

Oddziaływanie nikotyny z melaniną

Nicotine–melanin interaction

Marcin Delijewski, Ewa Buszman, Dorota Wrześniok

STRESZCZENIE

WSTĘP

Dostępna literatura sugeruje, że nikotyna może kumulować się w ludzkich tkankach zawierających melaninę, co powoduje zwiększenie biosyntezy tego barwnika. Dotychczasowe badania nad oddziaływaniem nikotyny z melaniną nie wyjaśniają wpływu wiązania na metabolizm i dystrybucję nikotyny, poziom uzależnienia, zdolność do zaprzestania palenia czy zwiększenie ewentualnych działań niepożądanych nikotyny. Rola tych oddziaływań może mieć duże znaczenie w przypadku osób o wysokim stopniu pigmentacji skóry. Odpowiedzi wymagają pytania dotyczące charakteru wiązań między nikotyną a melaniną oraz zmian, jakie nikotyna może wywierać w komórkach, tkankach i narządach ludzkiego ciała, w których występuje melanina. Celem badań była ocena zdolności nikotyny do wiązania się z melaniną syntetyczną, a także ocena kinetyki wiązania i trwałości powstałych kompleksów.

MATERIAŁ I METODY

Kompleksy nikotyna–melanina oceniano metodą Scatcharda. Ilość nikotyny związanej z melaniną wyznaczono techniką spektrofotometrii UV-VIS.

WYNIKI

Wykazano, że nikotyna tworzy kompleksy z melaniną. Ilość nikotyny związanej z melaniną wzrasta wraz ze wzrostem stężenia początkowego oraz z wydłużeniem czasu inkubacji. Dla badanych kompleksów stwierdzono występowanie dwóch klas niezależnych miejsc wiążących o wartościach stałych trwałości $K_1 = 2,44 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ oraz $K_2 = 7,72 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują na możliwą rolę melaniny w działaniach niepożądanych nikotyny oraz w problematyce zaprzestania palenia u osób o wysokim stopniu pigmentacji.

SŁOWA KLUCZOWE

nikotyna, melanina, kompleksy nikotyna-melanina

Katedra i Zakład Chemii i Analizy Leków
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Prof. dr hab. n. farm. inż. Ewa Buszman
Katedra i Zakład Chemii i Analizy Leków
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Jagiellońska 4
41-200 Sosnowiec
tel. +48 32 364 16 11
e-mail: ebuszman@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2013, 67, 6, 361–366
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
eISSN 1734-025X
www.annales.sum.edu.pl

ABSTRACT

BACKGROUND

The available literature suggests that nicotine may accumulate in human tissues containing melanin, which increases the biosynthesis of this pigment. Studies conducted on the interaction between nicotine and melanin do not explain the impact of this binding on the metabolism and distribution of nicotine, level of dependence, effectiveness of smoking cessation therapies and potential adverse effects of nicotine. The role of these interactions may be important for people with a high degree of skin pigmentation. It is necessary to answer questions concerning the nature of nicotine–melanin interaction as well as the effect of nicotine on human cells, tissues and organs containing melanin pigment. The aim of this study was to examine the ability of nicotine to bind to synthetic melanin and to evaluate the kinetics and the nature of these interactions.

MATERIAL AND METHODS

Nicotine–melanin complexes were analyzed by use of the Scatchard method. The amounts of nicotine bound to melanin were determined spectrophotometrically.

RESULTS

It has been demonstrated that nicotine forms complexes with melanin. The amounts of nicotine bound to melanin increase with rising initial concentrations and prolongation of incubation time. For the studied complexes, two classes of independent binding sites with association constants $K_1 = 2.44 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $K_2 = 7.72 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ have been found.

CONCLUSIONS

The obtained results indicate the possible role of melanin in side effects of nicotine and in smoking cessation therapies effectiveness among people with high levels of pigmentation.

