

ZALĄCZNIK 3a

AUTOREFERAT

dr Michał Sarna
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

1. Imię i Nazwisko

Michał Sarna

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

a) stopień naukowy doktora

Miejsce: Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej, Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie

Data nadania: 27.04.2015

Dziedzina i dyscyplina nadanego stopnia: nauki fizyczne, fizyka

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Melanin granules modify nanomechanical properties of melanoma cells and inhibit invasive abilities of the cells”

Promotor: prof. dr hab. Květoslava Burda

Recenzenci: prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny

b) tytuł zawodowy magistra

Miejsce: Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński

Data nadania: 03.09.2008

Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ topografii podłoża na żywotność, proliferację i migrację komórek nowotworowych”

Promotor: prof. dr hab. Marek Szymoński

Recenzent: prof. dr hab. Zbigniew Madeja

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

2017 – obecnie Adiunkt w Zakładzie Biofizyki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński

2015 – 2017 Asystent w Zakładzie Biofizyki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Mechaniczna rola melaniny w komórkach i tkankach barwnikowych

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

1. **Sarna Michał***, Krzykawska-Serda M, Jakubowska J, Zadło A, Urbanska K. Melanin inhibits melanoma cell spread in mice in a unique mechanical fashion. (2019). Scientific Reports, doi: 10.1038/s41598-019-45643-9.

IF₂₀₁₇ = 4.122, IF_{5-letni} = 4.609, Pkt_{MNiSW} = 40, L. Cyt. = 0.

*Autor korespondencyjny

2. **Sarna Michał***, Zadło A, Czuba-Pelech B, Urbanska K. Nanomechanical phenotype of melanoma cells depends solely on the amount of endogenous pigment in the cells. (2018). International Journal of Molecular Sciences, 19(2): E607.

IF₂₀₁₇ = 3.687, IF_{5-letni} = 3.878, Pkt_{MNiSW} = 30, L. Cyt. = 6.

*Autor korespondencyjny

3. **Sarna Michał***, Olchawa M, Zadło A, Wnuk D, Sarna T. The nanomechanical role of melanin granules in the retinal pigment epithelium. (2017). Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 13(3): 801-807.

IF₂₀₁₇ = 6.500, IF_{5-letni} = 6.306, Pkt_{MNiSW} = 40, L. Cyt. = 3.

*Autor korespondencyjny

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

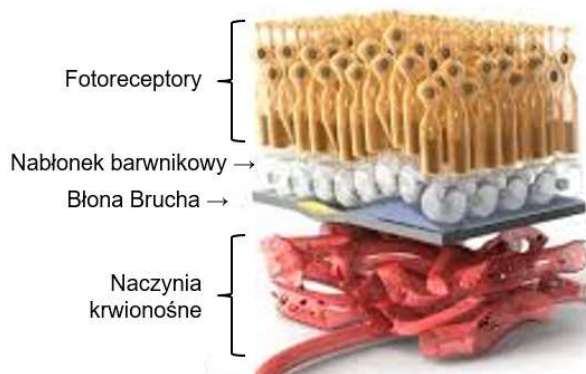
Melanina to najbardziej rozpowszechniony barwnik w przyrodzie, który u ludzi występuje w tkankach barwnikowych, między innymi w skórze, włosach, oczach, mózgu oraz uchu wewnętrznym (d'Ischia i inni, 2015). Synteza melaniny zachodzi w wyspecjalizowanych komórkach barwnikowych takich jak: melanocyty (skóra, włosy, tęczówka, ucho wewnętrzne), komórki nabłonka barwnikowego siatkówki (oko wewnętrzne) oraz neurony dopaminergiczne (istota czarna śródmózgowia) (Słominski i inni, 2004). Melanina w komórkach barwnikowych występuje w postaci ziaren, tzw. melanosomów (Raposo i Marks, 2007). Organelle te wykazują zróżnicowanie w kształcie (może być okrągły lub elipsoidalny) oraz rozmiarze (od 0.5 do 3.5 μm) (Liu i inni, 2005). Wyróżnia się dwa główne typy barwnika melaninowego: brązowo-czarną eumelaninę oraz żółto-czerwoną feomelaninę (Rioux i inni, 2019). Podstawowymi funkcjami biologicznymi melaniny jest ochrona tkanek przed szkodliwym działaniem promieniowania słonecznego oraz mimikra (Sarna, 1992; Jeon i inni, 2016). Pomimo, iż fizykochemiczne właściwości melaniny są dobrze poznane (szczegółowo opisane w pracy: Meredith i Sarna, 2006), jak dotąd tylko w

jednej pracy opisano właściwości mechaniczne melanosomów. Okazało się, że ziarna te mają unikatowe, jak dla materiału biologicznego, właściwości mechaniczne – są bardzo sztywne i mało podatne na deformację (Guo i inni, 2008), co czyni je potencjalnie ważnym składnikiem determinującym właściwości mechaniczne ubarwionych komórek i tkanek. Co ciekawe, mechaniczna rola melaniny w komórkach i tkankach barwnikowych dotychczas w ogóle nie była brana pod uwagę. Jest to tym dziwniejsze i trudne do wyjaśnienia, jeśli uświadomić sobie szybki rozwój biomechaniki komórek i tkanek jaki ma miejsce w ostatnich latach.

Tkanki barwnikowe wchodzące w skład barier mechanicznych

W organizmie człowieka występują liczne bariery mechaniczne, które mają za zadanie chronić narządy wewnętrzne przed urazami, jak również przed czynnikami chorobotwórczymi, które mogą przeniknąć do wnętrza organizmu ze środowiska zewnętrznego (Tissot i inni, 2016; Richbourg i inni, 2019). Spośród wszystkich tkanek, budujących bariery mechaniczne tylko dwie są ubarwione. Są nimi: nabłonek barwnikowy siatkówki, wchodzący w skład bariery krew-siatkówka oraz naskórek, stanowiący ważny element skóry. Ze względu na duże zróżnicowanie ubarwienia skóry u ludzi, uwarunkowane genetycznie (Lin i Fisher, 2007), bardzo trudno jest zbadać w sposób systematyczny wpływ melaniny na właściwości mechaniczne skóry, z pominięciem szeregu czynników biochemicznych. W przeciwieństwie do skóry, ubarwienie nabłonka barwnikowego siatkówki nie zależy od uwarunkowań genetycznych (Boulton, 2014), co istotnie ułatwia analizę mechanicznej roli melaniny w tej tkance.

Nabłonek barwnikowy siatkówki to pojedyncza warstwa komórek pomiędzy naczyniówką a siatkówką w oku wewnętrznym (Strauss, 2005). Cechą charakterystyczną tej tkanki jest jej silne ubarwienie (Sarna, 1992). Za główną rolę melaniny w nabłonku barwnikowym siatkówki uważa się pochłanianie rozproszonego światła oraz zmiatanie wolnych rodników (Różanowski i inni, 2008). Rysunek 1 pokazuje schematycznie przekrój przez kompleks naczyniówka-siatkówka z zaznaczonymi poszczególnymi tkankami.



Rysunek 1. Schematyczny przekrój przez kompleks krew-siatkówka.

Jedną z podstawowych funkcji bariery krew-siatkówka jest podtrzymywanie integralności mechanicznej tego kompleksu i zapobieganie wnikania naczyń do wnętrza oka (Steuer i inni, 2005). Spośród tkanek wchodzących w skład kompleksu krew-siatkówka błona Brucha uważana jest za główny element w podtrzymywaniu integralności mechanicznej bariery krew-siatkówka (Booij i inni, 2010). Błona Brucha to wyspecjalizowany kompleks o grubości od 1 do 4 μm , składający się z błony podstawnej, warstwy włókien kolagenowych, warstwy włókien sprężystych i z blaszki podstawnej nabłonka barwnikowego siatkówki (Bai i inni, 2017). **Co ciekawe jak dotąd mechaniczna rola melaniny w podtrzymywaniu bariery krew-siatkówka w ogóle nie była brana pod uwagę.**

Przerwanie bariery krew-siatkówka zachodzi w różnych stanach patologicznych, takich jak choroby metaboliczne, stan zapalny oraz zależne od wieku zwyrodnienie plamki żółtej AMD (z ang. Age-related Macular Degeneration) (Klassen i inni, 2013), co w konsekwencji może prowadzić do częściowej albo nawet całkowitej utraty wzroku (Zhang i Lai, 2018). Najczęstszą przyczyną przerwania bariery krew-siatkówka jest wnikanie naczyń krwionośnych z naczyniówki do siatkówki podczas wysiękowej odmiany AMD. Należy zaznaczyć, że zwyrodnienie plamki żółtej jest chorobą cywilizacyjną; jest to najważniejsza patologia odpowiedzialna za ślepotę u ludzi powyżej 60-go roku życia w rozwiniętych krajach Europy i Ameryki, która dotyka coraz większą część populacji w tych krajach. Co więcej, jest to tzw. choroba „cicha”, ponieważ nie daje żadnych wczesnych objawów do momentu przerwania bariery krew-siatkówka, co prowadzi do niemalże natychmiastowej utraty wzroku nie pozostawiając czasu na interwencję lekarską. Stąd tak istotne jest poznanie dokładnych mechanizmów tej choroby oraz ustalenie najważniejszych czynników ryzyka prowadzących do AMD. Niestety, jak dotąd nie ma jednoznacznych odpowiedzi na pytanie – co wywołuje AMD oraz jak zapobiegać tej chorobie?

Ubarwienie komórek czerniaka a ich przerzutowanie

Czerniak to złośliwy nowotwór, który wywodzi się ze stransformowanych melanocytów – komórek, produkujących melaninę (Lin i Fisher, 2007). W przeciwieństwie do melanocytów, w których synteza melaniny jest procesem ściśle regulowanym (Słominski i inni, 2012), a sam barwnik pełni określoną rolę biologiczną, głównie jest to ochrona skóry przed promieniowaniem słonecznym, w komórkach czerniaka produkcja melaniny jest mocno rozregulowana (Mishra i inni, 2014). Pomimo, iż rola melaniny w komórkach czerniaka jest przedmiotem licznych badań i spekulacji, jak dotychczas, nie udało się jednoznacznie jej ustalić. Ponadto, nie ma jednej spójnej teorii na temat jak ubarwienie komórek czerniaka wpływa na zdolności przerzutowe tych komórek (Słominski i inni, 2015). Należy zaznaczyć, że pomimo stosunkowo niskiego występowania czerniaka, jest to jeden z najbardziej złośliwych nowotworów. Stąd tak ważne wydaje się poznanie mechanizmów związanych z przerzutowaniem komórek tego nowotworu a w szczególności roli melaniny podczas przerzutowania.

Generalnie uważa się, że w trakcie syntezy melaniny, komórki czerniaka nie przerzutują, ponieważ ekspresja licznych genów zaangażowanych w produkcję barwnika hamuje zdolności przerzutowe tych komórek (np. Hoek i inni, 2006; Carreira i inni, 2009). Szczególne kontrowersje dotyczą zachowania komórek czerniaka po wyprodukowaniu melaniny. Wielu badaczy uważa, że zahamowanie przerzutowania w trakcie syntezy melaniny jest przejściowe, a komórki szybko wracają do swojego stanu sprzed produkcji barwnika zaraz po zakończeniu syntezy melaniny, ponieważ cała maszynaria molekularna odpowiedzialna za produkcję barwnika również wraca do stanu sprzed jego produkcji (np. Hoek i inni, 2008; Pinner i inni, 2009). Należy zaznaczyć, że sam proces syntezy melaniny jest stosunkowo krótki – trwa od kilku godzin, do maksymalnie kilku dni. Kiedy już komórka wytworzy barwnik, to pozostaje ubarwiona przez wiele dni, a nawet tygodni (w zależności od zdolności podziałowych). Należy tutaj podkreślić, że w przeciwieństwie do melanocytów, komórki czerniaka nie pozbywają się melanosomów na drodze egzocytozy (Lazova i Pawelek, 2009).

