Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Wydział Lekarski

Marek Koprowski

Rola pochodnych tauryny w ostrej reakcji zapalnej

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Janusz Marcinkiewicz
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kraków 2005

Badania zostały wykonane dzięki wsparciu finansowemu Fundacji na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny (grant nr 501/FP/1) oraz Komitetu Badań Naukowych (501/P/22/L – badania statutowe)

Składam serdeczne podziękowania

Panu Profesorowi Januszowi Marcinkiewiczowi

za promotorską opiekę i cenne wskazówki.

Pragnę również podziękować

pracownikom Katedry Immunologii

za okazaną pomoc i życzliwość

oraz mojej Żonie – za wyjątkową cierpliwość.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów 5

1. Wstęp 7

1.1 Rola tauryny w organizmie człowieka 7

1.2 Pochodne tauryny w ostrej reakcji zapalnej 11

1.3 Biologiczne właściwości chloraminy i bromaminy tauryny 13

2. Cel pracy 15

3. Materiały i metody 16

3.1 Odczynniki 16

3.2 Materiały i aparatura 16

3.3 Model doświadczalny *in vitro* – założenia 17

3.3.1 Izolacja makrofagów otrzewnowych 18
3.3.2 Hodowle komórkowe 18
3.3.3 Synteza chloraminy i bromaminy tauryny 19
3.3.4 Ocena żywotności komórek – test MTT 20
3.3.5 Ocena żywotności komórek – test zahamowania wchłaniania błękitu trypanu 20
3.3.6 Transport TauCl przez błonę komórkową 21
3.3.7 Oznaczanie stężenia tlenku azotu w nadsączach hodowli komórkowych 21
3.3.8 Oznaczanie stężenia cytokin w nadsączach hodowli komórkowych 22
3.3.9 Ocena ekspresji HO-1 i COX-2 metodą Western blot 23

3.4 Model doświadczalny ostrego odczynu zapalnego *in vivo* – założenia 23

3.4.1 Zwierzęta doświadczalne 24
3.4.2 Wytwarzanie komór powietrznych, indukcja zapalenia, pozyskiwanie wysięku zapalnego i napływających komórek 24
3.4.3 Test chemiluminescencji 25
3.4.4 Oznaczanie aktywności mieloperoksydazy w homogenatach komórkowych 25

3.5 Analiza statystyczna wyników 25

4. Wyniki 26

4.1 Określenie trwałości chloraminy (TauCl) i bromaminy tauryny (TauBr) 26

4.2 Cytotoksyczność TauCl i TauBr 33

4.3 Transport TauCl przez błonę komórkową 37

4.4 Ocena wpływu badanych związków na aktywność sekrecyjną makrofagów *in vitro* 39

4.5 Ocena wpływu TauCl i TauBr na ekspresję indukowalnej formy oksygenazy hemowej-1 (HO-1) i indukowalnej formy cyklooksygenazy (COX-2) w komórkach śródbłonka 44

4.6 Ocena wpływu badanych związków na przebieg ostrego odczynu zapalnego *in vivo* ... 46

5. Dyskusja 50

6. Podsumowanie 58

7. Wnioski 59

8. Streszczenie 60

9. Abstract 63

10. Bibliografia 64

Wykaz stosowanych skrótów

BSA – albumina bydlęca (bovine serum albumin)

COX – cyklooksygenaza

DPBS – pozbawiona jonów wapnia i magnezu, zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna

EPO – peroksydaza eozynofilów

FCS – płodowa surowica cielęca (fetal calf serum)

GES – guanidynoetanosulfonian; inhibitor białka TauT

H3-Tau – tauryna znakowana trytem

H3-TauCl – chloramina tauryny znakowana trytem

HBSS – (Hank's buffered saline solution)

HO-1 – oksygenaza hemowa-1

HRP – peroksydaza chrzanowa

HUVEC – ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej (human umbilical vein endothelial cells)

IFN – interferon

IL-6, -10, -12 – interleukina 6, 10, 12

LPS – lipopolisacharyd

MPO – mieloperoksydaza

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu

$NADP^+$ – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; forma utleniona

NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; forma zredukowana

NDD – N-(1-naftylo)-etylenodiamina

NO – tlenek azotu

NOS – syntaza tlenku azotu

PGE_2 – prostaglandyna E_2

ROS – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species)

Tau – tauryna

TauBr – bromamina tauryny

$TauBr_2$ – dibromamina tauryny

TauCl – chloramina tauryny

$TauCl_2$ – dichloramina tauryny

TauT – białko transportujące taurynę

TNF – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor)

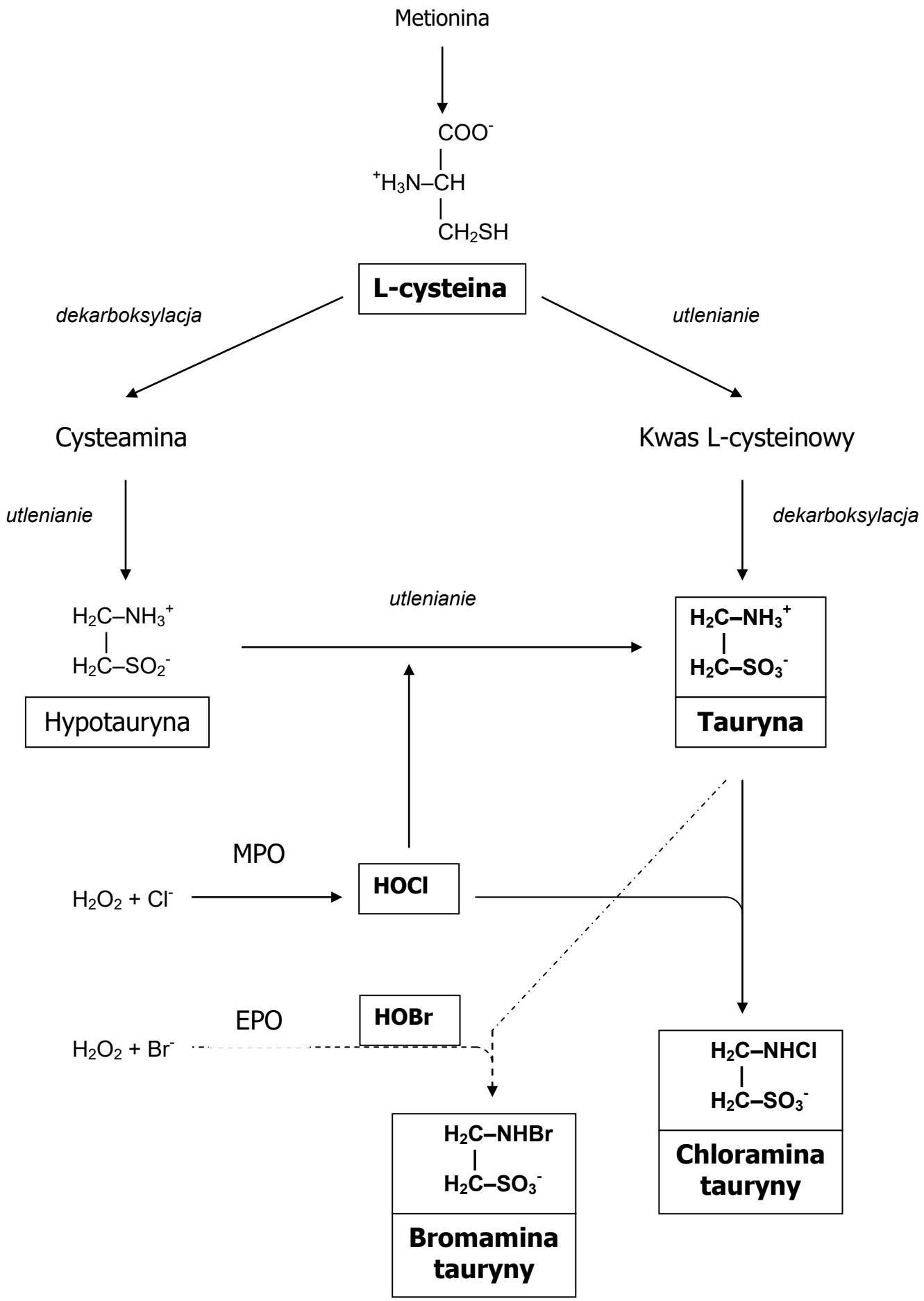
1. Wstęp

1.1 Rola tauryny w organizmie człowieka

Tauryna jest β-aminokwasem sulfonowym występującym powszechnie w komórkach i płynie tkankowym zarówno u człowieka, jak i u innych ssaków. Jakkolwiek nie jest ona wbudowywana do łańcuchów polipeptydowych, pełni istotną rolę regulacyjną. Jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju ośrodkowego układu nerwowego i siatkówki oka, funkcjonowania układu rozrodczego oraz immunologicznego [Schuller-Levis i Park, 2003].

Szlaki powstawania i rozkładu tauryny w organizmie człowieka zostały dość dokładnie scharakteryzowane [Wright i wsp., 1986]. Naturalnym substratem w procesie biosyntezy tauryny jest L-cysteina, aminokwas występujący w organizmie zarówno w stanie wolnym, jak i będący składnikiem łańcuchów polipeptydowych. Jest ona utleniana do kwasu L-cysteinowego, a następnie dekarboksylowana do tauryny (ryc. 1). Enzym katalizujący tę ostatnią reakcję – dekarboksylaza kwasu L-cysteinowego – stanowi kluczowy element szlaku metabolicznego, warunkujący zdolność endogennej produkcji tauryny. Alternatywna droga syntezy tauryny polega na dekarboksylacji L-cysteiny do cysteaminy, a następnie utlenieniu jej do hypotauryny i tauryny (ryc. 1).

Poszczególne gatunki ssaków różnią się poziomem dekarboksylazy kwasu L-cysteinowego, a co za tym idzie – zdolnością do endogennej syntezy tauryny. U kotów aktywność tego enzymu jest bardzo niska, stąd poziom tauryny jest u nich całkowicie zależny od dostępności tego aminokwasu w diecie. W przeciwieństwie do nich szczury są w stanie syntetyzować niemal całą niezbędną ilość tauryny *de novo*. Dane obserwacyjne, jak również badania przeprowadzone na zwierzętach należących do rzędu naczelnych, sugerują, że u człowieka zdolność do endogennej syntezy tauryny jest ograniczona [Wright i wsp., 1986; Sturman, 1993].



Ryc. 1. Droga endogennej syntezy tauryny z metioniny i cysteiny oraz powstawania chloraminy i bromaminy tauryny. MPO – mieloperoksydaza, EPO – peroksydaza eozynofilów

Stężenie tauryny w surowicy u ludzi cechuje się dużą zmiennością w zależności od podaży tego aminokwasu w diecie, na ogół nie przekraczając kilkuset μM. Tymczasem stężenie tauryny w cytoplazmie leukocytów osiąga od 5 mM (monocyty) do 19 mM (granulocyty), co jest wynikiem aktywnego wychwytu tauryny przez komórki na wczesnych etapach hematopoezy [Learn i wsp., 1990]. Co więcej, badania przeprowadzone u pacjentów poddawanych długotrwałemu żywieniu pozajelitowemu bez suplementacji tauryny wykazały istotny spadek poziomu tego aminokwasu w surowicy oraz w cytoplazmie komórek krwi – z wyjątkiem granulocytów [Vinton i wsp., 1986]. Obserwacja ta wskazuje na bardzo istotne znaczenie prawidłowego poziomu tauryny dla funkcjonowania granulocytów.

Tauryna pełni również niezwykle istotną funkcję w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie działa jako regulator osmolarności (jest gromadzona w komórkach w sytuacji wzrostu osmolarności płynu tkankowego) [Bitoun i Tappaz, 2000] oraz modulator neurotransmisji [Idrissi i Trenkner, 2004].

Wydalanie tauryny następuje w większości w postaci niezmienionej z moczem i żółcią; w kanaliku proksymalnym nerki zachodzi zwrotna resorpcja tego związku stanowiąca podstawowy mechanizm utrzymania stałego poziomu tauryny w sytuacji niedoboru tego aminokwasu w diecie [Chesney i wsp., 1985]. Niewielkie ilości tauryny – prawdopodobnie po wcześniejszym utlenieniu m. in. do chloraminy tauryny – ulegać mogą deaminacji z wytworzeniem aldehydu sulfooctowego.

Tauryna pełni istotną rolę w procesach ochrony komórek i tkanek przed skutkami stresu oksydacyjnego. Jej zdolności antyoksydacyjne *in vivo* potwierdzone zostały w licznych badaniach na modelach zwierzęcych [Gordon i wsp., 1986; Schuller-Levis i wsp., 1994; Mahalakshmi i wsp., 2003; Hagar, 2004;], jak i u ludzi [Cantin, 1994; Zhang i wsp., 2004]. Pojawiło się również doniesienie wskazujące na zależność pomiędzy dostępnością tauryny i jej poziomem w surowicy a stanem ogólnym pacjentów i rokowaniem w posocznicy

[Chiarla i wsp., 2000].

Mechanizmy, dzięki którym antyoksydacyjne i cytoprotekcyjne właściwości tauryny przekładają się na jej rolę w funkcjonowaniu układu immunologicznego, pozostają niejasne. U kotów, których dietę całkowicie pozbawiono tauryny, obserwowano leukopenię, zmniejszenie odsetka komórek wielojądrzastych wśród leukocytów oraz zmniejszenie aktywności leukocytów w zakresie „wybuchu tlenowego" i fagocytozy. Odnotowano również zaburzenia budowy histologicznej śledziony i węzłów chłonnych [Schuller-Levis i wsp., 1990]. Wszystkie te spostrzeżenia wskazują na istotną rolę tauryny w prawidłowym funkcjonowaniu układu immunologicznego.

Badania ostatnich 10 lat wykazały, że haloaminy tauryny (TauCl, TauBr) produkowane w odczynie zapalnym przez aktywowane neutrofile i eozynofile wykazują *in vitro* właściwości immunoregulacyjne i przeciwbakteryjne.

1.2 Pochodne tauryny w ostrej reakcji zapalnej

Haloaminy – chloramina i bromamina tauryny – to główne pochodne tauryny syntetyzowane *in vivo*. Powstają one jako produkt reakcji tauryny ze związkami wytwarzanymi w procesie tzw. „wybuchu tlenowego" („respiratory burst") leukocytów – jednego z kluczowych mechanizmów ostrej reakcji zapalnej.

Z chwilą dotarcia do ogniska zapalenia podstawowym zadaniem leukocytów staje się zniszczenie czynnika wywołującego zapalenie – najczęściej drobnoustrojów. W ostrej reakcji zapalnej najistotniejsza rola przypada neutrofilom i makrofagom. Mają one zdolność fagocytozy, co umożliwia wewnątrzkomórkowe niszczenie zarówno mikroorganizmów, jak i cząstek innego pochodzenia [Zgliczyński i Stelmaszyńska, 1975; Aderem i wsp., 1999]. Są również zdolne do pozakomórkowego zabijania drobnoustrojów dzięki czynnikom uwalnianym do otoczenia, przede wszystkim enzymom i aktywnym formom tlenu – produktom „wybuchu tlenowego" [Babior, 1978; Jong i wsp., 1980; Thomas i wsp., 1995; Hampton i wsp., 1998].

Pierwszym etapem wytwarzania aktywnych form tlenu przez neutrofile i makrofagi jest aktywacja oksydazy NADPH – enzymu stanowiącego kompleks cząsteczek przenoszących elektrony. W wyniku przeniesienia elektronu z NADPH na tlen cząsteczkowy powstaje anion ponadtlenkowy:

$$2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^{-} + NADP^{+} + H^{+}$$

W procesie dysmutacji (spontanicznej lub katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową) powstaje z anionu ponadtlenkowego nadtlenek wodoru:

$$2O^{-}_2 + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Z nadtlenku wodoru przy udziale jonów żelazawych oraz kwasu podchlorawego powstają rodniki hydroksylowe ($^{\cdot}OH$) i tlen singletowy ($^1O_2$):

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + {}^{\cdot}OH$$

$$HOCl + H_2O_2 \rightarrow {}^1O_2 + H_2O + Cl^- + H^+$$

Kwas podchlorawy powstaje w reakcji katalizowanej przez mieloperoksydazę (MPO) [Thomas, 1979; Klebanoff i Hamon, 1992; Winterbourn i wsp., 2000]:

$$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + OH^-$$

Reaguje on z aminami, w wyniku czego powstają chloraminy, w tym chloramina tauryny.

Wymienione aktywne formy tlenu powstają w znakomitej większości wewnątrz fagolizosomu, tam działają i ulegają inaktywacji; mogą być jednak – w niewielkiej części – uwalniane na zewnątrz i działać pozakomórkowo. Stanowią również zagrożenie dla samej komórki, stąd obecność mechanizmów obronnych – katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, a także wysokiego poziomu przeciwutleniaczy, przede wszystkim glutationu i tauryny [Thomas i wsp., 1983; McLoughlin i wsp., 1991; Banks i wsp., 1992; Davies i wsp., 1993]. Istnieją doniesienia wskazujące na silniejsze działanie antyoksydacyjne prekursorów na szlaku endogennej syntezy tauryny, a mianowicie hypotauryny i cysteaminy, jednakże ich poziom w cytoplazmie wydaje się być zbyt niski, aby mogły odgrywać znaczącą rolę w mechanizmach cytoprotekcji [Aruoma i wsp., 1988; Learn i wsp., 1990].

Mniej wiadomo o powstawaniu i działaniu bromaminy tauryny. Uważa się, że głównym jej źródłem są aktywowane eozynofile. W odróżnieniu od neutrofilów i monocytów posiadają one – zamiast mieloperoksydazy – specyficzną peroksydazę, która wykorzystuje jony bromkowe (Br^-) do wytwarzania kwasu podbromawego (HOBr) [Mayeno i wsp., 1989; van Dalen i Kettle, 2001]; reakcja ta jest katalizowana również przez MPO [Thomas i wsp., 1995; Gaut i wsp., 2001; Henderson i wsp., 2001]. Analogicznie do HOCl kwas ten jest silnym czynnikiem bakteriobójczym i przeciwpasożytniczym [Jong i wsp., 1980; Yazdanbakhsh i wsp., 1987; Thomas i wsp., 1995]. Może także reagować z H_2O_2 wytwarzając tlen singletowy oraz z aminami tworząc bromaminy, w tym bromaminę tauryny.

1.3 Biologiczne właściwości chloraminy i bromaminy tauryny

Do najlepiej zbadanych pochodnych tauryny należy chloramina tauryny (TauCl) [Thomas i wsp., 1986; Park i wsp., 1993; Marcinkiewicz i wsp., 1995; Park i wsp., 1995; Quinn i wsp., 1996; Park i wsp., 1997; Marcinkiewicz i wsp., 1998; Marcinkiewicz i wsp., 1999]. Powstaje ona *in vivo* w reakcji pomiędzy tauryną a HOCl – podstawowym produktem mieloperoksydazy obecnej w neutrofilach i monocytach [Weiss i wsp., 1982] lub też w procesie bezpośredniego chlorowania tauryny przez MPO z udziałem H_2O_2 i Cl^- (bez wytwarzania HOCl) [Marquez i Dunford, 1994]. HOCl, silny i wysoce reaktywny oksydant, uważany jest za jeden z podstawowych związków bakteriobójczych uwalnianych przez aktywne neutrofile do wnętrza fagolizosomu. TauCl jest związkiem znacznie stabilniejszym i mniej reaktywnym. Jej działanie bakteriobójcze potwierdzono zarówno *in vitro,* jak i *in vivo;* aktualnie jej zastosowanie miejscowe w leczeniu infekcji (przede wszystkim w okulistyce i laryngologii) jest przedmiotem badań klinicznych II fazy [Nagl i wsp., 2000a; Nagl i wsp., 2000b; Neher i wsp., 2004; Neher i wsp., 2005; Teuchner i wsp., 2005]. W ostatnim czasie opublikowano wyniki badań właściwości chemicznych i bakteriobójczych dichloraminy tauryny, jednakże w porównaniu z TauCl związek ten wydaje się mniej obiecujący w aspekcie potencjalnego zastosowania klinicznego [Gottardi i wsp., 2005].

Zarówno HOCl, jak i TauCl mogą przyczyniać się do uszkodzenia białek macierzy zewnątrzkomórkowej – czy to bezpośrednio poprzez ich chlorowanie [Olszowska i wsp., 1989], czy też pośrednio poprzez aktywację kolagenazy uwalnianej z granulocytów [Claesson i wsp., 1996].