KEY WORDS

nicotine, melanin, nicotine-melanin complexes

WSTĘP

Nikotyna jest związkiem z grupy alkaloidów pirydynowych syntetyzowanym w korzeniach roślin tytoniu (*Nicotiana*) z rodziny *Solanaceae*. W swojej strukturze ma pierścienie pirydynowy i N-metylopirolidynowy. Charakteryzuje się działaniem ganglioplegicznym, działa na receptory N-cholinergiczne [1]. Największe znaczenie mają jednak jej zdolności uzależniające, co przejawia się powszechnie w postaci wysokiego odsetka osób palących papierosy, wynoszącego w Stanach Zjednoczonych ok. 31% mężczyzn i 23% kobiet [2,3].

Melaniny są naturalnymi barwnikami występującymi w skórze człowieka, a także w innych narządach i strukturach, takich jak: oko, włosy, ucho wewnętrzne, mózg, serce, płuca, wątroba i limfocyty. Są biopolimerami syntetyzowanymi w wyspecjalizowanych komórkach, zwanych melanocytami. Mają funkcję pigmentacyjną, ochraniają komórki przed szkodliwym wpływem promieniowania UV i wolnych rodników. Mogą wiązać wiele substancji, co ma znaczenie ochronne i detoksykacyjne, ale może też prowadzić do szkodliwej kumulacji leków i związków chemicznych

wskutek wydłużenia czasu ekspozycji organizmu na te związki [4].

Absorpcja leków mających powinowactwo do melaniny może wywoływać zmiany i uszkodzenia w zawierających ją narządach. Ponadto zmiany w strukturze samej melaniny mogą być powodowane przez leki mające do niej powinowactwo [5].

Nikotyna wykorzystywana jest jako lek w nikotynowej terapii zastępczej, stosowanej w celu zaprzestania palenia papierosów. Jej działania niepożądane w tej terapii, skorelowane z oddziaływaniami nikotyny z melaniną, nie zostały jeszcze wyjaśnione. Prowadzi się badania nad wykorzystaniem nikotyny w leczeniu m.in. chorób neurodegeneracyjnych. W przypadku choroby Parkinsona wykorzystuje się wpływ nikotyny na porażenie receptorów cholinergicznych i przekątnictwo dopaminergiczne, natomiast w chorobie Alzheimera, dodatkowe znaczenie ma wpływ nikotyny na czynnik wzrostu nerwów [6]. Oceniana jest również możliwość leczenia bólu przez aktywację nikotynowych receptorów cholinergicznych. Działanie przeciwbólowe agonistów receptora nikotynowego występuje zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u człowieka. Dotyczy ono bólu zapalnego i neuropatycznego oraz bodźców cieplnych, chemicznych i mechanicznych. Na drodze do wykorzystania nikotyny jako leku

przeciwbólowego stoją jednak profil bezpieczeństwa i jej wąski indeks terapeutyczny oraz krótkotrwały efekt działania. Mimo to nikotyna mogłaby być stosowana jako lek wspomagający leczenie bólu, pozwalający obniżyć dawkę opioidowych leków przeciwbólowych, tym bardziej że wykazano synergizm w działaniu tych leków [7]. Stwierdzono jednak, że nie przekłada się to na zmniejszenie odczuwania bólu przez osoby palące, a przeciwnie, wymagają one większych dawek opioidów niż osoby niepalące, co prawdopodobnie ma związek z przyspieszonym metabolizmem tych leków spowodowanym indukcją enzymatyczną przez składniki dymu tytoniowego [8]. Nadal prowadzone są badania mające na celu skonstruowanie nowocześniejszych leków zawierających nikotynę.

Właściwości uzależniające oraz toksyczne nikotyny, a dodatkowo wpływ jej niezmetylowanej postaci na biotransformację niektórych leków, mają szczególne znaczenie w odniesieniu do organizmu człowieka, w którym nikotyna może być kumulowana w postaci połączeń z melaniną [4,9].

