

Kraków, 2017

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Maria Walczewska

Porównanie właściwości biologicznych haloamin tauryny, jako potencjalnych leków w schorzeniach zapalnych i infekcyjnych.

Praca doktorska

Promotor: **prof. zw. dr hab. med. Janusz Marcinkiewicz**
Pracę wykonano w Katedrze Immunologii UJ CM
Kierownik jednostki: prof. Janusz Marcinkiewicz

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi
Panu Profesorowi Januszowi Marcinkiewiczowi
za opiekę naukową i cenne uwagi podczas pisania pracy.*

*Pragnę również podziękować moim Koleżankom i Kolegom z Katedry Immunologii,
Którzy przyczynili się do jej powstania.*

Dziękuję również mojemu Mężowi i Córce - za wyjątkową cierpliwość.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów

1. Wstęp	7
1.1 Tauryna	7
1.1.1 Synteza i metabolizm tauryny	8
1.1.2 Biologiczne funkcje tauryny.....	11
1.1.3 Rola tauryny w odczynie zapalnym i stresie oksydacyjnym.....	12
1.2 Naturalne pochodne tauryny: chloramina tauryny, bromamina tauryny	13
1.2.1 Właściwości przeciwzapalne TauCl i TauBr	15
1.2.2 Właściwości mikrobójcze TauCl i TauBr	17
1. 3. Syntetyczne pochodne i analogi tauryny i ich właściwości	19
2. Cel Pracy	29
3. Materiały i Metody	36
3.1. Odczynniki	36
3.2. Pochodne Tauryny	38
3.2.1 Przygotowanie TauBr, TauCl, 612Br	38
3.3. Model badawczy	39
3.4. Komórki	39
3.4.1 Izolacja komórek wysięku otrzewnowego	40

3.4.2 Hodowle komórkowe	40
3.5 Ocena żywotności komórek	41
3.6 Ocena wpływu 612Br, TauBr i TauCl, na produkcję cytokin.....	42
3.6.1 Oznaczenie poziomu cytokin	43
3.7 Oznaczenie poziomu tlenku azotu (NO) w nadsączach hodowli komórkowych.....	44
3.8 Ocena wpływu 612Br, TauBr i TauCl, na produkcję reaktywnych form tlenu (ROS)	45
3.9 Oznaczanie poziomu prostaglandyn (PGE ₂)	45
3.10 Ocena ekspresji HO-1, COX-2 oraz iNOS metodą Western Blot	46
3.11 Ocena właściwości mikrobójczych 612Br, TauBr oraz TauCl.....	47
3.11.1 Przygotowanie szczepów bakteryjnych.....	47
3.11.2 Określenie mikrobójczego działania 612Br, TauBr i TauCl.....	48
3.12. Analiza Statystyczna	49
4. Wyniki.....	50
4.1. Ocena właściwości fizykochemicznych 612Br w zależności o warunków przechowywania (temperatura, czas, pH)	50
4.2. Ocena wpływu 612Br na żywotność makrofagów otrzewnowych, makrofagów linii J774.A1 oraz keratynocytów linii HaCaT.....	56
4.3. Ocena właściwości immunomodulacyjnych 612Br	59
4.3.1. Wpływ 612Br na produkcję wybranych cytokin pro i przeciwzapalnych w porównaniu do TauBr i TauCl.....	59

4.3.2 Ocena wpływu 612Br, TauBr i TauCl na ekspresję HO-1, COX-2 oraz na produkcję prostaglandyn (PGE ₂) przez makrofagi otrzewnowe <i>in vitro</i>	63
4.3.3 Ocena wpływu 612Br na produkcję NO oraz ekspresję iNOS przez makrofagi otrzewnowe <i>in vitro</i> w porównaniu do TauCl, TauBr.....	65
4.3.4 Ocena wpływu 612Br, na produkcję ROS przez neutrofile <i>in vitro</i> w porównaniu do TauBr i TauCl.....	67
4.4 Ocena bakteriobójczego działania 612Br, w porównaniu do TauBr i TauCl, na wybrane szczepy bakteryjne mikrobiomu skóry.....	73
5. Dyskusja	76
6. Wnioski	86
7. Streszczenie	87
8. Abstract	90
9. Literatura	93

Wykaz stosowanych skrótów

BSA	albumina bydlęca (bovine serum albumin)
CFU	(colony forming unit) jednostka tworząca kolonię
COX-2	cyklooksigenaza 2
CDO	dioksygenaza cysteinowa
CSA	kwasy L-cysteiniosulfonowe
CSAD	dekarboksylaza kwasu L-cysteiniosulfonowego
DPBS	pozbawiona jonów wapnia i magnezu, zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna
EPO	peroksydaza eozynofilów
FBS	plodowa surowica bydlęca (fetal bovine serum)
HBSS	Hank's buffered saline solution
HO-1	oksygenaza hemowa-1
HOCl	kwasy podchlorawy/kwasy chlorowe (I)
HOBr	kwasy podbromawy/kwasy bromowe (I)
IFN	interferon
IL6, 10, 12p40, 8	interleukina 6, 10, 12p40, 8
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
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (Nuclear Factor kappa B)
NO	tlenek azotu
Nrf2	czynnik transkrypcyjny (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

Nrf2/ARE	Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway
iNOS	indukowalna syntaza tlenku azotu
PGE₂	prostaglandyna E2
ROS	reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species)
RLU	relative light units, arbitralne jednostki światła
SALT	skin-associated lymphoid tissue
SDS	siarczan dodecyłu sodu
TauBr	bromamina tauryny, N-bromotauryna
TauCl	chloramina tauryny, N-chlorotauryna
Tau	tauryna
TauT	transporter tauryny
TBST	sól fizjologiczna buforowana Tris z Tween 20 (Tris-buffered saline and Tween 20)
TNFα	czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor)
TRD	taurolidyna

1. Wstęp

1.1 Tauryna

Tauryna (2-aminoethanesulfonic acid) jest głównym niebiałkowym aminokwasem o istotnym znaczeniu w wielu procesach biologicznych, stanowiącym około 90 % wszystkich wolnych aminokwasów w cytozolu. Nazwa „tauryna” pochodzi od łacińskiej nazwy gatunkowej byka *Bos Taurus*, z którego żółci została po raz pierwszy wyizolowana na początku XIX wieku (Huxtable 1986, 1992). Tauryna nie jest wbudowywana w białka, występuje głównie w stanie wolnym, ponieważ zamiast grupy karboksylowej - COOH tauryna posiada grupę sulfonową - SO₃H, która nie tworzy wiązania peptydowego z grupą aminową innych aminokwasów (Kulasek i wsp. 2004; Schuller-Levis i Park 2003; Wright i wsp. 1986). Dystrybucja tauryny jest gatunkowo i tkankowo bardzo zróżnicowana. W mózгах noworodków ssaków (z człowiekiem włącznie) stwierdzono wysokie stężenie tauryny, może ono być trzy do czterech razy wyższe, niż u osobników dorosłych tego samego gatunku (Huxtable 1992,1989). W cytoplazmie komórek fagocytarnych osiąga stężenie 20-50 mM (w surowicy < 100 μM). Poziom tauryny w cytozolu komórek jest wynikiem zarówno transportu przez błonę komórkową egzogennej tauryny dostarczonej z pokarmem, jak i syntezy endogennej tauryny z metioniny i cysteiny (Fukuda i wsp. 1982; Schuller-Levis i Park 2003). Tauryna występuje również w wysokich stężeniach w nerkach, mięśniach szkieletowych, sercu i siatkówce (Brosnan i Brosnan 2006; El Idrissi 2004; Huxtable 1992; Sturman 1991, 1993).

1.1.1 Synteza i metabolizm tauryny

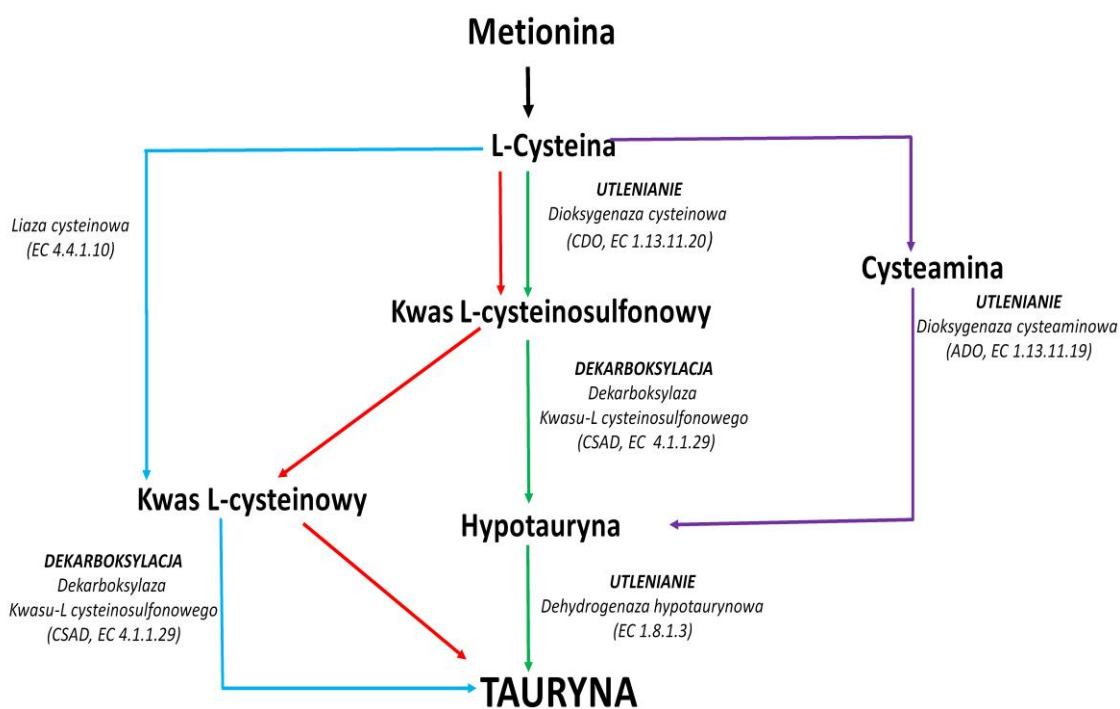
W organizmach ssaków tauryna pochodzi przede wszystkim z pokarmu (egzogenna). Endogenna synteza tauryny zachodzi przede wszystkim w wątrobie, mózgu i nerkach. Głównym substratem w procesie biosyntezy tauryny jest cysteina, aminokwas, który częściowo powstaje z metioniny. Stosunkowo dobrze poznano szlaki powstawania tauryny w organizmie człowieka (Wright i wsp. 1986). Poznano kilka szlaków biosyntezy tauryny (**Ryc. 1.1**). W czterech z nich cysteina jest przekształcana do tauryny (Huxtable 1989; Wright i wsp. 1986; Tang i wsp. 1997). Główny endogenny szlak biosyntezy rozpoczyna się od metioniny, która jest przekształcana do cysteiny, następnie cysteina jest utleniana przy udziale dioksygenazy cysteinowej (EC 1.13.11.20; CDO) do kwasu L-cysteiniosulfonowego (CSA). CSA jest przekształcany przy udziale dekarboksylazy sulfinoalaniny (dekarboksylaza kwasu L-cysteiniosulfonowego, EC 4.1.1.29; CSAD) do hypotauryny. Powstała hypotauryna jest utleniana z udziałem dehydrogenazy hypotaurynowej (EC 1.8.1.3) do tauryny. W szlaku alternatywnym CSA jest przekształcany do kwasu L-cysteinowego, a ten jest przekształcany do tauryny. W innym szlaku cysteamina lub cystyna są przekształcane do hypotauryny, a następnie do tauryny (**Ryc. 1.1**). Dekarboksylaza kwasu L-cysteiniosulfonowego (CSAD) stanowi kluczowy element szlaku metabolicznego, warunkujący możliwość endogennej syntezy tauryny (Wright i wsp. 1986; Huxtable 1986; Szymański i Winarska 2008). Poszczególne gatunki ssaków różnią się poziomem aktywności dekarboksylazy kwasu L-cysteiniosulfonowego, na przykład u kotów poziom aktywności dekarboksylazy kwasu L-cysteiniosulfonowego jest bardzo niski, stąd zaopatrzenie w taurynę jest u nich całkowicie zależne od dostępności tego aminokwasu w diecie. U człowieka i innych naczelnych poziom tego enzymu jest niski a zdolność do

endogennej syntezy tauryny jest też ograniczona. Ssaki roślinożerne (krowy, owce) natomiast, w całości syntetyzują endogenną taurynę i są niezależne od jej obecności w pokarmie (Sturman 1993; Sturman i wsp. 1991; Wright i wsp. 1986).

Wchłanianie tauryny dostarczonej z pokarmem odbywa się głównie w jelicie cienkim oraz jelicie grubym, jednak tempo wchłaniania tauryny w jelicie grubym jest znacznie wolniejsze niż w jelicie cienkim (Tomei i wsp. 2003). W jelicie cienkim wchłaniana jest tauryna pochodząca z rozpadu koniugatów tego aminokwasu z kwasami żółciowymi. U człowieka tauryna jest wchłaniana głównie na drodze transportu aktywnego przy udziale transportera TauT, a w mniejszym stopniu na zasadzie dyfuzji prostej czy ułatwionej. Transporter TauT jest swoisty dla β -aminokwasów; oprócz tauryny przenosi także β -alaninę i hypotaurynę (Tappaz 2004; Warskulat i wsp. 2007). TauT należy do rodziny transporterów zależnych od Na^+ i Cl^- , w skład której wchodzi pręnośniki neuroprzeKaźników, aminokwasów i osmolitów. Transport tauryny przez błonę wymaga co najmniej dwóch jonów Na^+ i jednego Cl^- na cząsteczkę aminokwasu (Voss i wsp. 2004). U ludzi wchłanianie tauryny z przewodu pokarmowego jest powolne i dlatego jeśli zaistnieje konieczność jej suplementacji, to stosowane dawki powinny wynosić powyżej 3 g/dziennie.

Tauryna, głównie w postaci niezmięnionej, jest wydalana z moczem i żółcią (Chesney i wsp. 1985; Szymański i Winiarska 2008). W kanaliku proksymalnym nerki zachodzi zwrotna resorpcja tauryny, stanowiąca podstawowy mechanizm utrzymania stałego poziomu tauryny w sytuacji niedoboru tego aminokwasu w diecie. W czasie niedoboru tego aminokwasu resorpcja tauryny może zwiększyć się nawet dwukrotnie (Chesney i wsp. 1985). Niewielkie ilości tauryny, prawdopodobnie po wcześniejszym utlenieniu do TauCl, mogą ulegać deaminacji z wytworzeniem aldehydu sulfooctowego, a następnie pod wpływem reduktazy aldehydowej są przekształcane do kwasu izotionowego (Cunnigham i wsp. 1998;

Della Corte i wsp. 2002). Niewielkie ilości tauryny w postaci wolnej lub w koniugatach z kwasami tłuszczowymi, mogą też być wydalone z kałem.



Ryc. 1.1 Szlaki biosyntezy tauryny.

1.1.2 Biologiczne funkcje tauryny

Tauryna jest aminokwasem o istotnym znaczeniu w wielu procesach biologicznych. Jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju ośrodkowego układu nerwowego i siatkówki oka, serca, funkcjonowania układu rozrodczego oraz immunologicznego (Schuller-Levis i Park 2003; Huxtable 1992). Fizjologiczna rola tauryny polega między innymi na koniugacji kwasów żółciowych, stabilizacji błon komórkowych, utrzymaniu homeostazy wapnia (Huxtable 1992; El Idrissi i Trenkner 2003; Foos i Wu 2002), osmoregulacji i cytoprotekcji. Jest aktywnie gromadzona w cytozolu komórek w przypadku wzrostu osmolarności płynu tkankowego, przy spadku ciśnienia osmotycznego nie dopuszcza do masowej ucieczki jonów z komórek i zakłócenia równowagi jonowej (Bitoun i Tappaz 2000; Schaffer i wsp. 2000). Tauryna reguluje fosforylację białek oraz modyfikuje lipidy wpływając na funkcje błony komórkowej (Petrosian i Haroutounian 2000). W ośrodkowym układzie nerwowym tauryna działa, jako regulator osmolarności chroniąc i stabilizując dzięki temu błony komórkowe neuronów, a także jako modulator neurotransmisji (El Idrissi i Trenkner 2004; Oja i Saransaari 2007). Tauryna, jako antyoksydant spełnia funkcje cytoprotekcyjne, chroniąc komórki i tkanki przed skutkami stresu oksydacyjnego. Jednym z istotnych elementów antyoksydacyjnego działania tauryny jest neutralizacja HOCl powstającego w miejscu zapalenia (Weiss i wsp. 1982). Działanie immunoregulacyjne tauryny wynika z jej zdolności do pułapkowania HOCl i HOBr, w wyniku którego powstają odpowiednio TauCl i TauBr, aktywne biologicznie związki, produkowane przez neutrofile i eozynofile w miejscu zapalenia (Marcinkiewicz i wsp. 1995, 1998, 2005, 2006A, B, 2009; Olszanecki i Marcinkiewicz 2004).

1.1.3 Rola tauryny w odczynie zapalnym i stresie oksydacyjnym

Tauryna odgrywa szczególną rolę w komórkach fagocytarnych odczynu zapalnego. Aktywowane neutrofile w czasie wybuchu tlenowego generują wiele reaktywnych form tlenu, w tym kwas podchlorawy (HOCl), powstający w reakcji katalizowanej przez mieloperoksydazę (MPO). HOCl silnie toksyczny czynnik utleniający, jest mało stabilnym, oraz wysoce reaktywnym oksydantem o silnych właściwościach mikrobójczych. W eozynofilach, analogicznie do neutrofilów, przy udziale peroksydazy eozynofilowej (EPO) powstaje kwas podbromawy HOBr (Hendreson i wsp. 2001; Thomas i wsp. 1995). Kwas podchlorawy i kwas podbromawy są wychwytywane przez taurynę. W wyniku tej reakcji powstają mniej toksyczne haloaminy, chloramina tauryny (TauCl) i bromamina tauryny (TauBr). TauBr i TauCl są bardziej stabilne w porównaniu do HOCl (Wu i wsp. 2000; Weiss i wsp. 1982). Ze względu na silne właściwości utleniające zarówno HOCl, jak i HOBr pełnią istotną rolę w eliminacji patogenów. Oprócz korzystnej dla organizmu funkcji obronnej (przeciwbakteryjnej), HOCl i HOBr wykazują również efekt destrukcyjny na tkanki objęte procesem zapalnym, a wiele obserwacji wskazuje na udział tych czynników w patogenezie różnych chorób (Heinecke 1999; Wu i wsp. 2000). System mieloperoksydazy generuje również drugorzędowe oksydanty (dwuchloraminy, monochloraminy, aldehydy) (Gaut i wsp. 2001; Weiss i wsp. 1982). Tauryna jest najobficiej występującym wolnym aminokwasem w cytoplazmie leukocytów (Learn i wsp. 1990), dlatego główną chloraminą generowaną w przez aktywowane neutrofile jest TauCl (Weiss i wsp. 1982), a główną bromaminą generowaną przez eozynofile jest TauBr (Thomas i wsp. 1995).

1.2 Naturalne pochodne tauryny: chloramina tauryny, bromamina tauryny

Chloramina Tauryny (TauCl, N - chlorotauryna) i bromamina tauryny (TauBr, N - bromotauryna) to dwie naturalne pochodne tauryny. Syntetyzowane przez neutrofile i eozynofile w reakcji z HOCl i HOBr. Komórki fagocytarne, do których zaliczane są granulocyty (eozynofile, neutrofile, monocyty) oraz makrofagi stanowią siły szybkiego reagowania, docierają do miejsc inwazji drobnoustrojów jako pierwsze. Aktywowane neutrofile oraz eozynofile produkują reaktywne formy tlenu w procesie wybuchu tlenowego. Pierwszym etapem wytwarzania aktywnych form tlenu przez neutrofile jest aktywacja oksydazy NADPH - enzymu stanowiącego kompleks cząsteczek przenoszących elektrony. W wyniku przeniesienia elektronu z NADPH na tlen cząsteczkowy powstaje anionorodnik ponadtlenkowy. Synteza anionorodnika ponadtlenkowego to proces inicjujący całą kaskadę syntezy reaktywnych form tlenu:



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



W kolejnym etapie z nadtlenku wodoru przy udziale jonów żelazawych oraz kwasu podchlorawego powstają rodniki hydroksylowe ($\cdot\text{OH}$) (reakcja Fentona) i tlen singletowy ($^1\text{O}_2$):

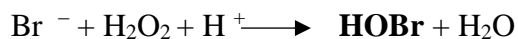


Mieloperoksydaza (MPO), syntetyzowana/uwalniana przez neutrofile i monocyty, katalizuje reakcję powstawania kwasu podchlorawego z H_2O_2 i Cl^- (Klebanoff i Hamon, 1992; Thomas 1979):

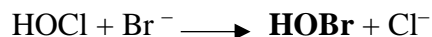


HOCl reaguje z aminami oraz tauryną, w wyniku, czego powstają chloraminy, w tym chloramina tauryny (TauCl, N-chlorotauryna).

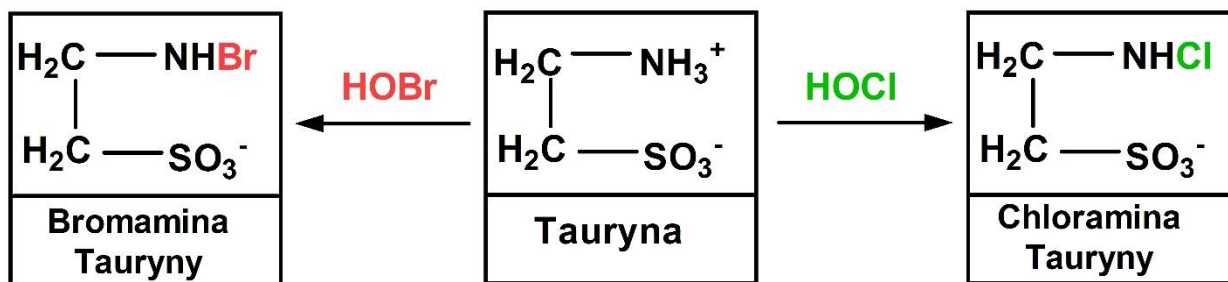
Peroksydaza eozynofilowa (EPO), enzym strukturalnie podobny do MPO, jest uwalniany przez aktywowane eozynofile. EPO preferencyjnie utlenia jony bromkowe (Br^-) do kwasu podbromawego (HOBr) (Thomas i wsp. 1995; van Dallen i Kettle 2001).



Wykazano, że HOBr może być generowane również przy udziale systemu mieloperoksydazy neutrofilów (Thomas i wsp. 1995; Gaut i wsp. 2001).



Kwas podbromawy jest słabszym utleniaczem niż HOCl, ale wykazuje silniejsze działanie mikrobójcze i cytotoksyczne (Thomas i wsp. 1995; Jong i wsp. 1980; Henderson i wsp. 2001; Hawkins i wsp. 2001). HOBr, podobnie jak HOCl, reaguje łatwo z aminami, α -aminokwasami oraz tauryną. W wyniku tych reakcji powstają bromaminy i wśród nich główna, bromowa pochodna to bromamina tauryny (TauBr, N-bromotauryna) (Thomas i wsp. 1995).



Ryc. 1.2 Tauryna, chloramina tauryny i bromamina tauryny.

1.2.1 Właściwości przeciwzapalne TauCl i TauBr

Wieloletnie badania pokazały, że obie haloaminy tauryny posiadają podwójne działanie farmakologiczne: przeciwzapalne i przeciwbakteryjne (Marcinkiewicz i wsp. 1995, 1998, 2005, 2006A, B, 2009; Olszanecki i wsp. 2004, 2008). Immunomodulacyjne działanie TauCl wynika z jej unikalnych właściwości przeciwzapalnych, potwierdzonych przez wiele zespołów badawczych w testach *in vitro*. Działanie przeciwzapalne TauCl polega na hamowaniu syntezy mediatorów zapalenia oraz redukcji generacji reaktywnych form tlenu (ROS) (Kim i wsp. 2009). TauCl działa hamująco na syntezę mediatorów prozapalnych uwalnianych zarówno przez komórki myszy: neutrofile, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki glejowe (Serban i wsp. 2003; Quinn i wsp. 2003; Marcinkiewicz i wsp. 1999, 2006B), jak i ludzkie: limfocyty, monocyty i synowioocyty fibroblastyczne (Kontny i wsp. 2006B, 2007; Chorąży M i wsp. 2002; Chorąży-Massalska i wsp. 2004). Wykazano, że TauCl hamuje proliferację synowioocytów fibroblastycznych pacjentów z RZS, prawdopodobnie poprzez hamowanie, zależnego od białka p53, cyklu komórkowego (Kontny i wsp. 2006B). Przeciwzapalne działanie TauCl wynika m.in. z jej zdolności do hamowania aktywności

kluczowych czynników transkrypcyjnych, NFκB i AP-1, regulowanych przez komórkowy potencjał oksydo-redukcyjny (Barua i wsp. 2001). Podobny mechanizm wykazano dla TauBr (Tokunaga i wsp. 2007). TauCl hamując produkcję mediatorów prozapalnych chroni tkankę przed ich cytotoksycznym działaniem. *In vivo*, aktywność TauCl wynika głównie z jej właściwości utleniających (Marcinkiewicz 1997). W porównaniu z HOCl TauCl jest związkiem znacznie mniej toksycznym, ale o przedłużonym działaniu (Marcinkiewicz 1997). Cytotoksyczność TauCl zależy w dużej mierze od typu komórek (Kontny i wsp. 2006A). Zarówno TauCl, jak i TauBr działa selektywnie na produkcję cytokin - hamują syntezę takich cytokin jak: TNFα, IL6, IL10, IL12p40 (Marcinkiewicz i wsp. 1995, 2005; Chorąży-Massalska i wsp. 2002, 2004). TauCl hamuje też aktywność metaloproteinazy 9 (MMP-9) (Park i wsp. 2000). TauCl i TauBr hamują aktywność komórek fagocytarnych, zmniejszając tym samym ich zdolność do konsumpcji tlenu i indukcji wybuchu tlenowego. TauBr i TauCl obniżają produkcję ROS, przez zwiększenie ekspresji peroksyredoksyny-1, tioredoksyny-1, antyoksydacyjnych enzymów normalnie indukowanych poprzez aktywację czynnika jądrowego 2, związanego z NF-E2 (Nrf2) (Kim i wsp. 2009, 2010A, 2010B, Sun Jang i wsp 2009).

