

# MODELOWE BADANIA EPR WPŁYWU STĘŻENIA LEKU NA WŁAŚCIWOŚCI CENTRÓW PARAMAGNETYCZNYCH W KOMPLEKSACH BIOPOLIMERU MELANINOWEGO Z NETILMICYNĄ

BARBARA PILAWA<sup>1\*</sup>, MAGDALENA ZDYBEL<sup>1</sup>, EWA BUSZMAN<sup>2</sup>,  
DOROTA WRZEŚNIOK<sup>2</sup>, JOANNA MROCHEN<sup>1</sup>

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, WYDZIAŁ  
FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ,

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI,

UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

<sup>2</sup>KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII I ANALIZY LEKÓW,

UL. JAGIELLOŃSKA 4, 41-200 SOSNOWIEC

\* E-MAIL: BPILAWA@SUM.EDU.PL

Melanina jest ciemnym pigmentem powszechnie występującym w organizmach roślinnych i zwierzęcych. U człowieka występuje w skórze, włosach, oczach, uchu wewnętrznym, ośrodkowym układzie nerwowym [1,2]. W organizmach żywych występuje głównie wybrana do badań eumelanina (RYS. 1). Jest to grupa melanin o zabarwieniu brązowo-czarnym [1,2]. Kolejną grupę stanowią feomelaniny o barwie czerwono-brązowej, które zawierają siarkę oraz alomelaniny [1,2].

Melanina to biopolimer wykazujący wysokie powinowactwo do jonów metali oraz substancji leczniczych [1-4]. Długotrwała ekspozycja lub wysokodawkowa terapia substancjami leczniczymi może prowadzić do nadmiernej kumulacji tych substancji w melaninie, a w konsekwencji do degradacji upigmentowanych tkanek [3,4].

Celem niniejszej pracy jest określenie wpływu stężenia leku na koncentrację i właściwości centrów paramagnetycznych występujących w kompleksach DOPA-melaniny – eumelaniny z przykładowym antybiotykem – netilmicyną.

Widma EPR kompleksów DOPA-melanina-netilmicyna mierzono z wykorzystaniem spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X (9.3GHz) w temperaturze pokojowej w szerokim zakresie mocy mikrofalowej wynoszącym 0.7-70mW. Zastosowano następujące stężenia netilmicyny w analizowanych kompleksach:  $1 \times 10^{-4} M$ ,  $5 \times 10^{-4} M$ ,  $1 \times 10^{-3} M$ ,  $5 \times 10^{-3} M$  oraz  $1 \times 10^{-2} M$ . Wyznaczono koncentrację centrów paramagnetycznych, współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$ , amplitudę i szerokość linii EPR. Zbadano wpływ mocy mikrofalowej na nasycenie mikrofalowe widm EPR kompleksów melaninowych.

Wszystkie badane kompleksy melaninowe charakteryzuje wysoka koncentracja centrów paramagnetycznych z zakresu  $1.6-2.2 \times 10^{19}$  spin/g. Koncentracja centrów paramagnetycznych w kompleksach DOPA-melanina-netilmicyna zależy od stężenia leku. Najmniejsza wartość koncentracji centrów paramagnetycznych otrzymano w przypadku kompleksów o stężeniu netilmicyny  $5 \times 10^{-4} M$ .

# MODEL EPR STUDIES OF INFLUENCE OF DRUG CONCENTRATION ON PROPERTIES OF PARAMAGNETIC CENTRES IN COMPLEXES OF MELANIN BIOPOLYMER WITH NETILMICIN

BARBARA PILAWA<sup>1\*</sup>, MAGDALENA ZDYBEL<sup>1</sup>, EWA BUSZMAN<sup>2</sup>,  
DOROTA WRZEŚNIOK<sup>2</sup>, JOANNA MROCHEN<sup>1</sup>

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,  
SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND,

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY,

4 JAGIELLOŃSKA STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

\* E-MAIL: BPILAWA@SUM.EDU.PL

Melanin is a pigment in the plants or animals. In humans, melanin biopolymer is found in skin, hair, the iris, inner ear and nervous system [1,2].