Przerzutowanie to wieloetapowy proces, w którym kluczową rolę odgrywa pokonywanie przez komórki nowotworowe różnych barier mechanicznych, znajdujących się wewnątrz tkanek, takich jak: liczne błony podstawne oraz ściany naczyń krwionośnych (Sherwood, 2006; van Zijl i inni, 2011). Okazuje się, że im bardziej komórka nowotworowa jest miękka i zdolna do podjęcia deformacji tym łatwiej może przenikać przez takie bariery (Makale, 2007). Liczne badania pokazały, że komórki nowotworowe o niskiej wartości modułu Younga były bardziej zdolne do przerzutowania (np. Cross i inni, 2007; Zhou i inni, 2013; Watanabe i inni, 2012). Można więc oczekiwać, że sama obecność „twardych jak kamień” ziaren melaniny w komórkach czerniaka powinna w istotny sposób modyfikować właściwości mechaniczne komórek, a co za tym idzie ich zdolność do przerzutowania. Co ciekawe istnieją nieliczne doniesienia kliniczne, wskazujące na to, że nieubarwione komórki czerniaka są bardziej złośliwe aniżeli ubarwione (np. Gualandri i inni, 2009; Thomas i inni, 2014). Niestety, potencjalny mechanizm odpowiedzialny za takie zachowanie komórek czerniaka nie został ustalony. ***Co ważne jak dotąd nikt nie zbadał w sposób systematyczny czy i jak sama obecność melaniny wpływa na przerzutowanie komórek czerniaka, a w szczególności nie zanalizował mechanicznego efektu obecności melaniny na zdolności przerzutowe tych komórek.***

Należy zaznaczyć, że obecna diagnoza czerniaka odbywa się głównie w oparciu o analizę histopatologiczną. Takie badanie jest w stanie stwierdzić, czy komórki zaczęły naciekać otaczające tkanki. Nie jest natomiast w stanie podać potencjału przerzutowego komórek nowotworowych co w przypadku każdego nowotworu jest ważne, a szczególnie w przypadku czerniaka.

Poniżej zostaną pokrótce omówione publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego. Ze względu na różną tematykę poruszoną w tych publikacjach, osiągnięcie zostało podzielone na dwie części.

Część I – mechaniczna rola melaniny w podtrzymywaniu bariery krew-siatkówka

Bezpośrednią motywacją dla podjęcia takiej tematyki badawczej był brak jakichkolwiek doniesień na temat mechanicznej roli melaniny w nabłonku barwnikowym siatkówki oraz roli tej tkanki w podtrzymywaniu mechanicznej integralności kompleksu krew-siatkówka.

Główny cel badawczy:

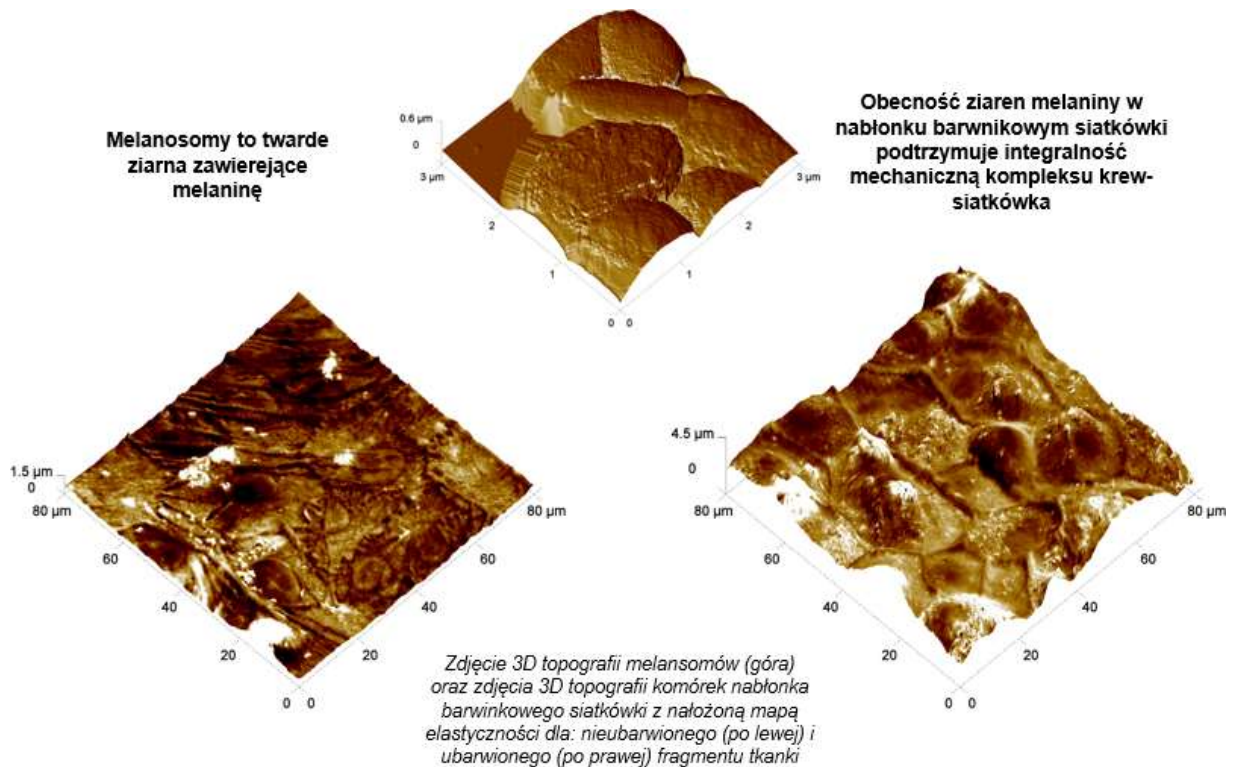
- wykazać mechaniczną rolę melaniny w komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki.

H1. Nanomechaniczna rola melaniny w nabłonku barwnikowym siatkówki

Na podstawie publikacji: **Sarna Michał**, Olchawa M, Zadło A, Wnuk D, Sarna T. The nanomechanical role of melanin granules in the retinal pigment epithelium. (2017). *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(3): 801-807.

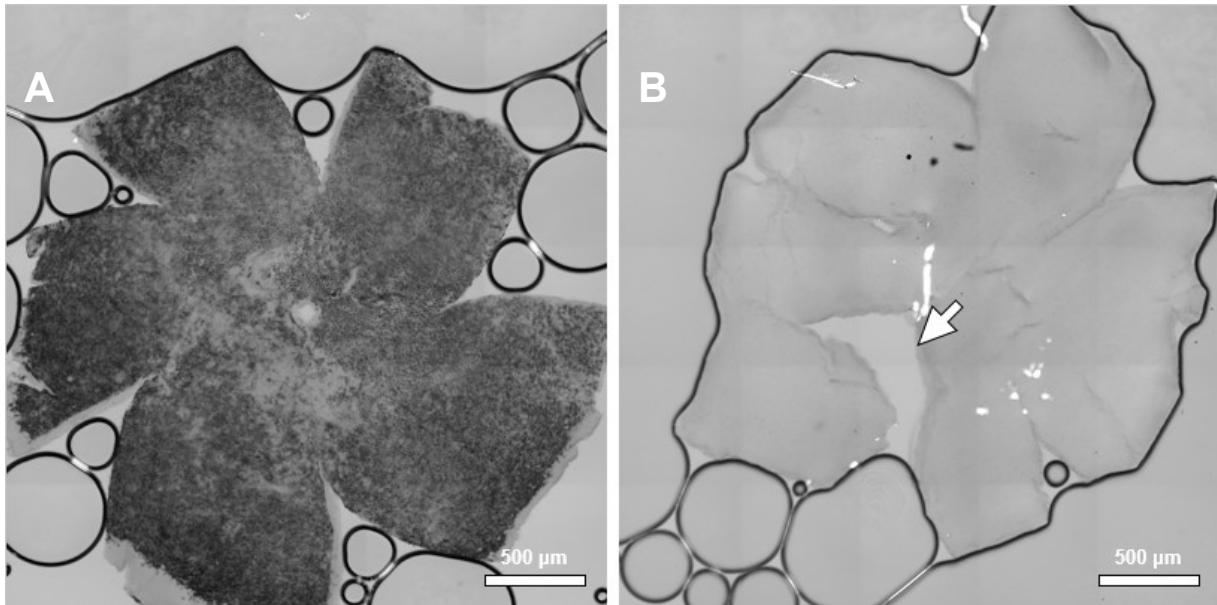
Bariera krew-siatkówka oddziela naczynia krwionośne naczyniówki od siatkówki oka. Należy zaznaczyć, że odpowiednie dotlenienie komórek oka jest kluczowe z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania tego organu, stąd jego silne unaczynienie. Z drugiej strony obecność tak dużej ilości naczyń krwionośnych stanowi potencjalne zagrożenie związane, między innymi, z mechanicznym uciskiem wywieranym przez te naczynia na najbardziej wrażliwe elementy siatkówki, czyli fotoreceptory. Rolę bariery mechanicznej, która powstrzymuje „napierające” do wnętrza oka naczynia krwionośne stanowi bariera krew-siatkówka. Za podstawowy element mechaniczny tej bariery powszechnie uważana jest błona Brucha (Booij i inni, 2010).

W pracy wchodzącej w skład osiągnięcia **H1** podważyłem ten ogólnie akceptowany pogląd zwracając uwagę na fakt, że błona Brucha ma stosunkowo niską wartość modułu Younga, która jest na poziomie kilopaskali (Last i inni, 2009). Dla porównania moduł Younga melanosomów jest na poziomie megapaskali, czyli o trzy rzędy wielkości większy (Guo i inni, 2008). Było dla mnie niemal oczywistym, że obecność dużej ilości ziaren melaniny w komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki powinna znacząco modyfikować właściwości nanomechaniczne tych komórek. W celu wykazania mechanicznej roli melaniny w nabłonku barwnikowym siatkówki, badania zostały przeprowadzone na wyizolowanej tkance z oczu świni. Z uwagi na znaczne podobieństwo anatomiczne pomiędzy okiem ludzkim a okiem świni, taki model badawczy wydawał się wystarczający adekwatny. Należy zaznaczyć, że ubarwienie nabłonka barwnikowego jest bardzo heterogenne (Burke i inni, 1996), co umożliwiło porównanie fragmentu ubarwionego i nieubarwionego tej tkanki. Rysunek 2 schematycznie ilustruje eksperymenty wykonane w pracy (Sarna i inni, 2017).