Z drugiej strony w wielu pracach wykazano *in vitro* działanie immunomodulacyjne TauCl polegające na hamowaniu wytwarzania NO, PGE_2, TNF-α oraz IL-6 przez aktywne makrofagi [Park i wsp., 1993; Marcinkiewicz i wsp., 1995; Park i wsp., 1995; Park i wsp., 1997]; co więcej, hamuje ona również wytwarzanie mediatorów zapalenia oraz aktywnych

form tlenu przez neutrofile [Marcinkiewicz i wsp., 1998] oraz produkcję cytokin przez synowiocyty w reumatoidalnym zapaleniu stawów [Kontny i wsp., 2000]. Tym samym TauCl wydaje się odgrywać istotną rolę w hamowaniu nieswoistej reakcji zapalnej i promowaniu swoistej odpowiedzi immunologicznej [Marcinkiewicz 1997].

Możliwości zastosowania TauCl do modyfikacji przebiegu przewlekłego zapalenia są aktualnie przedmiotem badań *in vivo* [Kwaśny-Krochin i wsp., 2002; Wojtecka-Łukasik i wsp., 2004; Verdrengh i Tarkowski, 2005; Wojtecka-Łukasik i wsp., 2005]. Jakkolwiek szybki rozkład TauCl *in vivo* pociąga za sobą konieczność jej częstego, miejscowego podawania i tym samym znacznie ogranicza jej przewlekłe stosowanie, związek ten mógłby znaleźć zastosowanie w terapii takich schorzeń jak reumatoidalne zapalenie stawów.

W przeciwieństwie do TauCl na temat TauBr dostępnych w literaturze danych jest jak dotychczas niewiele. *In vivo* powstaje ona w reakcji pomiędzy tauryną a HOBr – produktem peroksydazy eozynofilów [Jong i wsp., 1980; Thomas i wsp., 1995]. Jak dotychczas wykazano jej działanie przeciwbakteryjne i przeciwpasożytnicze [Yazdanbakhsh i wsp., 1987], jej funkcja immunomodulacyjna pozostaje jednak słabo poznana. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że TauBr – podobnie jak TauCl – indukuje w sposób zależny od dawki ekspresję oksygenazy hemowej-1 (HO-1) w makrofagach równocześnie obniżając poziom syntazy tlenku azotu (NOS-2) oraz hamując wytwarzanie TNF-α, IL-6, IL-12 i IL-10 przez aktywne makrofagi [Olszanecki i Marcinkiewicz, 2004; Marcinkiewicz i wsp., 2005].

2. Cel pracy

Badania nad właściwościami i mechanizmami działania TauCl potwierdziły przeciwbakteryjne i przeciwzapalne działanie TauCl w stężeniach fizjologicznych, niecytotoksycznych dla komórek odczynu zapalnego. Wyniki tych badań uzasadniają stosowanie TauCl *in vivo* w leczeniu schorzeń infekcyjnych.

Rola TauBr *in vivo* pozostaje niewyjaśniona. Z badań *in vitro* wynika jednak, że TauBr posiada szereg cech wspólnych z TauCl (wykazuje silniejsze działanie przeciwbakteryjne, słabsze natomiast immunomodulacyjne), co wskazuje na możliwość zastosowania TauBr *in vivo*.

Celem pracy było zbadanie tych cech i właściwości obu związków, które uzasadniałyby terapeutyczne zastosowanie TauBr w leczeniu ostrego odczynu zapalnego.

Realizacja założonego celu wymagała opracowania odpowiednich modeli doświadczalnych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Do eksperymentów *in vitro* wybrano linie komórkowe będące odpowiednikami głównych komórek uczestniczących w odczynie zapalnym – leukocytów (otrzewnowe makrofagi rezydentne myszy CBA/J oraz komórki mysich linii makrofagowych RAW 264.7 i J774.2) i śródbłonka naczyń (mysia linia ECV 304 oraz komórki HUVEC). Eksperymenty *in vivo* prowadzono w modelu ostrego odczynu zapalnego w komorze powietrznej („air pouch"), umożliwiającym odzyskiwanie wysięku zapalnego oraz izolację napływających do miejsca zapalenia aktywnych leukocytów (bez obecności komórek rezydentnych).

Cele pracy zrealizowano poprzez następujące szczegółowe zadania badawcze:

Zadania wstępne:

1) Określenie trwałości TauBr i TauCl (zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i w warunkach ostrego odczynu zapalnego) oraz ich właściwości fizykochemicznych istotnych dla działania *in vivo*.
2) Zbadanie cytotoksyczności TauBr i TauCl *in vitro* oraz *in vivo.*
3) Ustalenie drogi transportu TauCl przez błonę komórkową do wnętrza komórki.

Zadania zasadnicze:

1) Zbadanie wpływu TauBr i TauCl *in vitro* na aktywność komórek odczynu zapalnego.
2) Zbadanie wpływu TauBr i TauCl *in vivo* na przebieg ostrego odczynu zapalnego.

3. Materiały i metody

3.1 Odczynniki

Płodowa surowica cielęca (FCS) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA); błękit trypanu (Searle Diagnostics, High Wycombe Bucks, UK); L-tauryna, hypotauryna, perhydrol, 1% Triton, zymosan A, luminol, olej parafinowy, MTT, standard mysiego TNF-α (Sigma, St. Louis, MO, USA); NaOCl, *o*-fenylodiamina, heksadecylotrimetyloamina, *o*-dianizydyna, rekombinowany mysi TNF-α, rekombinowany IFN-γ, lipopolisacharyd *E. coli* 0.111:B4 (LPS) (Aldrich, Steinham, Niemcy); izopropanol, glukoza, H_3PO_4, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, KH_2PO_4, NaCl, NaBr, KCl, $CaCl_2$, $NaNO_2$, HCl, H_2SO_4, kwas sulfanilowy, NDD (P.O.Ch. S.A., Gliwice, Polska); tauryna znakowana trytem (Polatom, Otwock, Polska); heparyna (Polfa, Warszawa, Polska); podłoża: RPMI 1640, DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA); szczurze przeciwciała monoklonalne: przeciw mysiej IL-6 (MP5-20F3 i MP5-32C11), przeciw mysiej IL-10 (JES5-2A5 i JES5-16E3), przeciw mysiej IL-12 (p40) (C15.6), przeciw mysiemu TNF-α (TN3-19.12) oraz biotynylowane szczurze przeciwciało poliklonalne przeciw mysiemu TNF-α (Pharmingen, San Diego, CA, USA); biotynylowane szczurze przeciwciało monoklonalne przeciw mysiej IL-12 (p40) (C17.8) (Endogen, Woburn, USA); rekombinowana mysia IL-6 (PeproTech, Rocky Hill, USA); rekombinowane mysie interleukiny: IL-10 i IL-12 (Genzyme, Cambridge, UK); Streptavidin-HRP (Vector, Burlingame, CA, USA); mysie przeciwciało monoklonalne przeciw HO-1 (Stressgen, Canada); mysie przeciwciało monoklonalne przeciw COX-2 (Cayman, USA); odtłuszczone mleko w proszku (Marvel, Dublin, Irlandia).

3.2 Materiały i aparatura

Naczynia hodowlane typu Leighton (Bellco, USA); płytki Petriego o średnicy 100 mm, butelki hodowlane o pojemności 50 i 150 ml, płytki 6- i 96-dołkowe płaskodenne,

probówki plastikowe o pojemności 15 i 50 ml (Costar, Cambridge, MA, USA); żel poliakrylamidowy (Bio-Rad, USA); błony nitrocelulozowe (Amersham Pharmacia Biotech, USA); płytki do chemiluminescencji (Nunc, Roskilde, Dania); Parafilm „M" (American National Can™, Greenwich, CT, USA); skrobaczka do komórek (cell scraper) (diSpo, McGaw Park, IL, USA); igły jednorazowe 27G ½ (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA); filtry o średnicy porów 0,2 μm (Renner, Dannstadt, Niemcy); wytrząsarka (GFL Burgwedel, Niemcy); wirówka, komora laminarna, inkubator z przepływem CO_2 (Heraeus Sepatech, Hanau, Niemcy); luminometr „Lucy" (Anthos, Salzburg, Austria); spektrofotometr „PowerWave X" (Bio-tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA); licznik scyntylacyjny (Wallac, Turku, Finlandia).

3.3 Model doświadczalny *in vitro* – założenia

W celu wykazania wpływu TauCl i TauBr na przebieg odczynu zapalnego zaplanowano w pierwszej kolejności badania *in vitro* przy użyciu hodowli komórek biorących udział w ostrym odczynie zapalnym. W oparciu o dotychczasowe badania i publikacje Katedry Immunologii wytypowano do badań następujące komórki uczestniczące w rozwoju odczynu zapalnego:

- makrofagi: mysie makrofagi otrzewnowe oraz komórki mysich linii makrofagowych RAW 264.7 i J774.2;
- komórki śródbłonka: komórki HUVEC (ludzkie komórki śródbłonka izolowane z żyły pępowinowej) oraz komórki ludzkiej linii śródbłonkowej ECV 304.

Zaplanowano przeprowadzenie następujących badań:

- określenie cytotoksyczności TauCl i TauBr wobec badanych komórek;
- ustalenie drogi transportu TauCl przez błonę komórkową;
- zbadanie wpływu TauCl i TauBr na syntezę i uwalnianie tlenku azotu

i wybranych cytokin przez aktywowane komórki;

- zbadanie wpływu TauCl i TauBr na ekspresję HO-1 i COX-2.

3.3.1 Izolacja makrofagów otrzewnowych

W celu uzyskania makrofagów otrzewnowych myszom CBA/J podawano dootrzewnowo 1 ml oleju parafinowego (Sigma, ST. Louis, USA). Komórki odzyskiwano po 48 h przepłukując jamę otrzewnową 5 ml DPBS z dodatkiem heparyny (5 U/ml; Polfa, Warszawa). Następnie zawiesinę komórek wirowano, a komórki zawieszano ponownie w DPBS. Obecność makrofagów (85-90%) potwierdzano metodą cytochemiczną – poprzez wykazanie obecności niespecyficznych komórek jednojądrzastych zawierających esterazę.

3.3.2 Hodowle komórkowe

Komórki śródbłonka (linia ECV 304 i komórki HUVEC) oraz mysie komórki makrofagowe (linia J774.2) hodowano w medium DMEM (Gibco, USA) wzbogaconym 10% FCS oraz streptomycyną (100 μg/ml), penicyliną (100 U/ml) i fungizonem (0,25 μg/ml). Komórki linii makrofagowej RAW 264.7 hodowano w medium RPMI wzbogaconym 10% FCS w obecności gentamycyny (50 mg/l).

Wszystkie hodowle prowadzono w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO_2.

O ile nie podano inaczej, przed każdym eksperymentem komórki wysiewano na płytkę 96-dołkową i hodowano do uzyskania pojedynczej, adherentnej warstwy komórek. Jedynie eksperymenty z zastosowaniem techniki Western blot prowadzono przy użyciu płytek sześciodołkowych w celu uzyskania odpowiednio dużej ilości materiału do analizy.

O ile nie podano inaczej, substancje aktywujące komórki (LPS i IFN-γ w przypadku komórek makrofagowych oraz IL-1β dla komórek śródbłonka) dodawano do układu po 15 min. od podania TauCl lub TauBr.

3.3.3 Synteza chloraminy i bromaminy tauryny

Chloraminę i bromaminę tauryny syntetyzowano drogą reakcji pomiędzy tauryną i – odpowiednio – NaOCl lub NaOBr; metoda syntezy została opracowana w Zakładzie Immunologii CM UJ i opublikowana we wcześniejszych pracach [Marcinkiewicz i wsp., 1995].

W celu uzyskania TauCl krystaliczną L-taurynę (Sigma, St. Louis, USA) rozpuszczano w DPBS (pH = 7,4) do uzyskania stężenia 40 mM; analogicznie przygotowywano 35-40 mM roztwór NaOCl (Aldrich, Steinham, Niemcy) w DPBS (pH = 10,0 – 11,0). Następnie 5 ml roztworu NaOCl dodawano po kropli do 5 ml roztworu tauryny, ciągle mieszając.

Dla uzyskania TauBr przygotowywano najpierw roztwór NaOBr poprzez reakcję NaOCl z niewielkim nadmiarem NaBr [Thomas i wsp., 1995]. Uzyskany roztwór NaOBr rozcieńczano w DPBS do stężenia 10-12 mM i mieszano z roztworem tauryny o stężeniu 100 mM w sposób opisany powyżej.

Zawartość TauCl i TauBr w produkcie końcowym oraz obecność ewentualnych zanieczyszczeń (przede wszystkim $TauCl_2$ i $TauBr_2$) określano spektrofotometrycznie (spektrometr PowerWave X, Bio-tek Instruments, Inc.) przy pH = 7,4. Parametry badanych substancji (λ_{max}, A) zestawiono w tabeli 1. [Thomas i wsp., 1986; Thomas i wsp., 1995]

Tab. 1. Dane spektrofotometryczne badanych pochodnych tauryny.

Związek	***TauCl***	***TauBr***	***$TauCl_2$***		***$TauBr_2$***	
Absorbancja ($M^{-1} * cm^{-1}$)	429	430				
λ_{max} (nm)	252	288	207	300	241	336

3.3.4 Ocena żywotności komórek – test MTT

Żywotność komórek hodowanych *in vitro* oceniano przy pomocy testu redukcji soli tetrazolowej (MTT) do formazanu przez dehydrogenazy żywych komórek. Komórki śródbłonka (linia ECV 304) lub mysie komórki makrofagowe (linia J774.2 bądź RAW 264.7) hodowano na płytce 96-dołkowej do uzyskania pojedynczej, adherentnej warstwy komórek. Następnie wymieniano medium nakładając po 180 µl/dołek + 20 µl roztworu TauCl lub TauBr w DPBS tak, aby docelowe stężenie badanego związku w mieszaninie inkubacyjnej wynosiło od 0,03 do 10 mM. Po 24 godzinach inkubacji usuwano supernatant i nakładano świeże medium (po 180 µl/dołek) z dodatkiem MTT (roztwór w jałowej soli fizjologicznej; stężenie 4 mg/ml, 20 µl/dołek). Po dalszych 2 godzinach inkubacji usuwano nadsącz, a komórki umieszczano w temperaturze -20°C do następnego dnia. Po rozmrożeniu komórki zalewano izopropanolem z dodatkiem 0,04 M kwasu solnego (200 µl/dołek) celem rozpuszczenia wytrąconych kryształów formazanu. Stężenie produktu końcowego oceniano mierząc absorpcję dla $\lambda = 550$ nm.

3.3.5 Ocena żywotności komórek – test zahamowania wchłaniania błękitu trypanu

Żywotność komórek *in vivo* określano poprzez ocenę zdolności zahamowania wchłaniania do komórki błękitu trypanu, tj. pośrednią ocenę integralności błony komórkowej. Myszom szczepu CBA (wiek 6-8 tygodni) podawano dootrzewnowo roztwór TauCl lub TauBr w jałowym DPBS o stężeniu 1-7 mM w ilości 1 ml. Po 60 min. wypłukiwano rezydualne makrofagi otrzewnowe, wirowano i ponownie zawieszano w 1ml DPBS, a następnie dodawano błękit trypanu. Odsetek żywych (tj. nie wybarwionych) komórek oceniano w komorze Bürkera.

3.3.6 Transport TauCl przez błonę komórkową

Badania nad transportem TauCl przez błonę komórkową prowadzono przy użyciu komórek linii RAW 264.7 z zastosowaniem tauryny i TauCl znakowanej trytem (H3-Tau, H3-TauCl) oraz swoistego inhibitora białka TauT transportującego taurynę (guanidynoetanosulfonianu – GES). W dniu poprzedzającym eksperyment komórki zawieszone w medium (RPMI wzbogaconym 10% FCS; gęstość $2,5*10^6$ komórek/ml) wysiewano na płytkę 96-dołkową (po 200 µl/dołek) i pozostawiano na noc w cieplarce celem uzyskania adhezji komórek do podłoża. W dniu eksperymentu usuwano medium, komórki płukano kilkakrotnie DPBS, a następnie nakładano (po 200 µl/dołek) roztwór zawierający taurynę bądź TauCl w stężeniu 0,01–1 mM (rozpuszczone w HBSS) oraz H3-Tau o całkowitej aktywności 0,1 µCi/dołek. (W ostatnim eksperymencie użyto roztworów H3-Tau i H3-TauCl o aktywności 1,5 Ci/mol w stężeniu 0,01–1 mM.) Po 30 minutach inkubacji zdejmowano nadsącze, a komórki płukano kilkakrotnie DPBS, po czym poddawano lizie przy pomocy detergentu (30 minut inkubacji z 1% Triton, 50 µl/dołek). Aktywność zarówno zebranych nadsączów, jak i lizatów oceniano przy pomocy licznika scyntylacyjnego (Wallac, Turku, Finlandia).

3.3.7 Oznaczanie stężenia tlenku azotu w nadsączach hodowli komórkowych

Stężenie tlenku azotu w nadsączach oznaczano pośrednio, poprzez pomiar stężenia azotynów metodą Griessa. Do 100 µl nadsączu dodawano 100 µl 1% sulfanilamidu w 5% kwasie ortofosforowym, a następnie 100 µl 0,1% NDD. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze 23°C mierzono absorpcję przy λ = 550 nm i wyznaczano stężenie azotynów z krzywej standardowej (skonstruowanej w oparciu o wzorcowe roztwory $NaNO_2$).

3.3.8 Oznaczanie stężenia cytokin w nadsączach hodowli komórkowych

Stężenie cytokin w nadsączach mierzono metodą ELISA. Płytkę 96-dołkową pokrywano szczurzym przeciwciałem monoklonalnym przeciwko wybranej cytokinie (inkubacja 24 h). Po zablokowaniu płytki 4% roztworem albumin (2 h) lub 3% mlekiem nakładano badane nadsącze lub roztwory standardowe i pozostawiano na noc do inkubacji. Następnie nakładano biotynylowane przeciwciało przeciwko tej samej cytokinie. Po 1 godzinie inkubacji dodawano peroksydazę sprzężoną ze streptawidyną (Vector, Burlingame, USA), a następnie substraty reakcji barwnej: H_2O_2 i *o*-fenylodiaminę (Sigma, Steinham, Niemcy). Po 30 min zatrzymywano reakcję poprzez dodanie 3M H_2SO_4. Stężenie produktu końcowego oceniano poprzez pomiar absorpcji przy λ = 492 nm i porównanie z roztworem standardowym.

Dla IL-6 stosowano przeciwciała: MP5-20F3 (2 μg/ml) oraz biotynylowane MP5-32C11 (0,5 μg/ml) (Pharmingen, San Diego, USA). Jako standardu używano mysiej rekombinowanej IL-6 (PeproTech, Rocky Hill, USA). Próg wykrywalności cytokiny wynosił około 15 pg/ml.

Dla IL-10 stosowano przeciwciała: JES5-2A5 (5 μg/ml) oraz biotynylowane JES5-16E3 (2 μg/ml) (Pharmingen, San Diego, USA). Jako standardu używano mysiej rekombinowanej IL-10 (Genzyme, Cambridge, Wielka Brytania). Próg wykrywalności cytokiny wynosił około 30 pg/ml.

Dla IL-12 (p40) stosowano przeciwciała: C15.6 (2 μg/ml) (Pharmingen, San Diego, USA) oraz biotynylowane C17.8 (1 μg/ml) (Endogen, Woburn, USA). Jako standardu używano mysiej rekombinowanej IL-12 (Genzyme, Cambridge, Wielka Brytania). Próg wykrywalności cytokiny wynosił około 30 pg/ml.

Dla TNF-α stosowano przeciwciała: monoklonalne TN3-19.12 (2 μg/ml) oraz biotynylowane przeciwciało poliklonalne (1,6 μg/ml) (Pharmingen, San Diego, USA). Jako standardu używano mysiego rekombinowanego TNF-α (Sigma, Steinham, Niemcy). Próg

wykrywalności cytokiny wynosił około 30 pg/ml.