Wykazano, że TauCl i TauBr hamują indukcję syntazy iNOS, a w konsekwencji produkcję tlenku azotu w aktywowanych makrofagach i neutrofilach (Marcinkiewicz i wsp. 1995; Park i wsp. 1997; Olszanecki i wsp. 2008). Ponadto TauCl i TauBr, w podobny dawkozależny sposób, indukują ekspresję oksygenazy hemowej -1 w różnych komórkach (Olszanecki i Marcinkiewicz 2004; Olszanecki i wsp. 2008; Kim i wsp. 2010A, 2010B; Marcinkiewicz i wsp. 2009; Barua i wsp. 2001), głównego enzymu indukowanego przez stres oksydacyjny. Mechanizm indukcji ekspresji HO-1 przebiega u makrofagów przez aktywację

układu Nrf2/ARE (Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway) (Kim i wsp. 2010A; Sun Jang i wsp. 2009). TauCl i TauBr hamują też ekspresję COX-2, co prowadzi do hamowania syntezy prostaglandyn (PGE₂) (Olszanecki i wsp. 2008, Quinn i wsp. 1996). Wykazano również, że TauCl stymuluje proces efferocytozy (fagocytozy apoptotycznych neutrofilii przez makrofagi) mysich makrofagów, poprzez indukcję HO-1, w której pośredniczy czynnik Nrf2.

1.2.2 Właściwości mikrobójcze TauCl i TauBr

TauCl i TauBr uwalniane odpowiednio przez neutrofile, monocyty i eozynofile w odczynie zapalnym, odgrywają podwójną rolę. Oprócz działania przeciwzapalnego TauCl i TauBr, wykazują właściwości mikrobójcze. Jako długo żyjące czynniki utleniające, działają bakteriobójczo wspomagając mechanizmy obrony nieswoistej (innate immunity). Zakres ich działania jest bardzo szeroki i obejmuje zarówno bakterie, wirusy, grzyby i pierwotniaki, jak i wielokomórkowe pasożyty. Właściwości przeciwbakteryjne TauCl i TauBr wykazano w stężeniach niecytotoksycznych, dobrze tolerowanych przez błony śluzowe czy też skórę. Wykazano przeciwbakteryjne działanie TauCl na szczepy bakterii Gram (-) (*E. coli*, *P. mirabilis* i *P. aeruginosa*) (Nagl i wsp. 2000) i Gram (+) (*S. aureus*, *S. epidermidis*) (Nagl i wsp. 2000), a TauBr na szczepy bakterii Gram (-) (*E. coli*, i *P. aeruginosa*, *P. gingivalis*) (Marcinkiewicz i wsp. 2005, 2006A, 2008, 2013; Pasich i wsp. 2013) oraz Gram (+) (*S. mutans*, *S. epidermidis*, *P. acnes*) (Pasich i wsp. 2013, Marcinkiewicz i wsp. 2009, 2013). TauCl wykazuje również silne działanie przeciwbakteryjne w stosunku do *Mycobacterium terrae*, zwłaszcza w obecności amoniaku, co może wynikać z faktu powstawania w reakcji transhalogenacji amoniaku przez TauCl innej, bardzo mocnej, silnie bakteriobójczej monochloraminy NH₄Cl (Nagl i Gottardi 1998A). TauCl ma również

właściwości przeciwwirusowe, zwłaszcza w stosunku do wirusa *Herpes simplex* oraz adenowirusów a TauCl i TauBr w stosunku do *Herpes Zoster* (Nagl i wsp. 1998B; Kyriakopoulos i wsp. 2016).

Mechanizm działania przeciwbakteryjnego TauCl nie jest do końca wyjaśniony. Zakłada się, że TauCl zmienia białka bakteryjne na drodze modyfikacji oksydacyjnej, przez co tracą one swoje funkcje biologiczne (Arnitz i wsp. 2006; Peskin i Winterbourn 2006). Jedną z teorii mówi o działaniu postantybiotycznym TauCl. Polega to na zablokowaniu i opóźnieniu wzrostu drobnoustrojów po krótkiej ekspozycji na czynnik przeciwbakteryjny. Bakterie tracą okresowo swoją zjadliwość, ale nie wpływa to na ich żywotność. Po pewnym czasie, koniecznym do resyntezy białek, bakterie wracają do normalnej zjadliwości. Opóźnienie wzrostu bakterii po zastosowaniu TauCl daje czas układowi immunologicznemu na pokonanie zakażenia (Nagl i wsp. 1999). TauCl nie powoduje zniszczenia białek gospodarza. Dodatkowo TauCl może działać, jako repelent na bakterie, co zostało opisane na przykładzie *E. coli* (Benov i wsp. 1996). Wykazano również działanie przeciwgrzybicze TauCl na grzyby typu *Aspergillus* oraz *Candida* spp. *Aspergillus fumigatus* wytwarza immunosupresyjny czynnik - gliotoksynę, a TauCl niszczy tą toksynę, prawdopodobnie przez redukcję mostków dwusiarczkowych. W przypadku *Candida* spp. proteiny aspartylowe wydają się być głównym celem przeciwgrzybicznego działania TauCl obniżającego zjadliwość *Candida* spp. (Nagl i wsp. 2002; Reeves i wsp. 2006).

Wykazano również przeciwpasożytnicze (*Leishmania* spp., *Schistosoma masoni*) i przeciwpierwotniakowe (*Acanthamoeba* spp.) działanie TauCl (Förnkrantz i wsp. 2008; Gaut i wsp. 2001; Yazdanbakhsh i wsp. 1987). Potencjał immunoregulacyjny TauBr i TauCl jest porównywalny. TauBr natomiast wykazuje silniejsze, niż TauCl właściwości

bakteriobójcze (Marcinkiewicz i wsp. 2006). Co więcej, tylko TauBr może neutralizować H_2O_2 powstający w miejscu zapalenia.

1. 3. Syntetyczne pochodne i analogi tauryny i ich właściwości

Tauryna jest aminokwasem o szerokim spectrum działania. Ze względu na mnogość pełnionych w organizmie funkcji, mogłaby być potencjalnym lekiem na wiele rodzajów schorzeń takich jak epilepsja, cukrzyca, choroba alkoholowa, otyłość, zaburzenia kardiologiczne, zapobieganie zmianom neurodegeneracyjnym u osób w podeszłym wieku. Prowadzono próby kliniczne terapeutycznego zastosowania tauryny u ludzi oraz w modelach zwierzęcych: w chorobach serca (Azuma i wsp. 1983, 1984), w leczeniu nadciśnienia (Fujita i wsp. 1984, 1987; Kohashi i wsp. 1983; Yamori i wsp. 1996). Dotychczas jest jednak najszerzej stosowana jako dodatek do odżywek / mlek dla niemowląt i kotów, suplementów diety oraz w napojach energetyzujących. Stosowanie tauryny, jako leku w leczeniu wymienionych chorób może być utrudnione ze względu na jej naturę chemiczną. Przede wszystkim aminokwasy są słabo adsorbowane w przewodzie pokarmowym, stosunek między ilością tauryny przyjmowanej doustnie, a poziomem osiąganym końcowo w centralnym układzie nerwowym, jest bardzo niekorzystny. Dodatkowo tauryna jest silnie hydrofilna i lipofobowa, ma niekorzystną farmakokinetykę i duża jej ilość jest szybko wydalana z moczem w postaci niezmienionej (Oja i Saransaari 2007). Wszystkie te cechy, zarówno podkreślają jej znaczenie i rolę, jako potencjalnego leku, ale też wpływają na trudności w zastosowaniu praktycznym. W zwierzęcych modelach epilepsji, podawano taurynę bezpośrednio do komórek mózgowych, dzięki temu uzyskiwano bardzo dobre wyniki

przeciwdrgawkowego działania tauryny, tauryna skutecznie chroniła przed atakami konwulsji. Podobnych efektów nie zaobserwowano natomiast przy podaniu doustnym lub dootrzewnowym. Dopiero bardzo wysokie dawki wykazywały skuteczność, aczkolwiek nieporównywalną do skuteczności przy podaniu domózgowym (Oja i Saransaari 2013). Podejmowane są więc próby syntezy sztucznych bioizosterów: pochodnych, analogów, homologów tauryny. Zachowujących jej unikalne właściwości, a posiadających zmienioną strukturę. Wiele z nich może znaleźć lub znajduje zastosowanie w leczeniu różnych chorób: choroby alkoholowej, padaczki, chorób serca, nowotworów, zapalenia otrzewnej. Do sztucznych pochodnych/analogów tauryny można zaliczyć: taurolidynę, akomprazat, taumustine, taltrimide, tiotaurynę. Akomprazat to lek stosowany w leczeniu uzależnień alkoholowych, taumustine to substancja wykazująca aktywność przeciwnowotworową, taltrimide stosowany z powodzeniem w zwierzęcych modelach epilepsji, taumustine jest stosowany jako chemioterapeutyk w leczeniu raka jelita w modelach zwierzęcych.

Jedną z najlepiej poznanych i najszerzej stosowanych syntetycznych pochodnych tauryny jest Taurolidyna (TRD) (bis - (1,1 - dioksyperhydro-1,2,4 - tiadiazinylo - 4) metan). To syntetyczna pochodna tauryny, chemioterapeutyk, zsyntetyzowana po raz pierwszy przez Geistlich Pharma w 1970 roku. Taurolidyna składa się z dwóch cząsteczek tauryny i trzech cząsteczek formaldehydu, które tworzą dwa taurolidynowe pierścienie połączone mostkiem metylenowym. Taurolidyna jest rozkładana do trzech związków: taurultamu, taurinamidu oraz tauryny. Jest to związek o działaniu przeciwzapalnym, zmniejszającym wydzielanie mediatorów zapalenia, hamuje produkcję IL1 i TNF α (Bedrosian i wsp. 1991). Taurolidyna charakteryzuje się bardzo szerokim spektrum działania antybakteryjnego i przeciwgrzybiczego, obejmującym również bakterie odporne na metycylinę i wankomycynę (Torres-Viera i wsp. 2000; Traub i wsp. 1993). Wykazano, że Taurolidyna

2% hamuje powstawanie infekcji bakteryjnych w cewnikach i portach u pacjentów żywionych pozajelitowo, cewnikowanych i ze stałymi portami lekowymi, prawdopodobnie poprzez bezpośrednią interakcję ze ścianą komórkową bakterii. Zmienia jej strukturę i wpływa na utratę zdolności adhezyjnych przez komórki bakteryjne, tym samym hamując zdolność bakterii do formowania kolonii bakteryjnych, a potem biofilmu (Gorman i wsp. 1987; Jurewitsch i Jeejeebhoy 2005; Koldehoff i Zakrzewski 2004). Mechanizm działania bakteriobójczego tauroolidyny polega na degeneracji ściany komórkowej bakterii, wiązanie LPS i endotoksyn. Wiązanie LPS powoduje jego nieodwracalną inaktywację (Watson i wsp. 1995; Allwood 1980). Działanie bakteriobójcze tauroolidyny przebiega za pośrednictwem jej czynnych metabolitów; hydroksymetylo taurultamu i hydroksymetylo taurynoamidu, o działaniu antibakteryjnym, antyendotoksynowym i antyadhezyjnym. Obie te substancje są donorami czynnych grup hydroksymetylowych, grupy te działają przez reakcję z błonami komórkowymi bakterii i z pierwszorzędowymi grupami aminowymi (Gorman i wsp. 1987; Willatts i wsp. 1995; Blenkarn 1987). Tauryna - trzeci produkt rozpadu TRD, może być odpowiedzialna za właściwości immunoregulacyjne tauroolidyny, związane z hamowaniem produkcji cytokin prozapalnych (Bedrosian i wsp. 1991; Watson i wsp. 1995; Blenkarn 1987; Doddakula i wsp. 2010).

Dowiedziano też, iż TRD wykazuje działanie onkostatyczne, hamuje wzrost nowotworowych linii komórkowych *in vitro* i *in vivo* (Darnowski i wsp. 2004; McCourt i wsp. 2000; Nici i wsp. 2004; Eschenburg i wsp. 2014). Aktywność przeciwnowotworowa TRD polega na hamowaniu wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych, aktywności antyadhezyjnej i indukowaniu apoptozy komórek nowotworowych (jedna z hipotez mówi o indukcji apoptozy poprzez mechanizm mitochondrialny, zależny od cytochromu C).

Taurolidyna hamuje translację białek na wczesnym etapie, tym samym blokując biosyntezę białek zarówno w komórkach ssaczy nowotworowych, jak i bakteryjnych, co może wyjaśniać mechanizm jej aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej (Braumann i wsp. 2004). Taurolidyna wykazuje działanie cytotoksyczne, w stosunku do komórek nowotworowych, w stężeniach niecytotoksycznych dla komórek prawidłowych (Calabresi i wsp. 2001; Han i wsp. 2004). Badania przedkliniczne na modelach zwierzęcych wykazały skuteczność taurolidyny w leczeniu raka prostaty, jelita czy jajnika, guzów układu nerwowego oraz czerniaka. Na modelu szczurzym wykazano, że dootrzewnowe podanie taurolidyny powodowało zmniejszenie masy guza, żywotności komórek nowotworowych oraz redukcję przerzutów. Sugeruje to możliwość zastosowania taurolidyny jako chemioterapeutyku przeciwnowotworowego oraz ograniczającego możliwość występowania przerzutów, zarówno w monoterapii, jak i w terapii skojarzonej (Jacobi i wsp. 1999; Braumann i wsp. 2003; Wenger i wsp. 2002; Da Costa i wsp. 2001). Niektóre doniesienia wskazują na aktywność mikrobójczą taurolidyny w stosunku do mikroorganizmów odpowiedzialnych za schorzenia przyzębia oraz paradontozę (m in *P gingivalis*). Wykazano również, że aktywność mikrobójcza taurolidyny nie zmienia się w obecności surowicy, która obniża efektywność bakteriobójczą chlorheksydyny (Eick i wsp. 2012; 2016; Zollinger i wsp. 2015).

1.4 Potencjalne kliniczne zastosowania TauCl i TauBr

W ostatnich latach w Katedrze Immunologii oraz innych ośrodkach przeprowadzono liczne badania kliniczne i doświadczalne w celu oceny zastosowania TauCl i TauBr w leczeniu chorób o podłożu zapalnym i bakteryjnym (Marcinkiewicz i wsp. 2008; Teuchner i wsp. 2005, 2008; Neher i wsp. 2004; 2007; Nagl i wsp. 1998B, 1998C, 1998D, 2003; Kyriakopoulos i wsp. 2013). Właściwości przeciwzapalne TauCl i TauBr, w połączeniu z aktywnością mikrobójczą, bez wywoływania zjawiska lekooporności powodują, że obie haloaminy tauryny posiadają duży potencjał terapeutyczny nie tylko w leczeniu chorób infekcyjnych (zakażeń), ale także o podłożu zapalnym. Ze względu na wysoką reaktywność i możliwą interakcję ze składnikami surowicy TauCl i TauBr wykazują ograniczoną trwałość *in vivo* (Martini i wsp. 2012; Gottardi i wsp. 2013B, 2014). Przy podaniu systemowym ulegają szybkiej biodegradacji (wychwyty przez erytrocyty, rozkład przez enzymy wątrobowe), niemożliwe jest zatem, osiągnięcie stężeń terapeutycznych w miejscu zapalenia. W związku z tym możliwe jest tylko miejscowe, zewnętrzne zastosowanie TauCl i TauBr.

W okulistyce, laryngologii i dermatologii, w leczeniu stanów zapalnych i zakażeń stosuje się miejscowo połączenie antybiotyku i leków o działaniu przeciw-zapalnym (kortykosterydów), TauCl i TauBr posiadają właściwości obu typów leków. Synteza stabilnej krystalicznej soli sodowej TauCl (Cl-HN-CH₂-CH₂-SO₃-Na, TauCl) umożliwiła przeprowadzenie wielu badań nad właściwościami i potencjalnym zastosowaniem klinicznym TauCl (Gottardi i Nagl 2010). TauCl podawane miejscowo jest bardzo dobrze tolerowane (Gottardi i wsp. 2013A), nie powoduje działań niepożądanych przy zastosowaniu

na skórę, błony śluzowe, a nawet spojówkę oka, co wykazano w badaniach klinicznych (Gottardi i wsp 2003; Neher i wsp. 2007; Teuchner i wsp.2005; Nagl i wsp. 1998C, 2003). Wyniki te pozwoliły zastosować TauCl jako składnik kropli do oczu w leczeniu zakaźnego zapalenia spojówek (Teuchner i wsp. 2005). W badaniach klinicznych wykazano również, że połączenie TauCl z inną monochloraminą (NH₄Cl) jest bardzo skuteczne w leczeniu wirusowego zapalenia spojówek (Teuchner i wsp. 2008). Obiecujące wyniki aktywności mikrobójczej TauCl w stosunku w *Acanthamoeba* spp, który często powoduje zakażenia rogówki oka u osób noszących soczewki kontaktowe, wskazują na możliwość zastosowania TauCl w leczeniu infekcji oka wywołanych tym pierwotniakiem (Fürnkranz i wsp. 2008). Również w zapaleniu ucha zewnętrznego, wywołanego przez *P. aeruginosa* i *S. aureus*, TauCl stosowana miejscowo do kanału ucha zewnętrznego, wykazała wysoką skuteczność. W próbach klinicznych ponadto wykazano korzystny wpływ TauCl, stosowanej jako antyseptyk, w pooperacyjnej profilaktyce po plastyce błony bębenkowej ucha (Neher i wsp. 2004, 2007). TauCl posiada silne działanie przeciwgrzybicze w stosunku do grzybów pleśniowych z rodzaju *Aspergillus* spp. *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. i *Alternaria* spp. (Reeves i wsp. 2006), będących przyczyną przewlekłego alergicznego nieżyty nosa i zapalenia zatok bocznych, co wskazuje na możliwe miejscowe zastosowanie TauCl w leczeniu przewlekłego eozynofilowego nieżyty nosa i zatok bocznych (Nagl i wsp. 2001; Neher i wsp 2005). Wykazano również, że TauCl może być stosowana w miejscowym leczeniu schorzeń dróg moczowych, wywołanego przez *P. aeruginosa*. Stosowana w zapaleniu pęcherza moczowego, w postaci wlewek była dobrze tolerowana i nie powodowała działań niepożądanych (Nagl i wsp. 1998D). W leczeniu przewlekłych owrzodzeń podudzi, TauCl wykazuje podobną skuteczność do chloraminy T, zwykle stosowanej w terapii tego schorzenia, jednak jest lepiej tolerowana (Nagl i wsp 2003). Ze względu na aktywność

mikrobójczą TauCl i TauBr w stosunku do bakterii będących przyczyną powstawania kamienia nazębnego oraz próchnicy, obie substancje mogą być wykorzystywane jako składniki płukanek do ust, lub jako składnik pasty do zębów (Lorenz i wsp. 2009; Mainnemare i wsp. 2004; Pasich i wsp. 2013). Pojawiły się również doniesienia o skuteczności TauCl, podawanej drogą inhalacji, w leczeniu chorób układu oddechowego u świni (Schwienbacher i wsp. 2011). W niektórych doniesieniach wskazuje się też możliwość zastosowaniu TauCl w szczepionkach przeciwwirusowych np. przeciw HIV. Większość retrowirusów, włączając w to wirusa HIV, posiada wysoko konserwatywne, bogate w cysteinę regiony, które są istotne dla replikacji i właściwości infekcyjnych wirusa. TauCl wykazuje wysoką reaktywność i działanie selektywne w stosunku do cysteiny (Peskin i wsp. 2006), dzięki temu wykazuje skuteczne działania inaktywujące i może blokować aktywność wirusa HIV. W modelu mysiej AIDS (MAIDS) wykazano, że inaktywacja retrowirusa MIV przez TauCl może być wykorzystana do stworzenia skutecznej inaktywowanej szczepionki przeciwwirusowej (Dudani i wsp. 2008). Infekcje wywołane wirusem *Herpes zoster* są problemem u chorych z obniżoną odpornością, cierpiących na inne schorzenia autoimmunizacyjne. U pacjentów ze stwardnieniem rozsianym infekcja *Herpes zoster* może być wstępem do późniejszych komplikacji neurologicznych. Kombinowana terapia TauCl 0,8% i TauBr 1% u pacjenta ze stwardnieniem rozsianym z infekcją *Herpes zoster* okazała się bardzo skuteczna. Po 4 dniach miejscowego stosowania obserwowano ustąpienie dolegliwości bólowych, a po kolejnych 3, ustąpienie zmian skórnych (Kyriakopoulos i wsp. 2016).

Większość badań nad potencjalnym klinicznym zastosowaniem haloamin tauryny dotyczy soli sodowej TauCl. TauBr, mimo podobnych właściwości przeciwzapalnych i nawet silniejszych właściwości mikrobójczych, nie jest tak szeroko badana.

W Katedrze Immunologii UJ CM prowadzono badania nad potencjalnym zastosowaniem TauBr w leczeniu chorób skóry, takich jak trądzik pospolity oraz w leczeniu chorób przyzębia (Marcinkiewicz i wsp. 2006; Pasich i wsp. 2013). W dermatologii najbardziej obiecujące wydaje się zastosowanie TauBr, w miejscowym leczeniu trądziku pospolitego. TauBr w niecytotoksycznych dawkach wykazuje silne działanie bakteriobójcze w stosunku do bakterii *P. acnes*, jednego z czynników patogennych trądziku (Marcinkiewicz i wsp. 2006, 2005). W pilotażowych badaniach klinicznych potwierdzono, że TauBr jest dobrym kandydatem do leczenia trądziku pospolitego o łagodnym lub średnio ciężkim przebiegu, zwłaszcza u pacjentów, u których stwierdzono lekooporność na klindamycynę i erytromycynę (Marcinkiewicz i wsp. 2008). Wysoka reaktywność TauBr i możliwa interakcja z białkami surowicy sprawia, że najlepszą drogą podania TauBr jest stosowanie miejscowe (Gottardi i wsp. 2013B, 2014). Ograniczeniem dla potencjalnego klinicznego zastosowania klasycznie syntetyzowanej formy TauBr jest jej niska trwałość. W już po 14 dniach w temperaturze 4⁰ C obserwowano ok. 30% spadek stężenia, a w temperaturze 23⁰ C podobny spadek stężenia obserwowano już po 7 dniach przechowywania (Marcinkiewicz i wsp. 2008). Ze względu na niską trwałość zastosowanie klasycznie syntetyzowanej TauBr jest ograniczone.

Zrodziło to więc konieczność poszukiwania nowych strategii w stosowaniu TauBr obejmujących:

1. Uzyskanie stałego stężenia terapeutycznego TauBr (bakteriobójczego i przeciwzapalnego), poprzez miejscowe podanie TauBr o wysokim stężeniu, w preparatach pozwalających na jej wolne uwalnianie.

a. Krem z dużym nadmiarem tauryny, która będzie pułapkowała uwalniane z rozkładu TauBr jony Br^- - leczenie trądziku pospolitego,

b. Tabletki poloksamerowo-karbomerowe wolno uwalniające TauBr - ewentualne leczenie chorób przyzębia

2. Podanie do miejsca zapalenia i nacieku neutrofilii tauryny, jako pro-leku. Tauryna będzie wychwytywała miejscowo uwalniany przez neutrofile HOCl i HOBr w wyniku czego może powstać TauCl i/lub TauBr. Taka strategia wydaje się być odpowiednia do stosowania TauCl w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, stosowano ją też w leczeniu zapalenia jelita podając połączenie tauryny z kwasem 5 - aminosalicylowym (5-ASA-Tau), które w miejscu zapalenia uwalnia taurynę umożliwiając wychwyt endogennej HOCl i syntezę TauCl (Jung i wsp. 2006; Kim i wsp. 2006).

3. Synteza trwałej postaci TauBr - 612Br (N-monobromo-dimetylotauryna).

Nowa, trwała pochodna TauBr - 612Br (N-monobromo-dimetylotauryna) zsyntetyzowana na Uniwersytecie w Innsbrucku przez zespół prof. Waldemara Gottardiego i prof. Marcusa Nagla otwiera nowe perspektywy na jej zastosowanie w terapii różnych schorzeń o podłożu infekcyjnym. Uzyskanie nowej, trwałej formy bromaminy tauryny (612Br) daje nowe możliwości, wymaga jednak dalszych badań nad właściwościami nowej trwałej formy bromaminy tauryny.

Tabela .1.1 Potencjalne terapeutyczne zastosowanie TauCl i TauBr

Substancja	Jednostka chorobowa	Referencje
TauCl	Zapalenie ucha zewnętrznego	Neher i wsp. 2004
	Półpasiec	Kyriakopoulos i wsp.2013
	Próchnica, zapalenie przyzębia	Pasich i wsp.2013; Lorenz i wsp. 2009; Mainnemaire i wsp. 2004
	Owrzodzenia podudzi	Nagl i wsp. 2003
	Zapalenie spojówek	Teuchner i wsp. 2005, 2008; Nagl i wsp. 1998B
	Zakażenie rogówki oka	Furkranz i wsp. 2008
	Zapalenie zatok, przewlekły alergiczny nieżyt nosa i zatok bocznych	Nagl i wsp. 2001; Neher i wsp. 2005
	Zapalenie pęcherza moczowego	Nagl i wsp. 1998D
TauBr	Trądzik Pospolity	Marcinkiewicz i wsp.2008
	Półpasiec	Kyriakopoulos i wsp.2013
	Zapalenie przyzębia	Pasich i wsp.2013

2. Cel Pracy

Unikatowe właściwości przeciwzapalne i przeciwbakteryjne obu haloamin tauryny pozwalają sądzić, że związki te mogą być dobrymi kandydatami do miejscowego leczenia wielu schorzeń o podłożu zapalnym i infekcyjnym. Wieloletnie badania zespołów naukowych na świecie oraz zespołu Katedry Immunologii UJ CM wykazały, że TauCl oraz TauBr działają bakteriobójczo w stężeniach niecytotoksycznych dla komórek ssaków. Badania naszego zespołu wykazały też właściwości immunomodulacyjne TauCl i TauBr. Dzięki udanej syntezie trwałej soli sodowej chloraminy tauryny ($\text{Cl-HN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{-Na}$, TauCl) przeprowadzono testy *in vivo*, które wykazały tolerancję tkanek na chloraminę tauryny w stężeniach terapeutycznych (bakteriobójczych). Szybki rozkład TauCl *in vivo* ogranicza jej zastosowanie do podawania miejscowego w wysokich stężeniach. TauBr wykazuje silniejsze działanie przeciwbakteryjne i porównywalny z TauCl potencjał, jako środek farmaceutyczny o działaniu przeciwzapalnym. Należy sądzić, że TauBr może znaleźć zastosowanie w stomatologii (leczenie stanów zapalnych dziąseł - przyzębica) oraz w dermatologii (stany zapalne skóry o podłożu bakteryjnym/grzybiczym - trądzik pospolity). TauBr jest jednak znacznie mniej stabilna od TauCl. Dotychczasowe badania dotyczące właściwości i zastosowania TauBr były prowadzone na „naturalnej”, każdorazowo syntetyzowanej i nietrwalej formie TauBr.

Nowa, trwała pochodna tauryny 612Br (N-monobromo-dimetylotauryna) zsyntetyzowana na Uniwersytecie w Innsbrucku przez zespół prof. Waldemara Gottardiego i prof. Marcusa Nagla otwiera nowe perspektywy i daje nowe możliwości na jej zastosowanie w miejscowym leczeniu schorzeń o podłożu zapalnym i infekcyjnym. Powstaje jednak

pytanie czy modyfikacja chemiczna która umożliwiła syntezę trwałej 612Br nie spowodowała utraty lub zmiany jej potencjalnych właściwości biologicznych.