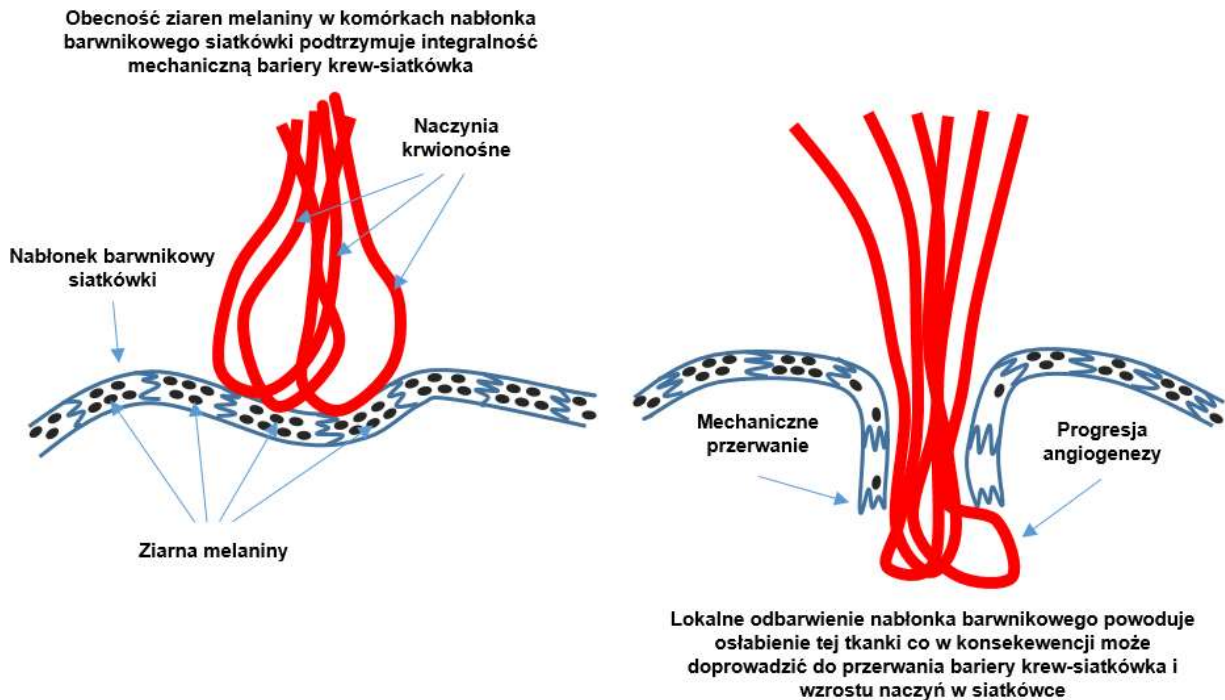
Rysunek 2. Abstrakt graficzny badań wykonanych w pracy (Sarna i inni, 2017).

Analiza nanomechaniczna komórek wykonana za pomocą mikroskopu sił atomowych wykazała jednoznacznie, że ubarwiony fragment nabłonka barwnikowego siatkówki ma co najmniej cztery razy wyższą wartość modułu Younga aniżeli fragment pozbawiony barwnika. Ponadto, analiza melanosomów wyizolowanych z nabłonka barwnikowego potwierdziła, że obserwowany efekt zależy wyłącznie od obecności w tych komórkach ziaren melaniny. Wyniki te pokazują nową, dotychczas nieznaną rolę mechaniczną melaniny w nabłonku barwnikowym siatkówki, który wchodzi w skład bariery krew-siatkówka. Badania te wskazują na to, że silnie ubarwiony nabłonek barwnikowy siatkówki powinien być bardziej odporny na stres mechaniczny aniżeli nabłonek nieubarwiony. Rysunek 3 pokazuje morfologię dwóch kompleksów krew-siatkówka wyizolowanych z oczu myszy C57BL/6J czarnej i albinotycznej u której nastąpiło przerwanie tej bariery. Jak widać na poniższych zdjęciach kompleks krew-siatkówka nie zawierający barwnika jest znacznie bardziej podatny na uszkodzenia mechaniczne aniżeli kompleks ubarwiony, co objawia się jego przerwaniem widocznym w dolnej części tkanki. Należy zaznaczyć, że jedyną różnicą pomiędzy tymi dwoma tkankami jest obecność lub brak melaniny. W ostatnim czasie ukazała się ciekawa praca, w której pokazano, że wnikanie naczyń w głąb oka w wysiękowej odmianie zwyrodnienia plamki żółtej kolokalizuje z miejscowym odbarwieniem tej tkanki (Dugel i Zimmer, 2016). Badacze nie potrafili jednak przedstawić wiarygodnego wytłumaczenia obserwowanego zjawiska.



Rysunek 3. Zdjęcia mikroskopowe kompleksów krew-siatkówka wyizolowanych z myszy czarnej (A) oraz albinotycznej (B), pokazujące uszkodzenie mechaniczne w przypadku nie ubarwionej tkanki zaznaczone strzałką.

Biorąc pod uwagę mechaniczną rolę melaniny wykazaną w pracy (Sarna i inni, 2017), zasugerowałem, że lokalne odbarwienie nabłonka barwnikowego można powiązać z potencjalnym występowaniem AMD. Zmapowanie ubarwienia całego nabłonka barwnikowego mogłoby więc ułatwić diagnostykę określającą prawdopodobieństwo wystąpienia wysiękowej odmiany tej choroby. Osobnicy o dużej heterogenności ubarwienia nabłonka barwnikowego siatkówki z licznymi lokalnymi odbarwieniami tej tkanki byłiby w grupie podwyższonego ryzyka wystąpienia tej choroby. Należy zaznaczyć, że synteza melaniny w nabłonku barwnikowym siatkówki zachodzi w trakcie życia płodowego a zawartość melaniny w tej tkance praktycznie nie ulega zmianie przez długość życia (Seagle i inni, 2005). Z tego powodu, wspomniane wyżej zmapowanie ubarwienia można by wykonać na dowolnym etapie życia. Takie badanie powinno umożliwić ewentualną interwencję lekarską na długo przed wystąpieniem głównych symptomów AMD, przyczyniając się do zachowania wzroku przynajmniej niektórym pacjentom. Należy również podkreślić znaczenie procesu angiogenezy podczas wysiękowej odmianie AMD (Ambati i Fowler, 2012). Jak pokazano we wcześniejszych pracach, angiogenezę można zahamować poprzez stosowanie odpowiednich barier mechanicznych (van Rij i inni, 2008). W pracy (Sarna i inni, 2017) zasugerowałem, że silnie ubarwiony nabłonek barwnikowy siatkówki pełni rolę takiej bariery mechanicznej, powstrzymując neowaskularyzację w zdrowym oku. Z drugiej strony brak ubarwienia nabłonka barwnikowego albo jego miejscowe odbarwienie nie tylko zmniejsza mechaniczną stabilność tej tkanki, sprzyjając przerwaniu podczas wysiękowej odmiany zwyrodnienia plamki żółtej, ale może prowadzić do niekontrolowanego wzrostu naczyń w siatkówce oka. Rysunek 4 graficznie przedstawia główny postulat osiągnięcia **H1**.



Rysunek 4. Postulowana rola melaniny w podtrzymywaniu integralności mechanicznej bariery krew-siatkówka (Sarna i inni, 2017).

Podsumowując tę część, wyniki zawarte w pracy stanowiącej osiągnięcie **H1** wskazują na nową, dotychczas nieznaną rolę melaniny w podtrzymywaniu integralności mechanicznej nabłonka barwnikowego siatkówki, który wchodzi w skład bariery krew-siatkówka, powstrzymując wnikanie naczyń do wnętrza oka.

Wnioski i postulaty z części pierwszej osiągnięcia

- W1** Ziarna melaniny nadają odpowiednią sztywność nabłonkowi barwnikowemu siatkówki oraz przyczyniają się do mechanicznego podtrzymywania bariery krew-siatkówka;
- P1** Lokalne odbarwienie nabłonka barwnikowego siatkówki stanowi poważny czynnik ryzyka przerwania bariery krew-siatkówka w wysiękowej odmianie zwyrodnienia plamki żółtej;
- P2** Kolokalizacja wrastania naczyń w głąb oka podczas zwyrodnienia plamki żółtej z odbarwieniem nabłonka barwnikowego siatkówki stanowi potencjalny marker diagnostyczny – dokładne zmapowanie ubarwienia nabłonka barwnikowego na dowolnym etapie życia może określić prawdopodobieństwo wystąpienia wysiękowej odmiany tej choroby.

Część II – mechaniczna rola melaniny w przerzutowaniu komórek czerniaka

Bezpośrednią motywacją dla podjęcia tych badań był brak doniesień na temat wpływu endogennej melaniny na właściwości nanomechaniczne komórek czerniaka oraz sprzeczne dane na temat czy i w jakim stopniu sama obecność melaniny wpływa na przerzutowanie komórek czerniaka *in vivo*.

Główne cele badawcze:

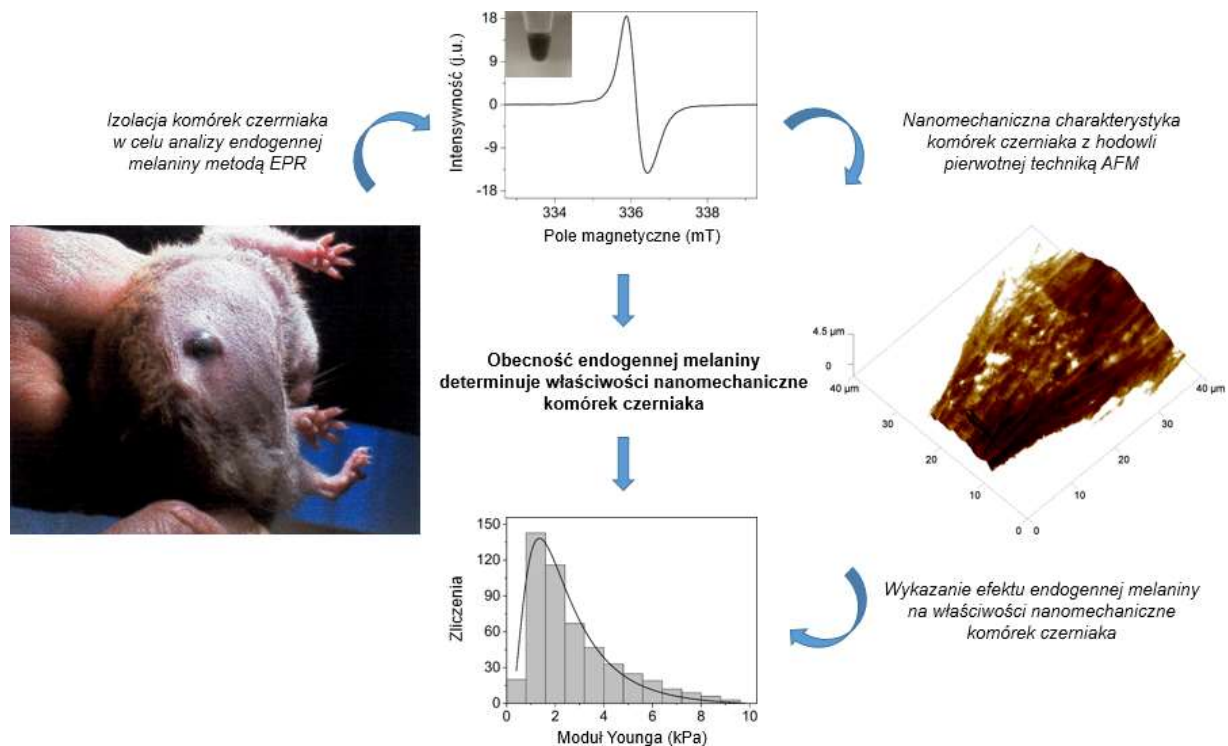
- wykazać, że właściwości nanomechaniczne komórek czerniaka zależą wyłącznie od ilości endogennej melaniny w tych komórkach;
- pokazać, że obecność melaniny w komórkach czerniaka obniża zdolność do przerzutowania tych komórek w warunkach *in vivo*.

H2. Nanomechaniczne właściwości komórek czerniaka zależą wyłącznie od ilości endogennej melaniny wewnątrz komórek

Na podstawie publikacji: Nanomechanical phenotype of melanoma cells depends solely on the amount of endogenous pigment in the cells. (2018). International Journal of Molecular Sciences, 19(2): E607.