3.3.9 Ocena ekspresji HO-1 i COX-2 metodą Western blot

Komórki HUVEC po 24 godzinach od aktywacji poddawano lizie, a następnie próbki lizatu zawierające jednakową ilość białka całkowitego mieszano z buforem obciążającym (50mM Tris, 3% SDS, 10% glicerolu, 7% 2-merkaptoetanolu, 0,1% błękitu bromofenolowego) w stosunku objętościowym 4:1 i gotowano przez 4 min. Następnie próbki (30 μg białka całkowitego na ścieżkę) rozdzielano na żelu poliakrylamidowym (7,5% SDS-polyacrylamide gels; Mini Protean II, Bio-Rad, USA) i przenoszono na błonę nitrocelulozową (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał blokowano poprzez inkubację w temperaturze 4°C z 5% odtłuszczonym mlekiem (próbki pozostawiano na noc). Następnie próbki inkubowano przez 2 godziny (w temperaturze pokojowej) mysim przeciwciałem monoklonalnym przeciw HO-1 (Stressgen, Canada) lub mysim przeciwciałem monoklonalnym przeciw COX-2 (Cayman, USA). Obecność białka wykrywano przy pomocy drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z HRP (Amersham Pharmacia Biotech, USA) oraz substratów reakcji barwnej (p. wyżej).

3.4 Model doświadczalny ostrego odczynu zapalnego *in vivo* – założenia

Do doświadczeń *in vivo* wytypowano model indukowanego zymosanem zapalenia w podskórnej komorze powietrznej („air pouch”) u myszy [Pelletier i wsp., 2001]. Model ten umożliwia swobodne odzyskiwanie wysięku zapalnego oraz izolację aktywnych komórek napływających do miejsca zapalenia – w nowo wytworzonych komorach powietrznych nie występują komórki rezydentne.

Zaplanowano ocenę przebiegu ostrego odczynu zapalnego poprzez pomiar następujących parametrów:

- stężenia białka całkowitego w wysięku zapalnym (jako wypadkowej przepuszczalności śródbłonka naczyń i aktywności komórek odczynu zapalnego);
- całkowitej liczby komórek napływających do miejsca zapalenia;
- aktywności MPO (enzymu charakterystycznego dla granulocytów obojętnochłonnych) w komórkach wysięku zapalnego;
- aktywności komórek w zakresie wytwarzania aktywnych form tlenu („wybuchu tlenowego") mierzonej metodą chemiluminescencji.

3.4.1 Zwierzęta doświadczalne

Do doświadczeń używano myszy szczepu CBA/J w wieku 6-8 tygodni. Zwierzęta pochodziły z hodowli Katedry Immunologii CM UJ. Zwierzęta karmione były komercyjną paszą „Murigran" i otrzymywały wodę *ad libitum*.

3.4.2 Wytwarzanie komór powietrznych, indukcja zapalenia, pozyskiwanie wysięku zapalnego i napływających komórek

Na 6 dni przed właściwym eksperymentem pod skórę grzbietu myszy wstrzykiwano z zachowaniem sterylności 3 ml powietrza przepuszczonego przez filtr o średnicy porów 0,2 μm (Renner, Dannstadt, Niemcy) dla usunięcia drobnoustrojów i zanieczyszczeń. Wstrzyknięcie powtarzano na 3 dni przed eksperymentem dla ostatecznego uformowania komory. W dniu eksperymentu do uformowanej komory powietrznej podawano 1 ml jałowej zawiesiny zawierającej DPBS, 1 mg zymosanu oraz badany związek w stężeniu 1–5 mM. Po 4 godzinach inkubacji myszy uśmiercano, a wysięk zapalny odzyskiwano poprzez przepłukanie komory 4 ml DPBS. Po zwirowaniu wysięku (5 min, 1000 obr/min) w nadsączu oznaczano spektrofotometrycznie poziom białka (λ_{max} = 280 nm), zaś komórki zawieszano ponownie w 1 ml HBSS i liczono w komorze Bürkera.

3.4.3 Test chemiluminescencji

W celu wykonania testu chemiluminescencji komórki rozcieńczano HBSS do gęstości $1*10^7$ komórek/ml, mieszano 1:1 z luminolem (0,4 mg/ml) i umieszczano na 30 min w temperaturze 37°C. Następnie zawiesinę komórek z luminolem nakładano na 96-dołkową płytkę do chemiluminescencji po 150 µl/dołek, po czym dodawano 50 µl/dołek zawiesiny opsonizowanego zymosanu. Płytkę niezwłocznie umieszczano w czytniku oznaczającym względną intensywność luminescencji (Anthos Lucy-1, Salzburg, Austria).

3.4.4 Oznaczanie aktywności mieloperoksydazy w homogenatach komórkowych

W celu oznaczenia aktywności MPO komórki zawieszano w 0,5% roztworze heksadecylotrimetyloaminy (Sigma, Steinham, Niemcy) w DPBS (pH = 6,0). Po trzykrotnym zamrożeniu i rozmrożeniu zawiesinę komórkową wirowano (15 min, 400 g, temp. 4°C). Z uzyskanego nadsączu pobierano próbki po 100 µl, które rozcieńczano w 2,9 ml DPBS (pH = 6,0) zawierającego 0,167 mg/ml chlorowodorku *o*-dianizydyny i 0,0005% nadtlenku wodoru (substraty reakcji barwnej). Uzyskany roztwór nakładano na płytkę 96-dołkową (200 µl/dołek) i inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono absorpcję dla $\lambda = 460$ nm. Aktywność MPO wyznaczano z krzywej standardowej.

3.5 Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy pomocy funkcji statystycznych używanego arkusza kalkulacyjnego (Microsoft Excel). O ile nie podano inaczej, wyniki przedstawiono jako średnią +/- SD. Istotność statystyczną różnic pomiędzy grupami badano przy pomocy analizy ANOVA oraz testu Studenta. Za istotną przyjmowano wartość $p<0,05$.

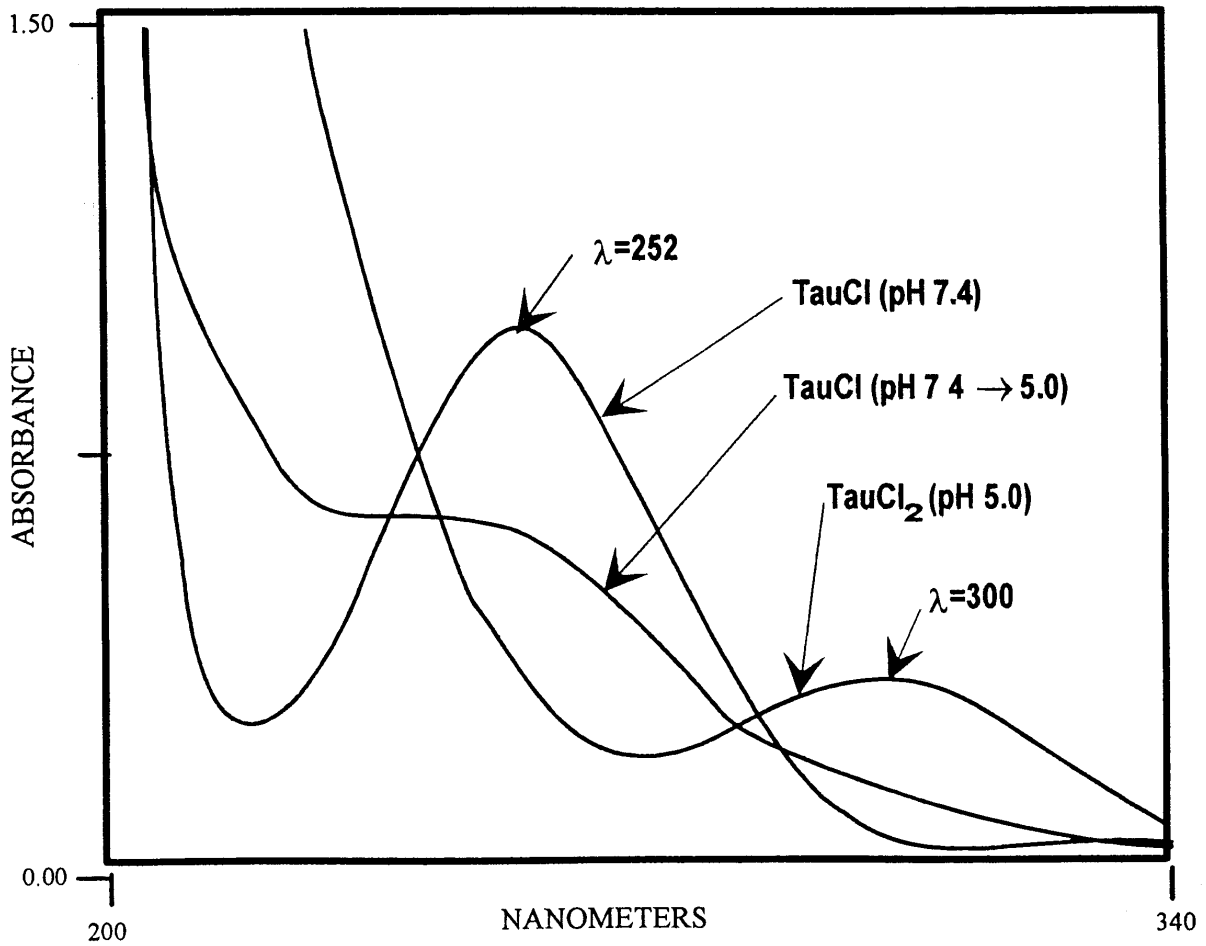
4. Wyniki

4.1 Określenie trwałości chloraminy (TauCl) i bromaminy tauryny (TauBr)

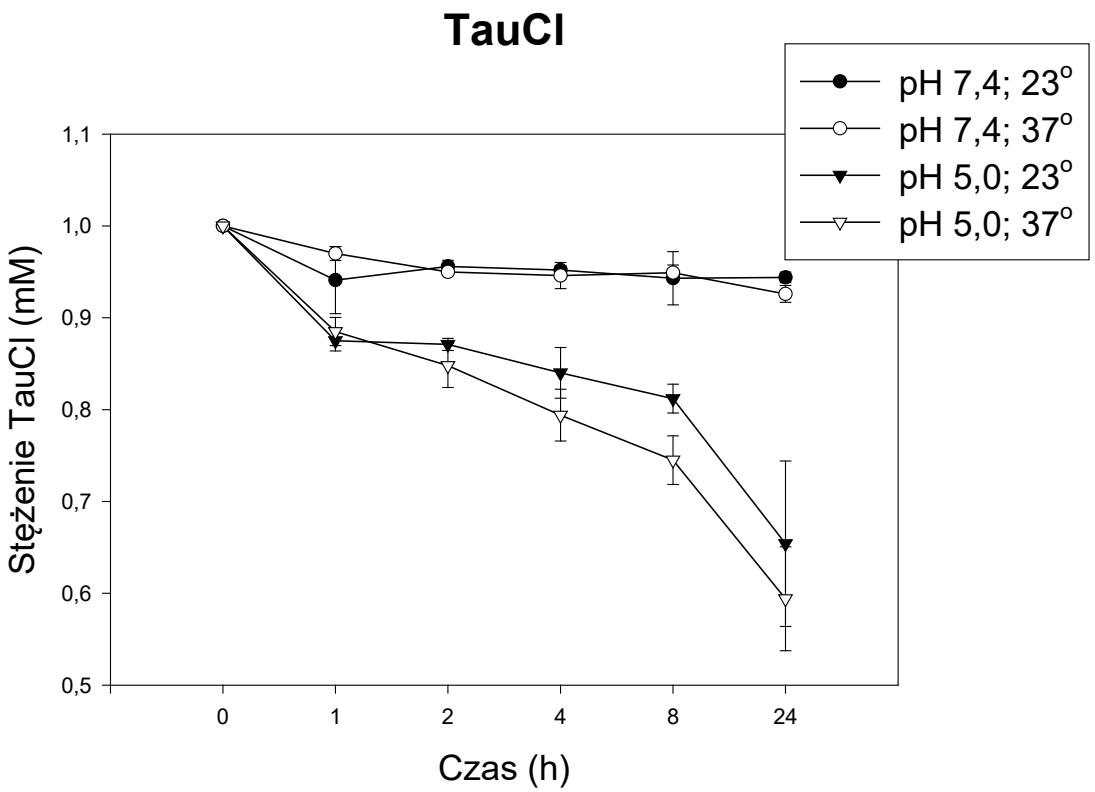
Zbadano prędkość rozkładu TauCl i TauBr w temperaturze +4 i +23°C (przechowywanie) oraz +37°C (działanie *in vivo*) przy pH=7,4 (fizjologicznym) i 5,0 (odzwierciedlającym warunki ostrego odczynu zapalnego).

Potwierdzono, że podstawowy mechanizm rozkładu obu związków stanowi dysproporcjonowanie (do tauryny oraz odpowiednio $TauCl_2$ i $TauBr_2$) (ryc. 2). W przypadku TauBr już w silnie zasadowym pH równowaga reakcji jest silnie przesunięta w stronę $TauBr_2$, stąd konieczność zastosowania znacznego nadmiaru Tau w stosunku do NaOBr podczas syntezy TauBr (p. rozdział 3.3.3); w miarę spadku pH równowaga ta ulega dalszemu przesunięciu w stronę $TauBr_2$, co w pH=5,0 prowadzi do niemal natychmiastowego dysproporcjonowania ok. 40% początkowej ilości TauBr (ryc. 4 i 6).

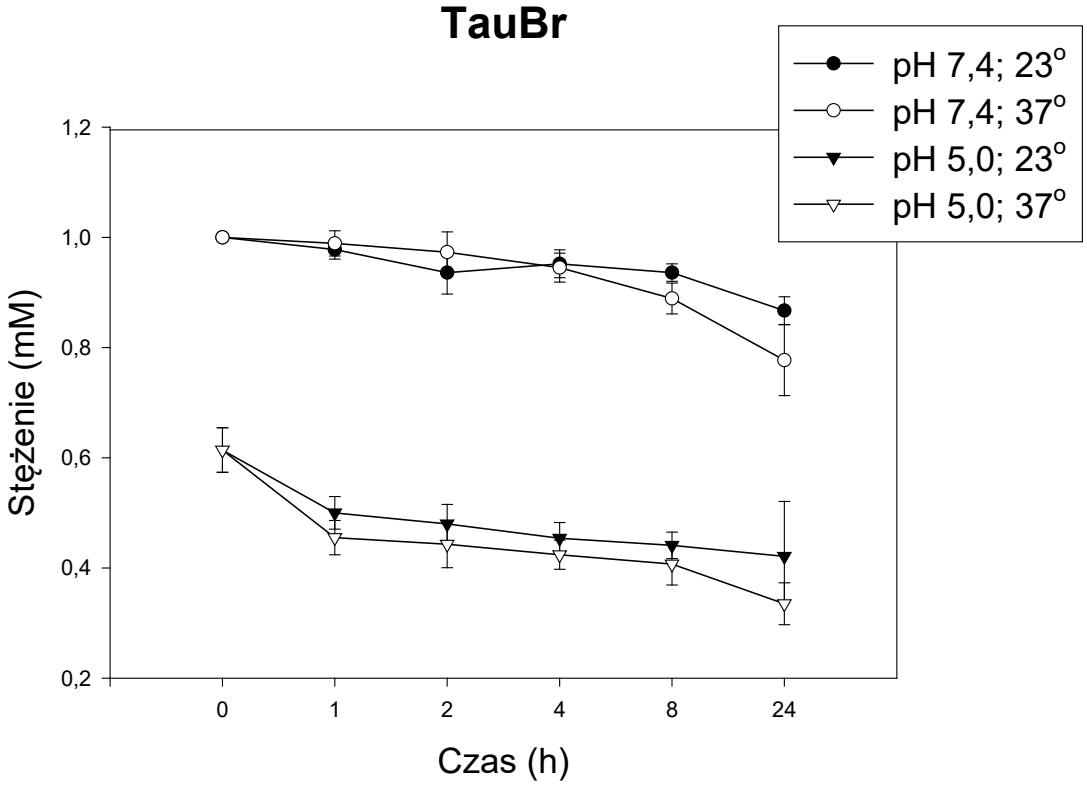
Wszystkie pomiary wykonano metodą spektrofotometryczną. Parametry badanych substancji (λ_{max}, A) zestawiono w tabeli 1. (rozdział 3.3.3). Prędkość rozkładu badanych związków w zależności od temperatury i pH ilustrują ryc. 3-6 (stężenia przedstawione na wykresach dotyczą wyłącznie monohaloamin).



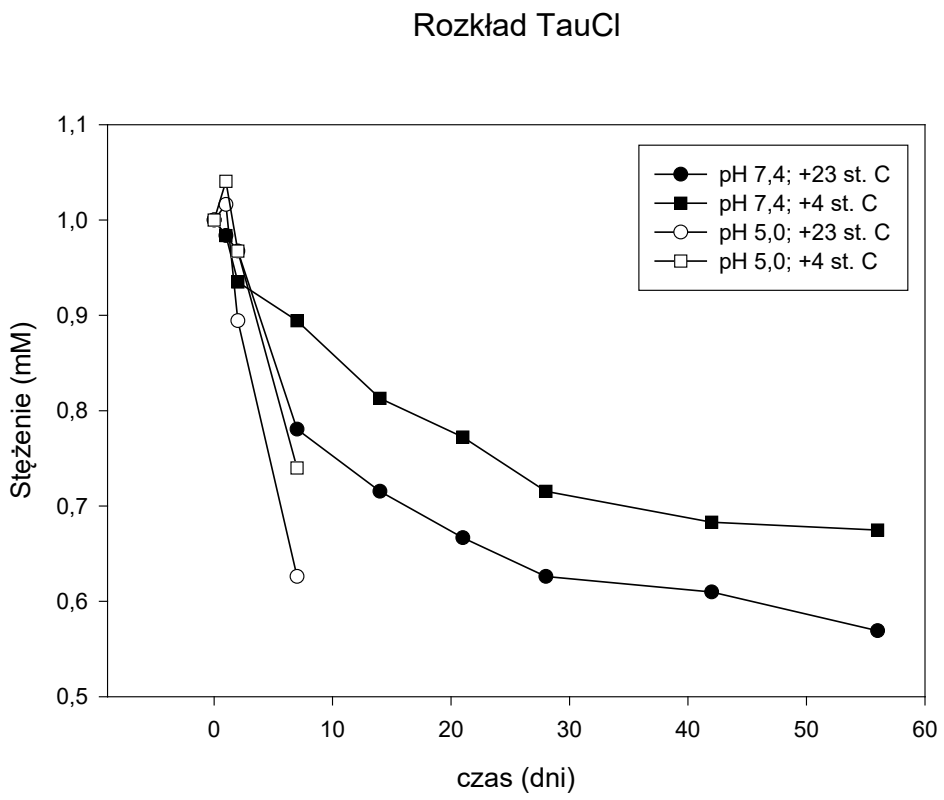
Ryc. 2 Widma absorpcyjne TauCl i $TauCl_2$ oraz mieszaniny obu związków powstającej przejściowo przy zmianie pH z 7,4 do 5,0. Dla TauBr przebieg wykresów jest analogiczny; jedynie maksima występują dla długości fali większej o 36 nm (por. tab.1).



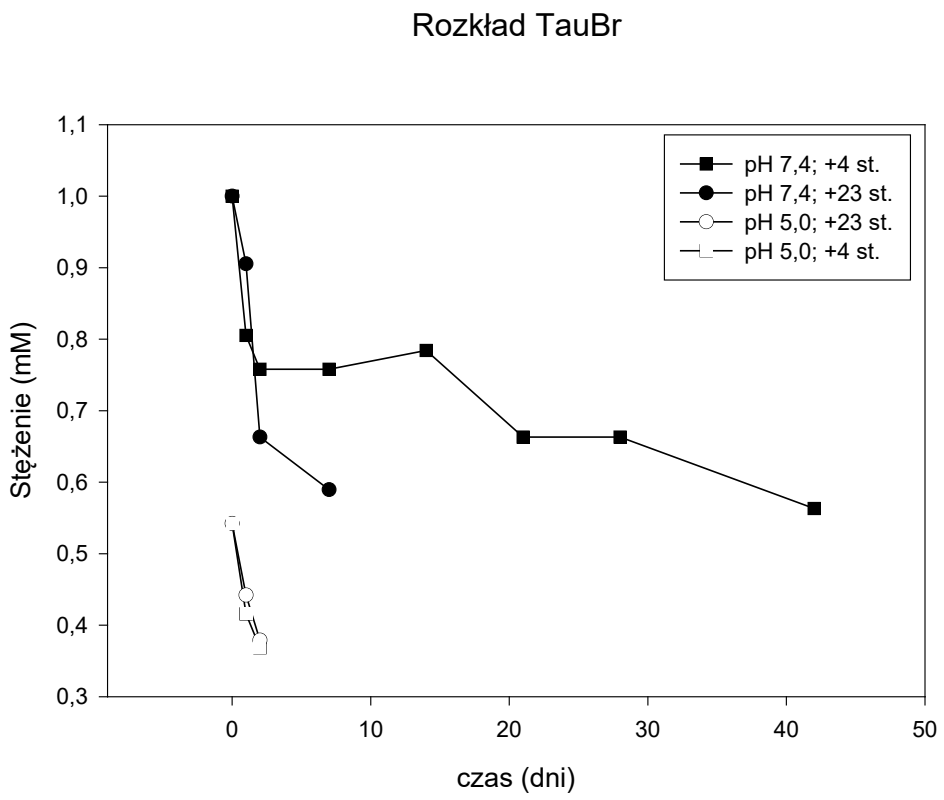
Ryc. 3. Rozkład TauCl – zmiana stężenia w funkcji czasu w ciągu 24 h w zależności od pH i temperatury. Przedstawione wyniki stanowią średnią (+/- SD) z trzech oddzielnych eksperymentów.



