Melanogenesis*. New York: Academic Press, 290p.
363. Raper H.S. (1927). The tyrosinase-tyrosine reaction: production from tyrosine of 5: 6-dihydroxyindole and 5: 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid - the precursors of melanin. *Biochem. J.*, v.21, p. 89-96. Doi: 10.1042/bj0210089.
364. Rapp L.M., Williams T.P. (1980). The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage. *Vision Res.*, v. 20, № 12, p. 1127- 1131.

365. Rasgon J.L., Scott T.W. (2004). Crimson: a novel sex-linked eye color mutant of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 41, p. 385–391. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.385>.

366. Reh T.A., Nagy T. (1987). A possible role for the vascular membrane in retinal regeneration in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Dev. Biol.*, v. 122, p. 471-482.

367. Reh T.A., Nagy T. (1989). Characterization of *Rana* germinal neuroepithelial cells in normal and regenerating retina. *Neurosci. Res. Suppl.*, v. 10, p. 151-161.

368. Reits E.A., Neefjes J.J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat. Cell Biol.*, v. 3, p. E145-E147.

369. Reuter J.H., Hobbelen J.F. (1977). The effect of continuous light exposure on the retina in albino and pigmented rats. *Physiol. and Behav.*, v. 18, p. 939-944.

370. Revskaya E., Chu P., Howell R.C., Schweitzer A.D., Bryan R.A., Harris M., Gerfen G., Jiang Z., Jandl T., Kim K., Ting L. M., Sellers R. S., Dadachova E., Casadevall A. (2012). Compton scattering by internal shields based on melanin-containing mushrooms provides protection of gastrointestinal tract from ionizing radiation. *Cancer Biotherapy Radiopharm.*, v. 27, p. 570-576. Doi: 10.1089/cbr.2012.1318.

371. Riou M., Christides J-P. (2010). Cryptic color change in a crab spider (*Misumenops vatia*): Identification and quantification of precursors and ommochrome pigments by HPLC. *J. Chem. Ecol.*, v. 36, p. 412–423. Doi: 10.1007/s10886-010-9765-7.

372. Rizzolo L.J. (1997). Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier. *Histol. Histopathol.*, v. 12, p. 1057-1067.

373. Romero Y., Martínez A. (2015). Antiradical capacity of ommochromes. *J. Mol. Model.*, v. 21, p. 220. Doi: 10.1007/s00894-015-2773-3.

374. Rosengren E.E., Linder-Eliasson E., Carlsson A. (1985). Detection of 5-S-cysteinyl-dopamine in human brain. *J. Neural Transmission*, v. 63, p. 247-253.

375. Rowan S., Bejarano E., Taylor A. (2018). Mechanistic targeting of advanced glycation end-products in age-related diseases. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, v. 1864, p. 3631–3643.

376. Rozanowska, M.B. (2011). Properties and functions of ocular melanins and melanosomes. In: Borovanský, J. and Riley, P. A., eds. *Melanins and Melanosomes: biosynthesis, biogenesis, physiological, and pathological functions*. Weinheim: Wiley-Blackwell, p. 187-224.

377. Rozanowska M., Korytowski W., Rozanowski B., Skumatz C. Boulton M.E., Burke J.M., Sarna T. (2002). Photoreactivity of aged human RPE melanosomes: a comparison with lipofuscin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 43, p.2088-2096.

378. Rózanowska M.B., Rózanowski B. (2022). Photodegradation of lipofuscin in suspension and in ARPE-19 cells and the similarity of fluorescence of the photodegradation product with oxidized docosahexaenoate. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 23, p. 922.

379. Rózanowski B., Burke J.M., Boulton M.E., Sarna T., Rózanowska M. (2008). Human RPE melanosomes protect from photosensitized and iron-mediated oxidation but become pro-oxidant in the presence of iron upon photodegradation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 49, p. 2838-2847. Doi: 10.1167/iovs.08-1700

380. Rozsival P., Obenberger J., Sladkova J. (1985). The effect of ionizing radiation on the eye. *Česk. Oftalmol.*, v. 41, №3, p. 173-189.