Celem pracy doktorskiej jest zbadanie właściwości biologicznych trwałej formy bromaminy tauryny 612Br i porównanie ich z właściwościami biologicznymi TauBr i TauCl.

Cele szczegółowe:

- ocena właściwości fizykochemicznych 612Br (stabilność w zależności od pH, temperatury, czasu przechowywania, obecności H₂O₂),
- ocena wpływu 612Br na żywotność komórek: makrofagi otrzewnowe, makrofagi linii J774.A1, linia keratynocytów ludzkich HaCaT w porównaniu do TauBr i TauCl;
- ocena właściwości immunomodulacyjnych 612Br obejmujących:
 - a. wpływ 612Br na produkcję wybranych cytokin pro i przeciwzapalnych prostaglandyn, reaktywnych form tlenu (ROS), przez makrofagi, keratynocyty ludzkie *in vitro* w porównaniu do TauBr, TauCl;
 - b. wpływ 612Br na ekspresję oksygenazy hemowej (HO-1), cyklooksygenazy (COX-2) i indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) w porównaniu do TauBr i TauCl;
- ocena bakteriobójczego działania 612Br w porównaniu do TauBr i TauCl, na wybrane szczepy bakteryjne mikrobiomu skóry (flora stała i bakterie patogenne)
 - ❖ Gram (+) (*P. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*)
 - ❖ Gram (–) (*P. aeruginosa*)
- porównanie właściwości przeciwbakteryjnych 612Br z kombinacją trwałych pochodnych tauryny TauCl i 612Br.

Proponowane badania w ramach pracy doktorskiej są kontynuacją moich wieloletnich badań w nad biologicznymi właściwościami TauCl i TauBr prowadzonych w Katedrze immunologii UJ CM.

Lista publikacji:

Walczevska Maria

Nazwisko panieńskie - **Kurnyta**

✓ **Prace oryginalne**

1. Marcinkiewicz J, **Kurnyta M**, Biedroń R, Bobek M, Kontny E, Maśliński W. Anti-inflammatory effects of taurine derivatives (taurine chloramine, taurine bromamine, and taurolidine) are mediated by different mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2006; 583:481-92.
2. Olszanecki R, **Kurnyta M**, Biedroń R, Chorobik P, Bereta M, Marcinkiewicz J. The role of heme oxygenase-1 in down regulation of PGE₂ production by taurine chloramine and taurine bromamine in J774.2 macrophages. *Amino Acids*. 2008; 35(2):359-64.
3. Marcinkiewicz J, Wojas-Pelc A, Walczewska M, Lipko-Godlewska S, Jachowicz R, Maciejewska A, Białecka A, Kasprowicz A. Topical taurine bromamine, a new candidate in the treatment of moderate inflammatory acne vulgaris. A pilot study *European Journal of Dermatology*. 2008; Jul-Aug; 18(4):433-9. Epub 2008 Jun 23.
4. Marcinkiewicz J, **Walczevska M**, Olszanecki R, Bobek M, Biedroń R, Dulak J, Józkwicz A, Kontny E, Maśliński W. Taurine haloamines and heme oxygenase-1 cooperate in the regulation of inflammation and attenuation of oxidative stress. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2009; 643:439-450.

5. **Walczewska M**, Białecka A, Gacoń A, Pasich E, Kasprowicz A, Marcinkiewicz J. Effect of selected biofilm inhibitors, N-acetylcysteine and DNase, on some biological properties of taurine haloamines (TauCl and TauBr). *Central European Journal of Immunology*. 2013; 38 (4): 434-442.
 6. Marcinkiewicz J, Strus M, **Walczewska M**, Machul A, Mikołajczyk D. Influence of taurine haloamines (TauCl and TauBr) on the development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a preliminary study. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013; 775:269-283.
 7. Pasich E, **Walczewska M**, Białecka A, Peruń A, Kasprowicz A, Marcinkiewicz J. Taurine Haloamines and Biofilm: II. Efficacy of Taurine bromamine and chlorhexidine against selected microorganisms of oral Biofilm. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015; 803:133-143.
 8. Strus M, **Walczewska M**, Machul A, Mikołajczyk D, Marcinkiewicz J. Taurine Haloamines and Biofilm. Part I: Antimicrobial Activity of Taurine bromamine and chlorhexidine against biofilm forming *Pseudomonas aeruginosa*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015; 803:121-132.
 9. **Walczewska M**, Ciszek-Lenda M, Surmiak M, Kozłowska A, Jozefowski S, Marcinkiewicz J. Impact of Taurine on Innate and Adaptive Immunity as the Result of HOCl Neutralization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015; 803:109-120.
- ✓ **Prace pogładowe**
1. **Walczewska M**, Marcinkiewicz J. Chloramina tauryny i jej potencjalne zastosowanie w terapii. *Przegląd Lekarski*. 2011; 68(6):334-8.

Lista doniesień zjazdowych:

✓ Międzynarodowych

1. The 15th Taurine Meeting, 12.06 -15.06. 2005, Tampere Finland:
 - a) Marcinkiewicz J, Bobek M, Kontny E, Maślinski W, **Kurnyta M**. The similar anti-inflammatory effects of taurine derivatives (taurine chloramines, taurine bromamine and taurolidyne) are mediated by different mechanisms in mouse macrophages.
 - b) Marcinkiewicz J, Głuszko P, Kwaśny - Korchin B, Bobek M, Biedroń R, **Kurnyta M**, Maśliński W. *In vitro* Taurolidine (TRD) inhibition of cell proliferation and cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes – a possible mechanism of TRD effect on the development of collagen –induced arthritis in mice.
2. The 1st Joint Meeting of European National Societes of Immunology, 16th European Congress of Immunology 6.09 - 9.09. 2006, Paris:

Marcinkiewicz J, **Kurnyta M**, Olszanecki R, Biedroń R, Chorobik P, Bereta M. Role of heme oxygenase –1 in the inhibition of PGE₂ production by taurine chloramine and taurine bromamine in J774.2 macrophages.
3. The 16th International Taurine Meeting „Taurine for Future Health care”, 2.08-5.08. 2007, Shimoda:

Marcinkiewicz J, Olszanecki R, **Walczewska-Kurnyta M**, Biedroń R, Chorobik P, Ewa Kontny E ,Maśliński W .Taurine haloamines (TauCl, TauBr) and heme oxygenase-1 (HO-1) cooperate in the regulation of inflammatory response.

4. The 17th International taurine Meeting” Taurine; a wonder molecule”. 14.12-19.12. 2009 Miami, Floryda USA:

Walczevska M, Wojas – Pelc A, Kasprowicz A, Marcinkiewicz J. Taurine bromamine (TauBr) in innate immunity, inflammation and oxidative stress. The novel therapy for inflammatory acne vulgaris.

5. The 18th International Taurine meeting 7.04-13.04. 2012 Marrakesh, Marocco:

Marcinkiewicz J, Strus M, **Walczevska M**, Gacoń A. Are taurine haloamines (TauCl and TauBr) good candidates for the treatment of biofilm associated infections?

6. The 19th International Taurine Meeting 21.05-24.05. 2014, Kraków:

a) Strus M, **Walczevska M**, Machul A, Mikołajczyk D, Marcinkiewicz J. Antimicrobial activity of taurine broamamine and chlorhexidine against biofilm forming *Pseudomonas aeruginosa*.

b) Pasich, E, Białecka A, **Walczevska M**, Peruń A, Kasprowicz A, Marcinkiewicz J. Efficacy of taurine haloamines and chlorhexidine against oral microbiome species.

7. The 20th International Taurine Meeting 23.05-27.05. 2016 Seoul Korea:

Walczevska M, Peruń A, Białecka A, Sróttek M, Jamróz W, Dorożyński P, Jachowicz R, Kulinowski P, Nagl M, Gottardi W, Marcinkiewicz J.:Comparative analysis of microbicidal and anti-inflammatory properties of novel taurine bromamine derivatives and bromamine T.

✓ **Krajowych**

1. XII Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej 19.05-22.05. 2005, Lublin:

Marcinkiewicz J, **Kurnyta M**, Mak M, Bobek M, Białecka A, Koprowski M, Kontny E, Maśliński W. The role of taurine bromamine (TauBr) in inflammation; interactive effects with nitrite and hydrogen peroxide.

2. XIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej 14.05-17.05. 2008, Kraków:

a) **Walczevska M**, Olszanecki R, Biedroń R, Chorobik P, Bereta M, Marcinkiewicz J. The role of heme oxygenase-1 in down regulation of PGE₂ production by taurine chloramine and taurine bromamine in J774.2 macrophages.

b) Olszanecki R, **Walczevska M**, Biedroń R, Marcinkiewicz J. Involvement of heme oxygenase-1 in anti-inflammatory actions of taurine chloramine and taurine bromamine.

c) Wojas-Pelc A, **Walczevska M**, Jachowicz R, Maciejewska A, Białecka A, Kasprowicz A, Marcinkiewicz J. Topical taurine bromamine compared with clindamycin gel in the treatment of moderate inflammatory acne vulgaris. A pilot study.

3. IV Konferencja Naukowo Szkoleniowa Sekcji Dermatologii Estetycznej Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego 13. 12-15. 12. 2007, Łódź:

Wojas-Pelc A, Lipko - Godlewska S, **Walczevska M**, Jachowicz R, Maciejewska A, Białecka A, Kasprowicz A, Marcinkiewicz J. Ocena skuteczności stosowanej miejscowo bromaminy tauryny w leczeniu trądziku.

4. XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego 3.09-6.09. 2008, Poznań:

Wojas-Pelc A, Lipko-Godlewska S, **Walczevska M**, Jachowicz R, Maciejewska A, Białecka A, Kasprowicz A, J. Marcinkiewicz J. Ocena skuteczności stosowanej miejscowo bromaminy tauryny w leczeniu zmian zapalnych w słabo i średnio nasilonym trądziku.

3. Materiały i Metody

3.1.Odczynniki

✓ **Synteza pochodnych tauryny**

Tauryna, NaOCl, (Sigma Aldrich, USA), NaBr (Chempur, Polska), DPBS (Lonza, Belgia)

✓ **Izolacja makrofagów i neutrofilii i hodowle komórkowe, żywotność komórek**

Tioglikolan (Gibco, USA), heparyna, gentamycyna (Polfa, Polska), podłoża hodowlane: Iscove's Modified Dubelco's Medium (IMDM) i Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza, Belgia), trypsyna z EDTA, surowica bydlęca (FBS) (PAA, USA) lipopolisacharyd E. coli 0.111:B4 (LPS), MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrezolium bromide), dimethyl sulfoxide DMSO (Sigma-Aldrich USA)

✓ **Oznaczenie poziomu cytokin, prostaglandyn, zestawy ELISA**

Streptawidyna (Vector, USA) H₂SO₄ (POCh, Polska), mleko odtłuszczone w proszku (SM Gostyń, Polska), o-fenylo-diamina, H₂O₂ (Sigma Aldrich, USA), królicze przeciwciało przeciw mysiej IL6 (MP5-20F3), biotynylowane szczurze przeciwciało przeciw mysiej IL6 (MP5-32C11), szczurze przeciwciało przeciwko mysiej IL 12p40 (C15.6), zestaw OPtEIA IL10, (BD Pharmingen USA), standard mysiej rekombinowanej IL6, szczurze przeciwciała przeciw mysiemu TNF α (TN3-19), biotynylowane szczurze przeciwciało przeciwko mysiej IL12p40 (C17.8), biotynylowane, szczurze przeciwciało przeciw mysiemu TNF α , rekombinowana mysia IL-12p40, rekombinowany mysi TNF α , zestaw do oznaczenia ludzkiej IL8, OptEIA Human IL-8 Set (eBioscience, USA), poziom prostaglandyn - PGE2 high sensitivity ELISA kit (Enzo Life Sciences)

✓ **Chemiluminescencja**

Luminol (Sigma Aldrich USA), HBSS Hanks Balanced salt solution (HBSS) (Lonza, Belgia), Zymosan A z *Saccharomyces Cerevisiae* (Santa Cruz Biotechnology, USA)

✓ **Oznaczanie poziomu NO**

HCl, dichlorowodorek N-1-naftyetylenodiaminy (NDD) (POCH, Polska), sulfanilamidu (BIS-(4-aminophenyl) - sulphon) DAPSON) (Sigma Aldrich , USA)

✓ **Western blot**

Błękit bromofenolowy, dodecylsulfian sodu SDS (Serva, Austria), TEMED, Nadsiarazan amonu (APS), Tween-20, Triton X-100, zestaw do oznaczenia białka testem BCA (bicinchoninic acid Solution I Coper Sulfate solution), glicerol, ditiotretitol (DTT), trizma base, inhibitory proteaz, substrat dla alkalicznej fosfatazy BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, Niemcy) HCl, glicyna, metanol, (POCH S.A, Polska), poliakrylamid, barwione standardy mas SDS-PAGE (Bio-Rad USA), bydlęca albumina (Roche, USA) królicze poliklonalne przeciwciała przeciwko mysiemu COX-2 (Caymann, USA), królicze poliklonalne przeciwciała przeciwko iNOS, mysie monoklonalne przeciwciała przeciwko HO-1 (Enzo Life Sciences, USA), kozie przeciwciała przeciwko mysiej IgG sprzężone z alkaliczną fosfatazą, kozie przeciwciała przeciwko króliczej IgG sprzężone z alkaliczną fosfatazą, mysie monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko β -aktynie (Sigma-Aldrich, USA), DPBS (Lonza, Belgia)

✓ **Hodowle bakteryjne**

Müller-Hinton agar, krew barania, Shaedler Agar, (bioMérieux, Francja), NaCl (POCH, Polska)

✓ Bufory

TBST - 0,9% roztwór NaCl buforowany Trisma Base z dodatkiem 0,1% Tween 20

Bufor do testów ELISA - PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ x 12H₂O, KH₂PO₄) +0,05% Tween 20

✓ Plastik i drobny sprzęt laboratoryjny

Butelki hodowlane o pojemności 50 i 150 ml, płytki hodowlane: 96 dołkowe, 24 dołkowe płaskodenne, płytki ELISA (Nunc, Dania lub Falcon, Corning USA), membrany nitrocelulozowe (Bio-Rad, USA), skrobaczki do komórek, probówki plastikowe o pojemności 15 i 50 ml (Falcon, USA), ciemne płytki do chemiluminescencji (Nunc, Dania)

3.2. Pochodne Tauryny

Bromamina tauryny (TauBr), Chloramina tauryny (TauCl), N-monobromo-dimetylotauryna (612Br).

3.2.1 Przygotowanie TauBr, TauCl, 612Br

TauBr syntetyzowano w dwuetapowej procedurze. W pierwszym etapie zsyntetyzowano NaOBr w reakcji równomolowych ilości bromku sodu (NaBr) oraz podchlorynu sodu (NaOCl) w buforze fosforanowym (DPBS). W takich warunkach wszystkie obecne jony OCl⁻ reagują z jonami Br⁻. Obecność i stężenie NaOBr sprawdzano spektrofotometrycznie w zakresie fal $\lambda=200$ do 400 nm, stężenie NaOBr wyznaczano przy pomocy molowego współczynnika absorpcji dla NaOBr: $\epsilon - 332 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ przy A₃₂₉. W drugim etapie mieszano równe ilości NaOBr i tauryny przez nakropienie roztworu 20mM NaOBr do roztworu 400mM Tauryny. Stężenie TauBr w produkcie końcowym oraz obecność ewentualnych dwubromamin (TauBr₂) określone zostało spektrofotometrycznie za pomocą spektrofotometru „Power Wave X” Tekan. Stężenie TauBr wyznaczano przy pomocy molowego współczynnika absorpcji dla TauBr: $\epsilon - 430 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ przy A₂₈₅.

TauCl, sól sodową w postaci krystalicznej, otrzymano z Innsbrucku dzięki uprzejmości prof. Markusa Nagla i prof. Waldemara Gottardiego (Innsbruck) Dimetylotauryna do syntezy 612Br została udostępniona dzięki uprzejmości D. Debabova i R. Najafiego (NovaBay Pharmaceuticals, Inc., Emeryville, CA, USA) i bromowana do 612Br przez prof. Markusa Nagla i prof. Waldemara Gottardiego. Z obu substancji przygotowywano roztwory wodne lub roztwory w DPBS na podstawie masy molowej.

3.3. Model badawczy

W pierwszym etapie badań oceniono wpływ badanych: 612Br, chloraminy tauryny (TauCl) oraz bromaminy tauryny (TauBr) na żywotność komórek. W kolejnym etapie oceniono wpływ badanych haloamin tauryny na produkcję cytokin pro i przeciw zapalnych, produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), tlenku azotu (NO) oraz prostaglandyn (PGE₂). W następnym etapie badań sprawdzano właściwości mikrobójcze badanych substancji w stosunku do wybranych szczepów bakteryjnych Gram (+) *P. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis* oraz Gram (-), *P. aeruginosa*.

3.4. Komórki

Komórki wysięku otrzewnowego:

- ✓ makrofagi otrzewnowe - 72 godzinne komórki wysięku otrzewnowego,
- ✓ neutrofile - 18 godzinne komórki wysięku otrzewnowego.

Linie komórkowe:

- ✓ linia makrofagów mysich J774.A1,
- ✓ linia keratynocytów ludzkich HaCaT.

3.4.1 Izolacja komórek wysięku otrzewnowego

Komórki wysięku otrzewnowego izolowano od myszy szczepu CBA (wiek 6-8 tygodni). Myszy pochodzą z własnej hodowli Katedry Immunologii UJ CM. Zwierzęta hodowane są w ilości 4-5 na klatkę w standardowych warunkach z dostępem do pożywienia i wody bez ograniczeń. Pozwolenie Lokalnej Komisji Etycznej na użycie zwierząt do eksperymentów (uchwała nr 91/2011 z dnia 21 września 2011 roku). Wysięk otrzewnowy zaindukowano dootrzewnowym podaniem tioglikolanu, 18 lub 72 godzin przed pobraniem komórek. Makrofagi otrzewnowe lub neutrofile uzyskano z płynu otrzewnowego zabitych myszy, po przepłukaniu jamy otrzewnowej buforem DPBS z heparyną.

3.4.2 Hodowle komórkowe

Makrofagi otrzewnowe hodowano na płytkach hodowlanych 24-dółkowych w płynie hodowlanym IMDM. Komórki linii J774.A1 oraz komórki linii HaCaT hodowano w płynie hodowlanym DMEM. Płyn hodowlany wzbogacono o 5% FBS i gentamycynę (50 µg/ml). Wszystkie hodowle prowadzono w temperaturze 37° C, w atmosferze zawierającej, 5% CO₂. Komórki stymulowano wybranymi stężeniami badanych substancji, a następnie zbierano nadsącze i zamrażano, aż do użycia.

3.5 Ocena żywotności komórek

Żywotność komórek hodowanych *in vitro* oceniano przy pomocy testu redukcji soli tetrazolowej (MTT) do formazanu przez dehydrogenazy żywych komórek. Makrofagi otrzewnowe oraz makrofagi linii J774.A1 hodowano na płytce 96 - dołkowej w gęstości 5×10^4 na dołek, komórki linii HaCaT hodowano na płytce 96 dołkowej w gęstości 2×10^4 na dołek.

*** Makrofagi otrzewnowe oraz makrofagi linii J774.A1:**

W pierwszym etapie do medium hodowlanego (DMEM lub IMDM) bez surowicy (FBS) dodawano substancje badane: TauCl, TauBr, 612Br w stężeniach od 1 do 0,001 mM. Po 1,5 godzinie zmieniano medium na medium z 5% FBS oraz lipopolisacharydem (LPS) o stężeniu 100 ng/ml.

***Linia keratynocytów ludzkich HaCaT:**

W pierwszym etapie komórki HaCaT wysiewano na płytkę 96 - dołkową w odpowiedniej gęstości i hodowano w DMEM + 5% FBS przez 24 godziny, lub aż do osiągnięcia ok. 80-90% konfluencji. Po 24 godzinach komórki przepłukiwano DPBS i wymieniano medium, na medium bez dodatku FBS, następnie dodawano substancje badane: TauCl, TauBr, 612Br w stężeniach od 4 do 0,003 mM. Po 1,5 godzinie zmieniano medium na medium z lipopolisacharydem (LPS) o stężeniu 25 μ g/ml.

Po 24 godzinach hodowli zarówno makrofagów jak i komórek HaCaT usuwano medium i nakładano świeże medium z dodatkiem MTT. Po dalszych 10 - 30 minutach inkubacji usuwano medium z MTT, następnie zalewano komórki DMSO w ilości 100 μ l na dołek w celu rozpuszczenia wytraconych kryształków formazanu. Stężenie

produktu końcowego oceniano mierząc absorpcję przy $\lambda = 510$ nm. Ilość powstałego w trakcie reakcji redukcji formazanu jest proporcjonalna do ilości żywych komórek.

3.6 Ocena wpływu 612Br, TauBr i TauCl, na produkcję cytokin

***Makrofagi otrzewnowe oraz makrofagi linii J774.A1**

Makrofagi linii J774.A1 oraz makrofagi otrzewnowe wysiewano na 24 - dołkowe płytki w gęstości 5×10^5 na dołek. w DMEM lub IMDEM z dodatkiem 5 % FBS. W celu uzyskania warstwy adherentnych komórek, po 15 minutach preinkubacji, medium wymieniano na świeże, z dodatkiem badanych substancji: 612Br, TauBr i TauCl, w stężeniach 100 i 300 μM bez dodatku surowicy. Po 1,5 godzinnej inkubacji medium wymieniano na świeże z dodatkiem 5% FBS oraz LPS 100 ng/ml. Po 24 godzinach hodowli zbierano nadsącze, w których oznaczano poziom cytokin, PGE_2 oraz NO.

*** Linia keratynocytów ludzkich HaCaT**

W pierwszym etapie komórki HaCaT wysiewano na płytkę 24 - dołkową w gęstości 2×10^5 na dołek i hodowano w DMEM z dodatkiem 5% FBS przez 24 godziny, lub aż do osiągnięcia konfluencji ok 80-90%. Po tym czasie komórki przepłukiwano DPBS i wymieniano medium, na medium bez dodatku FBS, następnie dodawano substancje badane: 612Br, TauBr i TauCl, w stężeniach od 1 do 0,003 mM. Po upływie 1,5 godziny zmieniano medium na medium z LPS 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Po 24 godzinnej hodowli zbierano nadsącze, w których oznaczano poziom cytokin.

3.6.1 Oznaczenie poziomu cytokin

Poziom cytokin oznaczano testem ELISA. Stężenie cytokin w nadsączach z hodowli komórkowych oznaczono przy użyciu immunoenzymatycznej metody ELISA. Płytkę 96 - dołkową pokrywano przeciwciałem skierowanym przeciwko wybranej cytokinie i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 4° C. Po zablokowaniu płytki roztworem 3% odtłuszczonego mleka (2 godziny), nakładano badane próbki i standardy dla każdej z cytokin. Po kolejnej 24 godzinnej inkubacji w temperaturze 4° C, nakładano biotynylowane przeciwciała skierowane przeciwko wybranej cytokinie. Całość inkubowano 1 godzinę, po czym dodano peroksydazę chrzanową sprzęgniętą ze streptawidyną na kolejne 45 minut. Następnie dodano substraty, dzięki którym otrzymano barwną reakcję: H₂O₂ i o-fenylo-diaminę. Po 30 minutach zatrzymano reakcję poprzez dodanie 3M H₂SO₄. Intensywność barwy próbek odczytano przy użyciu spektrofotometru PowerWave X (Bio-Tek Instruments, USA), przy długości fali 492 nm. Stężenie cytokin odczytywano opierając się na krzywych standardowych przygotowanych dla poszczególnych rekombinowanych cytokin. Pomędzy poszczególnymi inkubacjami płytki były płukane 0,05% roztworem Tween 20 w PBS. Wyjątek do powyższej procedury stanowiło oznaczenie IL10 oraz ludzkiej IL8, gdzie test przeprowadzono według instrukcji załączonej przez producenta zestawu.

Do oznaczenia IL6 stosowano przeciwciała: MP5-20F3 (5 mg/ml) oraz biotynylowane MP5-32C11 (2 mg/ml) (BD Pharmingen, USA). Jako standardu użyto mysiej rekombinowanej IL-6 (eBioscience, USA).

Do oznaczenia IL12p40 stosowano przeciwciała C15.6 (5 mg/ml) (BD Pharmingen, USA) oraz biotynylowane C17.8 (1 mg/ml) (eBioscience, USA). Jako standardu użyto rekombinowanej mysiej IL-12p40 (eBioscience, USA).

Do oznaczenia TNF α stosowano przeciwciała TN3-19 (2 mg/ml) oraz biotynylowane poliklonalne (2 mg/ml) oba (eBioscience, USA). Jako standardu użyto rekombinowanego mysiego TNF α (eBioscience, USA).

Do oznaczenia IL10 stosowano gotowy zestaw OptEIA (BD Pharmingen, USA).

Do oznaczenia IL8 ludzkiej w nadsączach z hodowli komórek HaCaT stosowano gotowy zestaw OpteEIA Human IL-8 Set (eBioscience, USA).

3.7 Oznaczenie poziomu tlenku azotu (NO) w nadsączach hodowli komórkowych

Stężenie tlenku azotu w nadsączach oznaczano poprzez pomiar stężenia azotynów, stabilnych metabolitów NO wykorzystując metodę Griessa (Ding AH i wsp. 1988). Do 100 μ l badanego nadsączu hodowli dodano 50 μ l 1% sulfanilamidu rozpuszczonego w 2M HCl a następnie 50 μ l 0,1% dichlorowodoru N-1-naftyletylenodiaminy(NDD). Po 10 minutach inkubacji w temperaturze 23⁰ C mierzono absorpcję przy λ = 550nm, a stężenie azotynów wyznaczano z krzywej standardowej (sporządzonej w oparciu o wzorcowe roztwory NaNO₂).

3.8 Ocena wpływu 612Br, TauBr i TauCl, na produkcję reaktywnych form tlenu (ROS)

Ocenę wpływu badanych substancji na produkcję ROS wykonano za pomocą testu chemiluminescencji zależnej od luminolu (LCL). Luminol w reakcji z ROS wchodzi na wyższy stopień energetyczny, a następnie uwalnia kwant energii. Związek ten pozwala na ocenę ROS zewnątrz- i wewnątrzkomórkowo. 18 godzinne komórki wysięku otrzewnowego-neutrofile po izolacji i odpłukaniu zawieszano w HBSS, liczone, następnie mieszano 1: 1 z luminolem (0,8 mg/ml) i wysiewano po 100 μ l / dołek, na 96-dołkową płytkę do chemiluminescencji, w gęstości 5×10^5 na dołek i umieszczano na 30 min w temperaturze 37°C. Następnie dodawano kolejno 100 i 300 μ M stężenia roztworów 612Br, TauBr oraz TauCl, i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37° C. Po czym dodawano 20 μ l/dołek zawiesiny opsonizowanego zymosanu (0,2 mg/ml) lub zabitych bakterii szczepu *P. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus* lub *P. aeruginosa*. Zabite komórki bakterii nakładano w takiej ilości na dołek, aby na jedną komórkę neutrofilową przypadało około 10 komórek bakteryjnych. Płytkę niezwłocznie umieszczano w czytniku oznaczającym względną intensywność luminescencji (Anthos Lucy, Austria). Pomiaru dokonywano przez 75 minut w 3 minutowych interwałach.