Ryc. 4. Rozkład TauBr – zmiana stężenia w funkcji czasu w ciągu 24 h w zależności od pH i temperatury. Przedstawione wyniki stanowią średnią (+/- SD) z trzech oddzielnych eksperymentów. Zwraca uwagę szybki rozkład TauBr w pH=5,0 – po zmianie pH roztworu z 7,4 do 5,0 ok. 40% związku ulega natychmiastowemu dysproporcjonowaniu do tauryny i $TauBr_2$ (por. ryc. 2).



Ryc. 5. Rozkład TauCl – zmiana stężenia w funkcji czasu w ciągu 8 tygodni w zależności od pH i temperatury; przedstawiono wyniki pojedynczego wybranego eksperymentu. Zwraca uwagę znacznie szybszy rozkład TauCl w pH=5,0.



Ryc. 6. Rozkład TauBr – zmiana stężenia w funkcji czasu w ciągu 8 tygodni w zależności od pH i temperatury; przedstawiono wyniki pojedynczego wybranego eksperymentu. Zwraca uwagę znacznie szybszy rozkład TauBr niż TauCl niezależnie od pH i temperatury (por. ryc. 5).

Zbadano trwałość obu związków w obecności H_2O_2 i NO_2^- [Marcinkiewicz i wsp., 2005]. Stwierdzono, że H_2O_2 reaguje z TauBr, lecz nie z TauCl; NO_2^- nie reaguje z żadnym z badanych związków (tabela 2.).

Tab. 2. Reaktywność TauCl i TauBr w środowisku bezkomórkowym wobec NO_2^- i nadtlenku wodoru. Po 100 µM NO_2^- i H_2O_2 inkubowano z podanymi stężeniami TauCl i TauBr oraz tauryny (pH = 7,4). Poziom NO_2^- i H_2O_2 oznaczano po 1 h. Wyniki podano jako średnią (+/- SE) z pięciu oddzielnych eksperymentów; *p<0,001 wobec kontroli (za: Marcinkiewicz i wsp., Inflamm Res. 2005 Jan; 54(1): 42-9.; za zgodą współautorów).

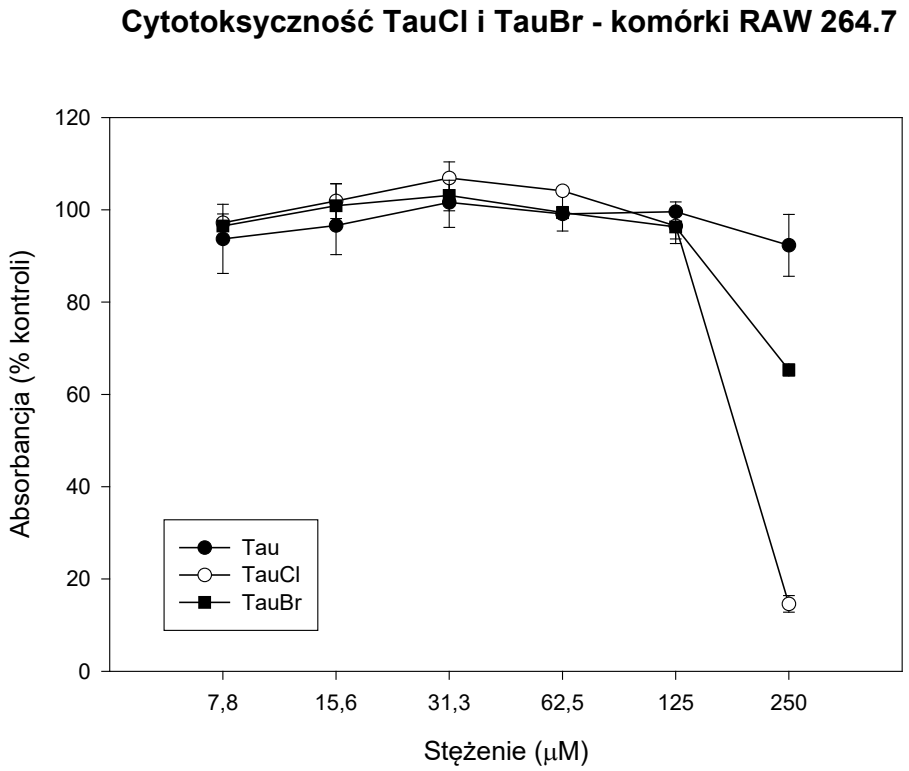
NO_2^-		H_2O_2	
100 µM inkubowano z:	Odzyskano NO_2^- (%):	100 µM inkubowano z:	Odzyskano H_2O_2 (%):
(kontrola)	100	(kontrola)	100
TauBr 1000 µM	84 (± 3)	TauBr 1000 µM	0
TauBr 500 µM	94 (± 3)	TauBr 500 µM	0
TauBr 250 µM	97 (± 1)	TauBr 250 µM	3 (± 1) *
TauBr 100 µM	**100 (± 1)**	**TauBr 100 µM**	**8 (± 3) ***
TauBr 50 µM	100 (± 1)	TauBr 50 µM	58 (± 5) *
TauCl 100 µM	**95 (± 2)**	**TauCl 100 µM**	**99 (± 3)**
Tau 1000 µM	101 (± 4)	Tau 1000 µM	97 (± 3)

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzić można, że:

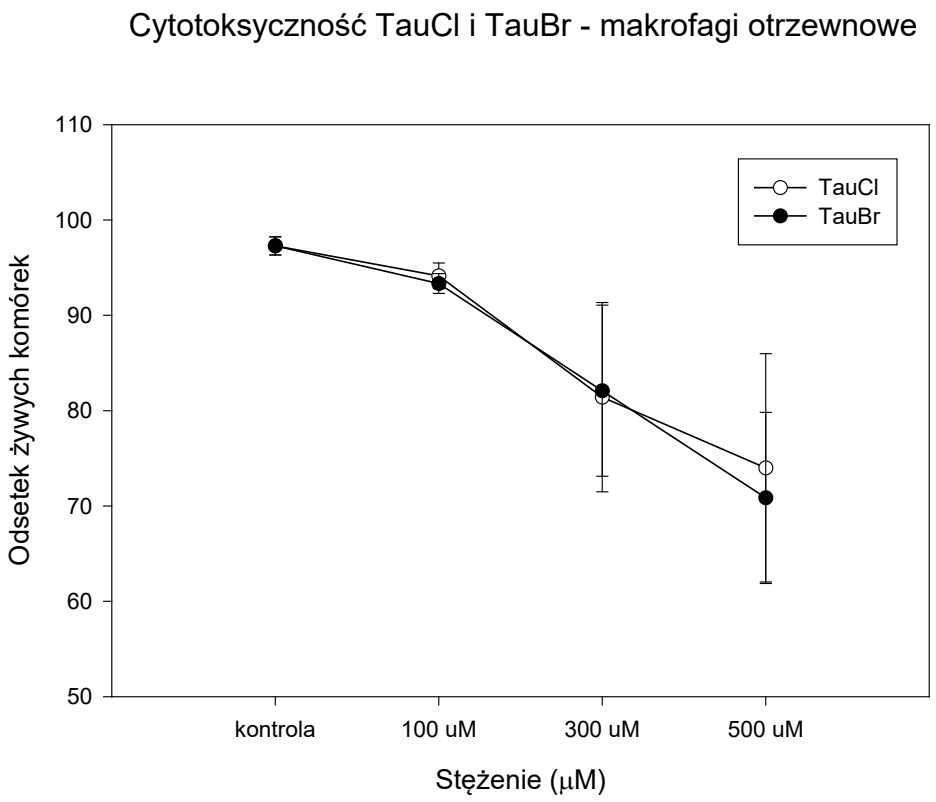
- trwałość obu związków jest zdecydowanie mniejsza w pH 5,0 niż w pH 7,4;
- dla obu związków trwałość maleje wraz ze wzrostem temperatury;
- niezależnie od warunków TauCl jest związkiem znacznie trwalszym od TauBr;
- badane związki wykazują różną reaktywność wobec H_2O_2 i NO_2^-: TauCl nie reaguje z żadnym z tych związków, natomiast TauBr tylko z H_2O_2.

4.2 Cytotoksyczność TauCl i TauBr

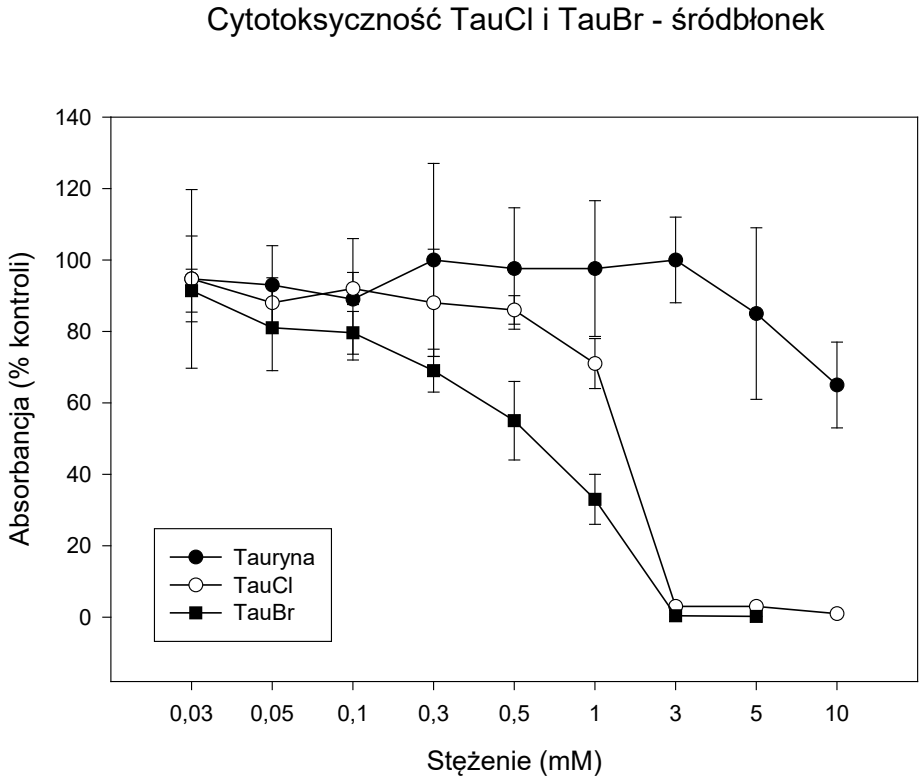
Cytotoksyczność badanych związków w hodowlach komórkowych *in vitro* mierzono przy pomocy testu MTT. Po 24 godzinach inkubacji komórek makrofagowych (RAW 264.7) ze wzrastającymi stężeniami TauCl i TauBr znamienna cytotoksyczność występuje przy stężeniu ok. 250 μM zarówno dla TauCl, jak i TauBr; TauCl jest w tym stężeniu bardziej toksyczna (ryc. 7.). Dla hodowanych *ex vivo* przez 24 godziny mysich makrofagów otrzewnowych stężenie to wynosi ok. 300 μM dla obu związków (ryc. 8). Dla komórek śródbłonka (linia ECV 304) znamienna cytotoksyczność występuje przy 300 μM dla TauBr i 1 mM dla TauCl (ryc. 9).



Ryc. 7. Cytotoksyczność tauryny i jej pochodnych wobec komórek RAW 264.7 w zależności od stężenia wyjściowego. Komórki inkubowano *in vitro* przez 24 godziny z różnymi stężeniami TauCl i TauBr (Tau zastosowano jako kontrolę). Żywotność komórek badano testem MTT. Przedstawione wyniki stanowią średnią (+/- SD) z trzech oddzielnych eksperymentów.

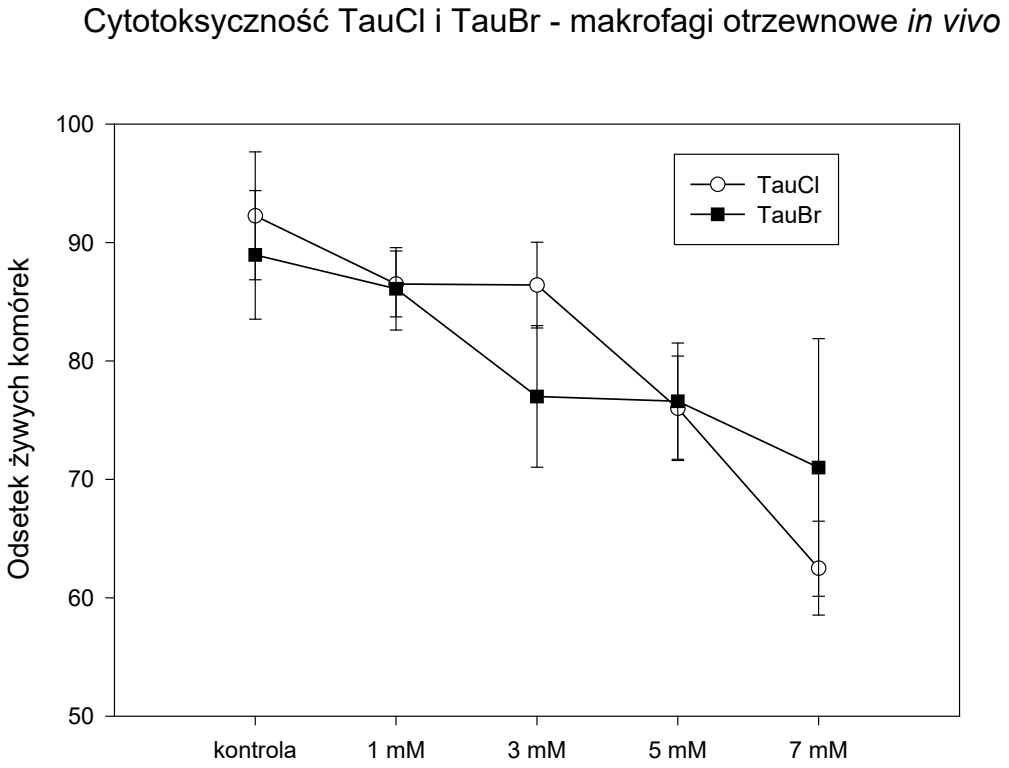


Ryc. 8. Cytotoksyczność pochodnych tauryny wobec mysich makrofagów otrzewnowych (hohowla *ex vivo*) w zależności od stężenia wyjściowego. Komórki inkubowano *in vitro* przez 24 godziny z różnymi stężeniami TauCl i TauBr (nie zastosowano kontroli Tau). Przedstawione wyniki stanowią średnią (+/- SD) z trzech oddzielnych eksperymentów.



Ryc. 9. Cytotoksyczność tauryny i jej pochodnych wobec komórek ECV 304 w zależności od stężenia wyjściowego. Komórki inkubowano *in vitro* przez 24 godziny z różnymi stężeniami TauCl i TauBr (Tau zastosowano jako kontrolę). Żywotność komórek badano testem MTT. Przedstawione wyniki stanowią średnią (+/- SD) z trzech oddzielnych eksperymentów.

Cytotoksyczność *in vivo* badano podając oba związki dootrzewnowo myszom w ilości 1 ml przy stężeniu 1-7 mM, a następnie wypłukując makrofagi otrzewnowe po 60 min. i oceniając ich zdolność do zahamowania wchłaniania błękitu trypanu. Stwierdzono zależny od wyjściowego stężenia efekt cytotoksyczny: dla TauCl odsetek żywych komórek maleje od ok. 92% dla 1 mM do 63% dla 7 mM, dla TauBr wartości te wynoszą odpowiednio 90 i 74% (ryc. 10). Jako maksymalne do doświadczeń *in vivo* przyjęto stężenie 5 mM, przy którym dla obu związków odsetek żywych komórek wynosi ok. 76% i nie ulega istotnej zmianie po 24 godzinach hodowli *ex vivo*.



Ryc. 10. Cytotoksyczność pochodnych tauryny wobec mysich makrofagów otrzewnowych *in vivo* w zależności od stężenia wyjściowego. TauCl i TauBr podawano dootrzewnowo myszom, u których wcześniej wywołano zapalenie otrzewnej (nie zastosowano kontroli Tau). Żywotność komórek oceniano *ex vivo* testem eliminacji błękitu trypanu po 60 min. od podania badanych związków. Przedstawione wyniki stanowią średnią (+/- SD) z trzech oddzielnych eksperymentów.

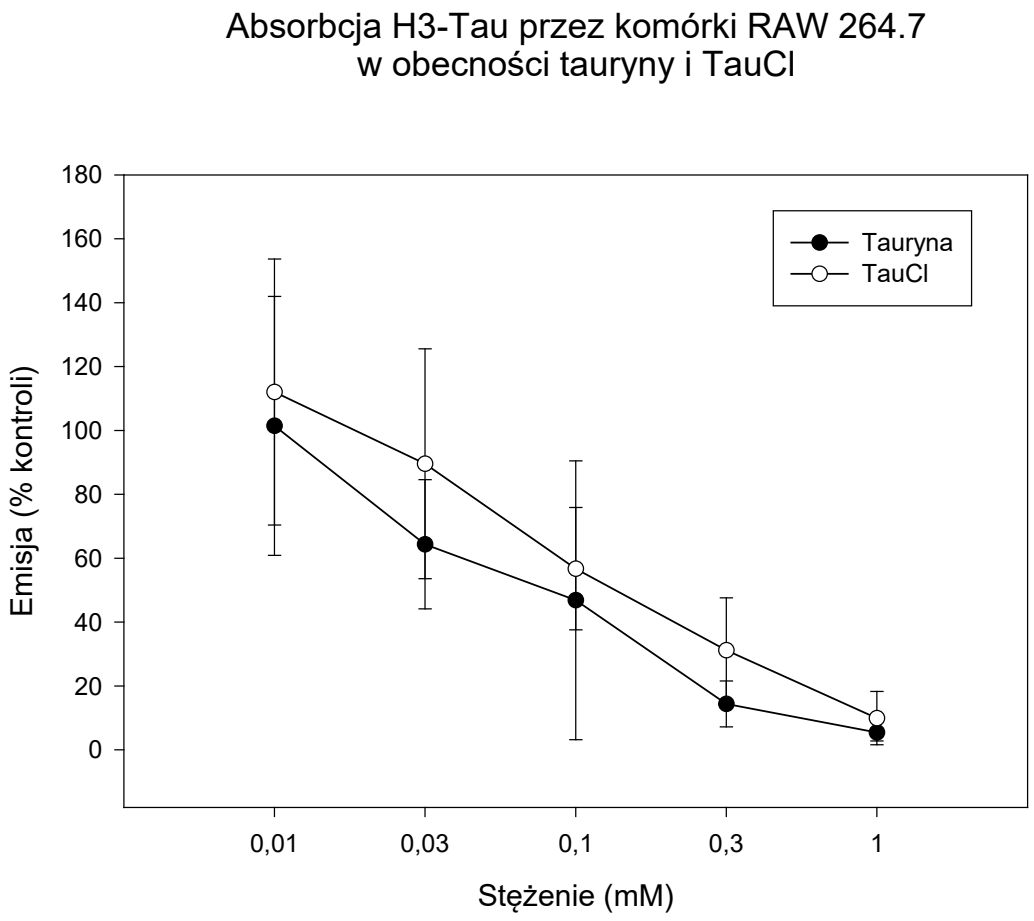
Przeprowadzone eksperymenty pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

- Dla obu związków znamienna cytotoksyczność *in vitro* w hodowli komórkowej trwającej 24 godziny występuje przy stężeniu ok. 250-300 µM.
- Różne typy komórek wykazują różną wrażliwość na badane substancje – dla komórek linii makrofagowej bardziej toksyczna jest TauCl, dla linii śródbłonkowej – TauBr.
- Aby uniknąć działania cytotoksycznego *in vivo* wskazane jest podawanie badanych związków w stężeniu nie przekraczającym 5 mM.