W dotychczasowych badaniach nad wpływem melaniny na właściwości nanomechaniczne komórek czerniaka wykazałem, że indukowanie melaniny w komórkach czerniaka w warunkach *in vitro* w sposób istotny modyfikuje właściwości nanomechaniczne tych komórek (Sarna i inni, 2012; Sarna i inni, 2013; Sarna i inni, 2014). W pracach tych wykorzystałem ustabilizowane linie komórkowe (mysia linia czerniaka B16F10 oraz ludzka linia czerniaka SKMEL-188), w których melanina była indukowana poprzez dodanie do medium hodowlanego odpowiedniego aminokwasu stanowiącego substrat dla syntezy melaniny. Główną zaletą takiego podejścia jest to, że w sposób kontrolowany można zmieniać zawartość melaniny w komórkach. Takie podejście ma również istotne ograniczenie wynikające z ewentualnych różnic strukturalnych ziaren melaniny syntetyzowanych w „sposób naturalny” w ubarwionych komórkach oraz w wyniku stymulacji chemicznej. Ponadto w komórkach, w których indukuje się melanogenezę, praktycznie niemożliwe jest określenie wkładu samej melaniny w mechanikę komórki, w porównaniu do np. cytoszkieletu komórkowego, ponieważ stymulacja barwnika może modyfikować cytoszkielet.

W pracy stanowiącej osiągnięcie **H2** zbadałem wpływ endogennej melaniny na właściwości nanomechaniczne pierwotnych komórek czerniaka Bomirskiego (BHM). Rysunek 6 schematycznie ilustruje doświadczenia wykonane w pracy (Sarna i inni, 2018). Guzy czerniaka rosnące na boku chomików syryjskich po osiągnięciu odpowiednich rozmiarów były wycinane, następnie komórki izolowano i hodowano *in vitro*. W celu uzyskania komórek o różnym stopniu ubarwienia trzymano je w hodowli przez określony czas.



Rysunek 5. Abstrakt graficzny badań wykonanych w pracy (Sarna i inni, 2018).

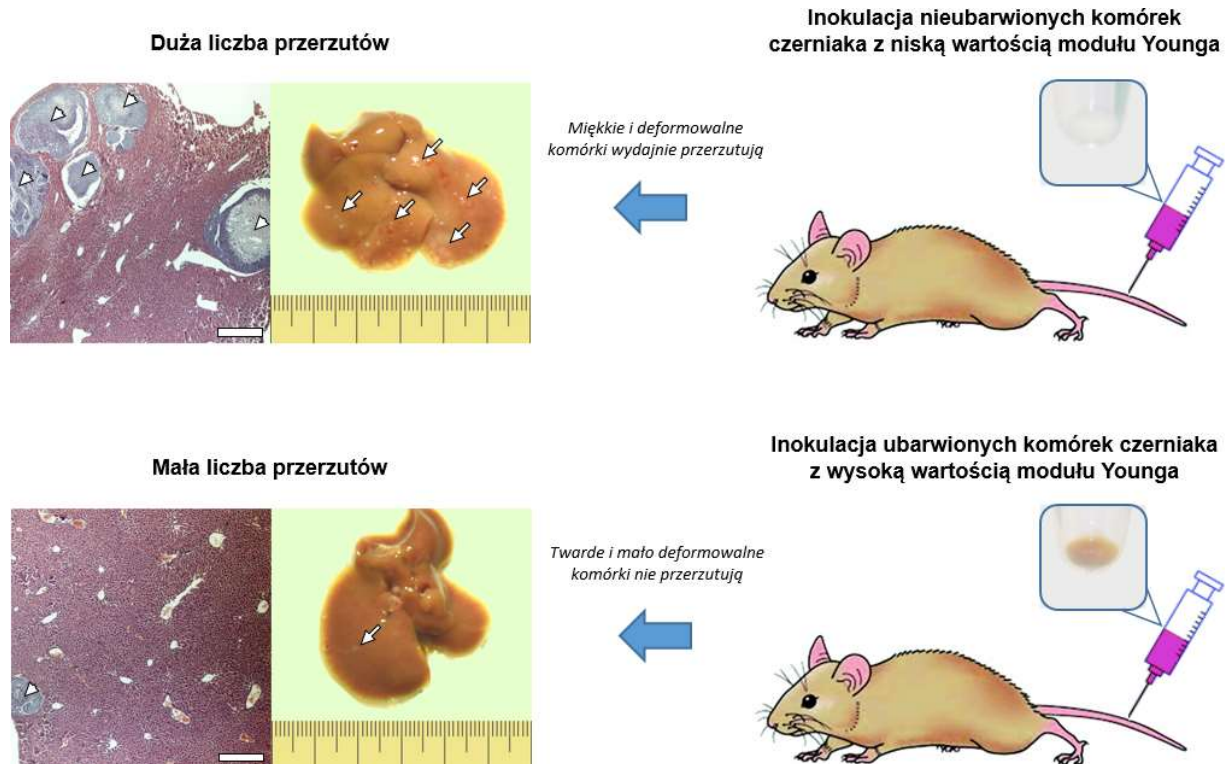
Należy zaznaczyć, że komórki BHM Ma (komórki wyizolowane z fragmentu guza ubarwionego) nie syntetyzują melaniny w warunkach *in vitro*. W związku z tym, że z każdym podziałem, komórki traciły około połowę zawartości melaniny, czas pomiędzy poszczególnymi pasażami komórek został dobrany tak, aby z każdym kolejnym pasażem komórki zawierały odpowiednio mniej melaniny. Komórki hodowano do piątego pasażu. Nieubarwioną kontrolę komórek czerniaka stanowiły komórki BHM Ab (komórki wyizolowane z fragmentu guza odbarwionego). Analiza nanomechaniczna komórek jednoznacznie wykazała, że komórki z pierwszego pasażu, zawierające największą ilość melaniny, miały najwyższą wartość modułu Younga w porównaniu do komórek z kolejnych pasaży oraz komórek kontrolnych – BHM Ab, które miały najniższą wartość modułu Younga. Wykorzystane w pracy podejście pozwoliło również na oszacowanie wkładu melaniny w mechanikę komórek w porównaniu do cytoszkieletu aktynowego. W komórkach z pasażu pierwszego cytoszkielet aktynowy praktycznie nie był jeszcze wykształcony a dopiero z czasem nabierał charakterystycznych cech. Dla odmiany komórki BHM Ab miały najlepiej wykształcony cytoszkielet aktynowy. Gdyby komórki BHM Ma nie zawierały barwnika, to komórki BHM Ab powinny mieć najwyższą wartość modułu Younga, a komórki z pasażu pierwszego najniższą. Okazało się jednak, że było dokładnie na odwrót. Pokazuje to dobitnie, że obecność endogennej melaniny determinuje właściwości nanomechaniczne komórek czerniaka.

H3. Obecność melaniny w komórkach czerniaka obniża zdolności przerzutowe tych komórek w warunkach *in vivo*

Na podstawie publikacji: **Sarna Michał**, Krzykawska-Serda M, Jakubowska J, Zadło A, Urbanska K. Melanin inhibits melanoma cell spread in mice in a unique mechanical fashion. (2019). Scientific Reports, doi: 10.1038/s41598-019-45643-9.

W swoim doktoracie wykazałem, że obecność melaniny w komórkach czerniaka obniża zdolności inwazyjne tych komórek w warunkach *in vitro* a efekt ten zależy od liczby ziaren melaniny w komórkach. Ponadto pokazałem, że obserwowany efekt jest wyłącznie mechaniczny, ponieważ obecność melaniny w tych komórkach nie wpływała w żaden istotny sposób na kluczowe z punktu przerzutowania komórki parametry, takie jak: migrację, proliferację, ekspresję prometastatycznych markerów oraz wydzielanie przez komórki metaloproteinaz. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy (Sarna i inni, 2014). Należy zaznaczyć, że każda obserwacja *in vitro*, aby mogła być poważnie brana pod uwagę np. w diagnozie klinicznej musi zostać potwierdzona w warunkach *in vivo*, wykorzystując odpowiedni model zwierzęcy.

W pracy stanowiącej osiągnięcie **H3** zbadałem wpływ obecności melaniny na przerzutowanie komórek czerniaka w warunkach *in vivo*. Rysunek 6 schematycznie ilustruje badania wykonane w pracy (Sarna i inni, 2019).



Rysunek 6. Abstrakt graficzny badań wykonanych w pracy (Sarna i inni, 2019).

W omawianej pracy myszy typu balb/c nude zostały nastrzyknięte komórkami czerniaka (ludzka linia SKMEL-188), zawierającymi różną ilość melaniny. Komórki czerniaka podano do żyły ogonowej zwierząt, a po dwóch tygodniach od nastrzyknięcia, myszy uśmiercono i poddano sekcji. Czas 14 dni od inokulacji został wyznaczony na podstawie pilotażowych eksperymentów w celu dobrania odpowiednich ram czasowych dla przeprowadzenia doświadczeń. Przerzuty czerniaka lokalizowały się w wątrobach myszy co umożliwiło łatwe wykonanie analizy ilościowej obserwowanego efektu. Analiza polegała na zliczeniu widzianych „gołym okiem” w trakcie sekcji przerzutów oraz pomiarze masy wątrób. Analiza ilościowa wykazała, że komórki czerniaka nie zawierające melaniny, które miały najniższą wartość modułu Younga, a jednocześnie były najbardziej podatne na deformację, dały najwięcej przerzutów w porównaniu do komórek ubarwionych o różnej zawartości melaniny. Ponadto średnio ubarwione komórki dały więcej przerzutów aniżeli komórki silnie ubarwione, ponieważ miały niższą wartość modułu Younga oraz wykazywały większą podatność na deformację aniżeli komórki silnie ubarwione. Dogłębna analiza danych doprowadziła do sformułowania wniosku, iż obserwowany efekt był wyłącznie mechaniczny i zależał od ilości ziaren melaniny w komórkach. Wyniki tej pracy po raz pierwszy pokazały, że komórki czerniaka zawierające ziarna melaniny, w porównaniu do komórek czerniaka niezawierających melaniny, wykazują mniejszą zdolność do przerzutowania w warunkach *in vivo*.

Uwzględniając dostępne doniesienia o przeżywalności pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem, z których wynika, że nieubarwione komórki czerniaka są bardziej agresywne w warunkach klinicznych, wyniki przedstawione w moim osiągnięciu **H3** mogą przyczynić się do lepszej diagnostyki czerniaka. Pomiar ilości melaniny w komórkach czerniaka podczas badania histopatologicznego mógłby stanowić stosunkowo prosty i obiektywny wyznacznik potencjału przerzutowego komórek czerniaka naciekających sąsiadujące tkanki. Można by się spodziewać, że komórki z mniejszą ilością barwnika byłyby bardziej agresywne aniżeli komórki silnie ubarwione. Taka analiza, przeprowadzona odpowiednio wcześniej, umożliwiłby oszacowanie prawdopodobieństwa wystąpienia przerzutów, dając lekarzom więcej czasu na zastosowanie optymalnego, indywidualnego leczenia.

Wnioski i postulaty z części drugiej osiągnięcia

- W1** Obecność endogennej melaniny w komórkach czerniaka determinuje właściwości nanomechaniczne tych komórek, znacząco usztywniając je oraz zmniejszając ich zdolności deformacyjne;
- W2** Obecność melaniny w komórkach czerniaka obniża zdolności przerzutowe tych komórek w warunkach *in vivo*;
- P1** Pomiar zawartości melaniny w komórkach czerniaka podczas badania histopatologicznego może stanowić potencjalny marker diagnostyczny – ilość barwnika w komórkach czerniaka może być prostym wskaźnikiem zdolności przerzutowych komórek.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Poza pracami wymienionymi w części przedstawiającej osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.) jestem współautorem 21 oryginalnych prac opublikowanych w czasopismach indeksowanych przez bazę JCR oraz 2 prac opublikowanych w czasopismach spoza bazy JCR. Poniżej omówiono skrótowo pozostałe prace. Prace pogrupowano ze względu na podobną tematykę badawczą.