3.9 Oznaczanie poziomu prostaglandyn (PGE₂)

Poziom PGE₂ mierzono przy użyciu gotowych testów immunoenzymatycznych metodą ELISA zgodnie z instrukcją producenta. Test oparty był na zasadzie konkurencji pomiędzy produkowanymi przez makrofagi PGE₂, a stałym stężeniem sprzężonego z alkaliczną fosfatazą standardu. Intensywność barwy mierzonej spektrofotometrycznie przy

długości fali $\lambda = 405$ nm była wprost proporcjonalna do ilości sprzężonego standardu, a odwrotnie proporcjonalna do ilości uwalnianych PGE₂. Pomiaru dokonano przy użyciu spektrofotometru PowerWave X (Bio-Tek Instruments, USA).

3.10 Ocena ekspresji HO-1, COX-2 oraz iNOS metodą Western Blot

Poziom ekspresji białka COX-2, HO-1 oraz iNOS oznaczano przy pomocy techniki Western Blot. Makrofagi hodowane w obecności wybranych stężeń 612Br, TauBr i TauCl stymulowane LPS przeznaczone do oznaczenia poddawano lizie w buforze zawierającym 1% Triton X - 100 i 0,1% SDS w DPBS oraz mieszaninę inhibitorów proteaz. Całkowite stężenie białka w otrzymanych lizatach komórkowych oznaczono przy użyciu testu BCA. Próbkę zawierającą równą ilość białka (14 lub 20 μ g) zawieszano w buforze obciążającym o składzie 0,125 M Trisma-base, 4% SDS, 20% glicerol, 0,2 M ditiotreitol oraz 0,02% błękit bromofenolowy w stosunku objętościowym 2: 1 i denaturowano przez 4 minuty w 100°C. Próbkę nakładano na żel poliakrylamidowy z dodatkiem 10% SDS i poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w systemie Laemmliego przy użyciu aparatu Mighty Small II (Amersham Biosciences, USA) (Laemmli 1970). Rozdzielone białka przenoszono na membrany nitrocelulozowe (Bio-Rad, USA) wykorzystując w aparacie do transferu Hoefer TE22 (Amersham Biosciences, USA). Po całkowitej inkubacji z roztworem białka blokującego w 4° C (3% mleko odtłuszczone), membrany inkubowano przez 2 godziny z króliczymi poliklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko COX-2 (5 μ g/ml) lub z mysimi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko HO-1 (1:2000), albo poliklonalnymi króliczymi przeciwciałami przeciwko iNOS (1:2000) oraz z mysimi monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko β -aktynie (1:2000;

Sigma-Aldrich, Niemcy). Inkubacje prowadzono w temperaturze pokojowej. Następnie po trzykrotnym płukaniu membran w 0,9% roztworze NaCl buforowanym Tris z dodatkiem 0,1% Tween 20 (TBST), inkubowano je przez 2 godziny w tej samej temperaturze z drugorzędowymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko króliczym lub mysim IgG (1: 3000) oraz kozimi przeciwciałami IgG sprzężonymi z alkaliczną fosfatazą (1:3000). Prążki zostały wywołane przy użyciu substratu dla alkalicznej fosfatazy BCIP/NBT. Jako znacznika mas używano barwionego standardu o zakresie 22-114 kDa lub 48-204 kDa (Bio-Rad, USA). Wybarwione membrany zostały zeskanowane, a gęstość optyczną uzyskanych prążków analizowano przy użyciu programu Scion Image dla Windows (Scion, USA). Pomędzy poszczególnymi inkubacjami membrany były płukane w roztworze TBST. Wyniki zostały przedstawione, jako stosunek gęstości optycznej badanego białka do białka β -aktyny, która ulega konstytutywnej ekspresji w komórkach.

3.11 Ocena właściwości mikrobójczych 612Br, TauBr oraz TauCl

3.11.1 Przygotowanie szczepów bakteryjnych

Do badań użyto szczepy z kolekcji szczepów wzorcowych *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1128, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 oraz *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

Szczepy bakteryjne przechowywano w stanie zamrożenia w -70°C w mikrobankach, przed przystąpieniem do badań posiewano je na podłoża stałe i inkubowano w odpowiednich warunkach. Szczep *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa* posiewano na podłoże Müller - Hinton agar i inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37°C . Szczep *Staphylococcus epidermidis* posiewano na podłoże Müller - Hinton agar z dodatkiem 5%

krwi baraniej i inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37° C. Natomiast szczep *Propionibacterium acnes* posiewano na podłoże Schaedler Agar i inkubowano w temp 37° C przez 5 dni.

3.11.2 Określenie mikrobójczego działania 612Br, TauBr i TauCl

Bezpośrednio przed rozpoczęciem badania z hodowli na podłożach stałych przygotowywano zawiesinę drobnoustrojów *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* i *P. acnes* tak, aby jej końcowe stężenie wynosiło 10⁵ CFU/ml i 10⁸ CFU/ml, w 0.9% NaCl (pH 7.4), a następnie inkubowano w zamkniętych próbkach z różnymi stężeniami substancji badanych, w 37° C przez 1 godzinę (100 µl zawiesiny drobnoustrojów + 1ml testowanej substancji). Zakres stężeń testowanych substancji wynosił od 0,5 µM - 10 mM. Do badań wykorzystywano rozcieńczenia połówkowe (w postępie arytmetycznym) badanych substancji w 0,9 % NaCl. Inkubację prowadzono w temperaturze 37° C przez 1 godzinę, po zakończeniu inkubacji bakterie posiewano na podłoża stałe, pobierając z każdej próbki, po dokładnym wymieszaniu, 100 µl zawiesiny. Dla szczepu *S. aureus* i *P. aeruginosa* stosowano podłoże Müller-Hinton agar, hodowle inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37° C. Dla *S. epidermidis* stosowano podłoże Müller-Hinton agar z dodatkiem 5 % krwi baraniej, inkubacje prowadzono przez 24 godzin w temperaturze 37° C. Dla *P. acnes* stosowano podłoże Schaedler Agar inkubacje prowadzono przez 3 dni w warunkach beztlenowych w temperaturze 37° C.

Po zakończeniu inkubacji liczono ilość kolonii, uwzględniając rozcieńczenie i porównując z kontrolą. Przygotowując kontrole wzrostu postępowano jak w przypadku

próbek badanych, nie dodając substancji przeciwbakteryjnej. Badania w układzie kontrolnym i badawczym przeprowadzono 3-krotnie dla każdego modelu badawczego.

Działanie mikrobójcze badanych substancji określono, jako:

- ✓ MIC (ang. minimal inhibitory concentration) MIC to najmniejsze stężenie środka bakteriobójczego całkowicie hamujące wzrost drobnoustrojów, w którym nie zaobserwowano wzrostu mikroorganizmu, wyrażone w mikromolach.
- ✓ MBC (ang. minimal bactericidal concentration). MBC to stężenie substancji, przy którym występuje zmniejszenie żywych komórek drobnoustroju o 99,9%. MBC jest zawsze większe lub równe MIC.

3.12. Analiza Statystyczna

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy pomocy programu GraphPad Prism ver. 5.01 (GraphPad Software, USA). Wyniki przedstawiono, jako średnią arytmetyczną \pm błąd średni. W przypadku porównywania większej ilości grup stosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post hoc Tukey. Za istotną przyjmowano wartość o $p < 0,05$.

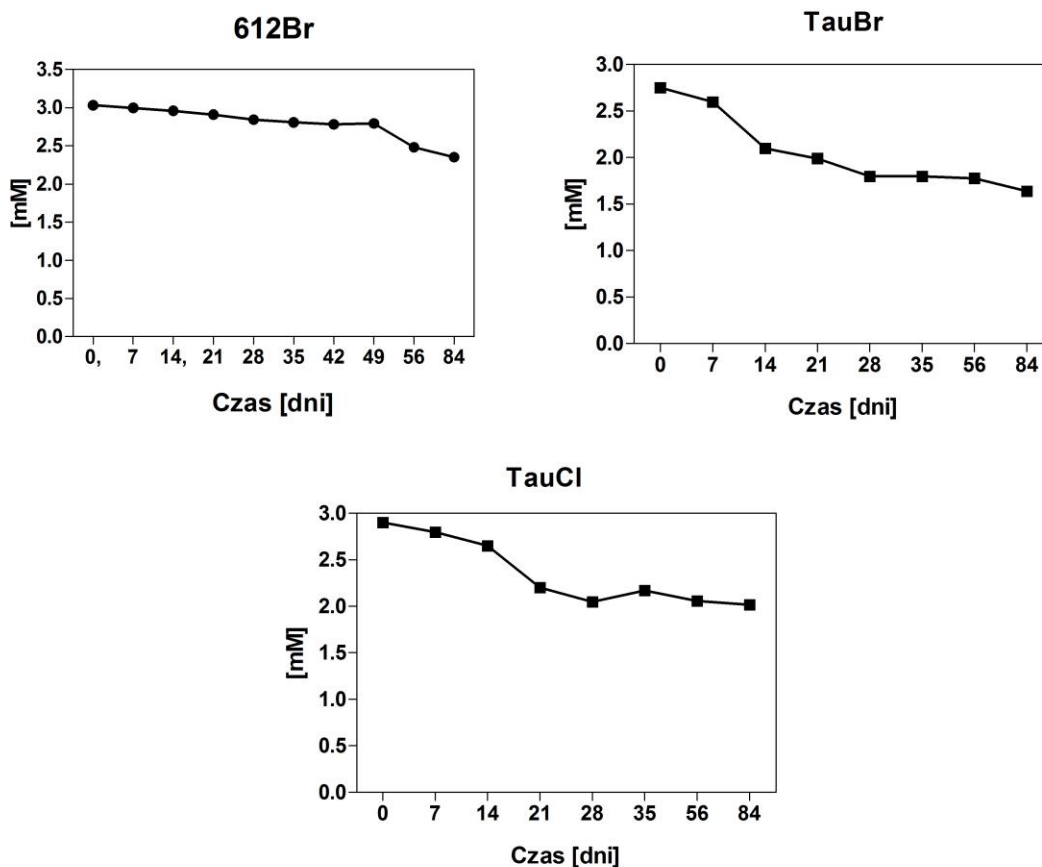
4. Wyniki

4.1. Ocena właściwości fizykochemicznych 612Br w zależności o warunków przechowywania (temperatura, czas, pH)

W celu oceny trwałości 612Br oraz TauBr i TauCl przechowywano je w temperaturze pokojowej (23⁰ C) oraz w lodówce (4⁰ C) przez okres 84 dni. Rozkład wszystkich badanych substancji jest czaso i temperaturozależny. 612Br, TauBr i TauCl wykazują większą trwałość w temperaturze 4⁰ C niż w temperaturze 23⁰ C (**Ryc. 4.1, 4.2**). W przypadku TauBr zaobserwowano, około 20% spadek stężenia po 14 dniach przechowywania w 4⁰ C, a w przypadku TauCl po 21 dniach przechowywania w 4⁰ C (**Ryc. 4.1, Tabela 4.2**). Tymczasem w przypadku 612Br wykazano ~ 19% spadek stężenia, dopiero w 56 dniu przechowywania w 4⁰ C (**Ryc. 4.1**). W temperaturze 23⁰ C najmniejszą trwałość ma TauBr, już w 7 dniu obserwowano ~ 24% spadek stężenia. Natomiast w przypadku 612Br wykazano ~24% spadek stężenia w 42 dniu przechowywania, a dla TauCl obserwowano ~ 28% spadek stężenia w 14 dniu przechowywania (**Ryc. 4.2, Tabela 4.3**). 612Br jest więc znacznie trwalsza niż TauBr i TauCl zarówno w temperaturze 23⁰ C jak i 4⁰ C.

Tabela 4.1 Wartości λ_{\max} dla badanych haloamin tauryny (wg Thomas i wsp. 1986,1983)

Związek	TauCl	TauBr	612Br	TauCl ₂		TauBr ₂		612Br ₂
Molowy współczynnik absorpcji (M ⁻¹ *cm ⁻¹)	429	430	430					
Długość fali λ_{\max}	252	285	283	207	300	241	336	241

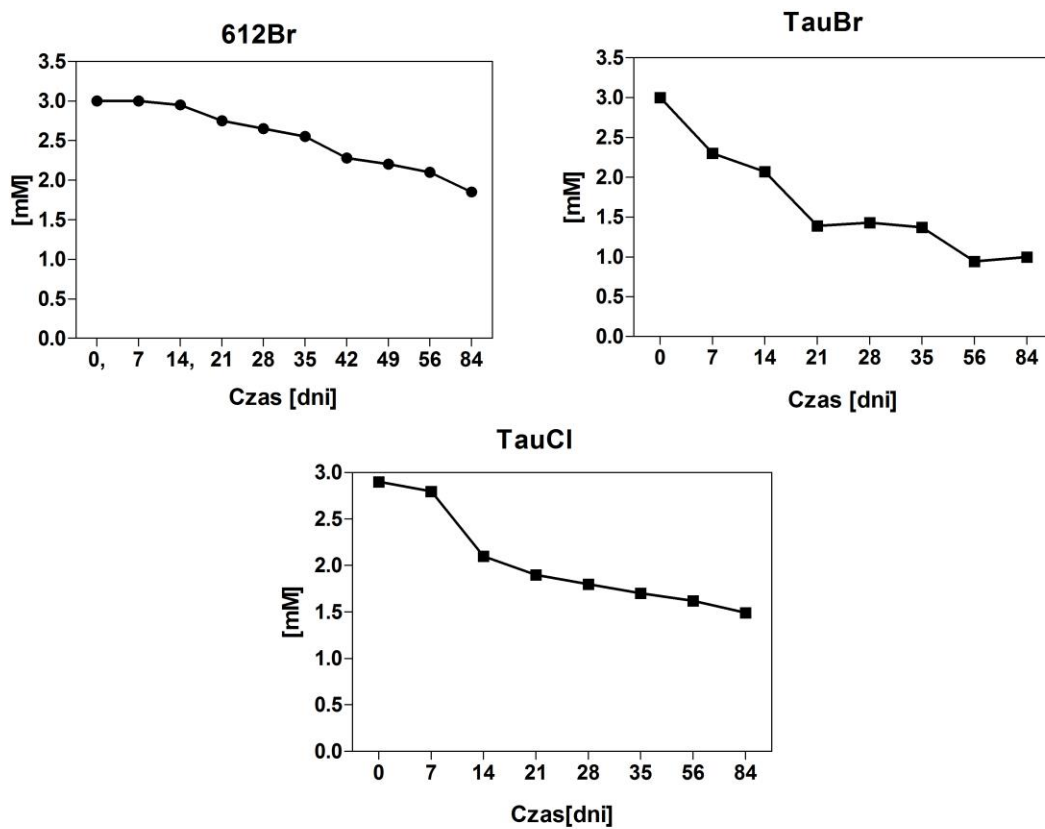


Ryc. 4.1 Ocena trwałości 612Br, TauBr i TauCl, w temperaturze 4⁰ C. Roztwory badanych substancji o stężeniu 3mM były przechowywane w lodówce przez 84 dni. Pomiarów stężeń metodą spektrofotometryczną dokonywano co 7 dni.

Tabela. 4.2 . Spadek stężenia 612Br, TauBr, TauCl w zależności od czasu przechowywania w temperaturze 4⁰C.

Dzień przechowywania	7	14	21	28	35	56	84
Spadek stężenia (%)							
Związek							
TauBr	4	20	29	35	35	37	41
612Br	1	1	3	6	7	19	24
TauCl	4	6	24	30	25	29	31

Spadek stężenia podano jako procentową różnicę między stężeniem substancji w dniu 0, a stężeniem w kolejnych dniach pomiarowych, jako 100% przyjmując stężenie substancji w dniu pomiarowym 0.



Ryc. 4.2 Ocena trwałości 612Br, TauBr, TauCl, w temperaturze pokojowej 22^o C. Roztwory badanych substancji o stężeniu 3 mM były przechowywane w temperaturze pokojowej przez 84 dni. Pomiarów stężeń metodą spektrofotometryczną dokonywano co 7 dni.

Tabela. 4.3 Spadek stężenia 612Br, TauBr, TauCl w zależności od czasu przechowywania w temperaturze 23^o C

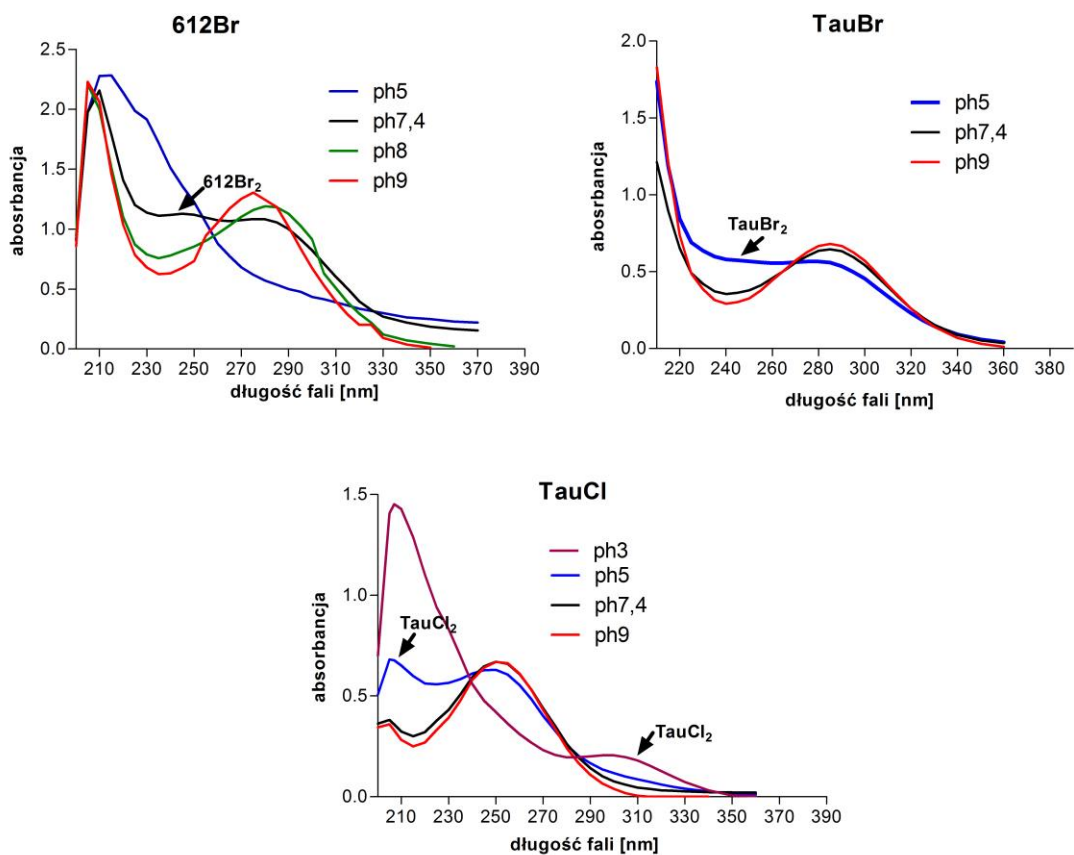
Dzień przechowywania	7	14	21	28	35	42	56	84
Spadek stężenia (%)								
Związek								
TauBr	24	32	54	53	55		69	67
612Br	0	2	8	11	15	24	30	39
TauCl	4	28	35	38	42		44	49

Spadek stężenia podano jako procentową różnicę między stężeniem substancji w dniu 0, a stężeniem w kolejnych dniach pomiarowych, jako 100% przyjmując stężenie substancji w dniu pomiarowym 0.

Porównywano również widma absorpcji badanych substancji w zależności od pH przechowywania. Roztwory badanych substancji doprowadzono do różnych wartości pH od 3 do 9, a następnie oceniano spektrofotometrycznie ich widma absorpcji. 612Br, TauBr i TauCl posiadają charakterystyczne widma absorpcji w zakresie długości fal od 200 do 400 nm, z maksimum absorpcji przy $\lambda_{\max}=285$ dla TauBr, $\lambda_{\max}=283$ dla 612Br oraz $\lambda_{\max}=252$ dla TauCl (**Tabela 4.1**). W pH 3 oraz 5 wszystkie badane substancje ulegają reakcji dysproporcjonowania (Równania 1, 2, 3), w wyniku której obserwowano przesunięcie maksimum widma absorpcji 612Br i TauBr w kierunku dwubromamin (TauBr_2 , 612Br_2) $\lambda_{\max}= 242$, lub 336 a widma absorpcji TauCl w kierunku dwuchloramin (TauCl_2) $\lambda_{\max}=207$ lub 300 nm (**Ryc. 4.3**).

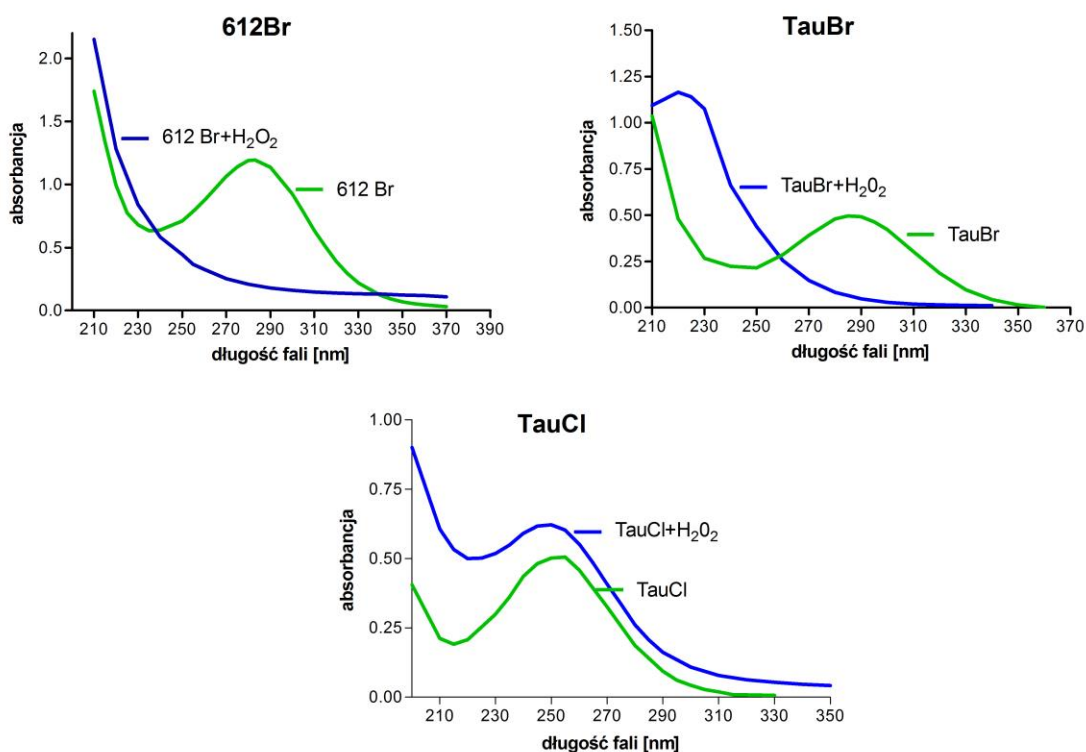
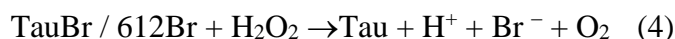


W buforze o $\text{pH} \leq 7,4$ 612Br ulega reakcji dysproporcjonowania, równowaga reakcji jest przesunięta w kierunku dwubromaminy (**Ryc. 4.3**). W roztworze 612Br o $\text{pH} \geq 8$, podobnie jak w przypadku TauBr i TauCl nie zaobserwowano zmian w widmie absorpcji.



Ryc. 4.3. Porównanie widma absorpcji TauBr, TauCl oraz 612Br w zależności od pH. Roztwory badanych substancji doprowadzono do różnych wartości pH od 3 do 9. Następnie widmo absorpcji oceniano spektrofotometrycznie.

Zbadano również trwałość wszystkich związków w obecności H₂O₂ (Marcinkiewicz i wsp. 2005) 612Br, TauBr i TauCl inkubowano z równomolowym stężeniem H₂O₂. TauCl nie reaguje z H₂O₂. Zarówno TauBr jak i 612Br ulegają rozkładowi w reakcji z H₂O₂ (Ryc. 4.4, Równanie 4).

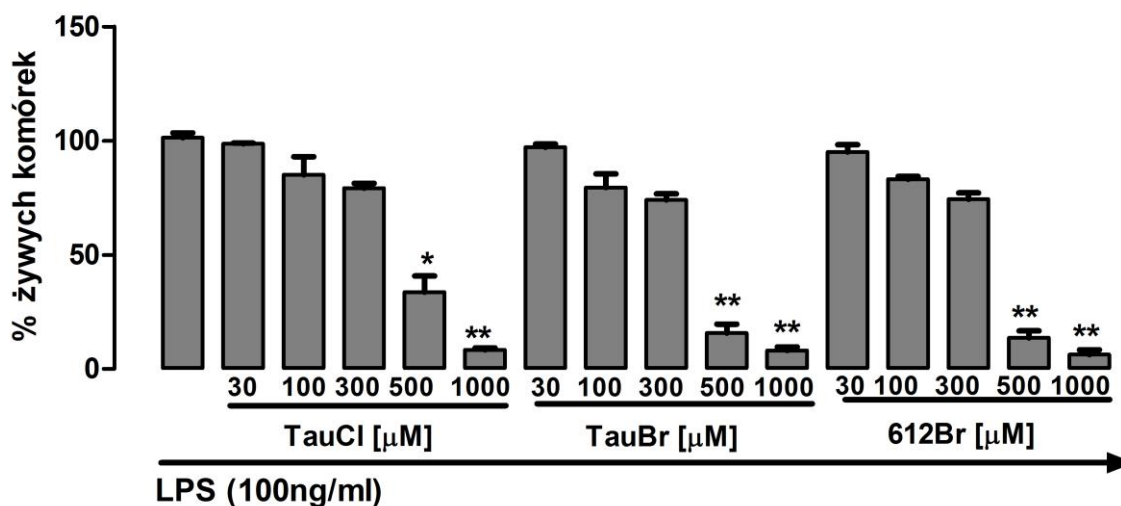


Ryc. 4.4 Wpływ H₂O₂ na trwałość TauBr, TauCl, 612Br. Badane substancje inkubowano z równomolowym stężeniem H₂O₂ przez 30 minut, następnie wykonywano badanie widma absorpcji metodą spektrofotometryczną.