Stwierdzono, że osoby ciemnoskóre szybciej uzależniają się od palenia papierosów i trudniej jest im zerwać z nałogiem. Ponadto absorpcja nikotyny jest w ich organizmie większa niż u ludności białej. Zjawiska te mogą mieć związek z oddziaływaniami nikotyny z melaniną [4,10,11,12].

Z danych literaturowych wynika, że stężenie nikotyny w niektórych narządach ma związek z pigmentacją, a jej odkładanie się np. we włosach odbywa się zarówno podczas ich rozwoju, jak i po tym okresie. Podczas biosyntezy w warunkach laboratoryjnych, w których melanina powstaje z tyrozyny pod wpływem enzymu tyrozynazy (oksydazy tyrozynowej), w obecności nikotyny dochodzi do inkorporacji nikotyny do melaniny [13].

Celem pracy była ocena zdolności wiązania nikotyny z melaniną syntetyczną oraz ocena kinetyki wiązania i trwałości powstałych kompleksów.

MATERIAŁ I METODY

Otrzymywanie syntetycznej DOPA-melaniny

Melaninę syntetyczną otrzymano w wyniku reakcji oksydacyjnej polimeryzacji 3,4-dihydroksyfenylo-L-alaniny (L-DOPA, prod. Sigma-Aldrich) w 0,067 M buforze fosforanowym o pH = 8,0 [14,15].

Otrzymywanie kompleksów nikotyna–melanina

Do badań zdolności wiązania nikotyny z melaniną zastosowano nikotynę firmy Sigma-Aldrich. Kompleksy melaniny z nikotyną otrzymywano w następujący sposób: do próbek z próbkami melaniny o masie 5 mg dodawano po 5 cm³ wodnego roztworu nikotyny o stężeniu od 1 × 10⁻⁴ M do 5 × 10⁻³ M. Mieszankę inkubowano w temperaturze 22°C, następnie

sączono, a supernatanty pozostawiono do dalszej analizy.

Metoda oznaczania ilości nikotyny związanej z melaniną

Ilość nikotyny związanej z melaniną oznaczano metodą spektrofotometryczną przez pomiar absorbancji roztworów wzorcowych o znanym stężeniu leku i supernatantów otrzymanych po kompleksowaniu. Równocześnie z próbkami badanymi zawierającymi kompleks nikotyna–melanina przygotowano próbki kontrolne, niezawierające nikotyny, stanowiące próby odniesienia w analizie spektrofotometrycznej. Nikotynę oznaczano przy długości fali λ_{max} 260 nm przy użyciu spektrofotometru UV-VIS firmy JASCO model V-630. Ilość związanej nikotyny (w μmol/mg melaniny), wyznaczono jako różnicę między ilością leku wprowadzonego do kompleksowania i ilością leku niezwiązanego – w supernatancie po kompleksowaniu.

Ocena kinetyki tworzenia kompleksów nikotyna–melanina

Kinetykę tworzenia kompleksów nikotyny z syntetyczną melaniną oceniono na podstawie zależności ilości leku związanego z melaniną od czasu kompleksowania (1, 3, 6, 12, 24 i 48 godzin) oraz wyjściowego stężenia dodanego leku (od 1 × 10⁻⁴ M do 5 × 10⁻³ M).

Wyznaczenie parametrów wiązania nikotyny do melaniny

Analiza wiązania nikotyny do melaniny została przeprowadzona metodą Scatcharda, przystosowaną przez Kalbitzera i Stehlika [16], przy uwzględnieniu ilości związanego leku po ustaleniu się stanu równowagi, czyli po 24 godzinach kompleksowania. Sporządzono izotermy wiązania oraz wykresy Scatcharda, z których wyznaczono wartości stałych trwałości kompleksów (K) i liczby miejsc wiążących (n).