381. Safa R., Osborne N.N. (2000). Retinas from albino rats are more susceptible to Chan- ischemic damage than age-matched pigmented animals. *Brain Res.*, v. 862, p. 36-42.
382. Saito N., Seiji M. (1973). Epidermal lysosome and the degradation of melanosomes. *Acta Dermatovener. (Stockholm), Suppl.*, v. 73, p. 69-74.
383. Saito N., Seiji M. (1976). Degradation of melanosomes in vitro and in vivo. *Pigment Cell*, v. 3, p. 384-392.
384. Salazar-Bookaman M.M., Wainer I., Patil P.N. (1994). Relevance of drug-melanin interactions to ocular pharmacology and toxicology. *J. Ocul. Pharmacol.*, v. 10, № 1, p. 217-239.
385. Sarna T. (1992). Properties and function of the ocular melanin – a photobiophysical view. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, v. 12, p. 215-258.
386. Sarna T., Burke J.M., Korytowski W., Rozanowska M., Skumatz C.M.B., Zareba A., Zareba M. (2003). Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. *Exp. Eye Res.*, v. 76, p. 89-98.
387. Sarna T., Duleba A., Korytowski W., Swartz H. (1980). *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 200, № 1, p. 140-148.
388. Sarna T., Pilas B., Land E.J., Truscott T.G. (1986). Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 883, p. 162-167. Doi: 10.1016/0304-4165(86)90147-9.
389. Sarna T., Rozanowska M., Zareba M. (2001). Mechanisms of melanin photoprotection: inhibition of lipid peroxidation by ocular melanin. 9th Congress of the European Society for Photobiology, Lillehammer, Norway.
390. Sastre A.A., Montoro M.L., Lacerda H.M., Llaveró F., Zugaza J.L. (2021). Small GTPases of the Rab and Arf Families: Key Regulators of Intracellular Trafficking in Neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 22, p. 4425. <https://doi.org/10.3390/ijms22094425>.
391. Sato N., Funayama N., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita Sa., Tsukita Sh. (1992). A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin: its specific localization and actin filament/plasma membrane association sites. *J. Cell Sci.*, v. 103, p. 131–143.
392. Sawada H., Nakagoshi M., Mase K., Yamamoto T. (2000). Occurrence of ommochrome-containing pigment granules in the central nervous system of silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, v. 125, p. 421–428.
393. Scalia M., Geremia E., Corsaro C., Santoro C., Baratta D., Sichel G. (1990). Lipid peroxidation in pigmented and unpigmented liver tissues: protective role of melanin. *Pigment Cell Res.*, v. 3, p. 115-119.
394. Schleicher E.D., Bierhaus A., Haring H.U., Nawroth P.P., Lehmann R. (2001). Chemistry and pathobiology of advanced glycation end products. *Contrib. Nephrol.*, v. 131, p. 1–9.
395. Schraermeyer U. (1993). Does melanin turnover occur in the eyes of vertebrates. *Pigment Cell Res.*, v. 6, p. 193-204.
396. Schraermeyer U., Dohms M. (1996). Detection of a fine lamellar gridwork after degradation of ocular melanin granules by cultured peritoneal macrophages. *Pigment Cell Res.*, v. 9, p. 248-254.

397. Schraermeyer U., Heimann K. (1999). Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Res.*, v. 12, p. 219-236.

398. Schraermeyer, U., Peters, S., Thumann, G., Kociok, N., Heimann, K. (1999) Melanin granules of retinal pigment epithelium are connected with the lysosomal degradation pathway. *Exp. Eye Res.*, v. 68, p. 237–245.

399. Schraermeyer U., Stieve H. (1994). A newly discovered pathway of melanin formation in cultured retinal pigment epithelium. *Cell Tissue Res.*, v. 276, p. 273-279.

400. Schmidt S.Y., Peisch R.D. (1986). Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. Regional variation and age-related reduction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 27, p. 1063-1067.

401. Schutt F., Davies S., Kopitz J., Holz F. G., Boulton M.E. (2000). Photodamage to human RPE cells by A2E, a retinoid component of lipofuscin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 41, p. 2303-2308.

402. Schutt F., Bergmann M., Holz F.G., Kopitz J. (2003). Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 44, 3663–3668.