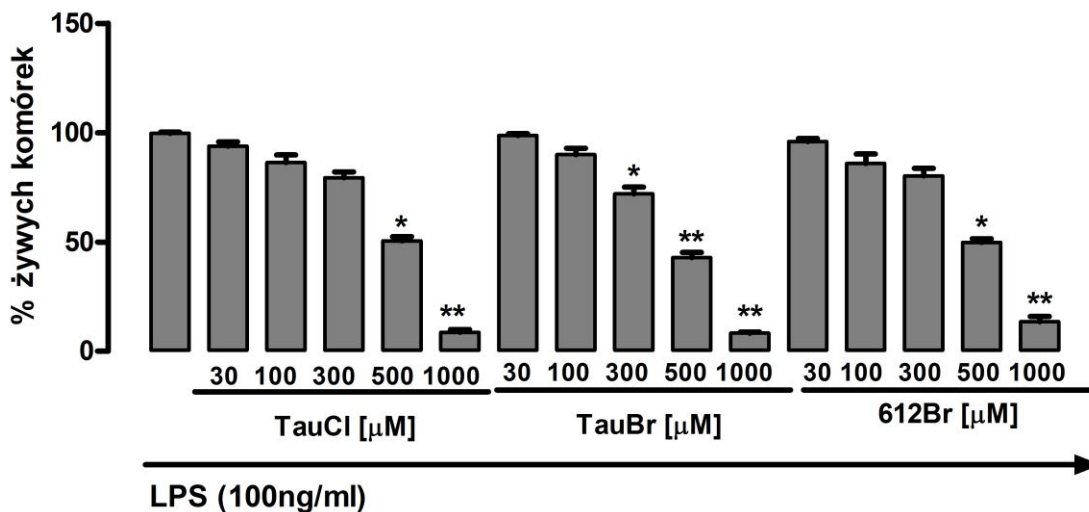
Powyższe wyniki pokazują, że zarówno w temperaturze 23⁰ C, jaki i 4⁰ C 612Br wykazuje największą trwałość. Podobnie jak TauBr wchodzi w reakcję z H₂O₂. W pH 5 612Br, podobnie jak TauBr i TauCl, ulega reakcji dysproporcjonowania do dwubromaminy, stabilna jest natomiast w pH 8 i 9.

4.2. Ocena wpływu 612Br na żywotność makrofagów otrzewnowych, makrofagów linii J774.A1 oraz keratynocytów linii HaCaT

Oceniano wpływ 612Br na żywotność aktywowanych LPS komórek pełniących istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej (makrofagów i keratynocytów linii HaCaT). Wykazano, że 612-Br, TauBr oraz TauCl w zakresie stężeń do 300 μM są niecytotoksyczne. Żywotność makrofagów otrzewnowych i makrofagów linii J774.A1 w obecności 612Br TauBr i TauCl w zakresie stężeń 30 - 300 μM wynosiła ~75-97%. Natomiast stężenie 500 μM wszystkich badanych substancji powoduje znamiennej statystycznie spadek żywotności makrofagów otrzewnowych i makrofagów linii J774.A1. Przy stężeniu 500 μM zaobserwowano spadek żywotności komórek poniżej ~20% (Ryc. 4.5, 4.6). Tauryna stosowana sama nie miała wpływu na żywotność komórek.

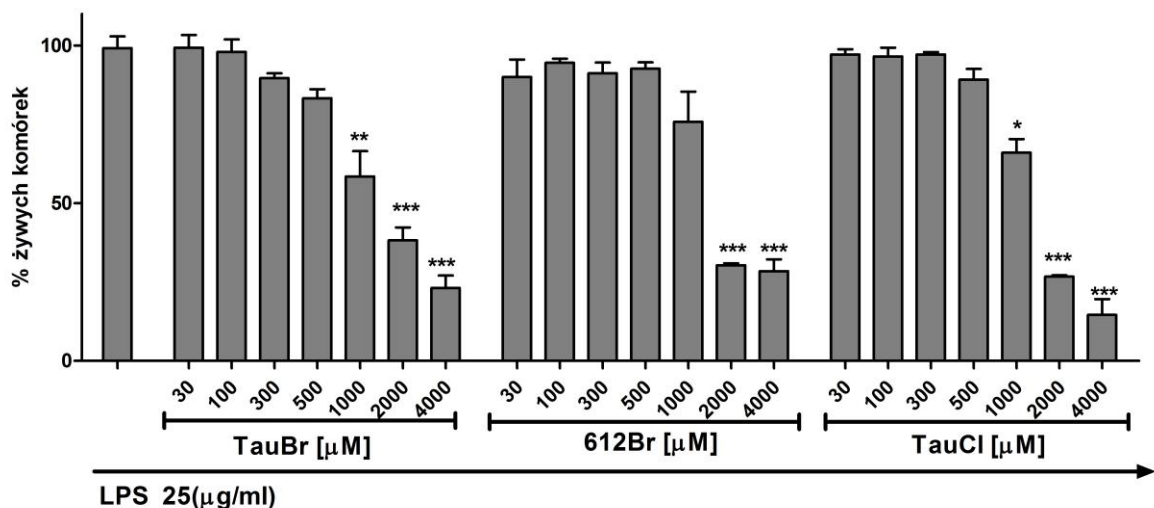


Ryc. 4.5 Wpływ 612Br, TauBr oraz TauCl na żywotność makrofagów otrzewnowych. Makrofagi inkubowano z różnymi stężeniami badanych substancji (30-1000 μM) przez 1,5 godziny w medium bez FBS. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS w stężeniu 100 ng/ml i hodowano dalsze 24 godziny w obecności 5% FBS. Po 24 godzinach sprawdzano żywotność komórek testem MTT. Przedstawione wyniki stanowią średnią \pm błąd średni z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus kontrola - komórki stymulowane LPS.



Ryc. 4.6 Wpływ 612Br, TauBr oraz TauCl na żywotność makrofagów linii J774.A1. Komórki inkubowano z różnymi stężeniami badanych substancji (30-1000 µM) przez 1,5 godziny w medium bez FBS. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS w stężeniu 100 ng/ml i hodowano dalsze 24 godziny w obecności 5% FBS. Po 24 godzinach sprawdzano żywotność komórek testem MTT. Przedstawione wyniki stanowią średnią, +/- błąd średni, z trzech niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus kontrola- komórki stymulowane LPS.

W przypadku linii keratynocytów ludzkich HaCaT zakres stężeń niecytotoksycznych badanych związków był zdecydowanie wyższy. Przy stężeniu do 500 µM obserwowano żywotność komórek na poziomie 80-90%. Większy spadek żywotności komórek obserwowano dopiero przy stężeniu 1000 µM. Przy stężeniach od 2000 do 4000 µM żywotność komórek wynosi około 30% przy stężeniu 2000 µM oraz około 15% przy stężeniu 4000 µM (**Ryc. 4.7**).



Ryc. 4.7 Wpływ 612Br TauBr oraz, TauCl na żywotność **keratynocytów linii HaCaT**. Hodowlę keratynocytów prowadzono przez 24 godziny do osiągnięcia 80-90% konfluencji, w medium z dodatkiem 5% FBS, po tym czasie wymieniano medium na medium bez FBS. Następnie komórki inkubowano z różnymi stężeniami badanych substancji (30-4000 µM) przez 1,5 godziny w medium bez FBS. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS w stężeniu 25 µg/ml i hodowano dalsze 24 godziny w medium bez FBS. Po 24 godzinach sprawdzano żywotność komórek testem MTT. Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych eksperymentów +/- błąd średni *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 *versus* kontrola - komórki stymulowane LPS.

Powyższe wyniki pokazują, że 612Br, podobnie jak TauBr i TauCl, jest niecytotoksyczna w stężeniach do 300 µM w przypadku makrofagów otrzewnowych i makrofagów linii J774.A1 W przypadku linii keratynocytów ludzkich zakres stężeń znamienne cytotoksycznych dla 612Br wynosił od 2000 do 4000µM. 612Br wykazuje podobny wpływ na żywotność makrofagów otrzewnowych, makrofagów linii J774.A1 oraz keratynocytów linii HaCaT, jak TauBr i TauCl. Jest nieco mniej cytotoksyczna niż TauBr.

4.3. Ocena właściwości immunomodulacyjnych 612Br

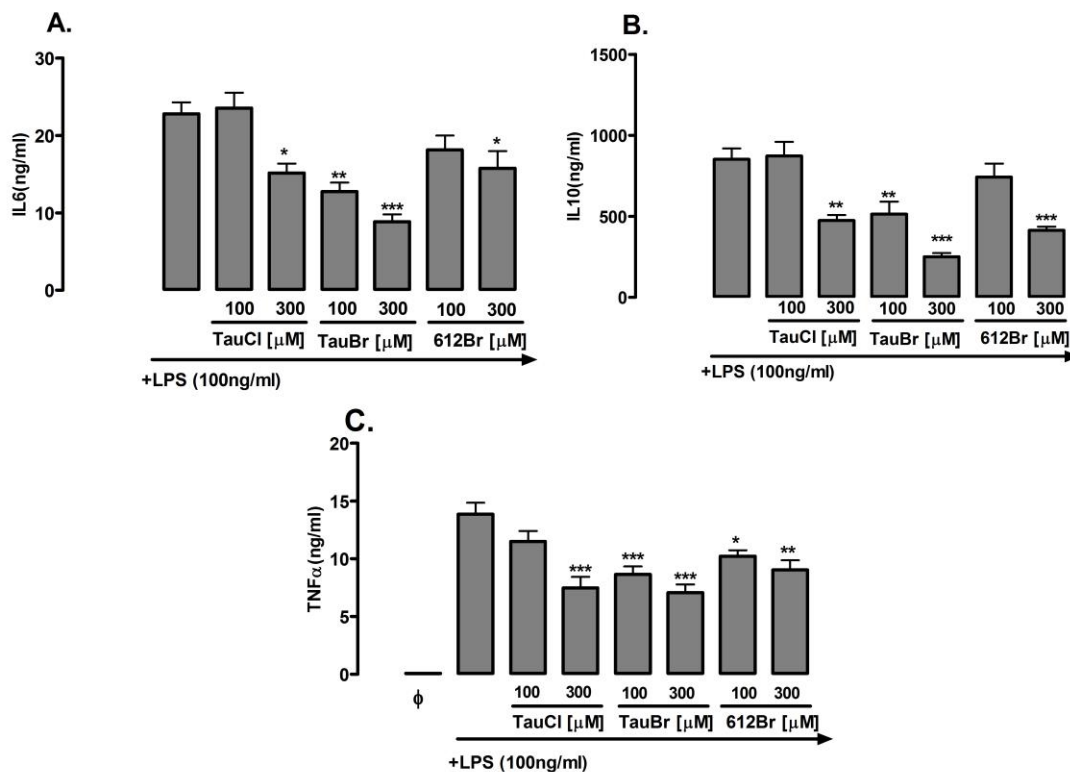
4.3.1. Wpływ 612Br na produkcję wybranych cytokin pro i przeciwzapalnych w porównaniu do TauBr i TauCl

Badanie wpływu 612Br, TauBr i TauCl na aktywność sekrecyjną komórek zbadano na dwóch typach komórek:

* Aktywowanych LPS (100 ng/ml) makrofagach otrzewnowych oraz makrofagach linii J774.A1.

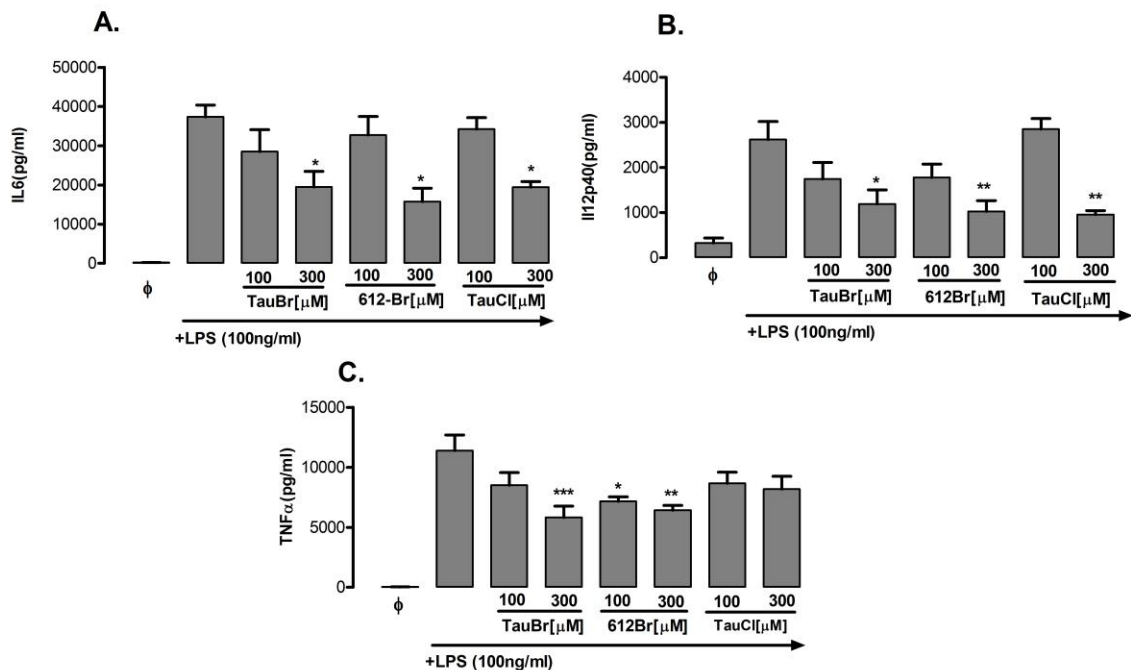
* Aktywowanych LPS (25 µg/ml) keratynocytów ludzkich linii HaCaT

Wybrany model eksperymentalny odpowiada stymulacji makrofagów i keratynocytów aktywowanych *in vivo* w miejscu zapalenia wywołanego przez bakterie Gram(-) i Gram (+). W badanym modelu eksperymentalnym wszystkie haloaminy tauryny, w stężeniach niecytotoksycznych 100 i 300 µM, znacząco obniżały produkcję IL6, IL10, TNFα (**Ryc. 4.8 A, B, C**) przez aktywowane makrofagi linii J774.A1. Tendencja ta nie była znamienna w przypadku wpływu 612Br, w stężeniu 100 µM, na produkcję IL10 oraz IL6.



Ryc. 4.8 Wpływ 612Br, TauBr oraz TauCl na produkcję IL6 (A), IL10 (B), TNFα (C) przez makrofagi linii J774. A1. Komórki inkubowano w obecności badanych substancji przez 1,5 godziny w medium bez FBS. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS w stężeniu 100 ng/ml i hodowano dalsze 24 godziny w obecności 5% FBS. Poziom cytokin oznaczano metodą ELISA. Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych eksperymentów \pm błąd średni * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ versus kontrola - komórki stymulowane LPS

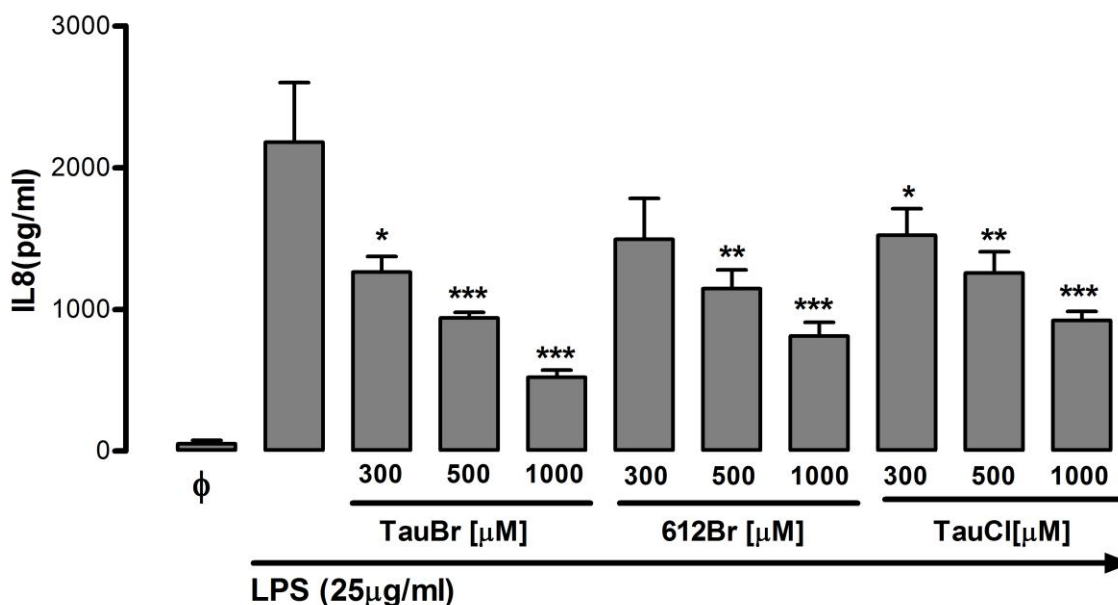
612Br, TauBr i TauCl, w stężeniu 300 μM, znacząco obniżały produkcję IL6, IL12p40 (Ryc. 4.9 A, B) przez aktywowane LPS makrofagi otrzewnowe. 612Br i TauBr w stężeniu 100 i 300 μM znacząco obniżały produkcję TNFα (Ryc. 4.9 C), natomiast TauCl nie wpływało statystycznie na produkcję TNFα przez aktywowane makrofagi otrzewnowe. 612Br wykazuje, podobny do TauBr, hamujący wpływ na produkcję cytokin prozapalnych przez aktywowane LPS makrofagi otrzewnowe oraz makrofagi linii J774.A1.



Ryc. 4.9 Wpływ 612Br, TauBr oraz TauCl na produkcję IL6 (A), IL12p40 (B), TNF α (C) przez **makrofagi otrzewne**. Komórki inkubowano w obecności badanych substancji przez 1,5 godziny, w medium bez FBS. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS w stężeniu 100 ng/ml i hodowano dalsze 24 godziny w obecności 5% FBS. Poziom cytokin oznaczano metodą ELISA. Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych eksperymentów +/- błąd średni. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001 *versus* kontrola - komórki stymulowane LPS

Kearatynocyty to jedne z komórek wchodzących w skład układu SALT (skin associated lymphoid tissue). Aktywowane kearatynocyty wykazują zdolność do wytwarzania wielu cytokin i czynników wzrostowych oraz mają ekspresję różnych antygenów i cząsteczek adhezyjnych charakterystycznych dla komórek efektorowych odpowiedzi immunologicznej, wykazują także ekspresję receptorów dla wielu cytokin. Najważniejsze cytokiny wytwarzane przez aktywowane kearatynocyty to IL1 β , IL6, IL8. W modelu *in vitro* hodowli keratynocytów linii HaCaT oceniano wpływ 612Br, TauBr oraz TauCl na produkcję IL8. Komórki aktywowane LPS 25 μ g/ml hodowano w obecności badanych związków.

Zaobserwowano hamowanie produkcji IL8 przez 612Br, TauBr oraz TauCl w dawkozależny sposób. Stężenia 500 i 1000 μM 612Br, TauBr i TauCl hamowały znacząco produkcję IL8 (**Ryc. 4.10**). 612Br w podobny, zależny od dawki sposób, hamuje uwalnianie wszystkich badanych cytokin ($\text{TNF}\alpha$, IL6, IL10, IL12p40 i IL8) we wszystkich modelach badawczych. Hamujące działanie 612Br jest porównywalne do działania TauBr.

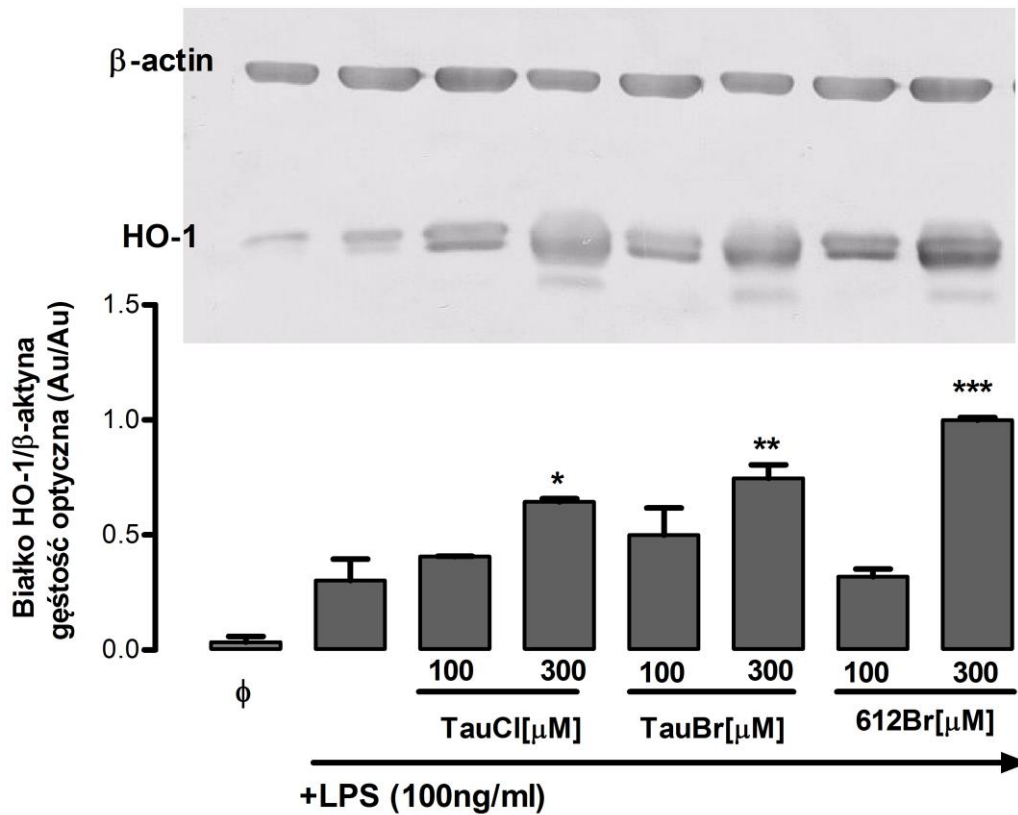


Ryc. 4.10 Wpływ 612Br TauBr oraz TauCl na produkcję IL8 przez **keratynocyty** linii HaCaT. Hodowlę keratynocytów prowadzono przez 24 godziny do osiągnięcia 80-90% konfluencji, w medium z dodatkiem 5% FBS, po tym czasie wymieniano medium na medium bez FBS. Dodawano haloaminy tauryny w stężeniach od 300-1000 μM . Po 1,5 godzinie wymieniano medium i dodawano LPS (25 $\mu\text{g/ml}$). Po 24 godzinach hodowli ściągano nadsącze i oznaczano poziom IL8 Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych eksperymentów \pm błąd średni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus kontrola- komórki stymulowane LPS.

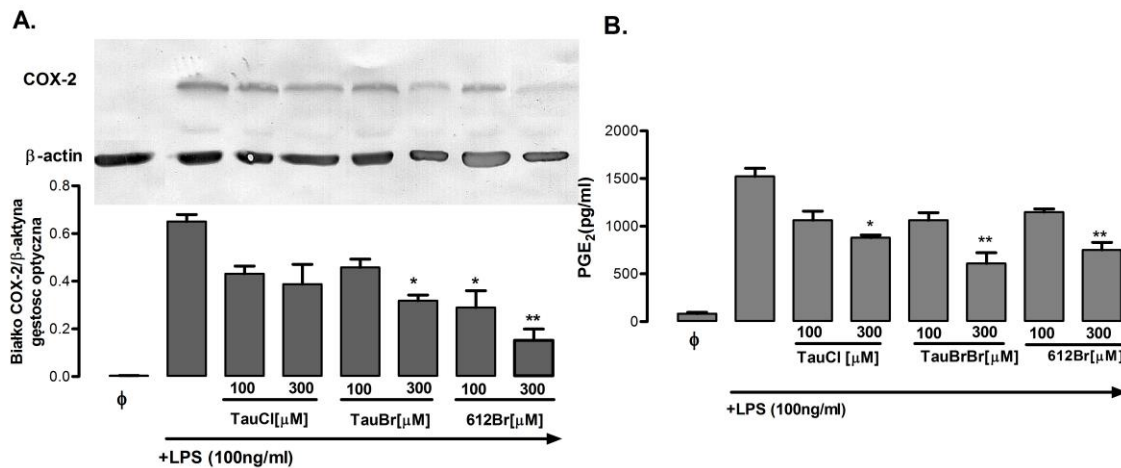
4.3.2 Ocena wpływu 612Br, TauBr i TauCl na ekspresję HO-1, COX-2 oraz na produkcję prostaglandyn (PGE₂) przez makrofagi otrzewnowe *in vitro*

Oksygenaza hemowa - 1 (HO-1) jest enzymem indukowanym stresem oksydacyjnym o właściwościach cytoprotekcyjnych i przeciwzapalnych. Katalizuje rozpad hemu do biliwerdyny, tlenku węgla (CO) i żelaza, odgrywa istotną rolę w regulacji odczynu zapalnego. Prostaglandyny są metabolitami kwasu arachidonowego i jest to jedna z grup czynników zaangażowanych w powstawania stanu zapalnego. Jedną z nich jest prostaglandyna PGE₂, w której syntezie główną rolę pełni indukowalna cyklooksygenaza COX-2 (Rocca i FitzGerald 2002). LPS jest induktorem ekspresji COX-2 oraz syntezy PGE₂.

Wpływ 612Br TauBr oraz TauCl na produkcję prostaglandyn, ekspresję COX-2 i HO-1 oceniano *in vitro* na modelu aktywowanych LPS (100 ng/ml), makrofagów otrzewnowych. Wszystkie badane haloaminy tauryny w stężeniu 300 μM indukowały ekspresję oksygenazy hemowej-1 (HO-1) (**Ryc. 4.11**). Hamują natomiast ekspresję COX-2 (**Ryc. 4.12 A**) enzymu odpowiedzialnego za produkcję prostaglandyny E₂ (PGE₂), co wiąże się również z dawkozależnym obniżeniem produkcji PGE₂ (**Ryc. 4.12 B**). 612Br najmocniej obniża ekspresję COX-2. Podsumowując 612Br podobnie jak TauBr i TauCl indukuje ekspresję HO-1, hamując jednocześnie ekspresję COX-2 i produkcję PGE₂.



Ryc. 4.11 Wpływ 612Br, TauBr oraz TauCl na ekspresję HO-1 w **makrofagach otrzewnowych**. Komórki inkubowano w obecności badanych substancji przez 1,5 godziny, w medium bez FBS. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS w stężeniu 100 ng/ml i hodowano dalsze 24 godziny w obecności 5% FBS. Po tym czasie zbierano komórki w celu oznaczenia ekspresji HO-1. Wyniki reprezentują średnią z 2 niezależnych eksperymentów +/- błąd średni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus kontrola - komórki stymulowane LPS.