4.3 Transport TauCl przez błonę komórkową

W opracowanym modelu doświadczalnym komórki RAW 264.7 inkubowano ze wzrastającymi stężeniami Tau lub TauCl oraz stałą ilością H3-Tau. Jako kontroli wychwytu tauryny używano GES – inhibitora białka TauT. Tauryna powodowała w tej sytuacji kompetycyjne zahamowanie wychwytu H3-Tau przez komórki w sposób zależny od stężenia Tau. Zbadanie transportu TauBr w tym modelu nie było możliwe z uwagi na znaczny nadmiar tauryny pozostający w mieszaninie reakcyjnej po wytworzeniu TauBr (p. rozdział 3.3.3).

Wykazano, że tauryna i TauCl współzawodniczą o ten sam transporter (TauT, ulegający zahamowaniu pod wpływem GES): inkubacja z TauCl powoduje – analogicznie jak w przypadku tauryny – zależne od jej stężenia kompetycyjne zahamowanie wnikania H3-Tau do komórek (ryc. 11). Uzyskane wyniki nie dają jednak jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy TauCl jest transportowana do wnętrza komórki przy pomocy TauT, czy też jedynie blokuje go uniemożliwiając transport H3-Tau.



Ryc. 11. Wpływ tauryny i TauCl na wychwyt H3-Tau przez komórki RAW 264.7; oba związki powodują kompetycyjne zahamowanie wychwytu H3-Tau. „Emisja" oznacza liczbę scyntylacji zarejestrowanych przez licznik wyrażoną w procentach w odniesieniu do grupy kontrolnej (tj. komórek inkubowanych z H3-Tau bez obecności Tau bądź TauCl – p. rozdział 3.3.6) Przedstawione wyniki stanowią średnią (+/- SD) z czterech oddzielnych eksperymentów.

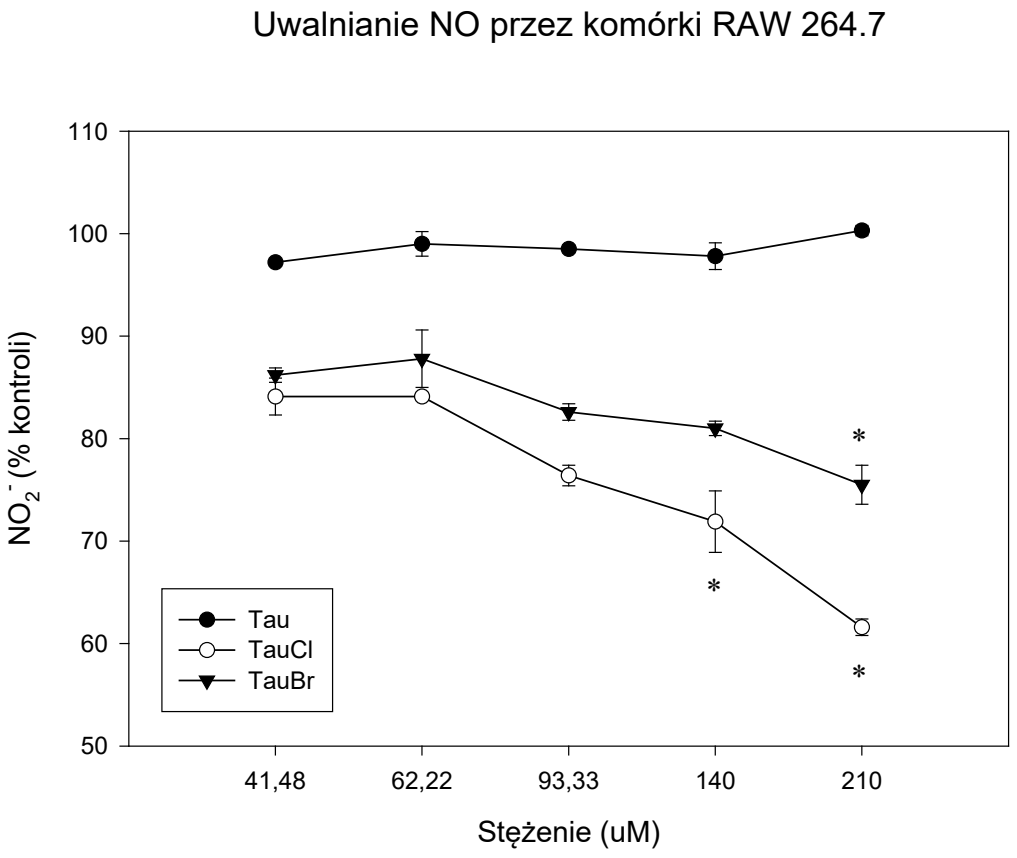
4.4 Ocena wpływu badanych związków na aktywność sekrecyjną makrofagów *in vitro*

Badanie wpływu TauCl i TauBr na aktywność sekrecyjną komórek odczynu zapalnego przeprowadzono na aktywowanych *in vitro* (LPS + IFN-γ) dwóch typach mysich komórek makrofagowych: linii makrofagowej RAW 264.7 oraz makrofagów wysięku otrzewnowego.

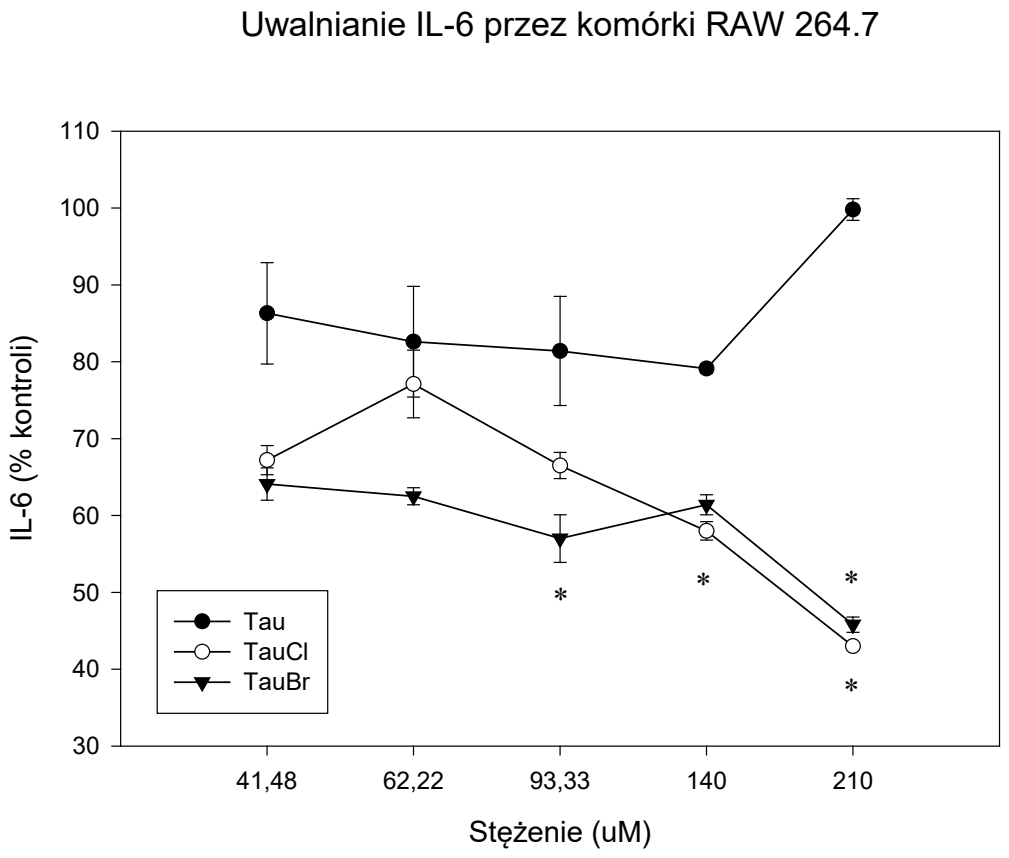
Wykazano, że w stężeniach niecytotoksycznych zarówno TauCl jak i TauBr w podobny, zależny od dawki sposób hamują uwalnianie tlenku azotu (badanego poprzez pomiar stężenia azotynów – trwałego metabolitu NO) oraz IL-6 przez komórki RAW 264.7; nie wykazano wpływu tych związków na uwalnianie TNF-α (ryc. 12-14).

Dla aktywowanych mysich makrofagów otrzewnowych obserwowano zahamowanie wydzielania IL-6, IL-10, IL-12 oraz TNF-α zarówno pod wpływem TauCl, jak i TauBr (ryc. 12).

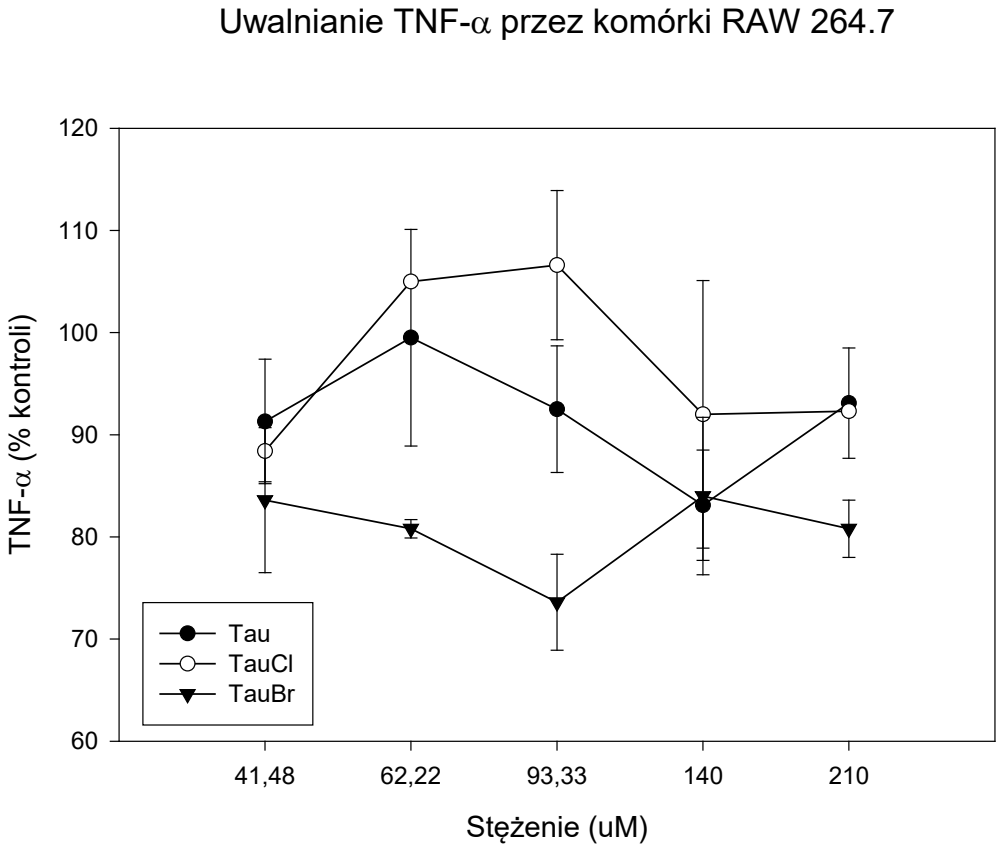
Oba związki wykazują podobne działanie, jednakże TauCl działa silniej od TauBr – w takim samym stężeniu wywołuje większe zahamowanie uwalniania badanych związków. Obserwacja ta dotyczy zarówno komórek RAW 264.7, jak i makrofagów wysięku otrzewnowego.



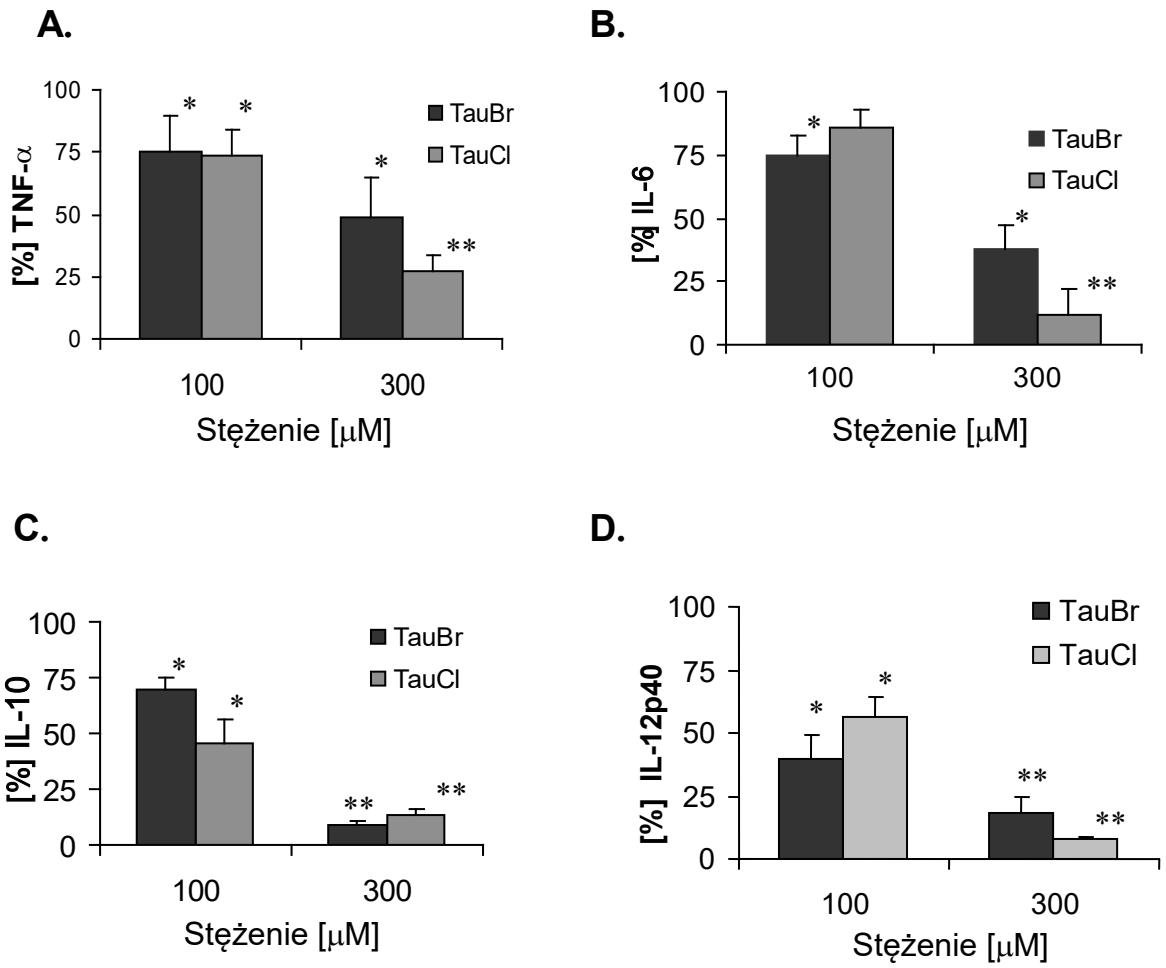
Ryc. 12. Wpływ Tau, TauCl i TauBr na aktywność sekrecyjną komórek RAW 264.7 – uwalnianie tlenku azotu. Komórki umieszczano w medium ze wzrastającymi stężeniami badanych związków, po 15 min. aktywowano przy pomocy LPS (0,1 μg/ml) i IFN-γ (20 U/ml), a następnie inkubowano przez 24 h. Przedstawione wyniki stanowią średnią (+/- SD) z trzech oddzielnych eksperymentów. *p<0,05 (względem kontroli).



Ryc. 13. Wpływ Tau, TauCl i TauBr na aktywność sekrecyjną komórek RAW 264.7 – uwalnianie IL-6. Komórki umieszczano w medium ze wzrastającymi stężeniami badanych związków, po 15 min. aktywowano przy pomocy LPS (0,1 μg/ml) i IFN-γ (20 U/ml), a następnie inkubowano przez 24 h. Przedstawione wyniki stanowią średnią (+/- SD) z trzech oddzielnych eksperymentów. *p<0,05 (względem kontroli).



Ryc. 14. Wpływ Tau, TauCl i TauBr na aktywność sekrecyjną komórek RAW 264.7 – uwalnianie TNF-α. Komórki umieszczano w medium ze wzrastającymi stężeniami badanych związków, po 15 min. aktywowano przy pomocy LPS (0,1 μg/ml) i IFN-γ (20 U/ml), a następnie inkubowano przez 24 h. Przedstawione wyniki stanowią średnią (+/- SD) z trzech oddzielnych eksperymentów. Nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu badanych związków na uwalnianie TNF-α.

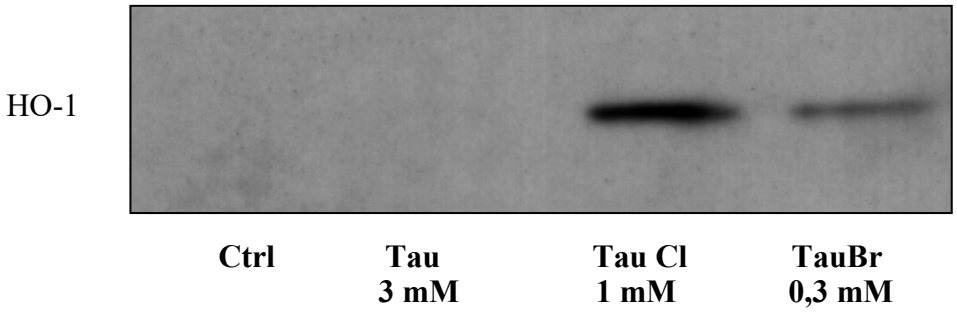


Ryc. 15. Wpływ TauBr i TauCl na produkcję cytokin przez aktywowane mysie makrofagi otrzewnowe. Komórki umieszczano w medium ze wzrastającymi stężeniami badanych związków, po 15 min. aktywowano przy pomocy LPS (0,1 μg/ml) i IFN-γ (20 U/ml), a następnie inkubowano przez 24 h Wyniki wyrażono w procentach w odniesieniu do grupy kontrolnej. *p<0,05; **p<0,01 (za: Marcinkiewicz i wsp., Inflamm Res. 2005 Jan; 54(1): 42-9.; za zgodą współautorów)

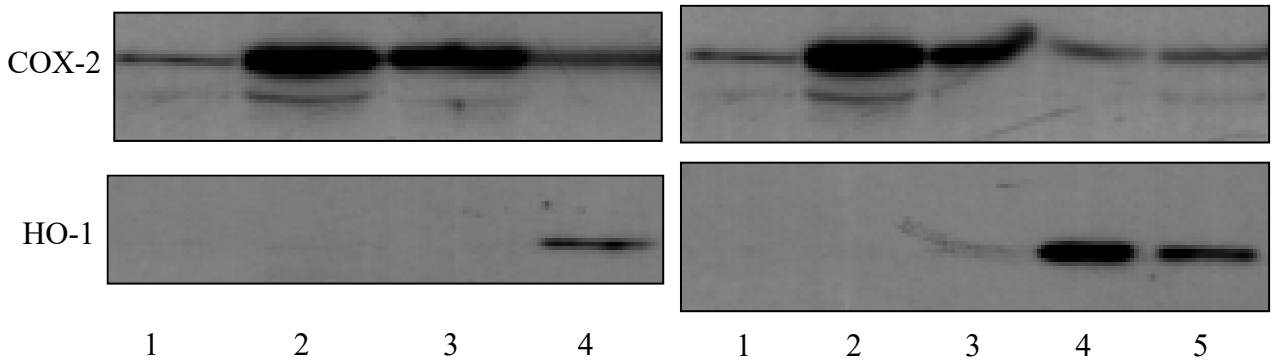
4.5 Ocena wpływu TauCl i TauBr na ekspresję indukowalnej formy oksygenazy hemowej-1 (HO-1) i indukowalnej formy cyklooksygenazy (COX-2) w komórkach śródbłonka

Zbadano wpływ TauCl i TauBr na ekspresję dwóch enzymów związanych z regulacją odczynu zapalnego. HO-1 wykazuje właściwości przeciwzapalne, natomiast COX-2 jest odpowiedzialna za syntezę prostanoidów (PGE_2), należących do głównych mediatorów odczynu zapalnego. Do badań wybrano komórki śródbłonka, których aktywacja ma istotne znaczenie dla rozwoju ostrego odczynu zapalnego.

