

dr hab. n. med. Ewa Kontny

Warszawa, 12.06.2017

Zakład Patofizjologii i Immunologii

Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii

i Rehabilitacji w Warszawie

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Marii Walczewskiej pt:

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

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem **prof. dr hab. med. Janusza Marcinkiewicza**.

Do niedawna najbardziej użyteczną bronią w walce z zakażeniami bakteryjnymi były antybiotyki. Obecnie, z powodu nabywania przez drobnoustroje antybiotykoodporności, coraz częściej antybiotyki okazują się nieskuteczne. Co więcej, znaczna dysproporcja pomiędzy tempem powstawania i rozprzestrzeniania się oporności bakterii na antybiotyki a wprowadzaniem nowych leków przeciwbakteryjnych sprawia, że problem ten zaczyna wymykać się spod kontroli a możliwości terapeutyczne zakażeń bakteryjnych stają się coraz bardziej ograniczone. Raport WHO („Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014”) opublikowany w 2014 roku wskazuje, że wkraczamy w erę post-antybiotykową, kiedy podobnie jak w czasie przed odkryciem antybiotyków, medycyna może stać się bezradna nawet wobec banalnych infekcji. Wobec tych zagrożeń podejmowane są różne strategie zmierzające do zapobiegania antybiotykoodporności, poszukuje się również nowych leków o działaniu bakteriobójczym. Wśród potencjalnych leków zastępczych uwagę badaczy zwracają haloaminy tauryny, chloramina tauryny (TauCl) i bromamina tauryny (TauBr). Wiele

obserwacji wskazuje, że te endogenne pochodne wolnego aminokwasu tauryny, w stężeniach fizjologicznych, mają szerokie spektrum działań mikrobójczych, są stosunkowo bezpieczne dla komórek i tkanek ssaków, a także wykazują właściwości przeciwzapalne. Z uwagi na te ostatnie przypuszcza się, że niedobór tauryny i/lub jej haloamin może przyczyniać się do konwersji zapalenia z fazy ostrej w przetrwałą. Dlatego rozważa się możliwość ich zastosowania nie tylko w zakażeniach bakteryjnych, ale także w leczeniu różnych schorzeń zapalnych. Poważnym ograniczeniem terapeutycznego użycia haloamin tauryny jest nietrwałość. Ostatnio zsyntezowano ich bardziej stabilne pochodne. Jedną z nich jest trwała pochodna TauBr – 612Br (N-monobromo-dimetylotauryna), wytworzona przez zespół prof. Waldemera Gottardiego i prof. Marcusa Nagla z Uniwersytetu w Innsbrucku.

Doktorantka postawiła sobie za cel opracowanie charakterystyki tej trwałej pochodnej TauBr (612Br), pod kątem jej potencjalnego zastosowania terapeutycznego. Ze względu na możliwość zmian właściwości biologicznych 612Br w następstwie modyfikacji jej budowy chemicznej, układem odniesienia były klasycznie syntezowane i oceniane równocześnie TauBr i TauCl. Cele szczegółowe badań przeprowadzonych przez doktorantkę obejmowały porównawczą ocenę tychże haloamin tauryny pod względem:

1. Właściwości fizykochemicznych (stabilność w zależności od pH, temperatury i czasu przechowywania, obecności H_2O_2).
2. Działania cytotoksycznego na wybrane rodzaje komórek (makrofagi otrzewnowe i linii J774.A1, linię keratynocytów ludzkich HaCaT).
3. Właściwości immunomodulujących, w tym: (i) wpływ na produkcję cytokin (prozapalnych i przeciwzapalnych), prostaglandyn oraz reaktywnych form tlenu (ROS) przez makrofagi i keratynocyty (jw.); (ii) wpływ na ekspresję oksygenazy hemowej 1 (HO-1), cyklooksygenazy 2 (COX-2) i indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) w makrofagach i keratynocytach.

4. Działania bakteriobójczego na wybrane szczepy mikrobiomu skóry (florę stałą i bakterie patogenne – *P. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*).

Dotychczasowy brak informacji o właściwościach 612Br w pełni uzasadnia zarówno główny cel badań zaproponowanych w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej, jak i ich zakres określony w celach szczegółowych.

Przedstawiona do oceny praca liczy 107 stron tekstu, ma typowy układ, zawiera 9 rozdziałów („Wstęp”, „Cel pracy”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Streszczenie” w jęz. polskim i jęz. angielskim oraz wykaz piśmiennictwa – „Literatura”), poprzedzonych „Wykazem stosowanych skrótów”. Zawiera także listę publikacji doktorantki (9 prac oryginalnych, 1 poglądowa, 9 doniesień na zjazdy międzynarodowe i 6 na zjazdy krajowe) (str. 31-35), świadczących iż temat rozprawy doktorskiej jest logiczną kontynuacją jej wieloletnich zainteresowań naukowych tauryną i jej pochodnymi. Wykaz tych prac dokumentuje również znaczną aktywność naukową doktorantki.