Analiza nanomechaniczna ubarwionych komórek czerniaka

Na podstawie następujących publikacji:

- D1 Sarna Michał**, Zadło A, Koczurkiewicz P, Burda K, Sarna T. (2012). Melanin modifies nanomechanical properties of melanoma cells. In: The melanocyte and its environment. Bologna, Italy, Medimond. 23-28.
- D2 Sarna Michał**, Zadło A, Pilat A, Olchawa M, Gkogkolou P, Burda K, Böhm M, Sarna T. (2013). Nanomechanical analysis of pigmented human melanoma cells. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 26(5): 727-730.
- D3 Sarna Michał**, Zadło A, Hermanowicz P, Madeja Z, Burda K, Sarna T. (2014). Cell elasticity is an important indicator of the metastatic phenotype of melanoma cells. *Experimental Dermatology*, 23(11): 813-818.

Czerniakiem, melaniną oraz właściwościami nanomechanicznymi komórek zajmuję się od ponad dziesięciu lat. Kiedy przystępowałem do tych badań z wielkim zdziwieniem zastałem fakt, że nikt przede mną nie badał właściwości nanomechanicznych ubarwionych komórek czerniaka, pomimo wyjątkowo wysokiej agresywności tego nowotworu oraz dużego zróżnicowania w ubarwieniu tych komórek.

W pracy **D1** po raz pierwszy pokazałem, że ubarwione komórki czerniaka są bardziej sztywne niż komórki nieubarwione. Wykazanie znaczącego wpływu melaniny na właściwości nanomechaniczne komórek czerniaka odegrało kluczową rolę w podważeniu ogólnie akceptowanego paradygmatu mówiącego, że komórki nowotworowe są bardziej miękkie niż ich zdrowe odpowiedniki.

W pracy **D2** pokazałem, że ubarwione komórki czerniaka są znacznie bardziej sztywne niż ich zdrowe odpowiedniki – melanocyty. Wyniki tej pracy zwracają uwagę na fakt, że tzw. nanodiagnoza komórek nowotworowych w oparciu o pomiar właściwości nanomechanicznych mogłaby dać fałszywe rezultaty w przypadku komórek czerniaka co wskazuje na ostrożność stosowania tego w ewentualnej diagnozie czerniaka.

W pracy **D3**, stanowiącej główne osiągnięcie mojego doktoratu wykazałem, że obecność melaniny w komórkach czerniaka obniża zdolności inwazyjne tych komórek w warunkach *in vitro* a efekt ten zależy

od liczby melanosomów w komórkach. Ponadto pokazałem, że obserwowany efekt jest wyłącznie mechaniczny, ponieważ obecność melaniny w tych komórkach nie wpływała w żaden istotny sposób na kluczowe z punktu przetrzutowania komórki parametry, takie jak: migracja, proliferacja, ekspresja prometastatycznych markerów oraz wydzielanie metaloproteinaz.

Analiza nanomechaniczna komórek nowotworowych i zmienionych chorobowo

Na podstawie następujących publikacji:

- D4** Koczurkiewicz P, Podolak I, Skrzeczyńska-Moncznik J, **Sarna Michał**, Wójcik KA, Ryszawy D, Galanty A, Lasota S, Madeja Z, Czyż J, Michalik M. (2013). Triterpene saponosides from *Lysimachia ciliata* differentially attenuate invasive potential of prostate cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 206(1): 6-17.
- D5** Ryszawy D, **Sarna Michał**, Rak M, Szpak K, Kędracka-Krok S, Michalik M, Siedlar M, Zuba-Surma E, Burda K, Korohoda W, Madeja Z, Czyż J. (2014). Functional links between Snail-1 and Cx43 account for the recruitment of Cx43-positive cells into the invasive front of prostate cancer. *Carcinogenesis*, 35(9): 1920-1930.
- D6** **Sarna Michał**, Wojcik KA, Hermanowicz P, Wnuk D, Burda K, Sanak M, Czyż J, Michalik M. (2015). Undifferentiated bronchial fibroblasts derived from asthmatic patients display higher elastic modulus than their non-asthmatic counterparts. *PLoS One*, 10(2): e0116840.
- D7** Piwowarczyk K, **Sarna Michał**, Ryszawy D, Czyż J. (2017). Invasive Cx43^{high} sub-line of human prostate DU145 cells displays increased nanomechanical deformability. *Acta Biochimica Polonica*, 64(3): 445-449.
- D8** Gkogkolou P, **Sarna Michał**, Sarna T, Paus R, Luger T, Böhm M. (2018). Protection of glucotoxicity by a tripeptide derivative of α -melanocyte-stimulating hormone in human epidermal keratinocytes. *British Journal of Dermatology*, 180(4): 836-848.
- D9** Jasińska-Konior K, Wiecheć O, **Sarna Michał**, Panek A, Swakoń J, Michalik M, Romanowska-Dixon B, Urbańska K, Elas M. (2019). Increased elasticity of melanoma cells after low-LET proton beam due to actin cytoskeleton rearrangements. *Scientific Reports*, praca przyjęta do druku.

W artykule **D4** zbadaliśmy wpływ saponin triterpenowych na różne parametry komórkowe, w tym na właściwości nanomechaniczne komórek ludzkiego raka prostaty oraz komórki prawidłowe, w celu oszacowania potencjału przeciwnowotworowego tych związków. Zaobserwowano wyraźne zatrzymanie wzrostu i odpowiedź apoptotyczną obu typów komórek w obecności sub-mikromolowych stężeń badanych saponin. Towarzyszyło temu uwalnianie cytochromu c i aktywacja kaspazy 3/7. Zahamowanie ruchliwości komórek rakowych obserwowano w przypadku obydwu badanych saponin, natomiast tylko jedna z nich wykazywała działanie obniżające zdolności inwazyjne komórek rakowych. Mechanizm działania polegał

na zmniejszeniu właściwości sprężystych tych komórek. Stosunkowo niska odpowiedź cytostatyczna i proapoptotyczna komórek prawidłowych na badane związki, sugeruje wysoką specyficzność działania saponin, oraz wskazuje na potencjalne wykorzystanie takich związków w terapii przeciwnowotworowej.

W pracy **D5** zidentyfikowaliśmy związek pomiędzy koneksyną Cx43 a czynnikiem transkrypcyjnym Snail-1. Wysoki poziom Snail-1 oraz koneksyny Cx43 w komórkach towarzyszył zwiększonej ruchliwości tych komórek i było to skorelowane ze zwiększoną elastycznością subpopulacji inwazyjnych komórek.

W publikacji **D6** wykorzystując spektroskopię sił atomowych oraz mikroskopię fluorescencyjną porównaliśmy właściwości mechaniczne i architekturę cytoszkieletu aktynowego ludzkich fibroblastów oskrzelowych, pochodzących od pacjentów z astmą i od zdrowych dawców. Wykazano, że w astmatycznych fibroblastach aktyna tworzy grube i wyraźne włókna naprężeniowe, którym towarzyszą powiększone kontakty ogniskowe. Różnice w architekturze cytoszkieletu pomiędzy komórkami astmatyków i zdrowych osobników korelują z wyższymi wartościami modułów Younga dla komórek pobranych od dawców chorych na astmę oraz ich zwiększoną podatnością do przejścia z fibroblastów w miofibroblasty. Ze względu na oczywiste powiązania pomiędzy architekturą cytoszkieletu komórkowego a mechaniką komórki, wyniki tej pracy wskazują na fakt, że fibroblasty, pochodzące z oskrzeli astmatycznych mogą wykazywać znacznie wyższe napięcie statyczne aniżeli komórki nieastmatyczne. Ta wcześniej niezbadana właściwość astmatycznych fibroblastów może być potencjalnie ważna dla ich różnicowania w miofibroblasty podczas przebudowy ściany oskrzeli podczas rozwoju astmy.

W artykule **D7** zbadaliśmy udział koneksyny Cx43 w regulacji inwazyjności komórek ludzkiego raka prostaty DU145 poprzez analizę elastyczności inwazyjnej subpopulacji komórek DU145 za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM). Komórki Cx43^{high} DU145 wykazywały znacznie większą podatność na odkształcenie mechaniczne aniżeli komórki DU145 typu dzikiego. Przejściowe wyciszenie Cx43 nie miało wpływu na ich właściwości mechaniczne. Uzyskane dane potwierdzają związek między potencjałem inwazyjnym, ekspresją Cx43 a elastycznością komórek DU145. Pokazują również, że Cx43 nie jest bezpośrednio zaangażowane w utrzymanie fenotypu inwazyjnego DU145.

W pracy **D8** zbadaliśmy wpływ wysokiego stężenia glukozy (HG) na normalne ludzkie keratynocyty (NHK) i sprawdzono, czy Lys-d-Pro-Thr (KdPT) tripeptyd, pochodzący z hormonu stymulującego α -melanocyty, ma działanie ochronne. Zbadaliśmy kluczowe funkcje komórek NHK w warunkach HG z lub bez KdPT w układzie *in vitro*, a także *ex vivo*, stosując model hodowli skóry. HG upośledzało aktywność metaboliczną, proliferację, żywotność i migrację komórek NHK. Na podstawie analizy mikroskopią sił atomowych, pokazaliśmy, że HG zmieniło biofizyczne właściwości komórek NHK, tj. ich rozmiar oraz elastyczność. Glukotoksyczność w komórkach NHK zachodziła równoległe do indukcji wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS) i stresu retikulum endoplazmatycznego. KdPT osłabiał indukowany przez HG stres oksydacyjny i ograniczał wpływ glukozy na żywotność komórek, aktywność

metaboliczną i migrację. Co istotne, KdPT antagonizował także hamujący wpływ HG na migrację naskórka w zranionych kulturach ludzkich narządów skóry. Te obserwacje wskazują na nowy efekt KdPT, który można wykorzystać do przyszłej terapii owrzodzeń cukrzycowych skóry.

W publikacji **D9** zbadaliśmy odpowiedź komórkową na subletalne promieniowanie protonowe i promieniowanie X. W szczególności zbadano wpływ promieniowania na elastyczność oraz organizację cytoszkieletu aktynowego w komórkach czerniaka BLM i czerniaka błony naczyniowej oka Mel270. Oba rodzaje promieniowania indukowały zmiany w organizacji cytoszkieletu aktynowego natomiast promieniowanie wiązki protonowej zwiększało elastyczność komórkową w znacznie większym stopniu aniżeli promieniowanie rentgenowskie. Poziom wimentyny w komórkach BLM wzrósł po obu rodzajach promieniowania. Uzyskane dane pokazują, że elastyczność komórek znacznie wzrasta po wiązce protonów o niskim LET i utrzymuje się długo po napromienieniu. Może to mieć istotne konsekwencje dla właściwości przerzutowych komórek czerniaka, a także na podatność komórek na terapię.

Badanie fotoreaktywności melanin

Na podstawie następujących publikacji:

- D10** Szewczyk G, Zadło A, **Sarna Michał**, Ito S, Wakamatsu K, Sarna T. (2016). Aerobic photoreactivity of synthetic eumelanins and pheomelanins: generation of singlet oxygen and superoxide anion. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 29(6): 669-678.
- D11** Ito S, Kikuta M, Koike S, Szewczyk G, **Sarna Michał**, Zadło A, Sarna T, Wakamatsu K. (2016). Roles of reactive oxygen species in UVA-induced oxidation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid-melanin as studied by differential spectrophotometric method. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 29(3): 340-351.
- D12** Zadło A, Szewczyk G, **Sarna Michał**, Kozinska A, Pilat A, Kaczara P, Sarna T. (2016). Photoaging of retinal pigment epithelial melanosomes: the effect of photobleaching on morphology and reactivity of the pigment granules. *Free Radical Biology and Medicine*, 97: 320-329.
- D13** Zadło A, Pilat A, **Sarna Michał**, Pawlak A, Sarna T. (2017). Redox active transition metal ions make melanin susceptible to chemical degradation induced by organic peroxide. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 75(3-4): 319-333.
- D14** Zadło A, Szewczyk G, **Sarna Michał**, Camenisch TG, Sidabras J, Ito S, Wakamatsu K, Sagan F, Mitoraj M, Sarna T. (2019). Photobleaching of pheomelanin increases its phototoxic potential; physicochemical studies of synthetic pheomelanin subjected to aerobic photolysis. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 32(3): 359-372.