Wykazano, że oba związki powodują indukcję ekspresji HO-1, hamują natomiast zależną od IL-1β indukcję ekspresji COX-2 (ryc. 16 i 17).



Ryc. 16: Indukcja HO-1 w komórkach HUVEC. Komórki inkubowano przez 24 h z badanymi związkami w podanych stężeniach. Ekspresję HO-1 badano metodą Western blot. Przedstawiono wyniki pojedynczego eksperymentu. HO-1 jest indukowana przez TauCl i TauBr, ale nie przez taurynę.



1. Kontrola
2. IL-1β 10 ng/ml
3. IL-1β + TauBr 0,03 mM
4. IL-1β + TauBr 0,1 mM

1. Kontrola
2. IL-1β 10 ng/ml
3. IL-1β + TauCl 0,1 mM
4. IL-1β + TauCl 0,3 mM
5. IL-1β + TauCl 1 mM

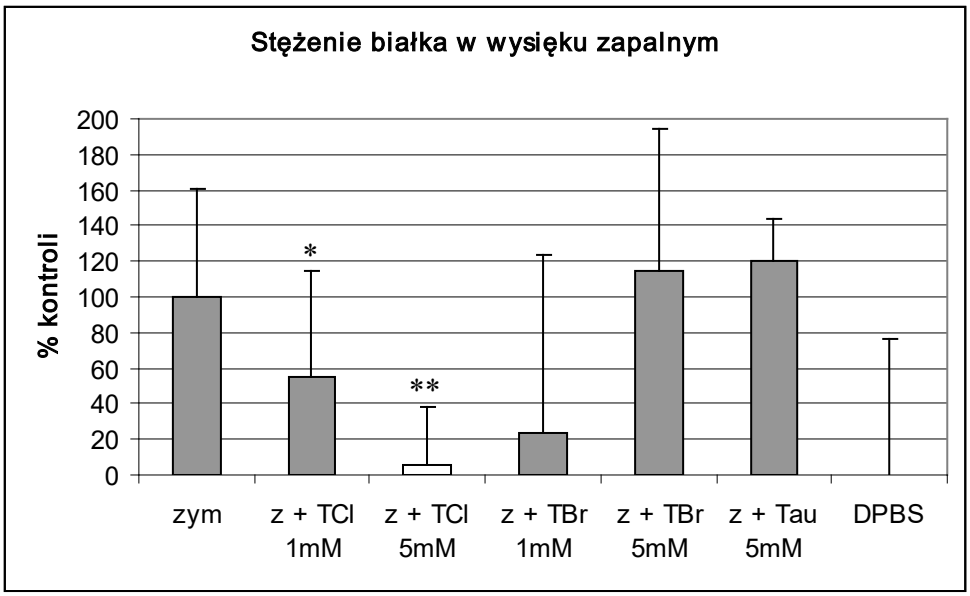
Ryc. 17. Indukcja COX-2 przez IL-1β w komórkach HUVEC. Komórki umieszczano w medium z badanymi związkami w podanych stężeniach, aktywowano przy pomocy IL-1β, a następnie inkubowano przez 24 h. Ekspresję COX-2 badano metodą Western blot. Przedstawiono wyniki pojedynczego eksperymentu. Zarówno TauBr, jak i TauCl hamują indukcję COX-2.

4.6 Ocena wpływu badanych związków na przebieg ostrego odczynu zapalnego *in vivo*

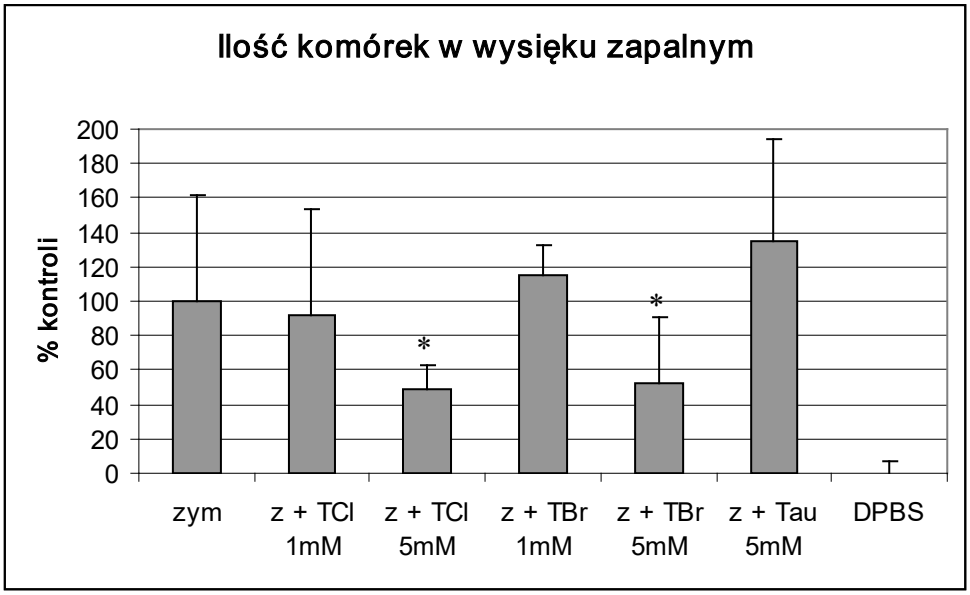
W opracowanym modelu ostrego odczynu zapalnego w komorach powietrznych („air pouch”) u myszy (p. rozdział 3.4) mierzono następujące parametry: stężenie białka całkowitego w wysięku zapalnym (parametr będący wypadkową przepuszczalności śródbłonka naczyń oraz aktywności komórek odczynu zapalnego), ilość komórek napływających do miejsca zapalenia, aktywność komórek w zakresie syntezy reaktywnych form tlenu (ROS) oraz aktywność MPO w homogenacie komórek.

W celu zmierzenia aktywności komórek w zakresie syntezy ROS zastosowano test chemiluminescencji zależnej od luminolu. Związek ten pozwala na określenie stężenia czynników indukujących chemiluminescencję zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowo. Jako kontrolny związek o silnym działaniu przeciwzapalnym zastosowano deksametazon; wykazał on silne działanie hamujące sygnał chemiluminescencji zależnej od luminolu.

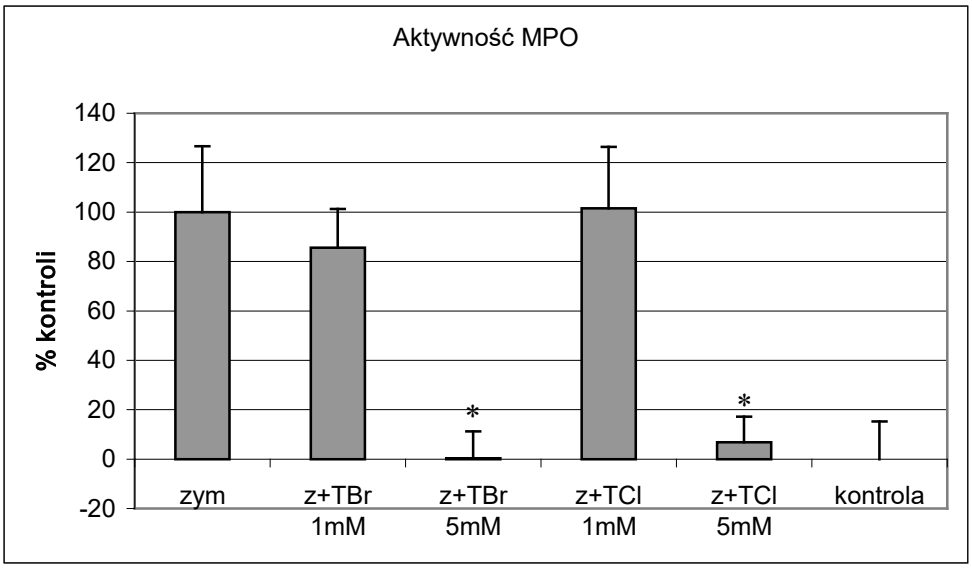
Dla TauCl obserwuje się zależne od dawki zmniejszenie stężenia białka całkowitego w wysięku zapalnym oraz liczby napływających komórek (na granicy istotności statystycznej; ryc. 18 i 19), jak i aktywności MPO (enzymu konstytutywnego neutrofilów) w homogenacie komórek (ryc. 20). Pod wpływem TauCl maleje również aktywność napływających neutrofilów w zakresie „wybuchu tlenowego” mierzona testem chemiluminescencji (ryc. 21). Dla TauBr stwierdzono spadek (na granicy istotności statystycznej) liczby napływających komórek i aktywności MPO oraz zahamowanie aktywności neutrofilów w zakresie „wybuchu tlenowego” (test chemiluminescencji). Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu tego związku na poziom białka w wysięku zapalnym.



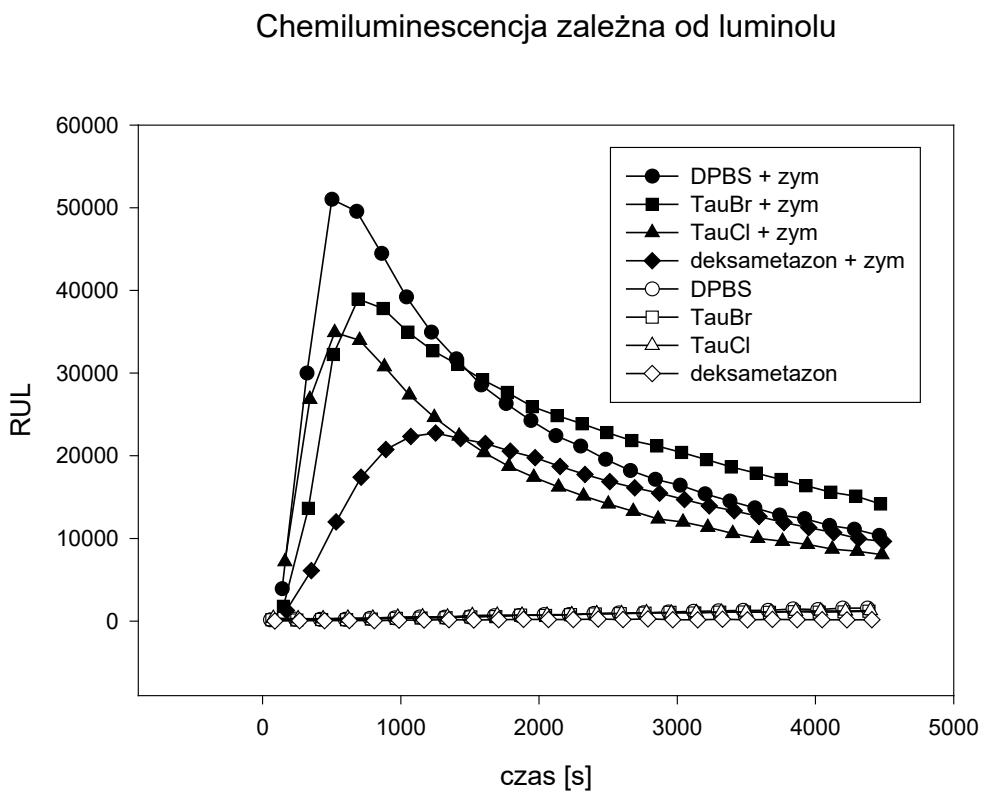
Ryc. 18. Stężenie białka w wysięku zapalnym *in vivo* w zależności od wyjściowego stężenia TauCl (TCl) i TauBr (TBr) oraz Tau. Związki podawano równocześnie z indukcją zapalenia (zymosan 1mg/ml); wysięk uzyskany po 4 godzinach inkubacji. Wyniki przedstawiono jako procent różnicy pomiędzy kontrolą pozytywną (zymosan, średnie stężenie białka 1,42 mg/ml) a negatywną (DPBS; średnie stężenie białka 0,78 mg/ml); *p<0,05; **p<0,0001 względem zymosanu. Tylko dla TauCl wykazano istotne statystycznie zmniejszenie stężenia białka w wysięku zapalnym.



Ryc. 19. Ilość komórek w wysięku zapalnym *in vivo* w zależności od wyjściowego stężenia TauCl i TauBr oraz Tau. Związki podawano równocześnie z indukcją zapalenia (zymosan 1mg/ml); wysięk uzyskany po 4 godzinach inkubacji. Wyniki przedstawiono jako procent różnicy pomiędzy kontrolą pozytywną (zymosan, średnia ilość komórek $14,2*10^6$) a negatywną (DPBS; średnia ilość komórek $1,03*10^6$); *p=0,05 względem zymosanu.



Ryc. 20. Aktywność MPO w homogenacie komórek wysięku zapalnego *ex vivo.* Zapalenie w komorze powietrznej indukowano zymosanem w obecności TauCl lub TauBr w podanych stężeniach. Oba związki hamują napływ neutrofilów podane w stężeniu 5 mM. *p<0,05 względem zymosanu.



Ryc. 21. Aktywność komórek wysięku zapalnego *ex vivo* w teście chemiluminescencji zależnej od luminolu. Ostry odczyn zapalny w komorze powietrznej indukowano zymosanem w obecności TauCl (5 mM), TauBr (5 mM) lub deksametazonu. Badano spontaniczne uwalnianie ROS przez komórki obecne w wysięku zapalnym (na wykresie: kontury symboli) oraz uwalnianie ROS przez komórki restymulowane *in vitro* zymosanem w obecności czynnika chemiluminescencyjnego (luminolu; na wykresie: symbole wypełnione). „RUL" oznacza jednostki względnej intensywności luminescencji.

Zebrane informacje pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

- Z obu badanych związków jedynie TauCl ma zdolność modyfikacji trzech głównych składowych odczynu zapalnego: przepuszczalności śródbłonka naczyń, napływu komórek do miejsca zapalenia oraz aktywności komórek w zakresie „wybuchu tlenowego".
- TauBr wykazuje zdolność hamowania napływu neutrofilów oraz produkcji aktywnych form tlenu przez napływające komórki, nie wpływa natomiast na przepuszczalność śródbłonka.

5. Dyskusja

TauCl i TauBr są pochodnymi tauryny i HOCl/HOBr. Haloaminy tauryny powstają w cytozolu komórek odczynu zapalnego zawierających MPO i EPO, to jest neutrofilów, monocytów i eozynofilów. Synteza TauCl jest katalizowana wyłącznie przez MPO; TauBr może być syntetyzowana zarówno przy udziale EPO, jak i MPO [Thomas i wsp., 1995; Winterbourn i wsp., 2000].

Rola TauBr w odczynie zapalnym *in vivo* pozostaje nie wyjaśniona, jednakże z badań *in vitro* wynika, że w stężeniach niecytotoksycznych dla komórek fagocytarnych wykazuje ona silne właściwości bakteriobójcze. Wykazano ostatnio, że TauBr podobnie jak TauCl indukuje i wzmaga ekspresję oksygenazy hemowej (HO-1), enzymu o właściwościach cytoprotekcyjnych i przeciwzapalnych [Olszanecki i Marcinkiewicz, 2004]. Wykazano również, że TauBr hamuje syntezę niektórych cytokin prozapalnych. Wyniki te wskazują na liczne podobieństwa pomiędzy TauCl i TauBr. Niezależnie zatem od tego, czy TauBr uzyskuje *in vivo* w odczynie zapalnym stężenia umożliwiające działanie immunomodulacyjne, należy sądzić, że – podobnie jak TauCl – wykaże ona w stężeniach niecytotoksycznych właściwości przeciwbakteryjne i przeciwzapalne, które wskazują na potencjalne zastosowanie terapeutyczne TauBr.

Celem pracy było zbadanie i porównanie tych właściwości TauCl i TauBr, które uzasadniają stosowanie obu związków w stężeniach tolerowanych *in vivo* w leczeniu schorzeń infekcyjnych przebiegających z ostrym odczynem zapalnym.

Przeprowadzono badania nad stabilnością TauCl i TauBr *in vitro* w warunkach fizjologicznych (temp. 37°C, pH 7,4); równolegle badano trwałość obu związków w temperaturze 4°C i 22°C w celu określenia optymalnych warunków ich przechowywania oraz w pH 5,0 charakterystycznym dla ostrego odczynu zapalnego.

Potwierdzono stabilność obu związków w środowisku bezkomórkowym, w warunkach fizjologicznych (37°C, pH = 7,4), co uzasadnia ich stosowanie *in vivo,* jak

również ich trwałość w temperaturze 4°C, co wskazuje na łatwość ich przechowywania, istotną w aspekcie zastosowania terapeutycznego. Obserwacje te są – w odniesieniu do TauCl – zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi [Gottardi i Nagl, 2002]. Z drugiej strony zaobserwowano istotny spadek trwałości obu związków wraz ze wzrostem temperatury i spadkiem pH (dotyczy to zwłaszcza TauBr). Obserwacje te mogą budzić wątpliwości co do skutecznego działania obu związków w warunkach odczynu zapalnego. Wątpliwości te zostały jednak rozwiane zarówno w niniejszej pracy (p. niżej), jak i – w odniesieniu do TauCl – w opublikowanych badaniach *in vivo* [Kwaśny-Krochin i wsp., 2002; Wojtecka-Łukasik i wsp., 2004; Verdrengh i Tarkowski, 2005].

Aby ocenić trwałość obu związków w środowisku zawierającym reaktywne formy tlenu, zbadano ponadto trwałość obu związków w obecności H_2O_2 i NO_2^- [Marcinkiewicz i wsp., 2005]. Nadtlenek wodoru jest podstawowym związkiem syntetyzowanym w procesie „wybuchu tlenowego" (p. rozdział 1.2), natomiast azotyny są głównymi metabolitami tlenku azotu wytwarzanego przez makrofagi. Wykazano, że H_2O_2 znosi aktywność TauBr, nie ma natomiast wpływu na działanie TauCl; inkubacja z NO_2^- nie wpływa na aktywność żadnego z badanych związków.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdzają badania innych autorów dotyczące TauCl [Nagl i wsp., 2000a; Nagl i wsp., 2000b; Gottardi i Nagl, 2002; Neher i wsp., 2004; Neher i wsp., 2005] i wskazują jednoznacznie, że TauCl i TauBr mogą być stosowane wyłącznie miejscowo w leczeniu schorzeń infekcyjnych przebiegających z ostrym odczynem zapalnym; systemowe podawanie TauCl i TauBr prowadzi do biodegradacji tych związków i uniemożliwia osiągnięcie stężenia terapeutycznego w tkance objętej zapaleniem. Bezpieczne stosowanie TauCl i TauBr wymaga jednak odpowiedzi na pytanie, czy efektywne stężenia terapeutyczne tych związków nie powodują wystąpienia działań ubocznych, a przede wszystkim – czy nie działają cytotoksycznie na komórki uczestniczące w ostrym odczynie zapalnym.

Jak wiadomo, oba badane związki cechuje dość znaczna cytotoksyczność. Postulowany mechanizm działania cytotoksycznego HOCl zależy od stężenia tego związku oraz warunków, w jakich komórki są na niego eksponowane i polegać może na indukcji nekrozy bądź apoptozy [Vissers i wsp., 1999]. Działanie cytotoksyczne HOCl drogą indukcji apoptozy wydaje się zależeć od wytwarzania chloramin, w tym przede wszystkim chloraminy tauryny [Englert i Schacter, 2002]. Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia TauCl jej działanie zmienia się: od modyfikacji aktywności sekrecyjnej komórki poprzez zahamowanie jej proliferacji aż do indukcji apoptozy; kluczową rolę w tych przemianach odgrywa indukcja białka p53 przez TauCl [Vile i wsp., 2000]. Równocześnie stwierdzono, że HOBr jest związkiem bardziej reaktywnym i cytotoksycznym od HOCl [Vissers i wsp., 1998]; podobnej zależności należało się zatem spodziewać pomiędzy TauBr i TauCl. W tej sytuacji przed przeprowadzeniem właściwych badań niezbędne stało się określenie stężenia obu związków, przy którym efekt cytotoksyczny mógłby wywierać istotny wpływ na uzyskiwane wyniki.