403. Schwab I.R., Yuen C.K., Buyukmihci N.C., Blankenship T.N., Fitzgerald P.G. (2002). Evolution of the tapetum. *Trans Am. Ophthalmol. Soc.*, v. 100, p. 187-200.

404. Schweitzer A.D., Howell R.C., Jiang Z., Bryan R.A., Gerfen G., Chen C.C., Mah D., Cahill S., Casadevall A., Dadachova E. (2009). Physicochemical evaluation of rationally designed melanins as novel nature-inspired radioprotectors. *PLoS One*, v. 4, p. e7229.

405. Selbmann L., Pacelli C., Zucconi L., Dadachova E., Moeller R., de Vera J. P., Onofri S. (2018). Resistance of an Antarctic cryptoendolithic black fungus to radiation gives new insights of astrobiological relevance. *Fungal Biol.*, v. 122, p. 546-554.

406. Serejnikova N.B., Trofimova N.N., Yakovleva M.A., Dontsov A.E., Zak P.P., Ostrovsky M.A. (2024). Blue light-induced accelerated formation of melanolipofuscin-like organelles in japanese quail RPE cells: An electron microscopic study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 65, p. 31. <https://doi.org/10.1167/iops.65.11.31>.

407. Sever R.J., Cope F.W., Polis B.D. (1962). Generation by visible light of labile free radicals in the melanin granules of the eye. *Science*, v. 137, p. 128-129.

408. Sheedlo H.J., Nelson T.H., Lin N., Rogers T.A., Roque R.S., Turner J.E. (1998). RPE secreted proteins and antibody influence photoreceptor cell survival and maturation. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, v. 107, p.57-69.

409. Shimolina L., Gulin A., Ignatova N., Druzhkova I., Gubina M., Lukina M., Snopova L., Zagaynova E., Kuimova M.K., Shirmanova M. (2021). The role of plasma membrane viscosity in the response and resistance of cancer cells to oxaliplatin. *Cancers*, v. 13, p. 616513.

410. Shoup J.R. (1966). The development of pigment granules in the eyes of wild type and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biology*, v. 29, p. 223–249. Doi: 10.1083/jcb.29.2.223.

411. Shuo T., Aono S., Matsui F., Tokita Y., Maeda H., Shimada K., Oohira A. (2004). Developmental changes in the biochemical and immunological characters of the carbohydrate moiety of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan. *Glycoconj. J.*, v. 20, p. 267-278.
412. Slawinska D., Slawinski J., Ciesla L. (1983). The inhibition of peroxyradical-induced chemiluminescence by melanins. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, v.15, p. 209-222.
413. Smith J.R., Jamie J.F., Guillemin G.J. (2016). Kynurenine-3-monooxygenase: a review of structure, mechanism, and inhibitors. *Drug Discovery Today*, v. 21, p. 315–324. Doi: 10.1016/j.drudis.2015.11.001.
414. Sohal R.S., Brunk U.T. (1989). Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 266, p. 17-29.
415. Sokolov V.S., Sokolenko E.A., Sokolov A.V., Dontsov A.E., Chizmadzhev Y.A., Ostrovsky M.A. (2007). Interaction of pyridinium bisretinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, v. 86, p. 177–185.
416. Sparrow J.R., Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K. (1999). A2E, a lipofuscin fluorophore, in human retinal pigmented epithelial cells in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 40, p. 2988–2995.
417. Sparrow J.R., Nakanishi K., Parish C.A. (2000). The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 41, p. 1981-1990.
418. Sparrow J.R., Cai B. (2001). Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 42, p. 1356-1362.
419. Sparrow J.R., Zhou J., Ben-Shabat S., Volmer H.R., Itagaki Y., Nakanishi K. (2002). Involvement of oxidative mechanisms in blue light induced damage to A2E-laden RPE. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 43, p. 1222-1227.
420. Sparrow J.R., Zhou J., Cai B. (2003a). DNA is a target of the photodynamic effects elicited in A2E-laden RPE by blue light illumination. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 44, p. 2245-2251.
421. Sparrow J.R., Fishkin N., Zhou J., Cai B., Jang Y.P., Krane S., Itagaki Y., Nakanishi K. (2003b). A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Res.*, v. 43, p. 2983–2990.
422. Sparrow J.R., Vollmer-Snarr H.R., Zhou J., Jang Y.P., Jockusch S., Itagaki Y., Nakanishi K. (2003b). A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E epoxide formation. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 18207–18213.
423. Sparrow J.R., Wu Y., Kim C.Y., Zhou J. (2010). Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids. *J Lipid Res.*, v. 51, p. 247–261. Doi: 10.1194/jlr.R000687.
424. Spitznas M., Hogan M.J. (1970). Outer segments of photoreceptors and the retinal pigment epithelium. Interrelationship in the human eye. *Arch. Ophthalmol.*, v. 84, p. 810-819.