Pomimo dobrze znanych fotoprotekcyjnych właściwości melaniny (Meredith i Sarna, 2006) barwnik ten charakteryzuje się pewną fotoreaktywnością i w odpowiednich warunkach może fotogenerować tzw.

reaktywne formy tlenu ROS (z ang. *Reactive Oxygen Species*), takie jak nadtlenek wodoru oraz anionorodnik ponadtlenkowy (Sarna i Sealy, 1984; Korytowski i inni, 1987), przy czym wydajność tych fotoprocusów jest bardzo niska. Do niedawna utrzymywano, że ze względu na swoje właściwości fotofizyczne melanina nie może generować tlenu singletowego. Jednak w ostatnich latach udało się zaobserwować bardzo słabą luminescencję przy 1270 nm, po laserowym wzbudzeniu preparatów melaniny syntetycznej i naturalnej, sugerującej fotogenerowanie tlenu singletowego (Chiarelli-Neto i inni, 2011). Ta sama grupa badaczy pokazała ponadto, że tlen singletowy fotogenerowany zarówno przez eumelaninę i feomelaninę uszkadza DNA (Chiarelli-Neto et al., 2014). Pomimo pionierskiego charakteru badań opisanych w cytowanych publikacjach, autorzy tych badań nie przedstawili zadawalających dowodów na rzeczywiste fotogenerowanie tlenu singletowego przez melaniny w zastosowanych warunkach doświadczalnych.

W artykule **D10**, zrealizowanym we współpracy z naukowcami japońskimi, przedstawiliśmy dowody doświadczalne, które w sposób jednoznaczny pokazują, że zarówno syntetyczne feomelaniny jak i eumelaniny fotogenerują tlen singletowy, przy czym jego wydajność kwantowa silnie zależy od długości fali wzbudzającego promieniowania. Chociaż efektywność fotogenerowania tlenu singletowego przez światło niebieskie jest bardzo mała, bo wynosi około 0,01%, istotnie zwiększa się przy wzbudzeniu melanin światłem ultrafioletowym, a ponadto melaniny są dobrymi wygaszaczami tlenu singletowego. Oznacza to, że tlen singletowy fotogenerowany przez barwniki melaninowe może przyczyniać się do ich oksydatywnej degradacji, czyli może być zaangażowany w zależnych od wieku zmianach fizykochemicznych właściwości barwników melaninowych prowadzących do utraty ich zdolności fotoprotekcyjnej i przeciwutleniającej.

W kolejnej pracy **D11** badaliśmy rolę tlenu singletowego, anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru w fotodegradacji syntetycznej eumelaniny wytworzonej z 5,6 dihydroksyindol-2-kwasu karboksylowego (DHICA). Wyniki tych badań pokazały, że w eumelaninie, promieniowanie UVA indukuje utlenianie DHICA do indolo-5,6-chinon-2-kwasu karboksylowego., który następnie ulega fotodegradacji do pochodnych pyrolowych. Badania wskazują na istotną rolę tlenu singletowego i anionordnika ponadtlenkowego w procesach, które mogą zachodzić in vivo w melaninie naskórka, przyczyniając się do niepożądanych reakcji fototoksycznych w skórze.

Dla wyjaśnienia mechanizmów chronicznych zmian przeciwutleniających i fotoprotekcyjnych właściwości melanosomów w nabłonku barwnikowym siatkówki, jakie występują u ludzi., w pracy **D12** analizowano efekty fotostarzenia in vitro melanosomów izolowanych z RPE oczu wolic, stosując wachlarz komplementarnych metod spektroskopowych i analitycznych: elektronowy rezonans paramagnetyczny, odzysk nasycalności EPR, mikroskopia sił atomowych, dynamiczne rozproszenia światła, spektroskopia absorpcyjna UV-VIS, czasowo-rozdzielcza detekcja tlenu singletowego i jodometryczne oznaczanie

wodoronadtlenku lipidów. Uzyskane wyniki pokazały, że fotobłaknięte melanosomy, w porównaniu do melanosomów natywnych, słabiej chroniły przed fotosensybilizowaną peroksydacją lipidów. Fotostarzenie *in vitro* prowadzi do zmian fizykochemicznych właściwości melanosomów, które zwiększają dostępność kluczowych grup funkcjonalnych melaniny dla reagentów zewnętrznych, zwiększając prawdopodobieństwo generowania toksycznych reaktywnych form tlenu.

Badania opisane w publikacji **D13**, dotyczą wpływu jonów metali przejściowych, zwłaszcza Fe(III) i Cu(II) na podatność melanosomów i syntetycznej eumelaniny do ulegania modyfikacjom chemicznym indukowanym organicznym wodoronadtlenkiem. Ma to związek z zależnymi od wieku fizykochemicznymi zmianami melanosomów w ludzkim RPE. Okazuje się bowiem, że w RPE u ludzi starszych zmniejsza się liczba “natywnych” melanosomów na korzyść złożonych ziarnistości tzw. melanolipofuscyny. Badania oparte były na postulatcie o utleniającym działaniu wodoronadtlenków lipidów, które mogą stanowić składnik lipofuscyny. Badania pokazały, że melanina ulega degradacji oksydacyjnej w wyniku oddziaływania z wodoronadtlenkiem tert-butyłu w dużym stężeniu, przy czym skompleksowane z melaniną redokso-aktywne jony metali w sposób znaczący przyspieszają ten proces. Wyniki tych modelowych badań sugerują, że w melanolipofuscynie może dochodzić do modyfikacji chemicznej melaniny, w wyniku której melanina traci swoje właściwości przeciwutleniające.

Chociaż melanina jest powszechnie uważana za efektywny barwnik fotoprotekcyjny i przeciwutleniacz, zwiększona aktywność fotochemiczna tego barwnika może prowadzić do zjawisk fototoksycznych. W artykule **D14** zbadaliśmy fotoreaktywność 5-S-cysteinydopa-melaniny, syntetycznego modelu feomelaniny oraz produktów jej kontrolowanej fotodegradacji, indukowanej promieniowaniem UV-VIS. Fotodegradacja feomelaniny, której towarzyszy blaknięcie pigment, prowadzi do silnych zmian jego paramagnetycznych właściwości i dramatycznego wzrostu zdolności melaniny do fotogenerowania tlenu singletowego. Wykazano, że zmiany te są następstwem foto-konwersji benzotiazynowych podjednostek melaniny do zmodyfikowanych pochodnych benzotiazolu. Zwiększonej wydajności fotogenerowania tlenu singletowego przez fotodegradowaną feomelaninę towarzyszy spadek jej efektywności gaszenia tlenu singletowego, co może prowadzić do wzmożenia toksycznego działania fotogenerowanego tlenu singletowego. Uwzględniając fakt, że feomelanina stanowi około 25% melaniny skórnej u wszystkich osobników, bez względu na stopień i rodzaj pigmentacji, wyniki badań sugerują, że takie niepożądane modyfikacje fotochemiczne melaniny skórnej mogą mieć charakter powszechny.

Opisane w powyższych pracach badania stanowiły dla mnie inspirację do złożenia do Narodowego Centrum Nauki wniosku o projekt na zbadanie fotoreaktywnej roli melaniny w powstawaniu czerniaka. Finansowanie otrzymałem w pierwszym podejściu i obecnie realizuję projekt z utworzoną przeze mnie grupą badawczą w Zakładzie Biofizyki, na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ (SONATA-10 nr projektu: 2015/19/D/ST4/01964).

Analiza mikropęcherzyków wydzielanych przez komórki macierzyste

Na podstawie następujących publikacji:

- D15** Bobis-Wozowicz S, Kmiotek K, Sekula M, Kedracka-Krok S, Kamycka E, Adamiak M, Jankowska U, Madetko-Talowska A, **Sarna Michał**, Bik-Multanowski M, Kolcz J, Boruckowski D, Madeja Z, Dawn B, Zuba-Surma EK. (2015). Human induced pluripotent stem cell-derived microvesicles transmit RNAs and proteins to recipient mature heart cells modulating cell fate and behavior. *Stem Cells*, 33(9): 2748-2761.
- D16** Adamiak M, Cheng G, Bobis-Wozowicz S, Zhao L, Kedracka-Krok S, Samanta A, Karnas E, Xuan YT, Skupien-Rabian B, Chen X, Jankowska U, Girgis M, Sekula M, Davani A, Lasota S, Vincent RJ, **Sarna Michał**, Newell KL, Wang OL, Dudley N, Madeja Z, Dawn B, Zuba-Surma EK. (2018). Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived extracellular vesicles are safer and more effective for cardiac repair than iPSCs. *Circulation Research*, 122(2): 296-309.

W ostatnim czasie mikropęcherzyki pozakomórkowe stały się przedmiotem intensywnych badań pod kątem ich możliwych zastosowań zarówno w badaniach podstawowych, jak i klinicznych. Te małe obiekty sferyczne są wydzielane przez prawie każdy typ komórki i są zaangażowane w transport ładunku pomiędzy komórkami. Znaczenie mikropęcherzyków zaobserwowano w wielu ważnych procesach komórkowych, w tym w komunikacji międzykomórkowej, odpowiedzi immunologicznej a ostatnio w różnicowaniu komórek macierzystych. Aby móc zbadać te submikronowe obiekty, wymagane są techniki mikroskopowe o wysokiej rozdzielczości. Jedną z najbardziej obiecujących technik w tych badaniach jest mikroskop sił atomowych (AFM).

W pracy **D15** zbadaliśmy zdolność mikropęcherzyków wydzielanych przez komórki macierzyste do przenoszenia bioaktywnych cząsteczek, w tym mRNA, mikroRNA i białek do komórek docelowych, takich jak mezenchymalne komórki zrębu serca. Uzyskane wyniki pokazują, że mikropęcherzyki z komórek macierzystych są bogate w mRNA, mikroRNA i białka. Wyniki te pokazują, że mikropęcherzyki wydzielane przez komórki macierzyste mogą być źródłem bezpiecznych, bezkomórkowych pochodnych bioaktywnych substancji do regeneracji tkanek.

W publikacji **D16** zbadaliśmy, czy pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste mogą wpływać na funkcje biologiczne komórek serca hodowanych *in vitro*. Ponadto porównano bezpieczeństwo i skuteczność działania samych mikropęcherzyków z komórkami macierzystymi w naprawie serca *in vivo*. W celu dokonania charakterystyki mikropęcherzyków wykorzystano zaawansowane techniki pomiarowe w tym mikroskopię sił atomowych. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że same mikropęcherzyki są bezpieczniejsze i bardziej wydajne w leczeniu napraw serca aniżeli komórki macierzyste.