Zbadano działanie cytotoksyczne obu związków zarówno wobec komórek hodowanych *in vitro* (ryc. 7-9), jak i poddawanych działaniu TauCl i TauBr *in vivo* (ryc. 10). Znamienną cytotoksyczność stwierdzono dla obu związków przy stężeniach 250-300 μM, przy czym dla komórek linii makrofagowej bardziej toksyczna okazała się TauCl, dla komórek śródbłonka zaś – TauBr. W dalszych doświadczeniach nie przekraczano zatem stężenia 250 μM dla komórek linii makrofagowych oraz 300 μM dla makrofagów otrzewnowych. Dla podawania TauCl i TauBr *in vivo* przyjęto jako maksymalne stężenie 5mM, przy którym dla obu związków odsetek żywych komórek wynosi ok. 76% i nie ulega istotnej zmianie po 24 godzinach hodowli *ex vivo*.

Kontrowersyjny pozostaje problem przechodzenia TauCl przez błonę komórkową. Istnieją dane świadczące o tym, że TauCl działa śródkomórkowo: molekularny mechanizm jej działania ma obejmować – oprócz indukcji białka p53 – oksydatywną modyfikację kinazy IκB i tym samym zahamowanie aktywacji komórki zależnej od czynnika jądrowego NFκB

[Barua i wsp., 2001; Kanayama i wsp., 2002] lub oksydatywne uszkodzenie mitochondriów i aktywację kaspazy-9 [Klamt i Schacter, 2005]. Inne prace wskazują na działanie regulacyjne TauCl poprzez czynniki transkrypcyjne NFκB oraz AP-1 oraz poprzez oddziaływanie na syntezę białek na różnych jej etapach (transkrypcji, translacji i obróbki posttranslacyjnej), jednakże nie dostarczają one bezpośrednich dowodów na działanie TauCl wewnątrz komórki [Marcinkiewicz i wsp., 1995; Park i wsp., 1995; Quinn i wsp., 1996; Kontny i wsp., 2000; Liu i wsp., 2003; Emerson i wsp., 2005; Kim i Kim, 2005]. Alternatywny postulowany mechanizm działania TauCl polegać ma na oddziaływaniu z białkami błonowymi bez wnikania do wnętrza komórki [Midwinter i wsp., 2004] bądź transchlorynacji – chlorowaniu innych drobnocząsteczkowych związków (np. glicyny) przez TauCl z wytworzeniem chloramin o większej niż w przypadku TauCl zdolności do przechodzenia przez błonę komórkową, a tym samym do działania śródkomórkowego, co miałoby wyjaśniać obserwowaną modyfikację oksydatywną białek śródkomórkowych pod wpływem TauCl [Peskin i wsp., 2005].

W niniejszej pracy podjęto próbę weryfikacji hipotezy o wykorzystywaniu przez TauCl błonowego białka transportowego dla tauryny (TauT) [Tappaz, 2004] do wnikania do wnętrza komórki. W tym celu przeprowadzono serię eksperymentów z wykorzystaniem tauryny znakowanej trytem (H3-Tau). Wykazano, że tauryna i TauCl współzawodniczą o ten sam transporter: inkubacja z TauCl powoduje – analogicznie jak w przypadku tauryny – zależne od jej stężenia kompetycyjne zahamowanie wnikania H3-Tau do komórek (ryc. 11). Niestety, nie udało się przeprowadzić wszystkich zaplanowanych eksperymentów z zastosowaniem znakowanej TauCl (H3-TauCl), a doświadczenia, które przeprowadzono, nie dały jednoznacznych wyników. W tej sytuacji można jedynie stwierdzić, że TauCl wiąże się z białkiem TauT i blokuje go, otwarte pozostaje natomiast pytanie, czy TauCl wykorzystuje białko TauT do przechodzenia przez błonę komórkową. Uzyskanie odpowiedzi na to pytanie wymagać będzie dalszych badań.

W licznych pracach wykazano wpływ TauCl na aktywność sekrecyjną różnych rodzajów komórek: aktywowanych makrofagów w zakresie uwalniania NO i TNF-α [Park i wsp., 1993; Park i wsp., 1995; Kim i wsp., 1996; Park i wsp., 1997], jak również PGE_2 i IL-6 [Marcinkiewicz i wsp., 1995] i innych mediatorów [Liu i Quinn, 2002; Quinn i wsp., 2003]; monocytów w zakresie produkcji TNF-α, IL-1β, IL-6 [Chorąży i wsp., 2002; Chorąży-Massalska i wsp., 2004] oraz IL-8 [Park i wsp., 2002], neutrofilów w zakresie uwalniania NO, TNF-α, IL-6 i PGE_2 [Marcinkiewicz i wsp., 1998], synowiocytów w odniesieniu do IL-6 i IL-8 [Kontny i wsp., 2000], komórek dendrytycznych wytwarzających NO, TNF-α, IL-6 i IL-12 [Marcinkiewicz i wsp., 1999] i komórek glejowych [Serban i wsp., 2003] (patrz tab. 3). W niniejszej pracy przeprowadzono porównanie działania TauCl i TauBr na wydzielanie cytokin przez aktywowane komórki linii makrofagowej (RAW 264.7) oraz aktywowane mysie makrofagi otrzewnowe; wyniki dla tych ostatnich zostały wcześniej opublikowane [Marcinkiewicz i wsp., 2005]. Na podstawie badań przeprowadzonych dotychczas w Katedrze Immunologii oraz publikacji wymienionych powyżej do badań wybrano – obok NO – TNF-α, IL-6, IL-10 oraz IL-12. Stwierdzono, że oba związki w stężeniu 100-300 μM powodują istotne, zależne od dawki zahamowanie syntezy NO oraz wybranych cytokin przez badane komórki (ryc. 11 i 12). TauCl wykazała silniejsze od TauBr działanie immunomodulacyjne.

Tab. 3. Wpływ TauCl na syntezę mediatorów reakcji zapalnej – zestawienie danych z piśmiennictwa (IC_{50} – stężenie w hodowli 24h powodujące spadek produkcji mediatora o 50%)

Mediator	IC_{50} dla TauCl	Model *in vitro*	Piśmiennictwo
Chemokiny MCP-1 i -2	ok. 500 μM	Makrofagi pęcherzykowe aktywowane LPS i IFN-γ	Liu i Quinn, 2002
IL-1β	ok. 250-300 μM	Ludzkie monocyty aktywowane LPS	Chorąży i wsp., 2002; Chorąży-Massalska i wsp., 2004
	ok. 400 μM	Ludzkie monocyty aktywowane LPS	Park i wsp., 2002
IL-6		Mysie neutrofile	Marcinkiewicz i wsp., 1998
	ok. 200 μM	Mysie komórki dendrytyczne aktywowane LPS i IFN-γ	Marcinkiewicz i wsp., 1999
	ok. 400-425 μM	Ludzkie monocyty aktywowane LPS	Chorąży i wsp., 2002; Chorąży-Massalska i wsp., 2004
	ok. 200 μM	Ludzkie monocyty aktywowane LPS	Park i wsp., 2002
	ok. 225 μM	Ludzkie synowiocyty aktywowane IL-1β	Kontny i wsp., 2000
IL-8	ok. 400 μM	Ludzkie monocyty	Park i wsp., 2002
	ok. 450 μM	Ludzkie synowiocyty aktywowane IL-1β	Kontny i wsp., 2000
TNF-α		Komórki makrofagowe RAW 264.7 aktywowane LPS i IFN-γ	Park i wsp., 1995
		Mysie neutrofile	Marcinkiewicz i wsp., 1998
	ok. 460-480 μM	Ludzkie monocyty aktywowane LPS	Chorąży i wsp., 2002; Chorąży-Massalska i wsp., 2004
NO		Mysie neutrofile	Marcinkiewicz i wsp., 1998
	ok. 250 μM	Mysie komórki dendrytyczne aktywowane LPS i IFN-γ	Marcinkiewicz i wsp., 1999
		Komórki makrofagowe RAW 264.7 aktywowane LPS i IFN-γ	Park i wsp., 1995; Park i wsp., 1997

Zbadano również wpływ TauCl i TauBr na ekspresję dwóch enzymów związanych z regulacją odczynu zapalnego: oksygenazy hemowej-1 (HO-1) oraz indukowalnej formy cyklooksygenazy (COX-2). HO-1 wykazuje właściwości przeciwzapalne, natomiast COX-2 jest odpowiedzialna za syntezę prostanoidów, przede wszystkim PGE_2 – jednego z głównych mediatorów odczynu zapalnego. Wstępne wyniki uzyskane dla komórek śródbłonka stymulowanych IL-1β (ryc. 13) wydają się wskazywać na efekt przeciwzapalny TauCl i TauBr uzyskiwany drogą indukcji HO-1, podobnie do efektu obserwowanego w komórkach makrofagowych [Olszanecki i Marcinkiewicz, 2004], przy równoczesnym zahamowaniu indukcji COX-2, analogicznie do efektu obserwowanego wcześniej w synowiocytach izolowanych od pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów [Kontny i wsp., 2003].

Na temat działania TauCl i TauBr w ostrym odczynie zapalnym *in vivo* zgromadzono dotychczas niewiele danych. Opublikowane dotąd prace koncentrują się na wpływie TauCl na przewlekłą reakcję zapalną [Kwaśny-Krochin i wsp., 2002], bądź dotyczą badania wybranych składowych reakcji zapalnej *ex vivo* oraz *in vitro* [Shasby i wsp., 1989; Grisham i wsp., 1990; Cantin, 1994; Tatsumi i Fliss, 1994]. Odnaleziono tylko jedną pracę dotyczącą modyfikacji ostrego odczynu zapalnego przez TauCl *in vivo* [Wojtecka-Łukasik i wsp., 2004]; w pracy tej oceniano jednakże aktywność neutrofilów izolowanych z krwi obwodowej, nie zaś – jak w pracy niniejszej – aktywność komórek bezpośrednio uczestniczących w reakcji zapalnej.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny wpływu TauCl i TauBr na trzy główne składowe ostrego odczynu zapalnego: przepuszczalność śródbłonka naczyń, prędkość napływu komórek do miejsca zapalenia oraz ich aktywność w zakresie „wybuchu tlenowego". Dla TauCl stwierdzono zależny od dawki istotny spadek poziomu białka oraz ilości komórek obecnych w wysięku zapalnym; dla TauBr zaobserwowano jedynie spadek ilości napływających komórek (ryc. 18 i 19). Dla obu związków wykazano zdolność hamowania napływu neutrofilów do miejsca zapalenia (spadek aktywności mieloperoksydazy – ryc. 20) oraz produkcji aktywnych form tlenu przez neutrofile mierzonej testem chemiluminescencji

(ryc. 21).

Równolegle badano wpływ TauCl na przebieg zapalenia w modelu nadwrażliwości kontaktowej (contact sensitivity) wywoływanej poprzez aplikację chlorku pikrylu na małżowinę uszną myszy. W modelu tym nie stwierdzono istotnego wpływu TauCl na badane punkty końcowe – przyrost grubości małżowiny usznej (obrzęk) oraz zawartość w tkance błękitu trypanu (podawanego dożylnie przyżyciowo; dane nie zaprezentowane). Uzasadnione wydaje się zatem stwierdzenie, iż TauCl wykazuje zdolność wielokierunkowego hamowania nieswoistego ostrego odczynu zapalnego *in vivo,* nie ma jednak wpływu na zależną od limfocytów T swoistą reakcję zapalną.

6. Podsumowanie

- Właściwości fizykochemiczne uzasadniają stosowanie terapeutyczne obu związków *in vivo,* jakkolwiek ich szybka biodegradacja wymusza częste podawanie leku i ogranicza zastosowanie badanych substancji do podawania miejscowego. TauCl jest związkiem bardziej trwałym i mniej reaktywnym od TauBr.
- Poszczególne typy komórek wykazują różną wrażliwość na działanie cytotoksyczne TauCl i TauBr. Dla uniknięcia działania cytotoksycznego oba związki należy stosować w stężeniach nie przekraczających 250-300 μM w warunkach hodowli komórkowych *in vitro* oraz 5 mM przy podawaniu *in vivo* do miejsca zapalenia.
- Wykazano, że TauCl współzawodniczy z tauryną o białko TauT. Nie udało się jednak uzyskać odpowiedzi na pytanie, czy TauCl wykorzystuje TauT do transportu do wnętrza komórki.
- Oba związki wykazują działanie immunomodulacyjne *in vitro* poprzez hamowanie wytwarzania cytokin i NO przez komórki odczynu zapalnego. Działanie immunomodulacyjne TauCl jest silniej wyrażone niż TauBr.
- *In vivo* jedynie TauCl wykazuje działanie na wszystkie trzy badane składowe ostrej reakcji zapalnej, tj. przepuszczalność śródbłonka naczyń, liczbę komórek napływających do miejsca zapalenia oraz syntezę aktywnych form tlenu. Dla TauBr obserwowano zahamowanie syntezy aktywnych form tlenu oraz spadek ilości neutrofilów w wysięku zapalnym.

7. Wnioski

Obie badane pochodne tauryny wykazują istotne działanie w ostrej reakcji zapalnej. Podstawienie atomu bromu zamiast chloru w cząsteczce związku zmienia jednak zasadniczo jego właściwości: jakkolwiek zachowana zostaje jego funkcja immunomodulacyjna, to jednak nowy związek ma słabsze właściwości przeciwzapalne, silniejsze natomiast – przeciwbakteryjne.

Dla TauCl wykazano wielokierunkowe działanie immunomudulacyjne: obok hamowania syntezy NO i cytokin przez aktywowane leukocyty związek ten wywiera istotne działanie na śródbłonek naczyń ograniczając wzrost jego przepuszczalności w ostrym odczynie zapalnym oraz migrację leukocytów do miejsca zapalenia i ich aktywność w zakresie „wybuchu tlenowego". TauBr hamuje produkcję cytokin i NO w stopniu porównywalnym z TauCl; wykazuje również podobne działanie hamujące migrację neutrofilów do miejsca zapalenia. Natomiast pomimo podobnego działania obu związków na komórki śródbłonka obserwowanego *in vitro*, tylko dla TauCl wykazano działanie na śródbłonek naczyń *in vivo*.

Oba związki wydają się pełnić istotne role w funkcjonowaniu układu odpornościowego: TauCl – i, być może, w mniejszym stopniu TauBr – uczestniczy w ograniczaniu nieswoistego ostrego odczynu zapalnego i promocji swoistej odpowiedzi immunologicznej, TauBr natomiast w większym zapewne stopniu odpowiada za eliminację drobnoustrojów.

Powyższe spostrzeżenia w połączeniu z większą trwałością TauCl zdają się wskazywać na potencjalne zastosowanie kliniczne tego właśnie związku. Należy jednak podkreślić, że szybki rozkład TauCl *in vivo* ogranicza jej zastosowanie do podawania miejscowego, jak również zmusza do częstej aplikacji leku zawierającego TauCl. Szersze zastosowanie terapeutyczne TauCl wymagać będzie opracowania takich postaci leku, które zwiększą trwałość TauCl lub też umożliwią stopniowe jej uwalnianie w miejscu zapalenia.

8. Streszczenie

Tauryna jest β-aminokwasem sulfonowym pełniącym istotną rolę regulacyjną w organizmie ludzkim – jest ona niezbędna dla prawidłowego rozwoju ośrodkowego układu nerwowego oraz funkcjonowania układu rozrodczego i immunologicznego. Liczne obserwacje wskazują zwłaszcza na jej istotne znaczenie dla prawidłowej funkcji granulocytów. Badania ostatnich 10 lat wykazały, że haloaminy tauryny (TauCl, TauBr) produkowane w odczynie zapalnym przez aktywowane neutrofile i eozynofile wykazują *in vitro* właściwości immunoregulacyjne i przeciwbakteryjne. Zastosowanie TauCl w miejscowym leczeniu infekcji (przede wszystkim w okulistyce i laryngologii) jest aktualnie przedmiotem badań klinicznych II fazy.

Celem pracy było zbadanie tych cech i właściwości obu związków, które uzasadniałyby ewentualne zastosowanie terapeutyczne TauBr w leczeniu chorób przebiegających z ostrym odczynem zapalnym.

Zbadano stabilność i trwałość TauCl i TauBr w środowisku bezkomórkowym, w różnych warunkach pH i temperatury. Potwierdzono, że oba związki ulegają dysproporcjonowaniu (do tauryny oraz odpowiednio $TauCl_2$ i $TauBr_2$). Stwierdzono, że trwałość obu związków jest zdecydowanie mniejsza w pH 5,0 niż w pH 7,4; dla obu związków trwałość maleje ponadto wraz ze wzrostem temperatury. Niezależnie od warunków TauCl jest związkiem znacznie trwalszym od TauBr. W odniesieniu do reaktywnych form tlenu stwierdzono różną reaktywność badanych związków wobec H_2O_2 i NO_2^-: TauCl nie reaguje z żadnym z tych związków, natomiast TauBr tylko z H_2O_2.

Zbadano cytotoksyczność obu związków i określono maksymalne niecytotoksyczne stężenia w hodowlach komórkowych *in vitro,* jak i przy podawaniu *in vivo* do miejsca zapalenia. Stwierdzono różną wrażliwość poszczególnych typów komórek na badane substancje – dla komórek linii makrofagowej bardziej toksyczna okazała się TauCl, dla linii

śródbłonkowej – TauBr. Dla obu związków stwierdzono występowanie znamiennej cytotoksyczności *in vitro* w hodowli komórkowej trwającej 24 godziny przy stężeniu ok. 250-300 μM. Aby uniknąć działania cytotoksycznego na komórki wysięku zapalnego przy podawaniu badanych związków *in vivo* wskazane jest podawanie ich w stężeniu nie przekraczającym 5 mM.

Podjęto próbę ustalenia mechanizmu transportu TauCl przez błonę komórkową. W tym celu przeprowadzono serię eksperymentów z użyciem tauryny znakowanej trytem. Wykonane doświadczenia pozwoliły stwierdzić, że tauryna i TauCl współzawodniczą o ten sam transporter (TauT, ulegający zahamowaniu pod wpływem GES). Uzyskane wyniki nie dają jednak jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy TauCl jest transportowana do wnętrza komórki przy pomocy TauT, czy też jedynie blokuje go uniemożliwiając transport znakowanej tauryny.

Zbadano wpływ TauCl i TauBr *in vitro* na wytwarzanie cytokin i NO przez komórki uczestniczące w odczynie zapalnym. Wykazano, że w stężeniach niecytotoksycznych zarówno TauCl jak i TauBr w podobny, zależny od dawki sposób hamują uwalnianie tlenku azotu oraz IL-6 przez komórki RAW 264.7; nie wykazano wpływu tych związków na uwalnianie TNF-α. Dla aktywowanych mysich makrofagów otrzewnowych obserwowano zahamowanie wydzielania IL-6, IL-10, IL-12 oraz TNF-α zarówno pod wpływem TauCl, jak i TauBr. W obu przypadkach stwierdzono silniejsze działanie TauCl niż TauBr – przy takim samym stężeniu odnotowano większe zahamowanie uwalniania badanych mediatorów przez TauCl.

Ponadto zbadano wpływ TauCl i TauBr na ekspresję w komórkach śródbłonka HO-1 i COX-2 – dwóch enzymów związanych z regulacją odczynu zapalnego. Wykazano, że oba związki powodują indukcję ekspresji HO-1, hamują natomiast zależną od IL-1β indukcję ekspresji COX-2.

Zbadano wpływ obu związków na przebieg ostrej reakcji zapalnej *in vivo*. Badania

przeprowadzono w modelu ostrego zapalenia w podskórnej komorze powietrznej („air pouch”) u myszy. Mierzono następujące parametry: stężenie białka całkowitego w wysięku zapalnym (parametr będący wypadkową przepuszczalności śródbłonka naczyń i aktywności komórek odczynu zapalnego), ilość komórek napływających do miejsca zapalenia, aktywność MPO (enzymu konstytutywnego neutrofilów) w homogenacie komórek oraz aktywność komórek w zakresie syntezy reaktywnych form tlenu (ROS) . Dla TauCl zaobserwowano zależne od dawki zmniejszenie stężenia białka całkowitego w wysięku zapalnym oraz liczby napływających komórek, jak i aktywności MPO w homogenacie komórek. Stwierdzono również spadek aktywności napływających neutrofilów w zakresie „wybuchu tlenowego” pod wpływem TauCl (mierzony testem chemiluminescencji). Dla TauBr stwierdzono spadek liczby napływających komórek i aktywności MPO oraz zahamowanie aktywności neutrofilów w zakresie „wybuchu tlenowego” (test chemiluminescencji). Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu tego związku na poziom białka w wysięku zapalnym

Oba związki wydają się pełnić istotne role w funkcjonowaniu układu odpornościowego: TauCl – i, być może, w mniejszym stopniu TauBr – uczestniczy w ograniczaniu nieswoistego ostrego odczynu zapalnego i promocji swoistej odpowiedzi immunologicznej, TauBr natomiast w większym zapewne stopniu odpowiada za eliminację drobnoustrojów.