- **Wstęp**, liczący 22 strony, jest przejrzystym przeglądem prac naukowych dotyczących takich zagadnień jak: (i) synteza i metabolizm tauryny, jej funkcje biologiczne, rola w odczynie zapalnym i stresie oksydacyjnym; (ii) naturalne pochodne tauryny (TauCl, TauBr) i ich właściwości przeciwzapalne i mikrobójcze, (iii) syntetyczne pochodne i analogi tauryny oraz ich właściwości biologiczne, (iv) próby terapeutycznego zastosowania tauryny i jej pochodnych. Jest to bardzo dobre wprowadzenie uzasadniające cel i zakres badań przeprowadzonych przez doktorantkę.
- **Cele badawcze** są dobrze uzasadnione, sformułowane logicznie i precyzyjnie.
- **Metody badawcze** nie budzą zastrzeżeń. Autorka rozprawy stosowała różne techniki laboratoryjne świadczące o jej dobrym przygotowaniu i doświadczeniu w prowadzeniu prac badawczych.

- **Wyniki** są opisane klarownie, w logicznym porządku, zgodnie z zaplanowanymi celami szczegółowymi, przedstawione graficznie w formie 18 rycin i zebrane w 6 tabelach. Na ich podstawie autorka opisuje właściwości 612Br konkludując, iż w porównaniu do klasycznie syntezowanych TauCl i TauBr, ta pochodna tauryny : (i) wykazuje największą trwałość, podobnie jak TauBr w kwaśnym pH ulega reakcji dysproporcjonowania w kierunku dwubromoaminy, reaguje też z H₂O₂; (ii) wykazuje nieco mniejszą cytotoksyczność niż TauBr, a jej maksymalne niecytotoksyczne stężenia zależą od typu komórek (≤300 μM dla makrofagów mysich, ≤1000 μM dla keratynocytów ludzkich); (iii) w podobny jak TauBr sposób hamuje produkcję cytokin przez aktywowane makrofagi mysie i keratynocyty ludzkie linii HaCaT; (iv) podobnie jak TauBr indukuje w komórkach ekspresję HO-1, hamuje ekspresję COX2 i produkcję PGE₂ oraz ekspresję iNOS i produkcję NO, a także silnie hamuje produkcję ROS przez aktywowane neutrofile; (v) ma silniejsze niż TauBr właściwości mikrobójcze w stosunku do bakterii Gram(+) i Gram(-). Założenia pracy doktorskiej zrealizowano w pełni.
- **Dyskusja** jest wyczerpująca, zawiera omówienie wyników w zestawieniu z dobrze dobranym, bogatym piśmiennictwem, liczącym 124 pozycje.
- **W końcowym wniosku** doktorantka wskazuje na potencjalne terapeutyczne zastosowanie 612Br, stwierdzając, że: „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) i w stomatologii (leczenie stanów zapalnych dziąseł – przyzębica)”.
- **Streszczenia** (w jęz. polskim i angielskim) napisane w sposób zwięzły i klarowny oddają istotę pracy.

Uwagi krytyczne

Praca jest napisana poprawną polszczyzną, trafiają się jednak błędy interpunkcyjne, literowe i redakcyjne. Niektóre z nich utrudniają zrozumienie tekstu (np. w objaśnieniach do ryc. 4.15 i 4.18) i odnalezienie właściwej pozycji z piśmiennictwa (np. na str. 19, 22-24). Jedna z cytowanych prac (str. 67 - Schleupner i Glasgow 1978) jest pominięta w wykazie. Znaczenie niektórych skrótów (np. TauCl i TauBr) jest niepotrzebnie wyjaśniane kilkakrotnie (np. str. 12, 13, 38, 39), a innych (RZS, str. 15) pominięte. Wydaje się, że konsekwencją potknięć redakcyjnych są dwa drobne błędy merytoryczne: (i) zaliczenie monocytów do granulocytów (str. 13) oraz (ii) *P. acnes* do bakterii Gram (-) (str.81), choć w innym miejscu (str. 30) prawidłowo do Gram (+). Pragnę podkreślić, że te drobne uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy – oceniam ją bardzo wysoko.

Przedstawiona do recenzji praca autorstwa mgr Marii Walczewskiej spełnia wszelkie wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi (*art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z późn. zm.; Dz.U. 2016, poz. 882*). **W związku z powyższą pozytywną oceną, zwracam się do Wysokiej Rady Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Marii Walczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Warszawa, 12.06.2017


dr hab. n. med. Ewa Kontny,

Z-CIA KIEROWNIKA
ZAKŁADU PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie

dr hab. n. med. Ewa Kontny, prof. nadzw. NIGRI