425. Stark W.S., Sapp R. (1988). Eye color pigment granules in wild-type and mutant *Drosophila melanogaster*. *Canadian Journal of Zoology*, v. 66, p. 1301–1308. <https://doi.org/10.1139/z88-191>.

426. Stavenga D.G. (2002). Color in the eyes of insects. *J. Comp. Physiol. A*, v. 188, p. 337–348.

427. Stavenga D.G., Leertouwer H.L., Wilts B.D. (2014). Coloration principles of nymphaline butterflies—thin films, melanin, ommochromes and wing scale stacking. *J. Exp. Biol.*, v. 217, p. 2171–2180. <https://doi.org/10.1242/jeb.098673>.

428. Steinberg R.H. (1985). Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc. Ophthalmol.*, v. 60, p. 327–346.

429. Steinberg R.H., Wood I., Hogan M.J. (1977). Pigment epithelial ensheathment and phagocytosis of extrafoveal cones in human retina. *Proc. R. Soc. B.*, v. 277, p. 459–471.

430. Stepień K.B., Dworzanski J.P., Bilinska B., Porebska-Budny M., Hollek A.M., Wilczok T. (1989). Catecholamine melanins. Structural changes induced by copper ions. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 997, p. 49-54.

431. Stepień K., Wilczok A., Zajdel A., Dzierzega-Leczna A., Wilczok T. (2000). Peroxynitrite mediated linoleic acid oxidation and tyrosine nitration in the presence of synthetic neuromelanins. *Acta Biochim. Pol.*, v. 47, p. 931-40.

432. Stevens J.G., Stevens V.E. (Eds). (1981). Mössbauer effect reference and data journal. USA: University of North Carolina, v. 4, № 9, p. 212.

433. Stokka A.J., Mosenden R., Ruppelt A., Lygren B., Tasken K. (2009). The adaptor protein EBP50 is important for localization of the protein kinase A-Ezrin complex in T cells and the immunomodulating effect of cAMP. *Biochem. J.*, v. 425, p. 381-388. Doi: 10.1042/BJ20091136.

434. Stone L.S., Steinitz H. (1957). Regeneration of neural retina and lens from retina pigment cell grafts in adult newts. *J. Exp. Zool.*, v. 135, p. 301-317.

435. Stowe S. (1983). Phagocytosis of rhabdomeral membrane by crab photoreceptors. *Cell Tissue Res.*, v. 234, № 2, p. 463-467.

436. Strother G.K. (1966). Absorption of *Musca domestica* screening pigment, *J. Gen. Physiol.*, v. 49, p. 1087–1088. <https://doi.org/10.1085/jgp.49.5.1087>.

437. Sundelin S.P., Nilsson S.E., Brunk U.T. (2001). Lipofuscin-formation in cultured retinal pigment epithelial cells is related to their melanin content. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 30, p. 74-81.

438. Suter M., Reme C.E., Grimm C., Wenzel A., Jaattela M., Esser P., Kociok N., Leist M., Richter C. (2000). Age-related macular degeneration. The lipofuscin component in N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 39625–39630.

439. Taubitz T., Tschulakow A.V., Tikhonovich M., Illing B., Fang Y., Biesemeier A., Julien-Schraermeyer S., Schraermeyer U. (2018). Ultrastructural alterations in the retinal pigment epithelium and photoreceptors of a Stargardt patient and three Stargardt mouse models: indication for the central role of RPE melanin in oxidative stress. *Peer J.*, v. 6, p. e5215. <https://doi.org/10.7717/peerj.5215>.