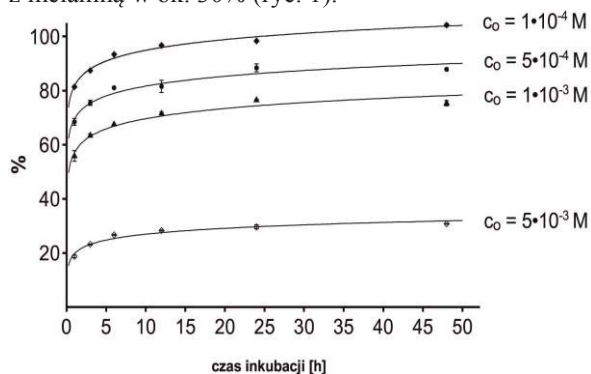
Analiza statystyczna

Dla każdego układu badawczego we wszystkich eksperymentach wykonano po trzy równoległe próby i obliczono wartości średnie oraz odchylenia standardowe (SD, *standard deviation*).

WYNIKI

Dla oceny kinetyki tworzenia kompleksów nikotyny z melaniną syntetyczną sporządzono wykresy zależności ilości leku związanego z melaniną (w %) od czasu kompleksowania i wyjściowych stężeń (c₀) nikotyny (ryc. 1). Stwierdzono, że ilość nikotyny związanej z melaniną wzrasta w początkowym okresie inkubacji

i po około 24 godzinach osiąga stan równowagi kompleksowania. Można zaobserwować, że ze wzrostem stężenia początkowego dodawanego leku maleje procent jego związania z melaniną. Analiza otrzymanych zależności dla czterech różnych stężeń pozwala stwierdzić, że dla najniższego stężenia wynoszącego 1×10^{-4} M z melaniną wiąże się prawie cała ilość wprowadzonej nikotyny (ok. 98%). Dla stężeń 5×10^{-4} M i 1×10^{-3} M wartości te wynoszą odpowiednio ok. 85% i 75%. W przypadku najwyższego z badanych stężeń (5×10^{-3} M) nikotyna wiąże się z melaniną w ok. 30% (ryc. 1).



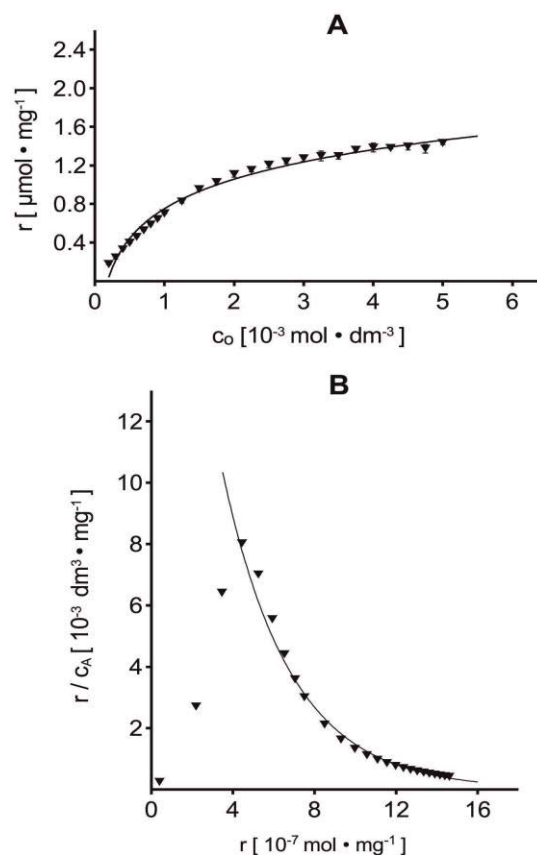
Ryc. 1. Zależność ilości nikotyny związanej z melaniną (w %) od czasu kompleksowania i stężenia wyjściowego leku (c_0).
Fig. 1. Effect of incubation time and initial nicotine concentration (c_0) on the amount of nicotine bound to melanin (in %).

W celu wyznaczenia parametrów wiązania nikotyny do syntetycznej DOPA-melaniny sporządzono izotermę wiązania (ryc. 2A) i wykres Scatcharda (ryc. 2B). W badaniach zastosowano stałe ilości melaniny, do której dodawano roztwory nikotyny o stężeniach od 1×10^{-4} M do 5×10^{-3} M. Czas kompleksowania wynosił 24 godziny.