The most common form of biological melanin is eumelanin (FIG. 1). It is a brown-black polymer. Another common form of melanin is pheomelanin. It is a red-brown polymer [1,2].

Melanin can bind medical drugs and metal ions [1-4]. Interactions of high doses of drugs with melanins may be responsible for many toxic effects in pigmented tissues, e.g. toxic retinopathy, hyperpigmentation of the skin, hair bleaching and some ocular and inner ear lesions [3,4].

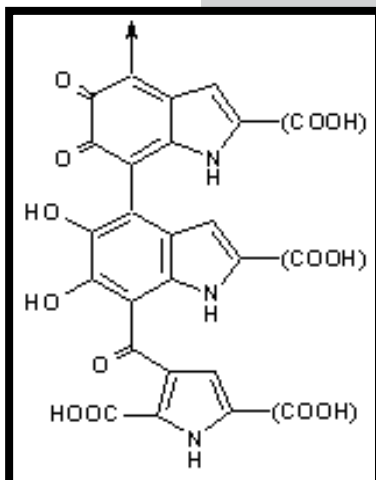
The aim of this work was to determine influence of drug concentration on the amount and properties of paramagnetic centres existing in complexes of DOPA-melanin – eumelanin with exemplary antibiotic – netilmicin.

EPR spectra of DOPA-melanin-netilmicin complexes were measured by the use of an X-band (9.3GHz) electron paramagnetic resonance spectrometer at room temperature in the wide range of microwave power (0.7-70mW). The following concentrations of netilmicin in the analyzed complexes were applied:  $1 \times 10^{-4} M$ ,  $5 \times 10^{-4} M$ ,  $1 \times 10^{-3} M$ ,  $5 \times 10^{-3} M$  and  $1 \times 10^{-2} M$ . Paramagnetic centres concentration,  $g$ -factor, amplitude and linewidth of EPR spectra were evaluated. We determined the effect of continuous microwave saturation on melanins EPR spectra.

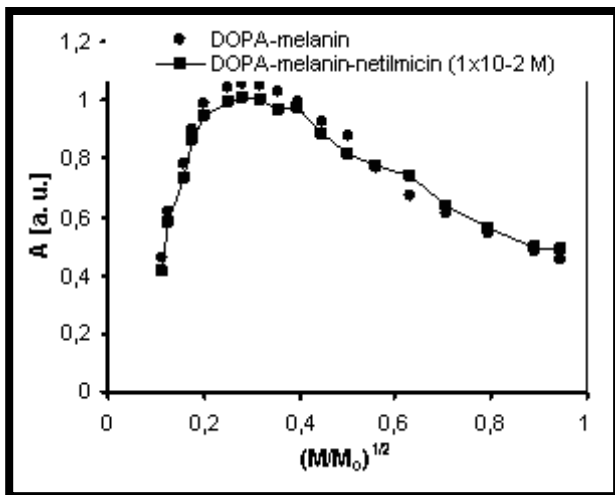
All the studied melanins complexes characterized high paramagnetic centres concentrations  $1.6-2.2 \times 10^{19}$  spin/g. The concentrations of paramagnetic centres in DOPA-melanin-netilmicin complexes depend on drug concentration. The lowest paramagnetic centres concentration was obtained for complexes with netilmicin concentration of  $5 \times 10^{-4} M$ .

The measured EPR spectra were broad asymmetrical lines with linewidths in the range 0.45-0.48mT.  $g$ -Factor of 2.0043 characteristic for o-semiquinone free radicals was obtained for the samples.