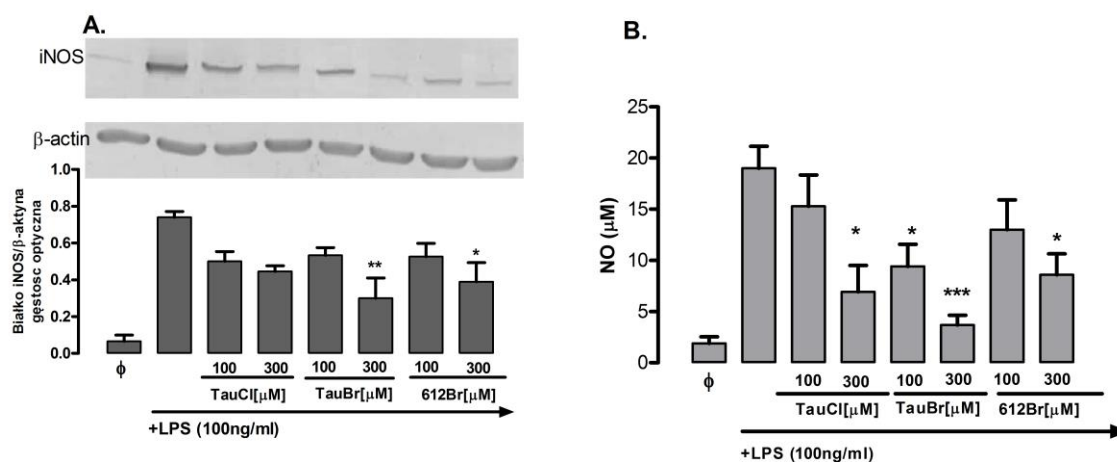


Ryc. 4.12 Wpływ TauBr, TauCl oraz 612Br na ekspresję COX-2 (A), produkcję PGE₂ (B) przez makrofagi otrzewnowe. Komórki inkubowano w obecności badanych substancji przez 1,5 godziny w medium bez surowicy. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS w stężeniu 100 ng/ml i hodowano dalsze 24 godziny w obecności 5% FBS. Po tym czasie nadsącze zbierano do oznaczeń poziomu PGE₂, w komórkach oznaczano poziom ekspresji COX-2. Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych eksperymentów +/- błąd średni. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 *versus* kontrola - komórki stymulowane LPS

4.3.3 Ocena wpływu 612Br na produkcję NO oraz ekspresję iNOS przez makrofagi otrzewnowe *in vitro* w porównaniu do TauCl, TauBr

Tlenek azotu (NO) jest cząsteczką o wysokiej aktywności biologicznej, biosynteza tlenu azotu odbywa się w obecności syntaz tlenu azotu, jedną z nich jest iNOS indukowalna syntaza tlenu azotu, substratem do produkcji NO jest L-arginina. iNOS występuje głównie w makrofagach i neutrofilach, a jej aktywacja wymaga stymulacji przez czynniki prozapalne takie jak LPS lub interferon γ . Wykazano że TauCl hamuje indukcję ekspresji iNOS i produkcję NO (Barua i wsp. 2001, Park i wsp 1997) w makrofagach alweolarnych i makrofagach linii RAW 264.7 oraz TauCl i TauBr hamują ekspresję iNOS w makrofagach linii J774.A1 stymulowanych LPS/IFN (Olszanecki i wsp. 2004).

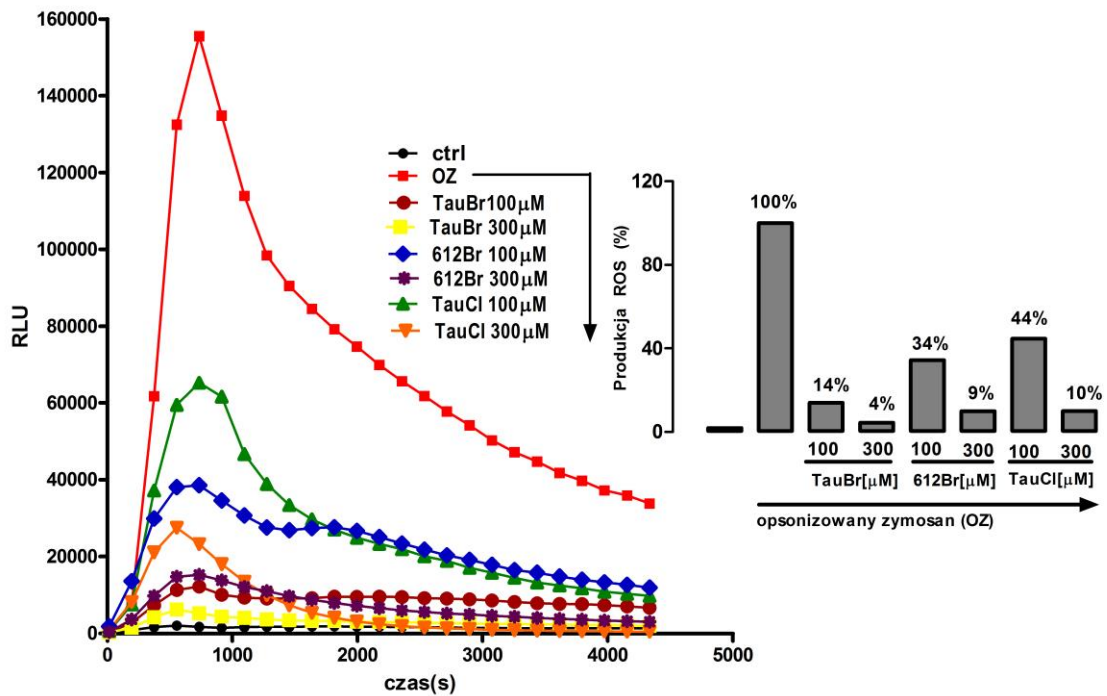
W wybranym modelu badawczym *in vitro* na makrofagach otrzewnowych, aktywowanych LPS (100 ng/ml) oceniano wpływ 612Br, TauBr oraz TauCl na produkcję NO oraz ekspresję iNOS. Zaobserwowano hamowanie produkcji NO oraz obniżenie ekspresji iNOS przez wszystkie badane haloaminy tauryny. TauBr i 612Br w stężeniu 300 μM hamowały znacząco ekspresję iNOS (**Ryc. 4. 13 A**) i w konsekwencji produkcję NO (**Ryc. 4. 13 B**)



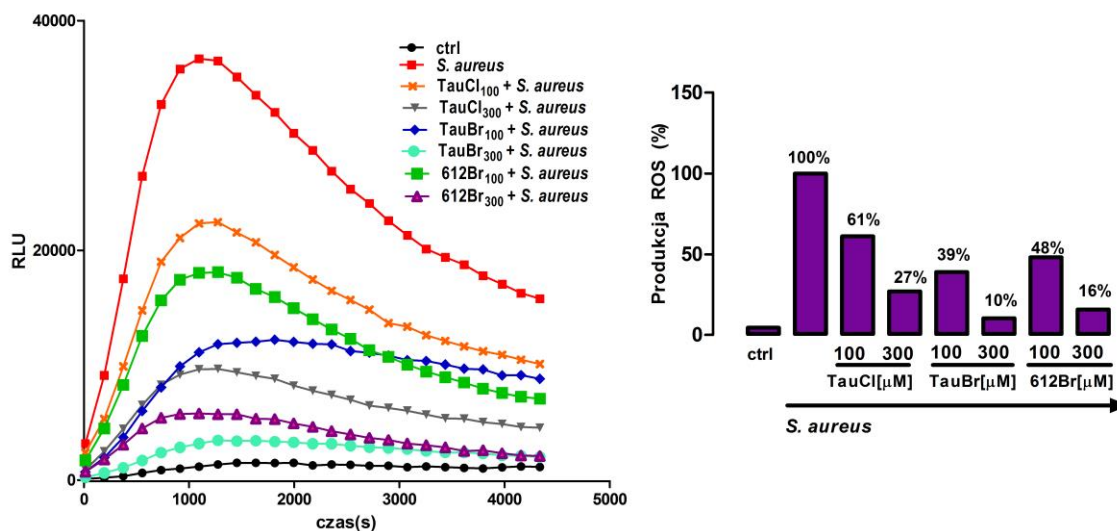
Ryc. 4. 13 Wpływ 612Br, TauBr oraz TauCl na ekspresję iNOS (**A**), produkcję NO (**B**) przez makrofagi otrzewnowe. Komórki inkubowano w obecności badanych substancji przez 1,5 godziny w medium bez FBS. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS w stężeniu 100 ng/ml i hodowano dalsze 24 godziny w obecności 5% FBS. Po tym czasie nadsącze zbierano do oznaczeń produkcji NO, a w komórkach oznaczano poziom ekspresji iNOS. Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych eksperymentów \pm błąd średni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus kontrola - komórki stymulowane LPS

4.3.4 Ocena wpływu 612Br, na produkcję ROS przez neutrofile *in vitro* w porównaniu do TauBr i TauCl.

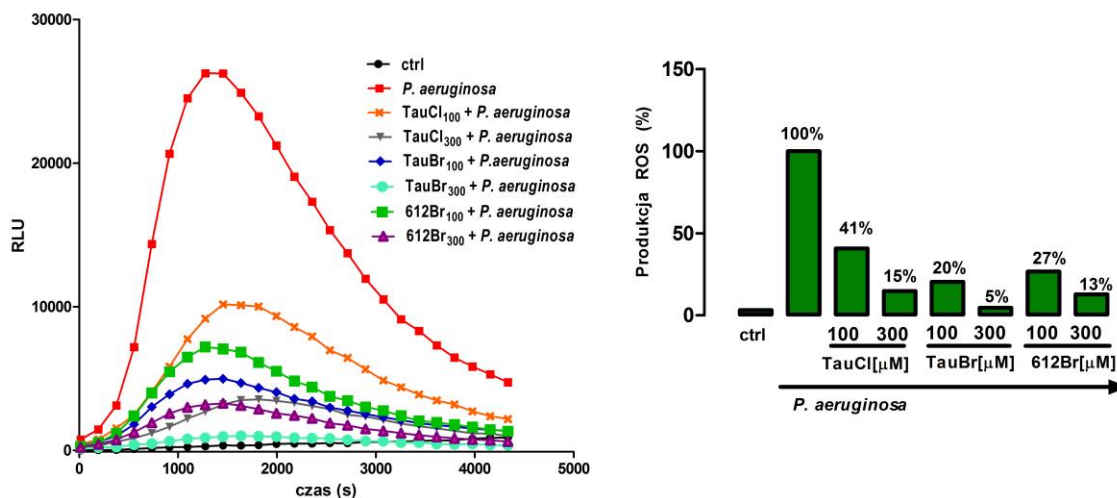
W celu oceny wpływu 612Br oraz TauBr i TauCl na produkcję ROS przez neutrofile wykonano test chemiluminescencji zależnej od luminolu (LCL) (Schleupner and Glasgow 1978). Luminol pozwala na określenie czynników indukujących chemiluminescencję zarówno zewnątrz-jak i wewnątrzkomórkowo. W wyniku podania opsonizowanego zymosanu aktywowane neutrofile zwiększają luminolozależną emisję światła indukowaną nieswoiście przez różne ROS wybuchu tlenowego, ale głównie przez produkty systemu MPO neutrofilów, uwalniane w trakcie fagocytozy. Wykazano, że 612Br niezależnie od użytego stymulatora (opsonizowany zymosan - **Ryc. 4.14**; *S. aureus* - **Ryc. 4.15**; *P. aeruginosa* **Ryc. 4.16**; *P. acnes* - **Ryc. 4.17**; *S. epidermidis* - **Ryc. 4.18**) silnie hamuje uwalnianie ROS. Zahamowanie LCL przy stężeniu 300 μM 612Br wynosiło 87 - 90%.



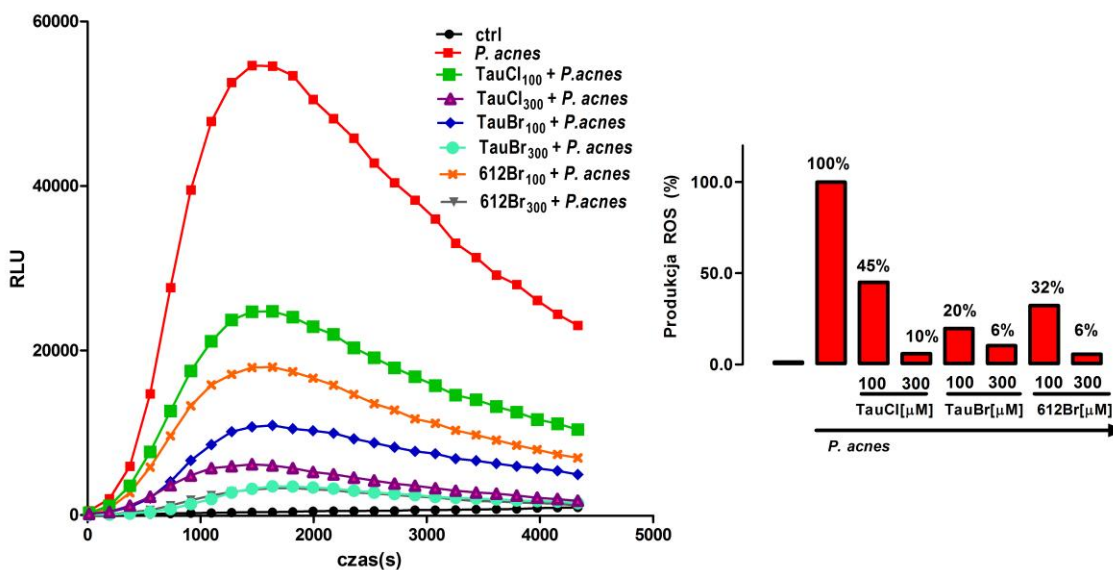
Ryc. 4.14 Wpływ 612Br oraz TauCl, TauBr na produkcję ROS przez neutrofile stymulowane **opsonizowanym zymosanem** (OZ). Chemiluminescencja zależna od luminolu. Ctrl - komórki niestymulowane. Wielkość chemiluminescencji jest wyrażona w jednostkach RLU (RLU ang. relative light unit, oznacza jednostki względnej intensywności luminescencji). Procent produkcji ROS obliczano na podstawie pomiaru pola powierzchni pod wykresem chemiluminescencji dla każdego badanego związku, jako 100% przyjmując produkcję ROS stymulowaną przez OZ.



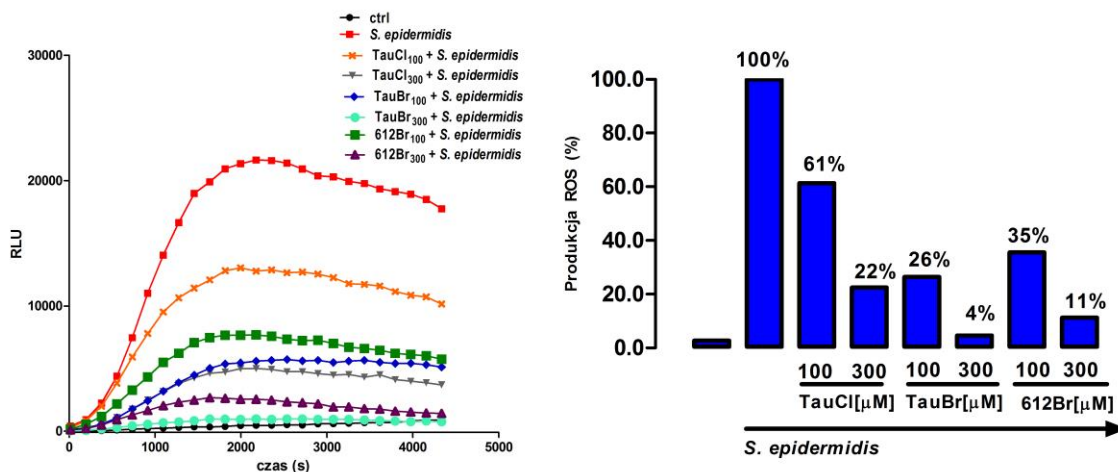
Ryc. 4.15 Wpływ 612Br oraz TauCl, TauBr na produkcję ROS przez neutrofile stymulowane zabitymi komórkami *S. aureus*. Chemiluminescencja zależna od luminolu. Ctrl - komórki niestymulowane. Wielkość chemiluminescencji jest wyrażona w jednostkach RLU (RLU ang. relative light unit, oznacza jednostki względnej intensywności luminescencji). Procent produkcji ROS obliczano na podstawie pomiaru pola powierzchni pod wykresem chemiluminescencji dla każdego badanego związku, jako 100% przyjmując produkcję ROS stymulowaną przez OZ.



Ryc. 4.16 Wpływ 612Br oraz TauCl, TauBr na produkcję ROS przez neutrofile stymulowane zabitymi komórkami *P. aeruginosa*. Chemiluminescencja zależna od luminolu. Ctrl - komórki niestymulowane. Wielkość chemiluminescencji jest wyrażona w jednostkach RLU (RLU ang. relative light unit, oznacza jednostki względnej intensywności luminescencji). Procent produkcji ROS obliczano na podstawie pomiaru pola powierzchni pod wykresem chemiluminescencji dla każdego badanego związku, jako 100% przyjmując produkcję ROS stymulowaną przez *P. aeruginosa*.



Ryc. 4.17 Wpływ 612Br oraz TauCl, TauBr na produkcję ROS przez neutrofile stymulowane zabitymi komórkami *P. acnes*. Chemiluminescencja zależna od luminolu. Ctrl - komórki niestymulowane. Wielkość chemiluminescencji jest wyrażona w jednostkach RLU (RLU ang. relative light unit, oznacza jednostki względnej intensywności luminescencji). Procent produkcji ROS obliczano na podstawie pomiaru pola powierzchni pod wykresem chemiluminescencji dla każdego badanego związku, jako 100% przyjmując produkcję ROS stymulowaną przez *P. acnes*.



Ryc. 4.18 Wpływ 612Br oraz TauCl, TauBr na produkcję ROS przez neutrofile stymulowane zabitymi komórkami *S. epidermidis*. Chemiluminescencja zależna od luminolu. Ctrl - komórki niestymulowane. Wielkość chemiluminescencji jest wyrażona w jednostkach RLU (RLU ang. relative light unit, oznacza jednostki względnej intensywności luminescencji). Procent produkcji ROS obliczano na podstawie pomiaru pola powierzchni pod widma chemiluminescencji dla każdego badanego związku, jako 100% przyjmując produkcję ROS stymulowaną przez *S. epidermidis*.

4.4 Ocena bakteriobójczego działania 612Br, w porównaniu do TauBr i TauCl, na wybrane szczepy bakteryjne mikrobiomu skóry.

Do oceny bakteriobójczego działania 612Br, TauBr oraz TauCl wybrano bakterie mikrobiomu skóry wchodzące w skład flory fizjologicznej skóry oraz bakterie patogene odpowiedzialne za choroby / zakażenia skóry i tkanek miękkich: *S. epidermidis*, *P. acnes*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*.

W przeprowadzanych badaniach porównywano aktywność mikrobójczą 612Br z aktywnością mikrobójczą TauBr i TauCl oraz badano aktywność mikrobójczą kombinacji TauBr +TauCl oraz 612Br + TauCl. Porównywano MIC oraz MBC badanych związków wobec bakterii o wysokiej gęstości odpowiadającej gęstości bakterii w biofilmie 10^8 CFU/ml oraz niskiej gęstości 10^5 CFU/ml. 612Br, jak pokazano w **Tabeli 4.5 i 4.6**, wykazuje bardzo silne działanie hamujące wzrost bakterii oraz mikrobójcze wobec wszystkich badanych szczepów drobnoustrojów, w obu gęstościach bakterii. MBC jest większe niż MIC. TauCl wykazuje zdecydowanie najsłabsze właściwości mikrobójcze w stosunku do badanych szczepów bakteryjnych, 612Br wykazuje najskuteczniejsze działanie mikrobójcze w porównaniu z TauBr i TauCl. Kombinacja 612Br +TauCl nie wykazuje działania addycyjnego w stosunku do działania samej 612Br, natomiast wykazuje znacznie wyższą skuteczność niż samo TauCl. Kombinacja TauBr +TauCl wykazuje słabsze właściwości mikrobójcze niż mieszanina 612Br + TauCl.

Tabela 4.5 Ustalenie wartości MIC (μM) dla testowanych substancji po godzinie inkubacji z poszczególnymi mikroorganizmami w gęstościach 10^5 oraz 10^8 CFU/ml

Substancja badana	CFU/ml	MIC (μM)			
		<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>
612Br	10^5	1,5	3	0,15	1,5
	10^8	7	15	0,7	30
TauBr	10^5	70	15	0,7	30
	10^8	600	70	3	1250
TauCl	10^5	1250	1250	150	2500
	10^8	5000	2500	300	5000
TauCl + TauBr	10^5	70	7	3	30
	10^8	600	30	7	300
TauCl + 612Br	10^5	1,5	7	0,3	3
	10^8	15	15	0,7	30

Zawiesinę badanych bakterii inkubowano przez godzinę z różnymi stężeniami 612Br, TauBr, TauCl (od $0,05 \mu\text{M}$ do 10 mM), w takiej ilości i aby gęstość końcowa zawiesiny bakteryjnej wynosiła 10^5 CFU/ml oraz 10^8 CFU/ml. Po tym czasie bakterie posiewano na podłoża stałe, pobierając z każdej probówki $100 \mu\text{l}$ zawiesiny inkubowano przez od 24 godzin do 3 dni. Po zakończeniu inkubacji liczono ilość kolonii, uwzględniając rozcieńczenie i porównując z kontrolą. Wyniki są prezentowane jako **MIC**.

Tabela 4.6 Ustalenie wartości MBC (μM) dla testowanych substancji po godzinie inkubacji z poszczególnymi mikroorganizmami w gęstościach 10^5 oraz 10^8 CFU/ml.

Substancja badana	CFU/ml	MBC (μM)			
		<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>
612Br	10^5	3	7	0,5	3
	10^8	15	15	1,4	30
TauBr	10^5	150	30	1,5	70
	10^8	1250	150	7	2500
TauCl	10^5	2500	2500	600	5000
	10^8	10000	5000	600	10000
TauCl + TauBr	10^5	150	15	7	70
	10^8	1250	70	15	600
TauCl + 612Br	10^5	3	15	0,7	7
	10^8	30	30	1,4	70

Zawiesinę badanych bakterii inkubowano przez godzinę z różnymi stężeniami 612Br, TauBr, TauCl (od 0,05 μM do 10 mM), w takiej ilości aby gęstość końcowa zawiesiny bakteryjnej wynosiła 10^5 CFU/ml oraz 10^8 CFU/ml. Po tym czasie bakterie posiewano na podłoża stałe, pobierając z każdej próbówki 100 μl zawiesiny inkubowano przez od 24 godzin do 3 dni. Po zakończeniu inkubacji liczono ilość kolonii, uwzględniając rozcieńczenie i porównując z kontrolą. Wyniki są prezentowane jako **MBC**.

5. Dyskusja

TauBr i TauCl to naturalne haloaminy tauryny, produkowane *in vivo* przez aktywowane neutrofile i eozynofile w miejscu zapalenia, o unikatowym podwójnym działaniu. Wykazują silne działanie mikrobójcze oraz silne właściwości przeciwzapalne, hamując produkcję mediatorów zapalenia takich jak cytokiny, tlenek azotu czy ROS. Właściwości biologiczne TauCl i TauBr sprawiają, że są to bardzo obiecujące środki w terapii wielu schorzeń o podłożu zapalnym i infekcyjnym. Należy jednak podkreślić, że wysoka reaktywność obu haloamin i szybki rozkład *in vivo* uniemożliwia ich ogólnoustrojowe (np. dożylnie) stosowanie i ogranicza do podania wyłącznie miejscowego.

Synteza trwałej krystalicznej soli sodowej TauCl umożliwiła przeprowadzenie wielu badań, niektórych w fazie badań klinicznych, nad potencjalnym zastosowaniem chloraminy tauryny w leczeniu wielu schorzeń, takich jak zapalenie spojówek, zapalenie pęcherza moczowego, przewlekłe owrzodzenie podudzi, przewlekły nieżyt nosa i zapalenie zatok bocznych (Teuchner i wsp. 2005, 2008; Neher i wsp. 2004, 2007; Nagl i wsp. 1998A, 1998B, 2003). Sól sodowa TauCl umożliwiła przeprowadzenie szeregu badań nad właściwościami TauCl i potencjalnym zastosowaniem klinicznym głównie dzięki jej trwałości.

Właściwości biologiczne TauBr są porównywalne do właściwości TauCl, a nawet silniejsze w przypadku właściwości mikrobójczych. TauBr nie była jednak tak szeroko badana, jako potencjalny lek w leczeniu schorzeń o podłożu zapalnym. Główną przeszkodą do tego typu badań była ograniczona trwałość TauBr klasycznie syntetyzowanej. Zespół profesorów Marcusa Nagla i Waldemara Gottardiego z Uniwersytetu Medycznego w Innsbrucku poprzez bromowanie dimetylotauryny uzyskał nową, trwałą formę bromaminy

tauryny. Synteza nowej, trwałej postaci bromaminy tauryny - 612Br (N-monobromodimetylotauryna) otworzyła nowe możliwości w badaniach nad właściwościami i zastosowaniem bromaminy tauryny w leczeniu schorzeń o podłożu zapalnym i infekcyjnym. Konieczne jednak było sprawdzenie czy modyfikacja chemiczna, która umożliwiła syntezę 612Br nie spowodowała utraty lub zmiany jej właściwości biologicznych. Tematem niniejszej pracy doktorskiej było porównanie właściwości nowej trwałej formy bromaminy tauryny - 612Br z właściwościami klasycznie syntetyzowanej TauBr i TauCl. Przedstawione wyniki odpowiedziały na wszystkie pytania zawarte w celach szczegółowych niniejszej pracy doktorskiej

- **Ocena właściwości fizykochemicznych 612Br (stabilność w zależności od pH, temperatury, czasu przechowywania, obecności H₂O₂).**

W pierwszym etapie badań oceniano właściwości fizykochemiczne 612Br w porównaniu do TauBr i TauCl. Oceniano trwałość 612Br w zależności od czasu, pH i temperatury przechowywania. Trwałość TauCl, TauBr i 612Br oceniano poprzez pomiar zmian w stężeniu i widmie absorbancji. Wykazano, że trwałość wszystkich badanych związków jest czaso i temperaturo zależna, jednak w przypadku 612Br obserwowano znacznie większą trwałość niezależnie od temperatury przechowywania. W temperaturze 23⁰ C spadek stężenia obserwowano dopiero w 42 dniu przechowywania, a w temperaturze 4⁰ C spadek stężenia zaobserwowano w 56 dniu przechowywania. W przypadku TauBr spadek stężenia w temperaturze 23⁰ C obserwowano już po 7 dniach przechowywania, natomiast w temperaturze 4⁰ C po 14 dniach przechowywania. Podobne wyniki uzyskano w pracy Marcinkiewicz i wsp. 2008, gdzie po 14 dniach przechowywania w 4⁰ C obserwowano około

30% spadek stężenia TauBr. Uzyskane wyniki świadczą o zdecydowanie lepszej trwałości 612Br w porównaniu do TauBr.