Sporządzona na podstawie danych eksperymentalnych izoterma wiązania ilustruje zależność ilości nikotyny związanej z melaniną (r) od stężenia początkowego dodanego leku (c_0) (ryc. 2A). Izoterma wiązania wskazuje, że ilość nikotyny związanej z melaniną rośnie wraz ze wzrostem stężenia początkowego.

Wykres Scatcharda, wyrażający zależność stosunku ilości nikotyny związanej z melaniną do stężenia nikotyny niezwiązanej (r/c_A) w funkcji ilości nikotyny związanej z melaniną (r) (ryc. 2B), ma postać krzywej typu hiperboli, co wskazuje, że w tworzeniu kompleksu nikotyna–melanina uczestniczą co najmniej dwie klasy niezależnych miejsc wiążących. Punkty doświadczalne uzyskane dla wartości ilości leku związanego z melaniną $r < 0,5 \mu\text{mol}/\text{mg}$ mogą świadczyć o przewadze oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy cząsteczką leku naładowaną dodatnio a anionowymi grupami polimeru w stosunku do innych typów interakcji, np. oddziaływań cząsteczkowych typu van der Waalsa. Podobne wyniki uzyskano dla kompleksów sulfonamidów z melaniną [17].

Wyznaczone parametry wiązania dla kompleksu nikotyna–melanina, czyli wartości stałych trwałości kompleksu (K_1 i K_2) oraz liczby miejsc silnie (n_1) i słabo (n_2) wiążących wynoszą:



Ryc. 2. Izoterma wiązania (A) i wykres Scatcharda (B) dla kompleksów nikotyna–melanina; r – ilość leku związanego z melaniną; c_0 – stężenie początkowe leku, c_A – stężenie leku niezwiązanego.
Fig. 2. Binding isotherm (A) and Scatchard plot (B) for nicotine–melanin complexes; r – amount of drug bound to melanin; c_0 – initial drug concentration, c_A – concentration of unbound drug.

$$K_1 = 2,44 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \quad n_1 = 0,712 \mu\text{mol nikotyny}/\text{mg melaniny},$$

$$K_2 = 7,72 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \quad n_2 = 1,036 \mu\text{mol nikotyny}/\text{mg melaniny}.$$

Porównując uzyskane wartości z parametrami wiązania kompleksów różnych wcześniej badanych leków z melaniną można stwierdzić, że nikotyna wiąże się z melaniną prawie w 2-krotnie większej ilości w stosunku do leków, których powinowactwo do melaniny określane jest jako wysokie, np. chlorochina – ok. $0,9 \mu\text{mol}$ leku/mg melaniny [18] czy ciprofloksacyna – ok. $1,2 \mu\text{mol}$ leku/mg melaniny [19]. Równocześnie wartości stałych trwałości kompleksu K_1 i K_2 wskazują na niezbyt silne wiązanie nikotyny do melaniny.

DYSKUSJA

W ostatnich latach coraz większy nacisk kładzie się na poznanie właściwości i funkcji biologicznych biopolimerów melaninowych. Dostępne piśmiennictwo szeroko omawia rolę pigmentów w wielu organizmach żywych, jednakże ich znaczenie nie jest do końca poznane. Melaniny, będące końcowym produktem złożonych przemian zachodzących w komórkach

barwnikowych, wyróżniają się wśród innych dobrze poznanych biopolimerów, takich jak białka czy kwasy nukleinowe, oryginalnymi właściwościami i budową. Są to ujemnie naładowane pigmenty o ciemnym zabarwieniu, nieregularnej, trójwymiarowej strukturze amorficznej, nierozpuszczalne w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych, odporne na działanie stężonych kwasów oraz wrażliwe na wybielanie przez substancje utleniające. Biopolimery melaninowe zbudowane są z podjednostek indolowych połączonych wiązaniami kowalencyjnymi typu węgiel–węgiel, ale mogą też zawierać w swojej strukturze zmienną ilość różnych produktów pośrednich melanogenezy, co sprawia, że są bardzo niejednorodnymi biomolekułami [20,21,22,23,24].