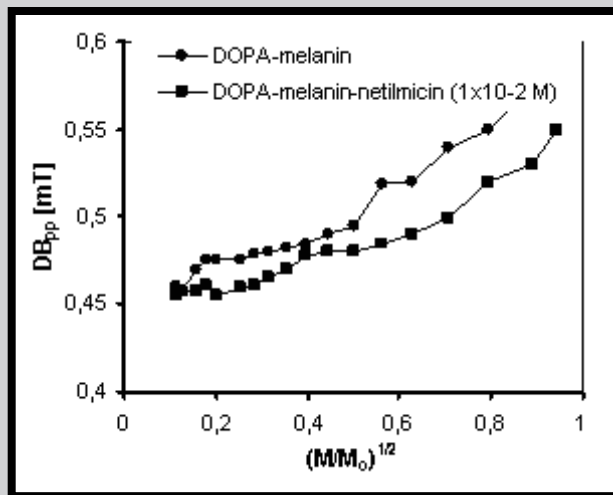
Changes of amplitude and linewidths of EPR lines of DOPA-melanin and the exemplary DOPA-melanin-netilmicin complex with increasing of



RYS. 1. Struktura chemiczna eumelaniny [2].  
FIG. 1. Chemical structure of eumelanin [2].



**RYS. 2.** Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) linii EPR DOPA-melaniny oraz jej kompleksu z netilmiciną. Stężenie czynnika kompleksującego wynosiło  $1 \times 10^{-2} M$ .  $M_o$  – całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klystron. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.  
**FIG. 2.** Influence of microwave power on amplitudes (A) of free radicals EPR spectra of DOPA-melanin and DOPA-melanin complex with netilmicin. Concentration of complexing agent was  $1 \times 10^{-2} M$ .  $M_o$  – total microwave power produced by klystron. M – microwave power used during the measurement.



**RYS. 3.** Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR DOPA-melaniny oraz jej kompleksu z netilmiciną. Stężenie czynnika kompleksującego wynosiło  $1 \times 10^{-2} M$ .  $M_o$  – całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klystron. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.  
**FIG. 3.** Influence of microwave power on line-widths ( $\Delta B_{pp}$ ) of free radicals EPR spectra of DOPA-melanin and DOPA-melanin complex with netilmicin. Concentration of complexing agent was  $1 \times 10^{-2} M$ .  $M_o$  – total microwave power produced by klystron. M – microwave power used during the measurement.

Rejestrowane widma EPR stanowiły szerokie asymetryczne linie o wartościach szerokości sygnału z zakresu 0.45-0.48 mT. Dla wszystkich próbek otrzymano wartość współczynnika  $g=2.0043$  charakterystyczną dla o-semichinonowych wolnych rodników.

Zmiany amplitudy i szerokości linii EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej dla DOPA-melaniny oraz przykładowego kompleksu DOPA-melanina-netilmicina pokazano odpowiednio na RYSUNKACH 2 i 3. Stwierdzono spadek amplitudy dla wyższych mocy mikrofalowych (RYS. 2). Szerokość linii EPR rośnie wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej (RYS. 3). Korelacje przedstawione na RYSUNKACH 2 i 3 wskazują na jednorodne poszerzenie linii EPR [4-6]. Podobne korelacje otrzymano dla wszystkich badanych kompleksów.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 65-66]

microwave power are compared in FIGURES 2 and 3, respectively. Decrease of amplitudes for the higher microwave powers were observed (FIG. 2). Linewidths increase with increasing of microwave power (FIG. 3). Correlations presented in FIGURES 2 and 3 indicate that the EPR spectra are homogeneously broadened [4-6]. Similar correlations were obtained for all the examined complexes.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 65-66]

## Piśmiennictwo

- [1] Sarna T. Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin. Zagad Biof Współ 1981; 6: 201-219.
- [2] Wakamatsu K, Ito S. Advanced chemical methods in melanin determination. Pigment Cell Res 2002; 15: 174-183.
- [3] Pilawa B, Buszman E, Wrześniok D, Latocha M, Wilczok T. Application of EPR spectroscopy to examination of gentamicin and kanamycin binding to DOPA-melanin. Appl Magn Reson 2002; 23: 181-192.

## References

- [4] Buszman E, Pilawa B, Zdybel M, Wrześniok D, Grzegorzczak A, Wilczok T. EPR examination of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  effect on free radicals in DOPA-melanin-netilmicin complexes. Chem Phys Letters 2005; 403: 22-28.
- [5] Wertz JE, Bolton JR. Electron spin resonance. Elementary theory and practical applications. New York: Academic Press; 1986.
- [6] Stankowski J, Hilczer W. Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych. Warszawa: PWN; 2005.