Pozostałe prace, w których wykorzystane zostały zaawansowane metody obrazowania oraz analizy obrazu i danych spektroskopowych

Na podstawie następujących publikacji:

- D17** Sarna Michał, Wybieralska E, Miekus K, Drukala J, Madeja Z. (2009). Topographical control of prostate cancer cell migration. *Molecular Medicine Reports*, 2(5): 865-871.
- D18** Wytrwal M, Sarna Michał, Bednar J, Kozik B, Nowakowska M, Kepczynski M. (2011). Formation of micelles by hydrophobically modified poly(allylamine hydrochloride). *Polish Journal of Applied Chemistry*, 55: 11-17.
- D19** Hermanowicz P, Sarna Michał, Burda K, Gabryś H. (2014). AtomicJ: an open source software for analysis of force curves. *Review of Scientific Instruments*, 85(6): 063703.
- D20** Wytrwal M, Leduc C, Sarna Michał, Goncalves C, Kepczynski M, Midoux P, Nowakowska M, Pichon C. (2015). Gene delivery efficiency and intracellular trafficking of novel poly(allylamine) derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1): 372-382.
- D21** Klimkiewicz K, Węglarczyk K, Collet G, Paprocka M, Guichard A, Sarna Michał, Jozkowicz A, Dulak J, Sarna T, Grillon C, Kieda C. (2017). A 3D model of tumour angiogenic microenvironment to monitor hypoxia effects on cell interactions and cancer stem cell selection. *Cancer Letters*, 396: 10-20.
- D22** Owczarek K, Szczepanski A, Milewska A, Baster Z, Rajfur Z, Sarna Michał, Pyrc K. (2018). Early events during human coronavirus OC43 entry to the cell. *Scientific Reports*, 8(1): 7124.
- D23** Wiktor A, Sarna Michał, Wnuk D, Sarna T. (2018). Lipofuscin-mediated photodynamic stress induces adverse changes in nanomechanical properties of retinal pigment epithelium cells. *Scientific Reports*, 8(1): 17929.
- D24** Koziel J, Bryzek D, Ciastoń I, Dobosz E, Gasiorek A, Makarska A, Sarna Michał, Eick S, Puklo M, Lech M, Potempa N, Potempa J. (2018). Triggering NETosis via protease-activated receptor (PAR)-2 signaling as a mechanism of hijacking neutrophils function for pathogen benefits. *PLoS Pathogens*, praca przyjęta do druku.

Artykuł **D17** podsumowuje wyniki uzyskane w trakcie mojej pracy magisterskiej. W niniejszej pracy zbadano wpływ topografii podłoża na migrację komórek nowotworowych. Wykazano, że komórki ludzkiego (DU-145) oraz szczurzego (MAT-LyLu i AT-2) raka prostaty mogą być wydajnie naprowadzane przez kontakt. Uzyskane wyniki pokazują, że topografia podłoża, z którym komórka ma kontakt odgrywa istotną rolę w trakcie migracji komórek nowotworowych podczas inwazji otaczających je tkanek.

W pracy **D18** zmodyfikowaliśmy dostępny komercyjnie poli(chlorowodorek alliloaminy) (PAH) w hydrofobowo modyfikowane silne polielektrolyty. Osiągnięto to przez redukcyjne aminowanie z użyciem

heksanalu lub oktanalu, a następnie metylowanie jodkiem metylu, prowadzące do czwartorzędowych soli amoniowych. Struktury chemiczne otrzymanych polikationów i stopnie podstawienia łańcuchami hydrofobowymi potwierdzono metodami spektroskopowymi i analizą elementarną. Struktury utworzone przez zmodyfikowane polimery w roztworze wodnym oznaczono za pomocą pomiarów potencjału zeta, techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i kriogenicznej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Morfologię osadzonych na powierzchni krzemu filmów polimerowych badano za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM). Obserwacja mikroskopowa potwierdziła tworzenie polimerycznych miceli o wielkościach zależnych od długości łańcuchów alkilowych, przyłączonych do szkieletu polikationowego.

W publikacji **D19** opracowaliśmy nową aplikację Java z otwartym kodzie źródłowym do analizy krzywych siłowych i obrazów zarejestrowanych za pomocą mikroskopu sił atomowych. Oprogramowanie „AtomicJ” obsługuje szeroki zakres modeli mechaniki kontaktowej i implementuje procedury, które zmniejszają wpływ odchylenia od modelu kontaktowego. Generuje mapy właściwości mechanicznych, w tym mapy modułu Younga, siły adhezji i wysokości próbki. Może również obliczać „stopy siłowe”, które ujawniają, w jaki sposób reakcja próbki na deformację zmienia się wraz z głębokością wcięcia. AtomicJ analizuje krzywe siły jednocześnie na wielu wątkach, co pozwala na dużą szybkość analizy. Działa na wszystkich popularnych systemach operacyjnych, w tym Windows, Linux i Macintosh.

W artykule **D20** opisaliśmy nowe pochodne poli(alliloaminy) o różnym bilansie podstawienia pierwszorzędowych, drugorzędowych, trzeciorzędowych i czwartorzędowych grup aminowych. Wszystkie pochodne były zdolne do kompleksowania pDNA w polipleksy przy niskich stosunkach masy genu do polimeru, tj. 1:1 lub 1:2. Ponadto badane polipleksy były mniej cytotoksyczne i wykazywały lepszą wydajność transfekcji w porównaniu z liniową poli(etylenoiminą). Stabilność polipleksów była zmierzona za pomocą mikroskopu sił atomowych. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność czwartorzędowych grup amoniowych jest ważna w tworzeniu stabilnych polipleksów. Polipleksy ze wszystkimi typami grup aminowych wykazały duży potencjał dostarczania genów do komórek. Ponadto polipleksy z takimi pochodnymi były dobrze internalizowane przez komórki.

W pracy **D21** stworzyliśmy model 3D wzrostu czerniaka, który naśladuje mikrośrodowisko guza. Uwzględnienie procesów związanych z angiogenezą dodatkowo umożliwiło zbadanie procesów wnikania naczyń do wnętrza guza. Opisana w pracy metoda hodowli komórek nowotworowych w sferoidach stanowi nowe narzędzie do badania oddziaływania nowotworu z mikrośrodowiskiem.

W publikacji **D22** zbadaliśmy mechanizm wnikania ludzkiego koronawirusa OC43 do wnętrza komórek. Przy pomocy mikroskopii konfokalnej oraz metod biologii molekularnej odkryto, że wirus wykorzystuje endocytozę zależną od kaweoliny-1. Wejścia i rozerwanie pęcherzyków zawierających wirusy z powierzchni komórki zależy od białka dynaminy. Ponadto proces internalizacji pęcherzyków

wymaga re-aranżacji cytoszkieletu aktynowego. Dzięki tym badaniom udało się poszerzyć wiedzę na temat procesu infekcji komórek, co w przyszłości może być wykorzystane do rozwoju skutecznych metod leczenia pacjentów.

W artykule **D23** zbadaliśmy wpływ fotoaktywacji lipofuscyny na właściwości nanomechaniczne komórek ludzkiego nabłonka barwnikowego siatkówki. Wyizolowana od zmarłych dawców w różnym wieku lipofuscyna została pogrupowana w dwa przedziały wiekowe: 18-29 lat oraz 50-59 lat. Następnie drogą fagocytozy wprowadzono ziarna lipofuscyny do komórek. Fotoaktywacja lipofuscyny światłem w zakresie długości fal 420-560 nm o stosunkowo niskim natężeniu dała spektakularne rezultaty. Komórki zawierające ziarna lipofuscyny z przedziału wiekowego 50-59 lat miały całkowicie zniszczony cytoszkielet aktynowy i znacząco obniżone wartości modułu Younga w porównaniu do komórek z ziarnami lipofuscyny z przedziału wiekowego 18-29 lat oraz do kontrolnych komórek nie zawierających lipofuscyny. Okazało się, że uszkodzenia cytoszkieletu są następstwem fotogenerowania przez lipofuscynę reaktywnych form tlenu, które utleniają białka komórkowe, w tym aktynę cytoszkieletu. Wyniki te wskazują na nową, nie rozważaną wcześniej rolę lipofuscyny w zmianach patologicznych zachodzących w nabłonku barwnikowym siatkówki.

W pracy **D24** zbadaliśmy rolę gingipain, odpowiedzialnych za wirulencję *Porphyromons gingivalis*, na powstawanie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilii (NET), indukowanych przez ten patogen. Pokazano, że NETy wyzwalane przez *P. gingivalis* są zależne od szczepu bakterii, ponieważ w przeciwieństwie do szczepu dzikiego (W83) szczep mutanta o zerowym poziomie gingipainy tylko nieznacznie indukował tworzenie NETów. Bezpośredni wpływ proteaz na NETozę został udokumentowany przy użyciu oczyszczonych gingipain. W szczególności indukcja NETów była zależna od aktywności katalitycznej gingipain, ponieważ proteolitycznie nieaktywne formy enzymów wykazywały zmniejszoną zdolność do indukowania NETów.

6. Działalność dydaktyczna i organizacyjna.

Dydaktyka stanowi bardzo ważny element mojej pracy zawodowej a nauczanie studentów dostarcza mi dużo satysfakcji. Dlatego bardzo poważnie traktuję swoje obowiązki dydaktyczne, próbując możliwie jak najlepiej się z nich wywiązać, między innymi poprzez stymulowanie zainteresowania u studentów tematyką poruszaną na zajęciach. O skuteczności takiego podejścia świadczą mogą liczne pytania studentów w trakcie zajęć, przychodzenie na konsultacje oraz wysyłanie e-maili z prośbą o dodatkowe informacje z zakresu poruszanych przeze mnie zagadnień. W trakcie krótkiego, bo zaledwie trzy letniego, doświadczenia dydaktycznego opiekowałem się trojgiem studentów, którzy pod moją opieką przygotowali a następnie obronili prace magisterskie. W procesie nauczania szczególnie cenię sobie możliwość wykorzystania posiadanego przeze mnie wykształcenia fizycznego. Praktycznie w każdym kontakcie dydaktycznym ze

studentami, po nakreśleniu znaczenia omawianego tematu, staram się przedstawiać jego fizyczne aspekty, aby budować wiedzę studentów na trwałych podstawach. W moim przekonaniu takie podejście daje możliwość głębokiego zrozumienia procesów opisywanych przez biofizykę, którą wykładam w ramach różnych kursów. Wydaje się, że studenci bardzo doceniają moje podejście do nauczania o czym mogą świadczyć bardzo pozytywne ankiety studenckie oceniające jakość procesu kształcenia pracowników w bazie USOS web. Wśród zajęć jakie prowadzę, za szczególnie istotny uważam kurs zatytułowany „Biomechanika komórki”. Ten do wyboru kurs jest moim autorskim opracowaniem, który przygotowałem dla studentów naszego Wydziału oraz studentów obcokrajowców, dla których prowadzę go w języku angielskim jako „Cell biomechanics”. Należy podkreślić, że po zaledwie trzech latach, odkąd go prowadzę, kurs ten został wpisany do programu nowo powstałego kierunku „Biofizyka molekularna i komórkowa” na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego jako kurs obowiązkowy. Innym kursem, który również spotkał się z uznaniem wśród studentów to zmodyfikowany przeze mnie kurs „Fotobiofizyka”, który również został wpisany do programu „Biofizyki molekularnej i komórkowej” jako kurs obowiązkowy. Poza tym współprowadzę kurs „Biofizyka z elementami fizyki”, który jest kursem obowiązkowym dla studentów III roku Biologii i Neurobiologii oraz ćwiczenia laboratoryjne w ramach specjalistycznych kursów obowiązkowych i do wyboru. Do tej pory byłem opiekunem trzech magistrantów. Obecnie w mojej grupie badawczej jest dwoje doktorantów (mgr inż. Krystian Mokrzyński i mgr Justyna Sopol) oraz pięciu magistrantów.