Melaniny wykazują specyficzne właściwości, z których wynika również ich szczególna zdolność do wiązania wielu substancji chemicznych. Wpływa na to obecność stabilnej populacji organicznych wolnych rodników orto-semichinonowych [25], a także grup utleniających lub redukujących, np. o-chinonów i hydrochinonów [26]. Ponadto w procesie melanogenezy do syntetyzowanego polimeru mogą zostać wbudowane – poprzez wiązania kowalencyjne, jonowe czy oddziaływania van der Waalsa – liczne cząsteczki o różnorodnej budowie chemicznej, szczególnie posiadające 1–3 pierścieni aromatycznych [5].

Interesująca wydaje się zdolność melanin do oddziaływania z wieloma substancjami leczniczymi. Interakcje te mogą mieć zarówno korzystne, jak i niekorzystne skutki dla organizmu. Zdolność tych biopolimerów do wiązania potencjalnie niebezpiecznych związków chroni komórki przed ekspozycją na zbyt wysokie stężenia szkodliwych substancji przez kumulację, a następnie stopniową eliminację ksenobiotyków w nietoksycznych stężeniach. Jednak długotrwała terapia substancjami leczniczymi, charakteryzującymi się wysokim powinowactwem do melaniny, może doprowadzić do degeneracji komórek upigmentowanych. Uważa się, że proces polekowych uszkodzeń tkanek i narządów bogatych w biopolimery melaninowe ma miejsce, gdy wyczerpują się zdolności detoksykacyjne melanin [5,27].

Wcześniejsze badania wykazały, że melaniny wykazują zdolność wiązania wielu substancji leczniczych, w tym antybiotyków aminoglikozydowych [14,15,28], fluorochinolonów [19], leków przeciwnowotworowych [29, 30] oraz psychotropowych [31].

Badania modelowe wykazały, że nikotyna wiąże się z melaniną. W powstałych kompleksach występują oddziaływania charakteryzujące się wartościami stałych trwałości wynoszącymi: $K_1 = 2,44 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ oraz $K_2 = 7,72 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. Całkowita liczba miejsc wiązających wynosi ok. 1,75 μmol nikotyny/mg melaniny.

Niepożądane efekty palenia papierosów, ujawniające się m.in. w postaci ciemnych plam w jamie ustnej palaczy i osób narażonych na bierne palenie tytoniu, w tym u dzieci [32], mogą wynikać z nasilenia biosyntezy melaniny pod wpływem nikotyny. Przebarwienia te związane są prawdopodobnie z melanizacją nabłon-

ka wskutek działania nikotyny w postaci dymu tytoniowego [33].

Procesy generowania przebarwień skóry pod wpływem nikotyny zostały dokładnie przebadane i opisane dla modelu płazów. Zdefiniowano zjawisko zwane dyspersją melaninową, polegające na szybkim transporcie melanosomów z regionu jądra melanocytu w kierunku dendrytów, którego konsekwencją jest wystąpienie przebarwień skóry. Odbarwienie skóry jest natomiast wynikiem ruchu cząstek melaniny z powrotem w region jądrowy. Zatem zjawisko dyspersji melaninowej przejawia się jako zmiana koloru skóry – od przebarwienia do odbarwienia. Podejrzewa się, że nikotyna stymuluje etap dyspersji melanosomów do dendrytów, co może charakteryzować się nasileniem zmian w upigmentowaniu skóry [34].

Biorąc pod uwagę możliwość wystąpienia zjawiska dyspersji melaninowej również u palaczy, a więc u osób narażonych bezpośrednio na działanie nikotyny, można przypuszczać, że występowanie przebarwień skóry może być m.in. związane z dyspersją melanosomów wypełnionych melaniną do dendrytów. Wykazano, że melanocyty u palaczy zawierały melanosomy znajdujące się w III lub IV stadium rozwoju, w całości wypełnione melaniną, natomiast u osób niepalących przeważały melanosomy w II stadium [33]. Nasilona pigmentacja u palaczy może być ponadto związana z liczbą keratynocytów zawierających melaninę i dystrybucją melanosomów w obrębie keratynocytów.