440. Taylor S.L., Landen M.P., Tappel A.L. (1976). Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids*, v. 11, № 7, p. 530-538.
441. Teirstein P.S., Goldman A.I., O'Brien P.J. (1980). Evidence for both local and central regulation of rat rod outer segment disc shedding. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 19, p. 1268-1273.
442. Thompson A, Land E.J., Chedekel M.R., Subbarao K.V., Truscott TG. (1985). A pulse radiolysis investigation of the oxidation of the melanin precursors 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) and the cysteinyl dopas. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 843, p.49-57.
443. Tombran-Tink J., Johnson L.V. (1989). Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 30, p. 1700-1707.
444. Tombran-Tink J., Shivaram S.M., Chader G.J., Johnson L.V., Bok D. (1995). Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J. Neurosci.*, v. 15, p. 4992-5003.
445. Tonnesen H.H. (1997). Drugs and light. *Tidsskr. Nor. Laegeforen*, v. 117, № 17, p.2481-2483.
446. Tso M.O.M., Friedman E. (1968). The retinal pigment epithelium III. Growth and development. *Arch. Ophthalmol.*, v. 80, p. 214–216.
447. Tugay T., Zhdanova N.N., Zheltonozhsky V., Sadovnikov L., Dighton J. (2006). The influence of ionizing radiation on spore germination and emergent hyphal growth response reactions of microfungi. *Mycologia*, v. 98, p. 521-527.
448. Tugay T.I., Zheltonozhskaya M.V., Sadovnikov L.V., Tugay A.V., Farfan E.B. (2011). Effects of ionizing radiation on the antioxidant system of microscopic fungi with radioadaptive properties found in the Chernobyl exclusion zone. *Health Phys*, v. 101, p. 375-382.
449. Ushakova N., Dontsov A., Sakina N., Bastrakov A., Ostrovsky M. (2019). Antioxidative properties of melanins and ommochromes from black soldier fly *Hermetia illucens*. *Biomolecule*, v. 9, p. 408. Doi: 10.3390/biom9090408.
450. Van Raay T.J., Vetter M.L. (2004). Wnt/frizzled signaling during vertebrate retinal development. *Dev. Neurosci.*, v. 26, p. 352-358. Doi: 10.1159/000082277.
451. Van Norren D., Gorgels T.G. (2011). The action spectrum of photochemical to the retina: a review of monochromatical threshold data. *Photochem. Photobiol.*, v. 87, p. 747–753.
452. Van Woert M.N. (1967). Oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by melanin, *Life Sci.*, v. 6, p. 2605–2612.
453. Vaughan D.K., Fisher S.K. (1987). The distribution of F-actin in cells isolated from vertebrate retinas. *Exp. Eye Res.*, v. 44, p. 393-406.
454. Wadano A., Takenaka Y., Matumoto M. (1993). 3-Hydroxykynurenine as a radical scavenger in the blowfly, *Aldrichina grahami*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 23, p. 919-925. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(93\)90109-6](https://doi.org/10.1016/0965-1748(93)90109-6).
455. Wagh S., Ramaiah A., Subramanian R., Govindarajan R. (2000). Melanosomal proteins promote melanin polymerization. *Pigment Cell Res.*, v. 13, p. 442-448. Doi: 10.1034/j.1600-0749.2000.130606.x.

456. 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.*, v. 25, p. 434-45. Doi: 10.1111/j.1755-148X.2012.01011.x.

457. Wang F., Ma W., Fan D., Hu J., An X., Wang Z. (2024). The biochemistry of melanogenesis: an insight into the function and mechanism of melanogenesis-related proteins. *Front. Mol. Biosci.*, v. 11, p. 1440187. Doi: 10.3389/fmolb.2024.1440187.

458. Wang Z., Keller L.M.M., Dillon J., Gaillard E.R. (2006). Oxidation of A2E results in the formation of highly reactive aldehydes and ketones. *Photochem. Photobiol.*, v. 82, p. 1251–1257.