W ramach działalności organizacyjnej brałem udział przy organizowaniu „Drugiej Krajowej Konferencji Nanotechnologii, NANO 2008”, która odbyła się w dniach 25-28 czerwca, 2008 roku w Krakowie oraz konferencji z okazji “Jubileuszu 90-lecia Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie”, który odbył się w dniach 28-30 maja 2009 roku. Ponadto współorganizowałem pokazy dla studentów podczas “Nocy naukowców” w latach 2009-2011. Ostatnio byłem zaangażowany w organizację “Pikniku pod Dębem” na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ, który odbył się w dniu 8 czerwca, 2018 roku.

Podsumowanie

Badania przedstawione jako moje osiągnięcie naukowe dotyczą mechanicznej roli melaniny w komórkach i tkankach barwnikowych. W części pierwszej mojego osiągnięcia wykazałem, że melanina w komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki nadaje odpowiednią sztywność tej tkance i przyczynia się do mechanicznej stabilizacji bariery krew-siatkówka, zapobiegając wnikaniu naczyń krwionośnych do wnętrza oka. Badania te mogą mieć potencjalne zastosowanie w medycynie, ponieważ razem z istniejącymi danymi klinicznymi dotyczącymi przerwania kompleksu krew-siatkówka podczas wysiękowej odmiany zwyrodnienia plamki żółtej wskazują na to, że lokalne odbarwienie nabłonka barwnikowego siatkówki

stanowi poważny czynnik ryzyka przerwania bariery krew-siatkówka w tej chorobie. Kolokalizacja wrastania naczyń do siatkówki oka podczas zwyrodnienia plamki żółtej z odbarwieniem nabłonka barwnikowego siatkówki stanowi potencjalny marker diagnostyczny – dokładne zmapowanie ubarwienia nabłonka barwnikowego w dowolnym momencie życia może określić prawdopodobieństwo wystąpienia wysiękowej odmiany tej choroby.

W drugiej części osiągnięcia wykazałem, że właściwości nanomechaniczne komórek czerniaka zależą wyłącznie od ilości endogennej melaniny wewnątrz tych komórek. Ponadto pokazałem, że obecność melaniny w komórkach czerniaka obniża zdolności przerzutowe tych komórek w warunkach *in vivo*. Obserwacja ta może mieć istotne znaczenie dla badań klinicznych, ponieważ wskazuje na to, że pomiar zawartości melaniny w komórkach czerniaka podczas badania histopatologicznego może stanowić potencjalny marker diagnostyczny. Takie badanie byłoby w stanie określić prawdopodobieństwo wystąpienia przerzutu, przyczyniając się do postawienia lepszej diagnozy.

Dodatkowo, w ramach współpracy naukowej z licznymi grupami badawczymi uczestniczyłem w realizacji różnych projektów naukowych, w których wykorzystałem swoją wiedzę i doświadczenie z zakresu biofizyki i nanotechnologii.

Podsumowując, mój dorobek naukowy obejmuje:

- 25 prac doświadczalnych w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym impact factor: 117,925 w tym 3 prace oryginalne wchodzące w skład osiągnięcia naukowego. Łączny impact factor prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi: 13.822;
- 2 prac doświadczalnych opublikowanych w czasopismach, które nie są indeksowane przez bazę JCR;
- *h*-indeks: 12, liczba cytowań: 282 (bez autocytań: 225);
- Wygłoszenie 6 referatów na międzynarodowych konferencjach na zaproszenie organizatorów;
- Współautorstwo 50 posterów prezentowanych na konferencjach naukowych;
- 1 opracowanie dydaktyczne;
- Wypromowanie 3 magistrantów.

Literatura

- Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*. 2012, 75(1): 26-39.
- Bai HX, Mao Y, Shen L, Xu XL, Gao F, Zhang ZB, Li B, Jonas JB. Bruch's membrane thickness in relationship to axial length. *PLoS One*. 2017, 12(8): e0182080.
- Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG, Bergen AA. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2010, 29(1): 1-18.

- Boulton ME. Studying melanin and lipofuscin in RPE cell culture models. *Experimental Eye Research*. 2014, 126: 61-67.
- Burke JM, Skumatz CM, Irving PE, McKay BS. Phenotypic heterogeneity of retinal pigment epithelial cells in vitro and in situ. *Experimental Eye Research*. 1996, 62(1): 63-73.
- Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, Testori A, Larue L, Goding CR. Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes and Development*. 2006, 20(24): 3426-3439.
- Chiarelli-Neto O, Ferreira AS, Martins WK, Pavani C, Severino D, Faião-Flores F, Maria-Engler SS, Aliprandini E, Martinez GR, Di Mascio P, Medeiros MH, Baptista MS. Melanin photosensitization and the effect of visible light on epithelial cells. *PLoS One*. 2014, 9(11): e113266.
- Chiarelli-Neto O, Pavani C, Ferreira AS, Uchoa AF, Severino D, Baptista MS. Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011, 51(6): 1195-1202.
- Cross SE, Jin YS, Rao J, Gimzewski JK. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature Nanotechnology*. 2007, 780-783.
- Dugel PU, Zimmer CN. Imaging of melanin disruption in age-related macular degeneration using multispectral imaging. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging of the Retina*. 2016, 47(2): 134-141.
- Gualandri L, Betti R, Crosti C. Clinical features of 36 cases of amelanotic melanomas and considerations about the relationship between histologic subtypes and diagnostic delay. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2009, 23(3): 283-287.
- Guo S, Hong L, Akhremitchev BB, Simon JD. Surface elastic properties of human retinal pigment epithelium melanosomes. *Photochemistry and Photobiology*. 2008, 84(3): 671-678.
- Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Döbbeling U, Kobert N, Schaerer L, Hemmi S, Dummer R. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Research*. 2008, 68(3): 650-656.
- Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, Sucker A, Ugurel S, Kumar R, Weber BL, Nathanson KL, Phillips DJ, Herlyn M, Schadendorf D, Dummer R. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Research*. 2006, 19(4): 290-302.
- d'Ischia M, Wakamatsu K, Cicoira F, Di Mauro E, Garcia-Borrón JC, Commo S, Galván I, Ghanem G, Kenzo K, Meredith P, Pezzella A, Santato C, Sarna T, Simon JD, Zecca L, Zucca FA, Napolitano A, Ito S. Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 2015, 28(5): 520-544.
- Jeon JR, Le TT, Chang YS. Dihydroxynaphthalene-based mimicry of fungal melanogenesis for multifunctional coatings. *Microbial Biotechnology*. 2016, 9(3): 305-315.

- Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2013, 34: 19-48.
- Korytowski W, Pilas B, Sarna T, Kalyanaraman B. Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. *Photochemistry and Photobiology*. 1987, 45(2): 185-190.
- Last JA, Liliensiek SJ, Nealey PF, Murphya CJ. Determining the mechanical properties of human corneal basement membranes with Atomic Force Microscopy. *Structural Biology*. 2009, 167(1): 19-24.
- Lazova R, Pawelek JM. Why do melanomas get so dark? *Experimental Dermatology*. 2009, 180: 934-938.
- Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007, 445: 843-850.
- Liu Y, Hong L, Wakamatsu K, Ito S, Adhyaru B, Cheng CY, Bowers CR, Simon JD. Comparison of structural and chemical properties of black and red human hair melanosomes. *Photochemistry and Photobiology*. 2005, 81(1): 135-144.
- Makale, M. Cellular mechanobiology and cancer metastasis. *Birth Defects Research. C Embryology Today*. 2007, 81: 329-343.
- Meredith P, Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment Cell Research*. 2006, 19(6): 572-594.
- Mishra RR, Kneitz S, Schartl M. Comparative analysis of melanoma deregulated miRNAs in the medaka and Xiphophorus pigment cell cancer models. *Comparative Biochemistry and Physiology. C Toxicology and Pharmacology*. 2014, 163: 64-76.
- Pinner S, Jordan P, Sharrock K, Bazley L, Collinson L, Marais R, Bonvin E, Goding C, Sahai E. Intravital imaging reveals transient changes in pigment production and Brn2 expression during metastatic melanoma dissemination. *Cancer Research*. 2009, 69(20): 7969-7977.
- Raposo G, Marks MS. Melanosomes – dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007, 8: 786-797.
- Richbourg NR, Peppas NA, Sikavitsas VI. Tuning the Biomimetic Behavior of Scaffolds for Regenerative Medicine Through Surface Modifications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2019, doi: 10.1002/term.2859.
- van Rij AM, Jones GT, Hill BG, Amer M, Thomson IA, Pettigrew RA, Packer SG. Mechanical inhibition of angiogenesis at the saphenofemoral junction in the surgical treatment of varicose veins: early results of a blinded randomized controlled trial. *Circulation*. 2008, 118(1): 66-74.
- Rioux, B., Rouanet, J., Akil, H., Besse, S., Debiton, E., Bouchon, B., ... Quintana, M. (2019). Determination of eumelanin and pheomelanin in melanomas using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) analysis. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1113, 60-68.

- Rózanowski B, Burke J, Sarna T, Rózanowska M. The pro-oxidant effects of interactions of ascorbate with photoexcited melanin fade away with aging of the retina. *Photochemistry and Photobiology*. 2008, 84(3): 658-670.
- Sarna T. Properties and function of the ocular melanin - a photobiophysical view. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 1992, 12(3): 215-258.
- Sarna T, Sealy RC. Photoinduced oxygen consumption in melanin systems. Action spectra and quantum yields for eumelanin and synthetic melanin. *Photochemistry and Photobiology*. 1984, 39(1): 69-74.
- Seagle BL, Rezai KA, Kobori Y, Gasyna EM, Rezaei KA, Norris JR. Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 2005, 102(25): 8978-8983.
- Sherwood DR. Cell invasion through basement membranes: an anchor of understanding. *Trends in Cell Biology*. 2006, 16: 250-256.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*. 2004, 84: 1155-1228.
- Slominski A, Zmijewski MA, Pawelek J. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 2012, 25: 14-27.
- Slominski RM, Zmijewski MA, Slominski AT. The role of melanin pigment in melanoma. *Experimental Dermatology*, 24: 258-259.
- Steuer H, Jaworski A, Elger B, Kausmann M, Keldenich J, Schneider H, Stoll D, Schlosshauer B. Functional characterization and comparison of the outer blood-retina barrier and the blood-brainbarrier. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2005, 46(3): 1047-1053.
- Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Review*. 2005, 85: 845-881.
- Tissot FS, Boulter E, Estrach S, Féral CC. The body's tailored suit: Skin as a mechanical interface. *European Journal of Cell Biology*. 2016, 95(11): 475-482.
- Thomas NE, Kriker A, Waxweiler WT, Dillon PM, Busman KJ, From L, ... Berwick M, Genes, Environment, and Melanoma (GEM) Study Group. Comparison of clinicopathologic features and survival of histopathologically amelanotic and pigmented melanomas: A population-based study. *JAMA Dermatology*. 2014, 150: 1306-1314.
- Watanabe T, Kuramochi H, Takahashi A, Imai K, Katsuta N, Nakayama T, Fujiki H, Suganuma M. Higher cell stiffness indicating lower metastatic potential in B16 melanoma cell variants and in (-)-epigallocatechin gallate-treated cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2012, 138(5): 859-66.

Zhou Z, Zheng C, Li S, Zhou X, Liu Z, He Q, Zhang N, Ngan A, Tang B, Wang A. AFM nanoindentation detection of the elastic modulus of tongue squamous carcinoma cells with different metastatic potentials. *Nanomedicine*. 2013, 9(7): 864-874.

van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research*. 2011, 728: 23-34.

Zhang X, Lai TY. Baseline Predictors of Visual Acuity Outcome in Patients with Wet Age-Related Macular Degeneration. *Biomed Research International*. 2018, 2018:9640131.

A handwritten signature in blue ink that reads "Michał Sarna". The signature is written in a cursive, flowing style.