Nikotyna może także aktywować melanocyty w sposób pośredni, przez β -adrenergiczne działanie epinefryny, której uwalnianie m.in. z rdzenia nadnerczy zwiększa się podczas palenia papierosów, powodując podwyższenie poziomu cyklicznego adenosynomonofosforanu (cAMP), który jest istotnym czynnikiem wpływającym na proces biosyntezy melaniny. U ludzi palących papierosy zawierające nikotynę zaobserwowano wyższy poziom cAMP w osoczu i w moczu, czego nie stwierdzono u palących papierosy beznikotynowe [34].

Badania przedstawione w niniejszej pracy pozwalają wysunąć hipotezę, że oddziaływanie nikotyny z melaniną może wpływać na powstawanie przebarwień u palaczy. Oprócz zmian w samych melanocytach, istotne znaczenie może mieć kumulowanie się nikotyny w tkankach bogatych w melaninę, co może wpływać na stopień uzależnienia, ilość nikotyny ulegającej absorpcji po wypaleniu papierosa oraz na efektywność leczenia z nałogu za pomocą nikotynowej terapii zastępczej [4].

WNIOSKI

1. Nikotyna tworzy kompleksy z syntetyczną melaniną. Ilość nikotyny związanej z melaniną zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia początkowego danego leku.

2. W tworzeniu kompleksów nikoty-na-melanina uczestniczą co najmniej dwie klasy niezależnych miejsc wiążących o wartościach stałych trwałości $K_1 = 2,44 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ oraz $K_2 = 7,72 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.
3. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność uwzględnienia roli melaniny w działaniach niepożądanych nikotyiny oraz w ocenie skuteczności nikotynowej terapii zastępczej u osób o wysokiej zawartości barwnika.

Badania finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny (umowa nr KNW-1-003/P/2/0).