459. Warburton S., Davis W.E., Southwick K., Xin H., Woolley A.T., Burton G.F., Thulin C.D. (2007). Proteomic and phototoxic characterization of melanolipofuscin: correlation to disease and model for its origin. *Mol. Vis.*, v. 13, p. 318-329.

460. Wavre-Shapton S.T., Meschede I.P., Seabra M.C., Futter C.E. (2014). Phagosome maturation during endosome interaction revealed by partial rhodopsin processing in retinal pigment epithelium. *J. Cell Sci.*, v. 127, p. 3852-3861. Doi:10.1242/jcs.154757.

461. Webber S.K., Domniz Y., Sutton G.L., Rogers C.M., Lawless M.A. (2001). Corneal deposition after high-dose chlorpromazine hydrochloride therapy. *Cornea*, v. 20, № 2, p. 217-219.

462. Weiter J.J., Delori F.C., Wing G.L., Fitch K.A. (1985). Relationship of senile macular degeneration to ocular pigmentation. *Am. J. Epidemiol.*, v. 99, p. 185-187. Doi: 10.1016/0002-9394(85)90230-2.

463. Weiter J.J., Delori F.C., Wing G.L., Fitch K.A. (1986). Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 27, p. 145-152.

464. Wenzel A., Grimm C., Samardzija M., Remé C.E. (2005). Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.*, v. 24, p. 275-306. Doi: 10.1016/j.preteyeres.2004.08.002.

465. Wilczok T., Stepien K., Dzierzega-Leczna A., Zajdel A., Wilczok A. (1999). Model neuromelanins as antioxidative agents during lipid peroxidation. *Neurotoxicity Res.*, v. 1, p. 141-147.

466. Wolfensberger T.J., Mahieu I., Jarvis-Evans J., Boulton M., Carter N.D., Nogradi A., Hollande E., Bird A.C. (1994). Membrane-bound carbonic anhydrase in human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 35, p. 3401-3407.

467. Wu Y.Q., Notario V., Chader G.J., Becerra S.P. (1995). Identification of pigment epithelium-derived factor in the interphotoreceptor matrix of bovine eyes. *Protein Expr. Purif.*, v. 6, p. 447-456.

468. Wu Y., Yanase E., Feng X., Siegel M.M., Sparrow J.R. (2010). Structural characterization of bisretinoid A2E photocleavage products and implications for age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 107, p. 7275–7280.

469. Xie W., Pakdel E., Liang Y., Kim Y.J., Liu D., Sun L., Wang X. (2019). Natural Eumelanin and Its Derivatives as Multifunctional Materials for Bioinspired Applications: A Review. *Biomacromolecules*, v. 20, p. 4312-4331.
470. Yakovleva M., Dontsov A., Trofimova N., Sakina N., Kononikhin A., Aybush A., Gulin A., Feldman T., Ostrovsky M. (2022). Lipofuscin granule bisretinoid oxidation in the human retinal pigment epithelium forms cytotoxic carbonyls. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 23, p. 222.
471. Yang X.J. (2004). Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis. *Semin Cell Dev. Biol.*, v. 15, p. 91-103. Doi: 10.1016/j.semcdb.2003.09.004.
472. Yamamoto M, Howells AJ, Ryall RL. (1976). The ommochrome biosynthetic pathway in *Drosophila melanogaster*: the head particulate phenoxazinone synthase and the developmental onset of xanthommatin synthesis. *Biochemical Genetics*, v. 14, p. 1077-1090. Doi: 10.1007/BF00485139.
473. Yamashita T. (1982). Selective inhibition by the sulfhydryl reagent maleimide of zymosan particle phagocytosis by neutrophils. *FEBS Lett.*, v. 141, № 1, p. 68-73.
474. Yin D. (1996). Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 21, № 6, p. 871-888.
475. Yonemura S., Hirao M., Doi Y., Takahashi N., Kondo T., Tsukita S. (1998). Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.*, v. 140, p. 885-895.
476. Yoon K.D., Yamamoto K., Ueda K., Zhou J., Sparrow J.R. (2012). A novel source of methylglyoxal and glyoxal in retina: Implications for age-related macular degeneration. *PLoS ONE*, v. 7, p. e41309.
477. Zadlo A., Rozanowska M.B., Burke J.M., Sarna T.J. (2006). Photobleaching of retinal pigment epithelium melanosomes reduces their ability to inhibit iron-induced peroxidation of lipids. *Pigment Cell Res.*, v. 20, p. 52-60.
478. Zadlo A., Rozanowska M.B., Burke J.M., Sarna T.J. (2007). Photobleaching of retinal pigment epithelium melanosomes reduces their ability to inhibit iron induced peroxidation of lipids. *Pigment Cell Research*, v. 20, p. 52-60.
479. Zadlo A., Burke J.M., Sarna T. (2009). Effect of untreated and photobleached bovine RPE melanosomes on the photoinduced peroxidation of lipids, *Photochem. Photobiol. Sci.*, v. 8, p. 830-837.
480. Zarbin M.A. (2004). Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.*, v. 122, p. 598-614.
481. 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*, v. 1271, p. 343-348.
482. Zeise L., Addison R.B., Chedekel M.R. (1992a). Bio-analytical studies of eumelanins. I. Characterizations of melanin the particle. *Pigment Cell Res.*, v. 5 (suppl. 2), p. 48-53.
483. Zeise L., Murr B.L., Chedekel M.R. (1992b). Melanin standard method – particle description. *Pigment Cell Res.*, v. 5, p. 132-142.