Powyższe spostrzeżenia w połączeniu z większą trwałością TauCl zdają się wskazywać na potencjalne zastosowanie kliniczne tego właśnie związku. Należy jednak podkreślić, że szybki rozkład TauCl *in vivo* ogranicza jej zastosowanie do podawania miejscowego, jak również zmusza do częstej aplikacji leku zawierającego TauCl. Szersze zastosowanie terapeutyczne TauCl wymagać będzie opracowania takich postaci leku, które zwiększą trwałość TauCl lub też umożliwią stopniowe jej uwalnianie w miejscu zapalenia.

9. Abstract

Taurine is a sulfonic β-amino acid of a significant regulatory role in human organism – it is necessary for proper development of central nervous system as well as for function of reproductive and immune system. Numerous observations indicate its particular importance for proper function of granulocytes. Studies performed over last 10 years have demonstrated that taurine haloamines (chloramine – TauCl – and bromamine – TauBr), synthesized in inflammatory reaction by activated neutrophils and eosinophils, show *in vitro* considerable immunoregulatory and antibacterial properties. Application of TauCl in topical treatment of infections (mostly in ophthalmology and laryngology) is presently studied in phase II clinical trials.

The aim of this work was to investigate and compare these properties of both compounds, which may give reasons for possible therapeutic application of TauBr in acute inflammatory conditions.

Stability of TauCl and TauBr in acellular environment, at various conditions of pH and temperature has been investigated. Cytotoxicity of both compounds has been studied and maximum non-cytotoxic concentrations determined, both for *in vitro* cell cultures and *in vivo* application at the site of acute inflammation. An attempt has been made to determine the mechanism of TauCl transport across the cellular membrane. Influence of TauCl and TauBr *in vitro* on production of cytokines and nitric oxide by inflammatory cells has been studied. Influence of both compounds on acute inflammatory reaction *in vivo* has been investigated.

Both studied taurine derivatives show significant effect in acute inflammatory reaction; TauBr as compared to TauCl is characterized by weaker anti-inflammatory properties and stronger antibacterial action. This observation as well as greater stability of TauCl indicates that TauCl is a more promising compound as related to clinical application.

10. Bibliografia

1. Aderem A, Underhill DM: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol. 1999; 17: 593-623.

2. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J: The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. Biochem J. 1988; 256: 251-255.

3. Babior BM: Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. Engl J Med 1978; 298: 659-68.

4. Banks MA, Porter DW, Martin WG, Castranova V: Taurine protects against oxidant injury to rat alveolar pneumocytes. Adv Exp Med Biol. 1992; 315: 341-354.

5. Barua M, Liu Y, Quinn MR: Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-kappaB activation and IkappaB kinase activity. J Immunol. 2001 Aug 15; 167(4): 2275-81.

6. Bitoun M, Tappaz M: Gene expression of taurine transporter and taurine biosynthetic enzymes in hyperosmotic states. In: Della Corte eds. Taurine 4, Plenum Press, NY 2000; 483: 239.

7. Cantin AM: Taurine modulation of hypochlorous acid-induced lung epithelial cell injury in vitro. Role of anion transport. J Clin Invest. 1994 Feb; 93(2): 606-14.

8. Chesney RW, Gusowski N, Dabbagh S: Renal cortex taurine content regulates renal adaptive response to altered dietary intake of sulfur amino acid. J Clin Chem 1985; 76: 2213-21.

9. Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH, Boldrini G, Castagneto M: The relationship between plasma taurine and other amino acid levels in human sepsis. J Nutr. 2000 Sep; 130(9): 2222-7.

10. Chorazy M, Kontny E, Marcinkiewicz J, Maslinski W: Taurine chloramine modulates cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. Amino Acids. 2002; 23(4): 407-13.

11. Chorazy-Massalska M, Kontny E, Kornatka A, Rell-Bakalarska M, Marcinkiewicz J, Maslinski W.: The effect of taurine chloramine on pro-inflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. Clin Exp Rheumatol. 2004 Nov-Dec; 22(6): 692-8.

12. Claesson R, Karlsson M, Zhang Y, Carlsson J: Relative role of chloramines, hypochlorous acid, and proteases in the activation of human polymorphonuclear leukocyte collagenase. J Leukoc Biol. 1996; 60: 598-602.

13. Davies JM, Horwitz DA, Davies KJ: Potential roles of hypochlorous acid and N-chloroamines in collagen breakdown by phagocytic cells in synovitis. Free Radic Biol Med. 1993; 15: 637-643.

14. Emerson DK, McCormick ML, Schmidt JA, Knudson CM: Taurine monochloramine activates a cell death pathway involving Bax and Caspase-9. J Biol Chem. 2005 Feb 4; 280(5): 3233-41.

15. Englert RP, Shacter E: Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species: amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis. J Biol Chem. 2002 Jun 7; 277(23): 20518-26.

16. Gaut JP, Yeh GC, Tran HD, Byun J, Henderson JP, Richter GM, Brennan ML, Lusis AJ, Belaaouaj A, Hotchkiss RS, Heinecke JW: Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Oct 9; 98(21): 11961-6.

17. Gordon RE, Shaked AA, Solano DF: Taurine protects hamster bronchioles from acute NO2-induced alterations. Am J Pathol. 1986 Dec; 125(3): 585-600.

18. Gottardi W, Nagl M: Chemical properties of N-chlorotaurine sodium, a key compound in the human defence system. Arch Pharm (Weinheim). 2002 Nov; 335(9): 411-21.

19. Gottardi W, Hagleitner M, Nagl M.: N,N-dichlorotaurine: chemical and bactericidal properties. Arch Pharm (Weinheim). 2005 Oct; 338(10): 473-83.

20. Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL: Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia- dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. J Biol Chem. 1984; 259: 10404-10413.

21. Grisham MB, Gaginella TS, von Ritter C, Tamai H, Be RM, Granger DN: Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolyte transport, and epithelial cell viability. Inflammation. 1990 Oct; 14(5): 531-42.

22. Hagar HH: The protective effect of taurine against cyclosporine A-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. Toxicol Lett. 2004 Jul 15; 151(2): 335-43.

23. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood 1998; 92: 3007-17.

24. Henderson JP, Byun J, Williams MV, Mueller DM, McCormick ML, Heinecke JW: Production of brominating intermediates by myeloperoxidase. J Biol Chem. 2001; 275: 7867-75.

25. Idrissi AE, Trenkner E: Taurine as a modulator of excitatory and inhibitory neurotransmission. Neurochem Res. 2004 Jan; 29(1): 189-97.

26. Jong EC, Henderson WR, Klebanoff SJ: Bactericidal activity of eosinophil peroxidase. J Immunol. 1980 Mar; 124(3): 1378-82.

27. Kanayama A, Inoue J, Sugita-Konishi Y, Shimizu M, Miyamoto Y: Oxidation of Ikappa Balpha at methionine 45 is one cause of taurine chloramine-induced inhibition of NF-kappa B activation. J Biol Chem. 2002; 277: 24049-56

28. Kim C, Park E, Quinn MR, Schuller-Levis G: The production of superoxide anion and nitric oxide by cultured murine leukocytes and the accumulation of TNF-alpha in the conditioned media is inhibited by taurine chloramine. Immunopharmacology. 1996 Sep; 34(2-3): 89-95.

29. Kim JW, Kim C: Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated though Ras-ERK-NF-kappaB. Biochem Pharmacol. 2005 Sep 15; [Epub ahead of print]

30. Klamt F, Shacter E: Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage. J Biol Chem. 2005 Jun 3; 280(22): 21346-52.

31. Klebanoff SJ, Hamon CB: Role of myeloperoxidase mediated antimicrobial system in intact leukocytes. J Reticuloendothel Soc. 1992; 12: 170-5.

32. Kontny E, Szczepanska K, Kowalczewski J, Kurowska M, Janicka I, Marcinkiewicz J, Maslinski W: The mechanism of taurine chloramine inhibition of cytokine (interleukin-6, interleukin-8) production by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. Arthritis Rheum. 2000 Oct; 43(10): 2169-77.

33. Kontny E, Rudnicka W, Kowalczewski J, Marcinkiewicz J, Maslinski W: Selective inhibition of cyclooxygenase 2-generated prostaglandin E2 synthesis in rheumatoid arthritis synoviocytes by taurine chloramine. Arthritis Rheum. 2003 Jun; 48(6): 1551-5.

34. Koprowski M, Marcinkiewicz J: Taurine chloramine – its role in immunity and new perspectives for clinical use. Centr Eur J Immunol. 2002; 27(2): 69-74

35. Kwasny-Krochin B, Bobek M, Kontny E, Gluszko P, Biedron R, Chain BM, Maslinski W, Marcinkiewicz J: Effect of taurine chloramine, the product of activated neutrophils, on the development of collagen-induced arthritis in DBA 1/J mice. Amino Acids. 2002; 23(4): 419-26.

36. Learn DB, Fried VA, Thomas EL: Taurine and hypotaurine content of human leukocytes. J Leukoc Biol. 1990; 48: 174-182.

37. Liu Y, Quinn MR: Chemokine production by rat alveolar macrophages is inhibited by taurine chloramine. Immunol Lett. 2002 Jan 1; 80(1): 27-32.

38. Liu Y, Barua M, Serban V, Quinn MR: Production of inflammatory mediators by activated C6 cells is attenuated by taurine chloramine inhibition of NF-kappaB activation. Adv Exp Med Biol. 2003; 526: 365-72.

39. Mahalakshmi K, Pushpakiran G, Anuradha CV: Taurine prevents acrylonitrile-induced oxidative stress in rat brain. Pol J Pharmacol. 2003 Nov-Dec; 55(6): 1037-43.

40. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszynska T: Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. J Leukoc Biol. 1995; 58: 667-74.

41. Marcinkiewicz J: Neutrophil chloramines: missing links between innate and acquired immunity. Immunol Today. 1997; 18: 577-580.

42. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Bryniarski K, Nowak B: Taurine chloramine down-regulates the generation of murine neutrophil inflammatory mediators. Immunopharmacology. 1998; 40: 27-38.

43. Marcinkiewicz J, Nowak B, Grabowska A, Bobek M, Petrovska L, Chain B: Regulation of murine dendritic cell functions in vitro by taurine chloramine, a major product of the neutrophil myeloperoxidase-halide system. Immunology. 1999 Nov; 98(3): 371-8.

44. Marcinkiewicz J, Mak M, Bobek M, Biedron R, Bialecka A, Koprowski M, Kontny E, Maslinski W: Is there a role of taurine bromamine in inflammation? Interactive effects with nitrite and hydrogen peroxide. Inflamm Res. 2005 Jan; 54(1): 42-9.

45. Marquez LA, Dunford HB: Chlorination of taurine by myeloperoxidase. Kinetic evidence for an enzyme-bound intermediate. J Biol Chem. 1994; 269: 7950-6.

46. Mayeno AN, Curran AJ, Roberts RL, Foote CS: Eosinophils preferentially use bromide to generate halogenating agents. J Biol Chem. 1989 Apr 5; 264(10): 5660-8.

47. McLoughlin DM, Stapleton PP, Bloomfield FJ: Influence of taurine and a substituted taurine on the respiratory burst pathway in the inflammatory response. Biochem Soc Trans. 1991; 19: 73-78.

48. Midwinter RG, Peskin AV, Vissers MC, Winterbourn CC: Extracellular oxidation by taurine chloramine activates ERK via the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem. 2004 Jul 30; 279(31): 32205-11.

49. Nagl M, Hess MW, Pfaller K, Hengster P, Gottardi W: Bactericidal activity of micromolar N-chlorotaurine: evidence for its antimicrobial function in the human defense system. Animicrob Agents Chemother 2000a; 44: 2507-13.

50. Nagl M, Teuchner B, Pottinger E et al.: Tolerance of N-chlorotaurine, a new antimicrobial agent, in infectious conjunctivitis - a phase II pilot study. Ophthalmologica. 2000b; 214: 111-4.

51. Neher A, Nagl M, Appenroth E et al.: Acute otitis externa: efficacy and tolerability of N-chlorotaurine, a novel endogenous antiseptic agent. Laryngoscope. 2004; 114(5): 850-4.

52. Neher A, Fischer H, Appenroth E, Lass-Florl C, Mayr A, Gschwendtner A, Ulmer H, Gotwald TF, Gstottner M, Kozlov V, Nagl M: Tolerability of N-chlorotaurine in chronic rhinosinusitis applied via yamik catheter. Auris Nasus Larynx. 2005 Jul 21; [Epub ahead of print]

53. Olszanecki R, Marcinkiewicz J: Taurine chloramine and taurine bromamine induce heme oxygenase-1 in resting and LPS-stimulated J774.2 macrophages. Amino Acids. 2004 Aug; 27(1): 29-35.

54. Olszowska E, Olszowski S, Zgliczynski JM, Stelmaszynska T: Enhancement of proteinase-mediated degradation of proteins modified by chlorination. Int.J.Biochem. 1989; 21: 799-805.

55. Park E, Quinn MR, Wright CE, Schuller-Levis G: Taurine chloramine inhibits the synthesis of nitric oxide and the release of tumor necrosis factor in activated RAW 264.7 cells. J Leukoc Biol. 1993; 54: 119-24.

56. Park E, Schuller-Levis G, Quinn MR: Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and TNF-alpha in activated RAW 264.7 cells by mechanisms that involve transcriptional and translational events. J Immunol 1995; 154: 4778-84

57. Park E, Schuller-Levis G, Jia JH, Quinn MR. Preactivation exposure of RAW 264.7 cells to taurine chloramines attenuates subsequent production of nitric oxide and expression of iNOS mRNA. J Leukoc Biol. 1997; 61: 161-6.

58. Park E, Jia J, Quinn MR, Schuller-Levis G: Taurine chloramine inhibits lymphocyte proliferation and decreases cytokine production in activated human leukocytes. Clin Immunol. 2002 Feb; 102(2): 179-84.

59. Pelletier M, Roberge CJ, Gauthier M, Vandal K, Tessier PA, Girard D: Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. J Leukoc Biol. 2001 Sep; 70(3): 367-73.

60. Peskin AV, Midwinter RG, Harwood DT, Winterbourn CC: Chlorine transfer between glycine, taurine, and histamine: reaction rates and impact on cellular reactivity. Free Radic Biol Med. 2005 Feb 1; 38(3): 397-405.

61. Quinn MR, Park E, Schuller-Levis G: Taurine chloramine inhibits prostaglandin E2 production in activated RAW 264.7 cells by post-transcriptional effects on inducible cyclooxygenase expression. Immunol Lett. 1996 May; 50(3): 185-8.

62. Quinn MR, Barua M, Liu Y, Serban V: Taurine chloramine inhibits production of inflammatory mediators and iNOS gene expression in alveolar macrophages; a tale of two pathways: part I, NF-kappaB signaling. Adv Exp Med Biol. 2003; 526: 341-8.

63. Quinn MR, Liu Y, Barua M, Serban V: Taurine chloramine inhibits production of inflammatory mediators and iNOS gene expression in alveolar macrophages; a tale of two pathways: part II, IFN-gamma signaling through JAK/Stat. Adv Exp Med Biol. 2003; 526: 349-56.

64. Shasby DM, Hampson F: Effects of chlorinated amines on endothelial and epithelial barriers in vitro and ex vivo. Exp Lung Res. 1989 May; 15(3): 345-57.

65. Schuller-Levis G, Mehta PD, Rudelli R, Sturman J: Immunologic consequences of taurine

deficiency in cats. J Leukoc Biol. 1990 Apr; 47(4): 321-31.

66. Schuller-Levis G, Quinn MR, Wright C, Park E: Taurine protects against oxidant-induced lung injury: possible mechanism(s) of action. Adv Exp Med Biol. 1994; 359: 31-9.

67. Schuller-Levis GB, Park E: Taurine: new implications for an old amino acid. FEMS Microbiol Lett. 2003 Sep 26; 226(2): 195-202.

68. Serban V, Liu Y, Quinn MR: Production of nitric oxide by activated microglial cells is inhibited by taurine chloramine. Adv Exp Med Biol. 2003; 526: 357-64.

69. Sturman JA: Taurine in development. Physiol Rev. 1993 Jan; 73(1): 119-47.

70. Tappaz ML: Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. Neurochem Res. 2004 Jan; 29(1): 83-96.

71. Tatsumi T, Fliss H: Hypochlorous acid and chloramines increase endothelial permeability: possible involvement of cellular zinc. Am J Physiol. 1994 Oct; 267(4 Pt 2): H1597-607.

72. Teuchner B, Nagl M, Schidlbauer A, Ishiko H, Dragosits E, Ulmer H, Aoki K, Ohno S, Mizuki N, Gottardi W, Larcher C: Tolerability and efficacy of N-chlorotaurine in epidemic keratoconjunctivitis--a double-blind, randomized, phase-2 clinical trial. J Ocul Pharmacol Ther. 2005 Apr; 21(2): 157-65.

73. Thomas EL: Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: effect of exogenous system on antibacterial action against Escherichia coli. Infect Immun. 1979; 25: 110-4.

74. Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM: Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. J Clin Invest. 1983; 72: 441-454.

75. Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM: Preparation and characterization of chloramines. Meth Enzymol. 1986; 132: 569-71.

76. Thomas EL, Bozeman PM, Jefferson MM, King CC: Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines. J Biol Chem. 1995 Feb 17; 270(7): 2906-13.

77. van Dalen CJ, Kettle AJ: Substrates and products of eosinophil peroxidase. Biochem J. 2001 Aug 15; 358(Pt 1): 233-9.

78. Verdrengh M, Tarkowski A: Inhibition of septic arthritis by local administration of taurine chloramine, a product of activated neutrophils. J Rheumatol. 2005 Aug; 32(8): 1513-7.

79. Vile GF, Rothwell LA, Kettle AJ: Initiation of rapid, P53-dependent growth arrest in cultured human skin fibroblasts by reactive chlorine species. Arch Biochem Biophys. 2000 May 1; 377(1): 122-8.

80. Vinton NE, Laidlaw SA, Ament ME, Kopple JD: Taurine concentrations in plasma and blood cells of patients undergoing long-term parenteral nutrition. Am J Clin Nutr. 1986 Sep; 44(3): 398-404.

81. Vissers MC, Carr AC, Chapman AL: Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis. Biochem J. 1998 Feb 15; 330 (Pt 1):131-8.

82. Vissers MC, Pullar JM, Hampton MB: Hypochlorous acid causes caspase activation and apoptosis or growth arrest in human endothelial cells. Biochem J. 1999 Dec 1; 344 Pt 2: 443-9.

83. Weiss SJ, Klein R, Slivka A, Wie M: Chlorination of taurine by human neutrophils: evidence for hypochlorous acid generation. J Clin Invest. 1982; 70: 598-603.

84. Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ: Myeloperoxidase. Curr Opin Hematol. 2000 Jan; 7(1): 53-8.

85. Wojtecka-Lukasik E, Marton A, Krajewska K, Burakowski T, Gujski M, Maslinska D, Maslinski S: Taurine chloramine modifies carrageenin- and casein-induced inflammation in the rat. Inflamm Res. 2004 Mar; 53 Suppl 1: S23-4.

86. Wojtecka-Lukasik E, Gujski M, Roguska K, Maslinska D, Maslinski S: Taurine chloramine modifies adjuvant arthritis in rats. Inflamm Res. 2005 Apr; 54 Suppl 1: S21-2.

87. Wright CE, Tallan HH, Lin YY, Gaull GE: Taurine: biological update. Annu Rev Biochem. 1986; 55: 427-453.

88. Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, Roos D: Killing of schistosomula by taurine chloramine and taurine bromamine. Am.J.Trop.Med.Hyg. 1987; 37: 106-110.

89. Zgliczynski JM, Stelmaszynska T: Chlorinating ability of human phagocytosing leucocytes. Eur J Biochem. 1975 Aug 1;56(1):157-62.

90. Zhang M, Izumi I, Kagamimori S, Sokejima S, Yamagami T, Liu Z, Qi B: Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men. Amino Acids. 2004 Mar; 26(2): 203-7.