PIŚMIENNICTWO

1. Kohlmünzer S. Farmakognozja. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007: 420–421.
2. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic 2011, World Health Organization; Genewa 2011; www.who.int/tobacco/mpower
3. Benowitz N.L. Nicotine addiction. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362: 2295–2303.
4. Yerger V.B., Malone R.E. Melanin and nicotine: A review of the literature. *Nicotine Tob. Res.* 2006; 4: 487–498.
5. Larsson B.S. Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Res.* 1993; 6: 127–133.
6. Pogoćki D., Ruman T., Danilczuk M., Danilczuk M., Celuch M., Wałajtys-Rode E. Application of nicotine enantiomers, derivatives and analogues in therapy of neurodegenerative disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 563: 18–39.
7. Flores C.M. The promise and pitfalls of a nicotinic cholinergic approach to pain management. *Pain* 2000; 88: 1–6.
8. Hooten W.M., Townsend C.O., Bruce B.K., Warner D.O. The effect of smoking status on opioid tapering among patients with chronic pain. *Anesth. Analg.* 2009; 108: 308–315.
9. Kroon L.A. Drug interactions with smoking. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 2007; 64: 1917–1921.
10. King G., Yerger V.B., Whembolua G.L., Bendel R.B., Kittles R., Moolchan E.T. Link between facultative melanin and tobacco use among African Americans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009; 92: 589–596.
11. Robles G., Singh-Franco D., Lee Ghin H. A review of the efficacy of smoking-cessation pharmacotherapies in nonwhite populations. *Clin. Ther.* 2008; 30: 800–812.
12. Hébert R. What's new in nicotine & tobacco research? *Nicotine Tob. Res.* 2006; 8: 481–486.
13. Claffey D.J., Stout P.R., Ruth J.A. ^3H -nicotine, ^3H -flunitrazepam, and ^3H -cocaine incorporation into melanin: a model for the examination of drug-melanin interactions. *J. Anal. Toxicol.* 2001; 25: 607–611.
14. Buszman E., Wrzeźniok D., Surazyński A., Pałka J., Mołęda K. Effect of melanin on netilmicin-induced inhibition of collagen biosynthesis in human skin fibroblasts. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14: 8155–8161.
15. Buszman E., Wrzeźniok D., Trzcionka J. Interaction of neomycin, tobramycin and amikacin with melanin in vitro in relation to aminoglycosides-induced ototoxicity. *Pharmazie* 2007; 62: 210–215.
16. Kalbitzer H.R., Stehlik D. On the analysis of competitive binding of various ligands to cooperative and independent binding sites of macromolecules. *Z. Naturforsch.* 1979; 34: 757–769.
17. Trzcionka J., Górna A., Buszman E. Rola melaniny w fotouczulającym działaniu sulfonamidów na skórę. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2007; 61: 462–467.
18. Buszman E., Kwaśniak B., Wilczok T. The effect of metal ions incorporated into DOPA-melanin on chloroquine binding ability. *Curr. Top. Biophys.* 1992; 16: 81–84.
19. Beberok A., Buszman E., Wrzeźniok D., Otręba M., Trzcionka J. Interaction between ciprofloxacin and melanin: the effect on proliferation and melanization in melanocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 2011; 669: 32–37.
20. Nosanchuk J. D., Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 2006; 50: 3519–3528.
21. d'Ischia M., Napolitano A., Pezzella A., Meredith P. Chemical and structural diversity in eumelanins: unexplored bio-optoelectronic materials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009; 48: 3914–3921.
22. Césarini J. P. Melanins and their possible roles through biological evolution. *Adv. Space Res.* 1996; 18: 35–40.
23. Wakamatsu K., Ito S. Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res.* 2002; 15: 174–183.
24. Plonka P., M., Passeron T., Brenner M. i wsp. What are melanocytes really doing all day long...? *Exp. Dermatol* 2009; 18: 799–819.
25. Szpoganicz B., Gidanian S., Kong P., Farmer P. Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu(II) and Zn(II) ions. *Inorg. Biochem* 2002; 89: 45–53.
26. McGraw K.J. The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? *Anim. Behav.* 2005; 69: 757–764.
27. Märs U., Larsson B.S. Pheomelanin as a binding site for drugs and chemicals. *Pigment Cell Res.* 1999; 12: 266–274.
28. Wrzeźniok D., Buszman E., Grzegorzczak M., Grzegorzczak A., Hryniewicz T. Impact of metal ions on netilmicin-melanin interaction. *Acta. Pol. Pharm.* 2012; 69: 41–45.
29. Surazyński A., Pałka J., Wrzeźniok D., Buszman E., Kaczmarczyk P. Melanin potentiates daunorubicin-induced inhibition of collagen biosynthesis in human skin fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 419: 139–145.
30. Wilczok T., Stepień K., Buszman E., Porębska-Budny M. Interaction of methotrexate with melanins and melanosomes from B16 melanoma. *Biophys. Chem.* 1990; 35: 265–270.
31. Buszman E., Beberok A., Rózańska R., Orzechowska A. Interaction of chlorpromazine, fluphenazine and trifluoperazine with ocular and synthetic melanin in vitro. *Pharmazie* 2008; 63: 372–376.
32. Sridharan S., Ganiger K., Satyanarayana A., Rahul A., Shetty S. Effect of environmental tobacco smoke from smoker parents on gingival pigmentation in children and young adults: a cross-sectional study. *J. Periodontol.* 2011; 82: 956–962.
33. Hedin A., Larsson Å. The ultrastructure of the gingival epithelium in smokers' melanosis. *J. Periodontal. Res.* 1984; 19: 177–190.
34. Hedin A., Larsson Å. In vitro activation of amphibian dermal melanocytes by nicotine. *Scand. J. Dent. Res.* 1986; 94: 57–65.