W roztworach wodnych o pH zasadowym TauBr i TauCl nie ulegają reakcji dysproporcjonowania (Thomas i wsp 1995; Gottardi i wsp. 2013A). Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku 612Br. W pH zasadowym 8 lub 9, nie obserwowano żadnych zmian w widmie absorpcji 612Br. Wraz ze spadkiem pH 612Br, podobnie jak TauBr, ulega reakcji dysproporcjonowania. W pH 3 zarówno 612Br jak i TauBr ulegają reakcji dysproporcjonowania, w której powstają dwubromaminy. W przypadku 612Br reakcję dysproporcjonowania obserwowano już w pH 7,4, pozostaje to w zgodzie z obserwacjami Gottardiego i wsp. 2013A, Thomasa 1995 oraz De Carvalho Bertozo i wsp. 2016, którzy opisali, że bromowe i chlorowe pochodne aminokwasów w zakresie pH od 4 do 8 mogą ulegać reakcjom dysproporcjonowania.

Marcinkiewicz i wsp. w 2005 wykazali, że TauBr, w przeciwieństwie do TauCl, wchodzi w reakcję z H_2O_2 . Obserwacja ta potwierdziła się także w przypadku 612Br, która podobnie jak TauBr reaguje z H_2O_2 , ulegając rozkładowi.

- **Ocena wpływu 612Br na żywotność komórek**

W następnym etapie badań oceniano właściwości biologiczne 612Br w porównaniu do TauBr i TauCl. TauBr i TauCl wykazują słabsze właściwości cytotoksyczne niż HOBr oraz HOCl. Cytotoksyczność TauCl i TauBr zależy od typu komórek (Kontny i wsp. 2006), w zależności od stężenia i rodzaju komórek TauCl różnie wpływa na ich losy, indukując apoptozę lub nekrozę. W wybranym modelu badawczym oceniano wpływ 612Br na żywotność komórek pełniących istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej. Oceniano

wpływ 612Br na żywotność makrofagów otrzewnowych, makrofagów linii J774.A1 i keratynocytów linii HaCaT. W Przypadku makrofagów otrzewnowych i makrofagów linii J774.A1 uzyskano wyniki porównywalne do TauBr i TauCl. 612Br, podobnie do TauBr i TauCl, w zakresie stężeń do 300uM, nie wpływa znacząco na żywotność komórek. Natomiast, w przypadku keratynocytów ludzkich, zakres stężeń niecytotoksycznych uległ przesunięciu. Wykazano, że stężenia zarówno 612Br jak i TauBr i TauCl w zakresie do 1000uM są dla komórek linii HaCaT niecytotoksyczne. Podsumowując przeprowadzone badania wykazały, że 612Br wykazuje podobny do TauBr wpływ na żywotność komórek.

- **Ocena właściwości immunomodulacyjnych 612Br**

TauBr i TauCl obniżają produkcję mediatorów zapalenia w różnych typach komórek (Marcinkiewicz i wsp. 1995, 2005,2006; Chorąży-Massalska i wsp. 2002, 2004; Serban i wsp. 2003, Quinn i wsp.2003; Kontny i wsp. 2006, 2007). W kolejnym etapie badań oceniano wpływ 612Br na produkcję cytokin: IL12p40, IL10, IL6, TNF α przez aktywowane LPS makrofagi mysie oraz produkcję IL8 przez aktywowane kearatynocyty linii HaCaT. Wybrany model eksperymentalny odpowiada aktywacji makrofagów i keratynocytów aktywowanych *in vivo* w miejscu zapalenia wywoływanego przez bakterie Gram(-) i Gram (+). Wykazano, że 612Br, podobnie jak TauBr i TauCl, hamuje produkcję mediatorów zapalenia takich jak IL12p40, IL10, IL6 oraz TNF α w modelu aktywowanych makrofagów mysich oraz produkcje IL 8 w modelu aktywowanych keratynocytów ludzkich linii HaCaT. Znamienne statystycznie działanie obserwowano zwłaszcza przy stężeniu 300 μ M. Właściwości przeciwzapalne 612Br są więc podobne do właściwości TauBr, a także TauCl opisywanych w licznych pracach naukowych.

Badania prowadzone w Katedrze Immunologii i innych zespołach badawczych wykazały, że TauCl i TauBr w podobny dawkozależny sposób indukują ekspresję HO-1 w aktywowanych i spoczynkowych makrofagach mysich (Olszanecki i Marcinkiewicz 2004; Olszanecki et al. 2008; Kim i wsp. 2010A, B; Marcinkiewicz i wsp. 2009; Barua i wsp. 2001). Ponadto TauCl oraz TauBr hamują indukcję indukowalnej syntazy tlenu azotu iNOS, a tym samym produkcję tlenu azotu w aktywowanych makrofagach i neutrofilach (Kim i wsp. 1996; Marcinkiewicz i wsp. 1995; Park i wsp. 1997; Olszanecki i wsp. 2008) TauCl i TauBr hamują również syntezę COX-2, co prowadzi do zablokowania syntezy prostaglandyn (PGE₂) (Olszanecki i wsp. 2008). W niniejszej pracy doktorskiej wykazano, że 612Br, stosowana zwłaszcza w niecytotoksycznym stężeniu 300 μM, indukuje ekspresję HO-1 w aktywowanych LPS makrofagach. Hamuje również ekspresję iNOS, a w konsekwencji produkcję NO. Co więcej, stosowana w stężeniu 100 i 300 μM hamuje ekspresję COX-2 oraz obniża produkcję PGE₂. Powyższe wyniki pokazują, że 612Br ma podobny do TauBr wpływ na ekspresję HO-1, COX-2, iNOS oraz produkcję NO i PGE₂

- **Ocena działania mikrobójczego 612Br w porównaniu do TauBr.**

TauBr wykazuje silne właściwości mikrobójcze w stosunku do różnych gatunków bakterii m.in. *P. acnes*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. mutans*, *P. gingivalis* (Marcinkiewicz i wsp. 2005, 2008, 2006; Pasich i wsp. 2013). Właściwości mikrobójcze TauBr są silniejsze niż właściwości mikrobójcze TauCl (Marcinkiewicz i wsp. 2006). Kolejnym celem pracy doktorskiej było porównanie znanych właściwości mikrobójczych TauBr z właściwościami 612Br. Do badań wybrano bakterie Gram (+) i Gram (-), stanowiące florę fizjologiczną i patogenną skóry: *P. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Bakterie te uczestniczą

w patogenezie schorzeń, w leczeniu, których TauBr może być potencjalnie stosowana (Marcinkiewicz i wsp. 2008, 2013)

S. epidermidis to bakteria Gram (+), należąca do rodzaju gronkowców, wywołująca zakażenia oportunistyczne. Występuje powszechnie na błonach śluzowych jamy ustnej, nosa, gardła; w drogach moczowo-płciowych w jelicie grubym oraz na skórze. Powoduje infekcje u osób z osłabioną odpornością. Izolowana jest też często ze zmian trądzikowych przy trądziku pospolitym (Nishijima i wsp. 2000). Odpowiedzialna jest również za formowanie biofilmu na urządzeniach medycznych typu cewniki, wkłucia centralne, implanty ortopedyczne, sztuczne zastawki serca itp., co prowadzi do powstania przewlekłego stanu zapalnego, wymuszającego konieczność wymiany stosowanego urządzenia medycznego (Van Mellaert i wsp. 2012).

P. acnes Gram (-), pałeczka beztlenowa. Stanowi florę fizjologiczną skóry, układu pokarmowego, oddechowego oraz dróg moczowo-płciowych. Jest jednym z głównych czynników etiologicznych trądziku pospolitego (Podstawy Mikrobiologii Lekarskiej 1979; Jappe i wsp. 2002; Nishijima i wsp. 2000). *P. acnes* i *S. epidermidis* to dwa gatunki bakterii izolowane najczęściej ze zmian trądzikowych (Nishijima i wsp. 2000). *P. acnes* pobudzając komórki fagocytarne do wydzielania mediatorów zapalenia jest główną przyczyną powstawania stanu zapalnego w zmianach trądzikowych. W badaniach pilotażowych wykazano dobry efekt terapeutyczny TauBr podawanej miejscowo na zapalne zmiany u pacjentów z trądzikiem pospolitym (Marcinkiewicz i wsp. 2008). Wykazano, że *P. acnes* jest bardzo wrażliwy na działanie TauBr w odróżnieniu od TauCl. (Marcinkiewicz 2006, 2008). 612Br wykazuje silne, silniejsze nawet niż TauBr, działanie mikrobójcze w stosunku do *P. acnes* i *S. epidermidis*.

Kolejne wybrane do badań aktywności mikrobójczej 612Br szczepy bakteryjne to *P. aeruginosa* i *S. aureus*. *S. aureus* Gram (+) bakteria występująca w jamie nosowo-gardłowej oraz na skórze ludzi i zwierząt. Szacuje się, że 10 do 50% populacji ludzkiej stale lub okresowo jest nosicielami tych bakterii bez wystąpienia objawów chorobowych. Nosicielstwo dotyczy najczęściej śluzówki przedścianki jamy nosowej, może również występować przejściowo na skórze, w gardle oraz w drogach rodnych u kobiet. Kolonizacja szczepem gronkowca złocistego może, w niekorzystnych warunkach, stanowić punkt wyjścia dla zakażenia. *S. aureus* to bakteria chorobotwórcza najczęściej powoduje zakażenia ropne skóry, tkanek podskórnych oraz tkanek miękkich, zakażenia układowe (posocznica, ropowica), ropne zakażenia płuc ucha środkowego zakażenia, zakażenia szpitalne lub zatrucia pokarmowe związane z produkcją toksyn (Podstawy Mikrobiologii Lekarskiej 1979; Cianciara i Juszczyk 2007).

P. aeruginosa pałeczka ropy błękitnej, Gram (-) bakteria oportunistyczna. Pałeczki *P. aeruginosa* mogą tworzyć skomplikowane makrokolonie - biofilm przyłączone do powierzchni albo bytować w formie wolnej, jako jednokomórkowe organizmy (formy planktoniczne). Bakteria w warunkach prawidłowych bytuje głównie w obrębie jamy nosowej. Powoduje często zakażenia szpitalne, infekcje w obrębie ucha środkowego i zewnętrznego, zakażenia ran oparzeniowych, cukrzycowych, zapalenie wsierdzia, zakażenia gałki ocznej u pacjentów noszących soczewki kontaktowe, zapalenie rogówki, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zakażenia układu moczowego (Podstawy Mikrobiologii Lekarskiej 1979 C; Lister i wsp. 2009). Do czynników ryzyka rozwinięcia procesu chorobowego należą: oparzenia, cukrzyca, mukowiscydoza, obecność cewników dożylnych oraz rurek intubacyjnych, zaburzenia odporności. *P. aeruginosa* wybrano ze względu na fakt, iż jest to częsty czynnik etiologiczny zakażeń ran lub trudno gojących się

ran, zwłaszcza u pacjentów z cukrzycą. Wykazano, że TauBr w stężeniu 300 μ M hamuje rozwój biofilmu *P. aeruginosa* (Marcinkiewicz i wsp. 2013). Przeprowadzone badania pokazały, że 612Br wykazuje bardzo silne, silniejsze niż TauBr, właściwości mikrobójcze w stosunku do *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Dodatkowo wykazano, że szybkość zabijania bakterii *S. aureus* przez 612Br jest bardzo duża – wynosi kilkanaście minut (Walczewska i wsp. 2017).

- **Ocena wpływu 612Br na produkcję ROS**

W wyniku podania opsonizowanego zymosanu lub zabitych komórek bakteryjnych, aktywowane neutrofile zwiększają luminolozależną emisję światła indukowaną głównie przez produkty systemu MPO neutrofilów uwalniane w trakcie fagocytozy. ROS są wytwarzane głównie w celu zniszczenia drobnoustrojów infekujących organizm. Jednakże, w stanach zapalnych przyczyniają się do uszkodzenia i niszczenia własnych komórek oraz tkanek. W wybranym modelu badawczym aktywowano neutrofile opsonizowanym zymosanem lub zabitymi komórkami bakterii. *P. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. W pracy Marcinkiewicz i wsp. 2006 wykazano, że TauBr obniża produkcję ROS przez neutrofile aktywowane opsonizowanym zymosanem. Podobny wynik uzyskano w niniejszej pracy doktorskiej. Wykazano, że 612Br, podobnie jak TauBr, hamuje produkcję ROS przez neutrofile aktywowane opsonizowanym zymosanem.

Czynniki chemotaktyczne, których produkcję indukuje *P. acnes* stanowią główny chemoatraktant przyciągający neutrofile do gruczołów łojowych. Następnie neutrofile fagocytują bakterie, a w czasie fagocytozy dochodzi do uwolnienia enzymów lizosomalnych, co prawdopodobnie pogłębia proces uszkodzenia naskórka w przebiegu trądziku pospolitego. Co więcej aktywowane neutrofile produkują duże ilości reaktywnych form tlenu, które mogą powodować, w miejscu zmian trądzikowych, uszkodzenia tkanek zwane uszkodzeniami

autooksydacyjnymi. W przeprowadzonych badaniach pokazano, że 612Br obniża w dawkozależny sposób produkcję ROS przez neutrofile aktywowane zabitymi komórkami *P. acnes* i *S. epidermidis*. Należy tu nadmienić, iż we wcześniejszych badaniach wykazano, że clinadmycyna, antybiotyk używany w leczeniu trądziku pospolitego, stosowana w stężeniu do 50µg/ml, nie wpływała na LCL (Marcinkiewicz i wsp. 2006). Również w przypadku aktywacji neutrofilii zabitymi bakteriami *P. aeruginosa* i *S. aureus* obserwowano znaczny spadek produkcji ROS w obecności 612Br, spadek produkcji ROS wyniósł 87-90%. Uzyskane wyniki wskazują, że 612Br niezależnie od użytego stymulatora silnie hamuje uwalnianie ROS.

W pilotażowych badaniach nad zastosowaniem TauBr w leczeniu trądziku pospolitego stosowano formułację TauBr w postaci kremu. Jednak niska trwałość TauBr wymuszała konieczność sporządzenia nowej porcji kremu dla pacjentów co 7 dni i przechowywanie go w lodówce. Podjęto kolejne próby technologiczne, mające na celu uzyskanie łatwych w aplikacji półstałych układów o zwiększonej trwałości TauBr, z zastosowaniem innych substancji pomocniczych takich jak: alginiany, karageniany, pochodne celulozy, syntetyczne kopolimery blokowe. Szczególnie interesująca była ocena możliwości zastosowania poloksameru, jako nośnika żelującego „in situ” o przedłużonej szybkości uwalniania substancji czynnej, z niewielkim dodatkiem karbomeru, jako składnika zwiększającego bioadhezję. Jednak w środowisku wodnych roztworów ww. substancji nośnikowych TauBr ulegała szybkiemu rozkładowi, natomiast karbomer nie wpływał już tak bardzo na stabilność klasycznie syntetyzowanej TauBr. Po uzyskaniu stabilnej, krystalicznej formy TauBr – 612Br, opracowano recepturę minitabletek zawierających między innymi karbomer, jako substancję żelotwórczą. Skuteczność mikrobójcza tak powstałych

minitabletek nie zmieniała się nawet po długim czasie przechowywania (Jamróz i wsp. 2014).

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że 612Br nowa trwała forma bromaminy tauryny posiada właściwości przeciwzapalne podobne do właściwości TauBr. Właściwości mikrobójcze 612Br są jeszcze silniejsze niż właściwości TauBr. Co więcej modyfikacja chemiczna przyczyniła się do znacznej poprawy trwałości 612Br. Należy sądzić, że 612Br jest obiecującym antyseptykiem w miejscowej terapii wielu schorzeń skóry (m. in. trądzik pospolity i łuszczyca) oraz błon śluzowych (m. in. paradontoza) o podłożu zapalnym i infekcyjnym.

6. Wnioski

- 612Br wykazuje w temperaturze 23⁰ C i 4⁰ C największą trwałość. Znacznie wyższą niż trwałość klasycznie syntetyzowanej TauBr. Podobnie jak TauBr ulega reakcji dysproporcjonowania w kierunku dwubromaminy w pH kwaśnym, reaguje też z H₂O₂.
- 612Br wykazuje nieco mniejszą cytotoksyczność niż TauBr. Maksymalne niecytotoksyczne stężenia 612Br zależą od typu komórek (≤ 300 μM dla makrofagów mysich, ≤ 1000 μM dla keratynocytów ludzkich).
- 612Br hamuje w podobny dawkozależny sposób produkcję cytokin przez aktywowane makrofagi mysie oraz keratynocyty ludzkie linii HaCaT.
- 612Br, podobnie jak TauBr, indukuje ekspresję HO-1 jednocześnie hamując ekspresję COX-2 i produkcję PGE₂, a także hamuje ekspresję iNOS oraz produkcję NO.
- 612Br wykazuje silne działanie mikrobójcze w stosunku do bakterii Gram(+) i Gram(-), silniejsze niż działanie TauBr.
- 612Br, podobnie jak TauBr, silnie hamuje produkcję ROS przez aktywowane neutrofile.
- Trwałość oraz porównywalne z TauBr właściwości przeciwzapalne, silniejsze niż TauBr działanie przeciwbakteryjne powodują, że 612Br może znaleźć zastosowanie w dermatologii (stany zapalne skóry o różnym podłożu), w stomatologii (leczenie stanów zapalnych dziąseł – przyzębica).

7. Streszczenie

Tauryna jest głównym wolnym aminokwasem w cytozolu leukocytów, o kluczowym znaczeniu w wielu procesach biologicznych. Tauryna odgrywa istotną rolę w regulacji ostrej reakcji zapalnej. Wychwytuje HOCl i HOBr, wysoce reaktywne oksydanty o silnych właściwościach mikrobójczych, produkowane w miejscu zapalenia przez aktywowane neutrofile i eozynofile. W wyniku tej reakcji powstają mniej toksyczne haloaminy tauryny: chloramina tauryny (TauCl) i bromamina tauryny (TauBr). Obie haloaminy tauryny wykazują właściwości przeciwzapalne i mikrobójcze. Dodatkowo TauCl i TauBr indukują ekspresję oksygenazy hemowej-1 (HO-1), enzymu indukowanego strebląd średni oksydacyjnym, o właściwościach przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych.

Ze względu na właściwości biologiczne TauCl prowadzono wiele badań nad jej zastosowaniem w miejscowym leczeniu zakażeń w okulistyce i laryngologii (np. w leczeniu zapalenia ucha zewnętrznego, zapalenia spojówek, przewlekłego zapalenia zatok). TauBr wykazuje silniejsze właściwości mikrobójcze niż TauCl, jednak efektywność terapeutyczna TauBr w leczeniu chorób o podłożu zapalnym i infekcyjnym jest ograniczona ze względu na jej niską trwałość. W celu pokonania tego ograniczenia grupa profesorów Nagla i Gottardiego z Uniwersytetu Medycznego w Innsbrucku zsyntetyzowała stabilną postać bromaminy tauryny N- monobromo - dimetylotaurynę (612Br).

Synteza trwałej postaci bromaminy tauryny - 612Br otworzyła nowe możliwości w badaniach nad właściwościami i zastosowaniem TauBr w leczeniu schorzeń o podłożu zapalnym i infekcyjnym. Konieczne było jednak sprawdzenie czy modyfikacja chemiczna,

która umożliwiła syntezę 612Br, nie spowodowała utraty lub zmiany jej potencjalnych właściwości biologicznych.

Celem pracy doktorskiej było porównanie właściwości fizykochemicznych, przeciwzapalnych i mikrobójczych 612Br z właściwościami TauBr i TauCl.

W pierwszym etapie badań oceniano właściwości fizykochemiczne 612Br w porównaniu z TauBr i TauCl. Wykazano, że 612Br wykazuje długoterminową trwałość w temperaturze poniżej 23⁰ C i pH powyżej 7. Podobnie jak TauBr w zakresie pH od 3 do 7 ulega reakcji dysproporcjonowania w wyniku, której powstają dwubromaminy. Dodatkowo 612Br, podobnie jak TauBr, reaguje z H₂O₂

W kolejnym etapie badań porównano właściwości biologiczne 612Br do TauBr i TauCl. Porównywano wpływ 612Br oraz TauBr i TauCl na żywotność komórek oraz produkcję mediatorów zapalenia przez mysie makrofagi i ludzkie keratynocyty aktywowane LPS *in vitro*. Wykazano, że 612Br wykazuje podobny wpływ na żywotność komórek jak TauCl i TauBr. 612Br, jest niecytotoksyczna w stężeniach do 300 μM dla makrofagów i do 1000 μM dla keratynocytów. 612Br zachowała wszystkie właściwości przeciwzapalne TauBr:

- 612Br hamuje produkcję TNF α , IL6, IL12p40 oraz IL10 przez stymulowane LPS makrofagi, oraz produkcję IL8 przez stymulowane LPS keratynocyty ludzkie.
- 612Br hamuje produkcję NO i ekspresję iNOS
- 612Br obniża produkcję PGE2 oraz hamuje ekspresję COX-2, co jest związane z indukcją ekspresji HO-1
- 612Br hamuje produkcję ROS przez neutrofile aktywowane opsonizowanym zymosanem lub zabitymi komórkami bakterii.

Wykazano ponadto, że 612Br wykazuje silne działanie mikrobójcze w stosunku do wszystkich badanych szczepów bakteryjnych. Właściwości mikrobójcze 612Br badano w stosunku do wybranych szczepów bakteryjnych: *P. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*.

Podsumowując, przeprowadzone badania udowodniły, że synteza 612Br stabilnej formy TauBr nie spowodowała utraty unikalnych biologicznych właściwości naturalnej TauBr. Co ważne, potencjał przeciwwzapalny 612Br jest bardzo podobny do potencjału TauBr, dodatkowo 612Br wykazuje silniejsze właściwości mikrobójcze niż TauBr i TauCl. Należy sądzić, że 612Br dzięki swoim właściwościom biologicznym i trwałości jest obiecującym antyseptykiem w miejscowej terapii wielu schorzeń o podłożu zapalnym i infekcyjnym (np. trądzik i parodontoza).

8. Abstract

Taurine is the most abundant free amino acid in leukocyte cytosol with a great impact on many biological processes. Taurine plays an important role in the regulation of acute inflammation. It acts like a scavenger and traps hypohalous acids (HOCl and HOBr), the microbicidal products of activated neutrophils and eosinophils, to produce less toxic taurine chloramine (TauCl) and taurine bromamine (TauBr), respectively. Both haloamines show anti-microbial and anti-inflammatory properties. In addition, TauBr and TauCl are able to induce expression of heme oxygenase-1 (HO-1), a stress-inducible enzyme, which also has anti-oxidative and anti-inflammatory capacities.

TauCl, due to its biological properties, has been used in topical treatment of various infections, mainly in ophthalmology and laryngology (e.g. otitis externa, keratoconjunctivitis, chronic rhinosinusitis). TauBr shows stronger microbicidal activity than TauCl. However, TauBr therapeutic effectiveness in infectious and inflammatory diseases is limited due to its poor stability. To overcome this disadvantage of TauBr, the stable form of taurine bromamine, namely, N-monobromo-dimethyltaurine (612Br) was synthesized by the group of Prof. W. Gottardi and Prof. M. Nagl from Medical University of Innsbruck.

Synthesis of the stable 612Br opened new possibilities in application of TauBr in the treatment of inflammatory and infectious diseases. However, it was necessary to test whether the chemical modification did not alter biological properties of 612Br.

The aim of this study was to compare physical and chemical, anti-inflammatory and microbicidal properties of 612Br, with those of TauBr and TauCl.

Stability of 612Br, TauBr and TauCl in various conditions of pH and temperature has been investigated:

- 612Br shows long-term stability at temperature below 23°C and pH above 7.0
- 612Br, like TauBr, at pH range from 3-7 undergoes disproportionation reaction to form dibromamines
- 612Br and TauBr reacts with H₂O₂.

We have also compared the effect of 612Br with that of TauBr and TauCl on the cell viability and production of the inflammatory mediators by mouse macrophages and human keratinocytes activated with LPS *in vitro*. The effect of 612Br on the cell viability was found to be similar to the cytotoxicity of TauBr and TauCl. It is non-cytotoxic at concentrations up to 300 µM for macrophages and up to 1000 µM for keratinocytes. 612Br retained all anti-inflammatory properties of TauBr:

- 612Br suppressed the production of TNF α , IL6, IL12p40 and IL10 by LPS-stimulated murine macrophages, and IL8 production by LPS-stimulated keratinocytes.
- 612Br significantly inhibited the production of NO and expression of iNOS.
- 612Br markedly reduced generation of ROS in activated cells. It was shown that 612Br inhibits the production of ROS by neutrophils stimulated with both opsonized zymosan and killed bacterial cells.
- 612Br decreased the production of PGE₂, and reduced the expression of COX-2 which was associated with enhancement of HO-1 expression.

Moreover, 612Br exerted strong microbicidal activity against all tested bacteria. Microbicidal activity was tested against the selected bacterial strains of *P. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

Finally, this study proved that synthesis of 612Br, the stable derivative of TauBr, did not cause the loss of the unique biological properties of native TauBr. Importantly, while anti-inflammatory potential of 612Br is very similar to that of TauBr, it shows much stronger microbicidal activity than TauBr and TauCl. Therefore, in our opinion, these biological properties and long term stability make 612Br a very promising agent in the local treatment of inflammatory and infectious diseases (e.g. *acne vulgaris*, periodontitis).

9. Literatura

- Allwod MC.: The interaction between taurolin and endotoxin. *Microbios Letters*. 1980; 52; 141-148.
- Arnitz R, Sarg B, Ott HW, Neher A, Lindner H, Nagl M.: Protein sites of attack of N-chlorotaurine in *Escherichia coli*. *Proteomics*. 2006; 6(3):865 - 869.
- Azuma J, Hasegawa H, Sawamura A, Awata N, Ogura K, Harada H, Yamamura Y, Kishimoto S.: Therapy of congestive heart failure with orally administered taurine. *Clin Ther*. 1983; 5(4):398 - 408.
- Azuma, J, Takihara K., Awata N, Ohta H, Sawamura A, Harada H, Kishimoto S.: Beneficial effect of taurine on congestive heart failure induced by chronic aortic regurgitation in rabbits. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. 1984; 45, 261 - 270.
- Barua M, Liu Y, Quinn MR.: Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF- α gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF κ B activation and kinase activity. *J. Immunol*. 2001; 167: 2275 - 2281.
- Bedrosian I, Sofia RD, Wolff SM, Dinarello CA.: Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*. 1991, 3:568 - 575.
- Benov L, Fridovich I.: *Escherichia coli* exhibits negative chemotaxis in gradients of hydrogen peroxide, hypochlorite, and N-chlorotaurine: products of the respiratory burst of phagocytic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1996; 14; 93(10): 4999 - 5002.
- Bitoun M, Tappaz M.: Gene expression of taurine transporter and taurine biosynthetic enzymes in hyperosmotic states: a comparative study with the expression of the genes involved in the accumulation of other osmolytes. *Adv Exp Med Biol*. 2000; 483:239 -48.
- Blenkharn JI.: The antibacterial and anti-endotoxin activity of taurolidine in combination with antibiotics. *Surg Res Commun*. 1987; 2: 583 - 586.