484. Zemel E, Loewenstein A, Lei B, Lazar M, Perlman I. (1995). Ocular pigmentation protects the rabbit retina from gentamicin-induced toxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 36, p. 1875-1884.

485. Zeng S., Zhang T., Madigan M.C., Fernando N., Aggio-Bruce R., Zhou F., Pierce M., Chen Y., Huang L., Natoli R., Gillies M.C., Zhu L. (2020). Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) in retinal health and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 14, p. 577935. Doi 10.3389/fncel.2020.577935.

486. Zhang X.M., Yang X.J. (2001). Temporal and spatial effects of Sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis. *Dev. Biol.*, v. 233, p. 271–290.

487. Zhang Y., Zeng W., Jia F., Ye J., Zhao Y., Luo Q., Zhu Z., Wang F. (2020). Cisplatin-induced alteration on membrane composition of A549 cells revealed by ToF-SIMS. *SIA*, v. 52, p. 256–263.

488. Zhdanova N.N., Zakharchenko V.A., Vember V.V., Nakonechnaya L.T. (2000). Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycological Research*, v. 104, p. 1421-1426.

489. Zhu H., Kirschfeld K. (1984). Protection against photodestruction in fly photoreceptors by carotenoid pigments. *J. Comp. Physiol.*, v. 154, p. 153-156.

490. Zhuravlev A.V., Vetrovoy O.V., Savvateeva-Popova E.V. (2018). Enzymatic and non-enzymatic pathways of kynurenines' dimerization: the molecular factors for oxidative stress development. *PLOS Computational Biology*, v. 14, p. e1006672. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006672>.

491. Zilis J.D., Machermer R. (1991). Light damage in the detached retina. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 111, p. 47 -50.

492. Zucca F.A., Giaveri G., Gallorini M., Albertini A., Toskani M., Pezzoli G., Lucius R., Wilms H., Sulzer D., Ito S., Wakamatsu K., Zecca L. (2004). The neuromelanin of human substantia nigra: Physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res.*, v. 17, p. 610-617.

Александр Е. ДОНЦОВ и Михаил А. ОСТРОВСКИЙ

**ЭКРАНИРУЮЩИЕ
ПИГМЕНТЫ ГЛАЗА –
МЕЛАНИНЫ И ОММОХРОМЫ
(СТРУКТУРА, ФИЗИКОХИМИЯ,
ФУНКЦИИ)**

Формат 70x100 1/16
Гарнитура Times
Усл.-п. л. 18,85. Уч.-изд. л. 17,9
Тираж 300 экз.

Издатель – Российская академия наук

Публикуется в авторской редакции

Верстка и печать – УНИД РАН
Отпечатано в экспериментальной цифровой типографии РАН

Издается по решению Научно-издательского совета
Российской академии наук (НИСО РАН) от 13.02.2025 № 19
и распространяется бесплатно