- Braumann C, Ordemann J, Kilian M, Wenger FA, Jacobi CA.: Local and systemic chemotherapy with taurolidine and taurolidine/heparin in colon cancer-bearing rats undergoing laparotomy. *Clin Exp Metastasis*. 2003; 20(5):387-394.
- Brosnan JT, Brosnan ME.: The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr*. 2006; 136: 6 1636S - 1640S
- Calabresi P, Goulette FA, Darnowski JW.: Taurolidine: cytotoxic and mechanistic evaluation of a novel antineoplastic agent. *Cancer Res*. 2001; 61:6816 - 6821
- Chesney RW, Gusowski N, Dabbagh S.: Renal cortex taurine content regulates renal adaptive response to altered dietary intake of sulfur amino acids. *J Clin Invest*. 1985; 76(6):2213 - 2221.
- Choraży M, Kontny E, Marcinkiewicz J, Maśliński W.: Taurine chloramine modulates cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Amino Acids*. 2002, 23: 407 - 413.
- Chorazy-Massalska M, Kontny E, Kornatka A, Rell-Bakalarska M, Marcinkiewicz J, Maśliński 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, 22(6):692 - 698.
- Cianciara J, Juszczak J.: *Choroby zakaźne i pasożytnicze*; Wydawnictwo Czelej SBN: 978-83-60608-34-0, Lublin 2007; wyd.1.
- Cunningham C, Tipton KF, Dixon HB. Conversion of taurine into N-Chlorotaurine (taurine chloramine) and sulpoacetoaldehyde. In response to oxidative stress. *Biochem J*. 1998; 1;330 (Pt 2):939 - 945.
- Da Costa ML, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ.: Taurolidine improves survival by abrogating the accelerated development and proliferation of solid tumors and development of organ metastases from circulating tumor cells released following surgery. *J Surg Res*. 2001; 101: 111 - 119.

- Darnowski JW, Goulette FA, Cousens LP, Chatterjee D, Calabresi P.: Mechanistic and antineoplastic evaluation of taurolidine in the DU145 model of human prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 54(3):249 - 58.
- De Carvalho Bertozo L, Morgon NH, De Souza AR, Ximenes VF.: Taurine Bromamine: Reactivity of an Endogenous and Exogenous Anti-Inflammatory and Antimicrobial Amino Acid Derivative. *Biomolecules.* 2016; 21;6(2). pii: E23.
- Della Corte L, Crichton RR, Duburs G, Nolan K, Tipton KF, Tirzitis G, Ward RJ.: The use of taurine analogues to investigate taurine functions and their potential therapeutic applications. *Amino Acids.* 2002; 23(4):367 - 379.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ.: Release of reactive nitrogen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 1988; 141: 2407 - 2412.
- Doddakula KK, Neary PM, Wang JH, Sookhai S, O' Donnell A, Aherne T, Bouchier-Hayes DJ, Redmond HP.: The antiendotoxin agent taurolidine potentially reduces ischemia/reperfusion injury through its metabolite taurine. *Surgery.* 2010; 148(3):567 - 72. doi: 10.1016/j.surg.2010.01.006.
- Dudani AK, Martyres A, Fliss H.: Short communication: rapid preparation of preventive and therapeutic whole-killed retroviral vaccines using the microbicide taurine chloramine. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008; 24, 635.7 - 379.
- Eick S, Gloor N, Püls C, Zumbunn J, Sculean A.: In vitro activity of taurolidine gel on bacteria associated with periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(3):597 - 606.
- Eick S, Radakovic S, Pfister W, Nietzsche S, Sculean A.: Efficacy of taurolidine against periodontopathic species-an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2012; 16(3):735 - 744.
- El Idrissi A, Trenkner E.: Taurine as a modulator of excitatory and inhibitory neurotransmission. *Neurochem Res.* 2004; 29(1):189 - 97.
- El Idrissi A, Trenkner E.: Taurine regulates mitochondrial calcium homeostasis. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 526:527 - 36.

- Eschenburg G, Luckert C, Reinshagen K, Bergholz R.: Taurolidine cooperates with antineoplastic drugs in neuroblastoma cells. *Genes Cancer*. 2014; 5(11-12):460-469.
- Foos TM, Wu JY.: The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis. *Neurochem Res*. 2002; 27(1-2):21 - 6.
- Fujita T, Ando K, Noda H, Ito Y, Sato Y.: Effects of increased adrenomedullary activity and taurine in young patients with borderline hypertension. *Circulation*. 1987; 75: 525 - 532
- Fujita T, Sato Y.: The antihypertensive effect of taurine in DOCA-salt rats. *J Hypertens* 2 [Suppl] 3: 563–565 Fujita T, Sato Y (1986) Changes with blood pressure and extracellular fluid with taurine in DOCA-salt rats. *AM J Physiol*. 1984; 250: R1014 - R1020
- Fukuda K, Hirai Y, Yoshida H, Nakajima T, Usui T.: Free amino acid content of lymphocytes and granulocytes compared. *Clin Chem*. 1982; 28: 1758 - 1761.
- Fürnkranz U, Nagl M, Gottardi W, Köhler M, Aspöck H, Walochnik J.: Cytotoxic activity of N-chlorotaurine on *Acanthamoeba* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(2):470 - 476.
- Gaut JP, Yeh GC, Tran HD, Byun J, Henderson JP, Richter GM, Brennan ML, Lulis AJ, Belaouaj A, Hotchkiss RS, Heinecke JW.: Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 11961 - 11966.
- Gorman SP, McCafferty DF, Woolfson AD, Jones DS.: Reduced adherence of microorganisms to human mucosal epithelial cells following treatment with Taurolin, a novel antimicrobial agent. *J Appl Bacteriol*. 1987; 62(4):315 - 320.
- Gottardi W, Debatov D, Nagl M.: N-chloramines, a promising class of well-tolerated topical anti-infectives. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013A; 57(3): 1107 - 1114.
- Gottardi W, Klotz S, Nagl M.: Superior bactericidal activity of N-bromine compounds compared to their N-chlorine analogues can be reversed under protein load. *J Appl Microbiol*. 2014; 116(6):1427 - 1437.

- Gottardi W, Nagl M.: Active halogen compounds and proteinaceous material: loss of activity of topical anti-infectives by halogen consumption. *J Pharm Pharmacol.* 2013B; 65(2):213 - 8.
- Gottardi W, Nagl M.: N-chlorotaurine, a natural antiseptic with outstanding tolerability. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(3):399 - 409.
- Han Z, Ribbizi I, Pantazis P, Wyche J, Darnowski J, Calabresi P.: The antibacterial drug taurolidine induces apoptosis by a mitochondrial cytochrome c-dependent mechanism. *Anticancer Res* 2002; 22: 1959 - 1964
- Hawkins CL, Brown BE, Davies MJ.: Hypochlorite- and Hypobromite- Mediated Radical Formation and Its Role in Cell Lysis. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 395: 137 - 145.
- Heinecke JW.: Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med.* 1999; 133: 321 - 325.
- Henderson J, Byun J, Williams M, Mueller D, McCormick M, Heinecke JW.: Production of brominating intermediates by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 2001; 275: 7867 - 7875.
- Huxtable R.J.: Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev;* 1992, 72 - 101.
- Huxtable R.J.: Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Prog Neurobiol.* 1989; 32(6):471 - 533.
- Huxtable R.J.: Taurine and the oxidative metabolism of cysteine. In Huxtable, R.J., ed., *Biochemistry of Sulfur.* 1986; 121 - 198. New York: Plenum Press.
- Jacobi CA, Peter FJ, Wenger FA, Ordemann J, Müller JM.: New therapeutic strategies to avoid intra- and extraperitoneal metastases during laparoscopy: results of a tumor model in the rat. *Dig Surg.* 1999; 16(5):393 - 399.
- Jamróz W, Jachowicz R, Cul J, Marcinkiewicz J.: Evaluation of poloxamer “in situ”, gelling system as a carrier of taurine bromamine. XIX International Taurine Meeting 21-24 Maja 2014 Kraków.
- Jappe U, Ingham E, Henwood J, Holland KT.: *Propionibacterium acnes* and inflammation in acne; *P. acnes* has T-cell mitogenic activity. *Br J Dermatol* 2002; 146(2): 202 - 9.

- Jong EC, Henderson WR, Klebanoff SJ.: Bactericidal activity of eosinophil peroxidase. *J Immunol* 1980; 124: 1378 - 82.
- Jung Y, Kim HH, Kim H, Kong H, Choi B, Yang Y, Kim Y.: Evaluation of 5-aminosalicyltaurine as a colon-specific prodrug of 5-aminosalicylic acid for treatment of experimental colitis. *Eur J Pharm Sci.* 2006; 28(1-2):26 - 33.
- Jurewitsch B, Jeejeebhoy KN.: Taurolidine lock: the key to prevention of recurrent catheter-related bloodstream infections. *Clin Nutr.* 2005; 24(3): 462 -465.
- Kim C, Cha YN.: Production of reactive oxygen and nitrogen species in phagocytes is regulated by taurine chloramine. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 643: 463 - 472.
- Kim C, Choi HS, Kim JW.: Taurine chloramine inhibits the production of nitric oxide and superoxide anion by modulating specific mitogen-activated protein kinases. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 583:493 - 498
- Kim C, Jang JS, Cho MR, Agarawal SR, Cha YN.: Taurine chloramine induces heme oxygenase-1 expression via Nrf2 activation in murine macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2010A; 10(4):440 - 446.
- 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- α in the conditioned media is inhibited by taurine chloramine. *Immunopharmacology.* 1996; 34(2-3):89 - 95.
- Kim H, Jeon H, Kong H, Yang Y, Choi B, Kim YM, Neckers L, Jung Y.: A molecular mechanism for the anti-inflammatory effect of taurine-conjugated 5-aminosalicylic acid in inflamed colon. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69(4):1405 - 12.
- Kim KS, Choi HM, da Oh H, Kim C, Jeong JS, Yoo MC, Yang HI.: Effect of taurine chloramine on the production of matrix metalloproteinases (MMPs) in adiponectin- or IL-1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes. *J Biomed Sci.* 2010B; 17(Suppl 1):S27.
- Klebanoff SJ, Hamon CB.: Role of myeloperoxidase mediated antimicrobial system in intact leukocytes. *J Reticuloendthel Soc* 1992; 12: 170 - 175.

- Kohashi N, Katori R.: Decrease of urinary taurine in essential hypertension. *Jpn Heart* 1983; J 24: 91 - 102.
- Koldehoff M, Zakrzewski JL.: Taurolidine is effective in the treatment of central venous catheter-related bloodstream infections in cancer patients. *Int J Antimicro Agents*.2004; 24(5): 491 - 5.
- Kontny E, Chorazy-Massalska M, Rudnicka W, Marcinkiewicz J, Maśliński W.: Cytotoxicity of taurine metabolites depends on the cell type. *Adv Exp Med Biol*. 2006A; 583: 157 - 171.
- Kontny E, Chorazy-Massalska M, Rudnicka W, Marcinkiewicz J, Maśliński W.: Comparison of taurine chloramine and taurine bromamine effects on rheumatoid arthritis synoviocytes. *Amino Acids*. 2007; 32(3):447 - 452.
- Kontny E, Rudnicka W, Chorazy-Massalska M, Marcinkiewicz J, Maśliński W.:Taurine chloramine inhibits proliferation of rheumatoid arthritis synoviocytes by triggering a p53-dependent pathway. *Inflamm Res*. 2006B; Oct; 55(10):446 - 455.
- Kulasek G, Jank M, Sawosz E.: Biologiczna rola tauryny u ssaków. *Życie weterynaryjne* 2004; 79: 603 - 608.
- Kyriakopoulos AM, Logotheti S,Marcinkiewicz J, Nagl M.:N-chlorotaurine and N-bromotaurine Combination Regimen for the Cure of Valacyclovir-unresponsive Herpes Zoster Comorbidity in a Multiple Sclerosis Patient. *International Journal of Medical and Pharmaceutical Case Reports*. Article no.IJMPCR.25476 ISSN: 2394-109X, NLM ID: 101648033: 2016; 7(2): 1-6.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 15: 680 – 685.
- Learn DB, Fried VA, Thomas EL.: Taurine and hypotaurine content of human leukocytes. *J Leukoc Biol* 1990; 48: 174 - 82.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND.: Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(4): 582 - 610.

- Lorenz K, Mayer D, Bruhn G, Noack B, Brex M, Heumann C, Toutenburg H, Netuschil L, Nagl M, Gottardi W, Hoffmann T.: Effect of N-chlorotaurine mouth rinses on plaque regrowth and plaque vitality. *Clin. Oral. Investig.* 2009; 13(1):9 - 14.
- Mainnemare A, Mégarbane B, Soueidan A, Daniel A, Chapple IL.: Hypochlorous acid and taurine-N-monochloramine in periodontal diseases *J. Dent. Res.* 2004; 83(11):823 - 31.
- Marcinkiewicz J, Biedroń R, Białecka A, Kasprowicz A, Mak M, Targosz M.: Susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* to killing by MPO-halide system products. Implication for taurine bromamine as a new candidate for topical therapy in treating acne vulgaris. *Arch Immunol Ther Exp.* 2006; 54: 61 - 68.
- 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.
- Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszyńska 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 - 674.
- Marcinkiewicz J, Kurnyta M, Biedroń R, Bobek M, Kontny E, Maśliński W.: Anti-inflammatory effects of taurine derivatives (taurine chloramine, taurine bromamine, and taurolidine) are mediated by different mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 583: 471 - 492.
- Marcinkiewicz J, Strus M, Walczewska M, Machul A, Mikołajczyk D.: Influence of taurine haloamines (TauCl and TauBr) on the development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a preliminary study. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 75:269 – 83.
- Marcinkiewicz J, Walczewska M, Olszanecki R, Bobek M, Biedroń R, Dulak J, Józkwicz A, Kontny E, Maśliński W.: Taurine haloamines and heme oxygenase-1 cooperate in the regulation of inflammation and attenuation of oxidative stress. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 643: 439 - 449.
- Marcinkiewicz J, Wojas-Pelc A, Walczewska M, Lipko-Godlewska S, Jachowicz R, Maciejewska A, Białecka A, Kasprowicz A.: Topical taurine bromamine, a new candidate in the treatment of moderate inflammatory acne vulgaris: a pilot study. *Eur J Dermatol.* 2008; 18(4):433 - 439.

- Marcinkiewicz J, Mak M, Bobek M, Biedroń R, Białecka A, Koprowski M, Kontny E, Maśliński W.: Is there a role of taurine bromamine in inflammation? Interactive effects with nitrite and hydrogen peroxide. *Inflamm. Res.* 2005; 54: 42 - 49.
- Marcinkiewicz J.: Neutrophil chloramines: missing links between innate and acquired immunity. *Immunol. Today.* 1997; 18: 577 - 580.
- Martini C, Hammerer-Lercher A, Zuck M, Jekle A, Debabov D, Anderson M, Nagl M.: Antimicrobial and anticoagulant activities of N-chlorotaurine, N,N-dichloro-2,2-dimethyltaurine, and N-monochloro-2,2-dimethyltaurine in human blood. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(4):1979 - 1984.
- McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP.: Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo. *Ann Surg Oncol.* 2000; 7(9):685 - 91.
- Nagl M, Gottardi W.: Rapid killing of *Mycobacterium terrae* by N-chlorotaurine in the presence of ammonium is caused by the reaction product monochloramine. *J Pharm Pharmacol.* 1998A; 50(11):1317 - 20.
- Nagl M, Gruber A, Fuchs A, Lell CP, Lemberger EM, Borg-Von Zepelin M, Würzner .: Impact of N-chlorotaurine on viability and production of secreted aspartyl proteinases of *Candida* spp. *Antimicro. Agents Chemother.* 2002; 46: 1996 - 1999.
- Nagl M, Hengster P, Semenitz E, Gottardi W.: The postantibiotic effect of N-chlorotaurine on *Staphylococcus aureus*. Application in the mouse peritonitis model. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43(6):805 - 809.
- 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. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(9):2507 - 2513.
- Nagl M, Larcher C, Gottardi W.: Activity of N-chlorotaurine against herpes simplex - and adenoviruses. *Antiviral Res.* 1998B; 38(1):25 - 30.
- Nagl M, Lass-Flörl C, Neher A.: Enhanced fungicidal activity of N-chlorotaurine in nasal secretion. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47(6):871 - 874.

- Nagl M, Miller B, Daxecker F.: Tolerance of N-chlorotaurine, an endogenous antimicrobial agent, in the rabbit and human eye-a phase I clinical study. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 1998C; 14(3):283 - 290.
- Nagl M, Nguyen VA, Gottardi W, Ulmer H, Höpfl R.: Tolerability and efficacy of N-chlorotaurine in comparison with chloramine T for the treatment of chronic leg ulcers with a purulent coating: a randomized phase II study. *Br J Dermatol.* 2003, 149(3):590 - 597.
- Nagl M, Pfausler B, Schmutzhard E, Fille M, Gottardi W.: Tolerance and bactericidal action of N-chlorotaurine in a urinary tract infection by an omni-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Zentralbl Bakteriol.* 1998D; 288(2):217 - 23.
- Neher A, Fischer H, Appenroth E, Lass-Flörl C, Mayr A, Gschwendtner A, Ulmer H, Gotwald TF, Gstöttner M, Kozlov V, Nagl M.: Tolerability of N-chlorotaurine in chronic rhinosinusitis applied via tympanic catheter. *Auris Nasus Larynx.* 2005; 32(4):359 - 64.
- Neher A, Gstöttner M, Nagl M, Scholtz A, Gunkel AR.: N-chlorotaurine--a new safe substance for postoperative ear care. *Auris Nasus Larynx.* 2007; 34(1):19 - 22.
- Neher A, Nagl M, Appenroth E, Gstöttner M, Wischatta M, Reisigl F, Schindler M, Ulmer H, Stephan K.: Acute otitis externa: efficacy and tolerability of N-chlorotaurine, a novel endogenous antiseptic agent. *Laryngoscope.* 2004; 114(5):850 - 854.
- Nici, L, Monfils B, Calabresi P.: The effects of taurolidine, a novel antineoplastic agent, on human malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 7655.
- Nishijima S, Kurokawa I, Katoh N, Watanabe K.: The bacteriology of *acne vulgaris* and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. *J Dermatol* 2000; 27(5): 318 - 23.
- Oja SS, Saransaari P.: Pharmacology of taurine. *Proc West Pharmacol Soc.* 2007; 50:8 - 15.
- Oja SS, Saransaari P.: Taurine and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2013; 104(3):187 - 94.
- Olszanecki R, Kurnyta M, Biedroń R, Chorobik P, Bereta M, Marcinkiewicz J.: The role of heme oxygenase-1 in down regulation of PGE₂ production by taurine chloramine and taurine bromamine in J774.2 macrophages. *Amino Acids* 2008; 35, 359 - 64.

- Olszanecki R, Marcinkiewicz J.: Taurine chloramine and taurine bromamine induce heme oxygenase-1 in resting and LPS-stimulated J774.2 macrophages. *Amino Acids*. 2004; 27: 29 - 35.
- Park E, Quinn MR, Schuller-Levis G.: Taurine chloramine attenuates the hydrolytic activity of matrix metalloproteinase-9 in LPS-activated murine peritoneal macrophages. *Adv Exp Med Biol*. 2000; 483:389 - 98.
- Park E, Schuller-Levis G, Jia JH, Quinn MR.: Preactivation exposure of RAW 264.7 cells to taurine chloramine attenuates subsequent production of nitric oxide and expression of iNOS mRNA. *J Leukoc Biol*. 1997; 61(2):161 - 166.
- Pasich E, Biańska A, Marcinkiewicz J.: Porównanie Właściwości mikrobójczych haloamin tauryny I chlorheksydy w obec wybranych drobnoustrojów mikrobiomu jamy ustnej. [Efficacy of taurine haloamines and chlorhexidine against selected oral microbiome species]. *Med Dosw Mikrobiol*. 2013; 65(3):187 - 96.
- Peskin AV, Winterbourn C.C.: Taurine chloramine is more selective than hypochlorous acid at targeting critical cysteines and inactivating creatine kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40(1):45 - 53.
- Petrosian AM, Haroutounian JE.: Taurine as a universal carrier of lipid soluble vitamins: a hypothesis. *Amino Acids*. 2000; 19(2):409 - 412.
- Podstawy Mikrobiologii Lekarskiej. PZWL, Warszawa. Praca pod redakcją Leona Jabłońskiego. ISBN 83-200-0181-1. 1979; A. Pleszczyńska E, rozdział 18, Strona 335, B. Zalichta S rozdział 15 str 191-199; C Doleżko-Marciniak H rozdział 16 Strony 237-240.
- Quinn MR, 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 - 356.
- 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, 50(3):185 - 188.

- Reeves EP, Nagl M, O'Keeffe J, Kelly J, Kavanagh K.: Effect of N-chlorotaurine on *Aspergillus*, with particular reference to destruction of secreted gliotoxin. *J Med Microbiol.* 2006; 55(Pt 7):913 - 918.
- Rocca B, FitzGerald GA.: Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2(5):603-630.
- Schaffer S, Takahashi K, Azuma J.: Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids.* 2000; 19(3-4):527 - 546.
- Schuller-Levis GB, Park E.: Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003; 226: 195 - 202.
- Schwienbacher M, Treml B, Pinna A, Geiger R, Reinstadler H, Pircher I, Schmidl E, Willomitzer C, Neumeister J, Pilch M, Hauer M, Hager T, Sergi C, Scholl-Bürgi S, Giese T, Löckinger A, Nagl M. Tolerability of inhaled N-chlorotaurine in an acute pig streptococcal lower airway inflammation model. *BMC Infect Dis.* 2011 Aug 29; 11: 231.
- 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 - 364.
- Sturman JA, Messing JM, Rossi SS.: Tissue taurine content, activity of taurine synthesis enzymes and conjugated bile acid composition of taurine-deprived and taurine-supplemented rhesus monkey infants at 6 and 12 mo of age. *J Nutr.* 1991; 121(6):854 - 862.
- Sturman JA.: Taurine in development. *Physiol Rev.* 1993; 73 - 119. (Review)
- Sun Jang J, Piao S, Cha YN, Kim C. Taurine Chloramine Activates Nrf2, Increases HO-1 Expression and Protects Cells from Death Caused by Hydrogen Peroxide. *J Clin Biochem Nutr.* 2009; 45(1):37 - 43.
- Szymański K, Winiarska K.: Taurine and its potential therapeutic application. *Postępy Hig Med Dośw.* 2008, 62 - 75.

- Tang XW, Hsu, CC, Schloss, JV, Morris, DF, Faiman, MD, Wu E, Yang, CY, Wu JY.: Protein phosphorylation and taurine biosynthesis in vivo and in vitro. *Journal of Neuroscience*. 1997; 17: 6947 - 6951.
- Tappaz ML.: Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochem. Res*. 2004; 29: 83 - 96.
- 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; 21(2):157 - 165.
- Teuchner B, Schmid E, Ulmer H, Gottardi W, Nagl M.: Tolerability of N-chlorotaurine plus ammonium chloride in the rabbit and human eye--a phase 1 clinical study. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. 2008; 246(12):1723 - 1730.
- 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; 270: 2906 - 2913.
- Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM.: Preparation and characterization of chloramines. *Methods Enzymol* 1986; 132: 569 - 71.
- Thomas EL.: Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: effect of exogenous system on antibacterial action against *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1979; 25: 110 - 4.
- Tokunaga S, Kanayama A, Miyamoto Y. Modification of IkappaBalpha by taurine bromamine inhibits tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *Inflamm Res*. 2007; 56(11):479 -8 6.
- Tomei S, Torimoto M, Hayashi Y, Inoue K, Yuasa H, Watanabe J.: Kinetic characterization of carrier-mediated transport systems for D-glucose and taurocholate in the everted sacs of colon. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26, 899 - 901.
- Torres-Viera C, Thauvin-Eliopoulos C, Souli M, DeGirolami P, Farris MG, Wennersten CB, Sofia RD, Eliopoulos GM.: Activities of taurolidine in vitro and in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(6): 1720 - 1724.

- Traub WH, Leonhard B, Bauer D.: Taurolidine: in vitro activity against multiple-antibiotic-resistant, nosocomially significant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, and diverse *Enterobacteriaceae*. *Chemotherapy*. 1993; 39(5): 322 - 30.
- Van Dalen CJ, Kettle AJ. Substrates and products of eosinophil peroxidase. *Biochem J*. 2001; 15;358 (Pt 1):233 - 239.
- Van Mellaert L, Shahrooei M, Hofmans D, Van Eldere J.: Immunoprophylaxis and Immunotherapy of *Staphylococcus Epidermidis* Infections. *Expert Rev Vaccines*. 2012; 11(3):319 - 334.
- Voss JW, Pedersen SF, Christensen ST, Lambert IH. Regulation of the expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in mouse NIH3T3 fibroblasts. *Eur J Biochem*. 2004; 271(23-24):4646 - 4658.
- Walczevska M, Peruń A, Białecka A, Śróttek M, Jamróz W, Doroczyński P, Jachowicz R, Kulinowski P, Nagl M, Gottardi W, Marcinkiewicz J.: Comparative analysis of microbicidal and anti-inflammatory properties of novel taurine bromamine derivatives and bromamine T. *Adv Exp Med Biol*. 2017 (w druku).
- Warskulat U, Borsch E, Reinehr R, Heller-Stilb B, Roth C, Witt M, Häussinger D.: Taurine deficiency and apoptosis: findings from the taurine transporter knockout mouse. *Arch Biochem Biophys.*, 2007; 462: 202 - 209.
- Watson, RW, Redmond, HP, Mc Carthy, J, Bouchier-Hayes D, Taurolidine, an antilipopolysaccharide agent, has immunoregulatory properties that are mediated by the amino acid taurine. *J Leukoc Biol*. 1995; 58: 299.
- 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.
- Wenger FA, Kilian M, Braumann C, Neumann A, Ridders J, Peter FJ, Guski H, Jacobi CA.: Effects of taurolidine and octreotide on port site and liver metastasis after laparoscopy in an animal model of pancreatic cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19(2):169 - 73.

- Willatts, SM, Radford S, Leitermann M.: Effect of the antiendotoxic agent, taurolidine, in the treatment of sepsis syndrome: a placebo-controlled, double-blind trial. *Crit Care Med.* 1995; 23: 1033 - 1039.
- Wright CE, Tallan HH, Lin YY, Gaull GE.: Taurine: biological update. *Annu Rev Biochem.* 1986; 55:427 - 53.
- Wu W, Samoszuk MK, Comhair SAA, Thomassen MJ, Farver CF, Dweik RA, Kavuru MS, Erzurum SC, Hazen SL.: Eosinophils generate brominating oxidants in allerger-induced asthma. *J Clin Invest* 2000; 105: 1455 - 1463.
- Yamori Y, Nara Y, Ikeda K, Mizushima S.: Is taurine a preventive nutritional factor of cardiovascular diseases or just a biological marker of nutrition? *Adv Exp Med Biol* 1996; 403: 623 – 629.
- Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, Roos D.: Killing of schistosomula by taurine chloramine and taurine bromamine. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 37(1):106 - 110.
- Zollinger L, Schnyder S, Nietzsche S, Sculean A, Eick S. In-vitro activity of taurolidine on single species and a multispecies population associated with periodontitis. *Anaerobe.* (2015);32:18 - 23.