

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
ul. H. Jordana 19,
41-808 Zabrze

Zabrze, 10.06.2017r.

Tel.: 32 272 25 54, e-mail: mikroimm@sum.edu.pl . zczuba@sum.edu.pl

Recenzja

**rozprawy doktorskiej wykonanej przez mgr Marię Walczewską pod tytułem:
„Porównanie właściwości biologicznych haloamin tauryny, jako potencjalnych leków
w schorzeniach zapalnych i infekcyjnych”**

Promotor: Profesor zw, dr hab. n. med. Janusz Marcinkiewicz

Tauryna (kwas 2-aminoetylosulfonowy) została odkryta w XIX wieku w żółci i jej nazwa pochodzi od gatunku zwierzęcia *Bos taurus*. Związek ten jest β -aminokwasem siarkowym, który występuje głównie w stanie wolnym i nie tworzy wiązań peptydowych z innymi aminokwasami. Wzrost zainteresowania tauryną odnotowano dopiero w latach siedemdziesiątych XX wieku, kiedy stwierdzono, że u kotów na diecie z niedoborem tauryny dochodzi do degeneracji siatkówki. Kolejne badania potwierdziły udział tauryny w wielu procesach biologicznych takich jak: prawidłowa pracy serca, regulacja ciśnienia osmotycznego, transport jonów, synteza i wydzielanie kwasów żółciowych, wpływ na proliferację komórek oraz funkcjonowanie układu rozrodczego. Ponadto tauryna wykazuje silne właściwości przeciwutleniające, immunomodulacyjne, a także detoksykacyjne chroniąc komórki przed działaniem kwasów, głównie podchloraowego i podbromawego. Reakcja tauryny z tymi kwasami prowadzi do tworzenia haloamin tauryny, które wykazują znacznie wyższą stabilność i ograniczają w ten sposób potencjalne uszkodzenia tkanek. Stężenie tauryny w organizmie jest gatunkowo i tkankowo bardzo zróżnicowane. Najwyższe stężenia dochodzące do kilkudziesięciu m moli/litr stwierdzono w leukocytach. Neutrofile po stymulacji wybuchu oddechowego mogą generować duże ilości głównie podchlorynów, jako produktów reakcji katalizowanych przez mieloperoksydazę w obecności nadtlenu wodoru i halogenków. Obecna w nich tauryna pozwala bardzo szybko wiązać powstające produkty tych reakcji. Okazuje się, że uwalniane z komórek haloaminy tauryny mogą mieć silny negatywny wpływ na drobnoustroje, jak i mogą modulować procesy zachodzące w układzie odpornościowym. Najczęściej jest to działanie przeciwzapalne polegające na hamowaniu

syntezy mediatorów procesu zapalnego oraz redukcji generacji reaktywnych form tlenu i azotu. Uzyskana wiedza dotycząca aktywności biologicznej haloamin tauryny może pozwolić na zaprojektowanie i otrzymanie nowych bardziej skutecznych ich syntetycznych pochodnych do zastosowania w terapii.

Podjęty przez Doktorantkę temat badań i wytyczony cel pracy jest uzasadniony i właściwie sprecyzowany w świetle poszukiwań nowych, poznawczych i przyszłych możliwości terapeutycznych pochodnych haloamin tauryny.

Przedstawiona mi do oceny praca liczy 107 stron maszynopisu. Jej układ pod względem merytorycznym jest właściwy dla tego typu opracowań. Główne części pracy to wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz dołączone streszczenia i piśmiennictwo liczące 144 pozycje w porządku alfabetycznym. Ponadto pracę zaopatrzone w spis treści i wykaz stosowanych skrótów.

Wstęp pracy jest podzielony na podrozdziały, gdzie w sposób przejrzysty zostały opisane zagadnienia wprowadzające czytelnika w tematykę pracy. Doktorantka zaczyna od opisu tauryny, jej syntezy i metabolizmu w organizmie, biologicznych funkcji oraz roli w odczynie zapalnym i stresie oksydacyjnym, a następnie właściwości przeciwzapalne i mikrobójcze chloraminy tauryny i bromaminy tauryny. Końcowa część wstępu jest poświęcona syntetycznym pochodnym i analogom tauryny oraz ich właściwościom. Wstęp kończy tabela podsumowująca potencjalne terapeutyczne zastosowania chloraminy i bromaminy tauryny wraz z podaniem stosownego piśmiennictwa.

Przy pierwszym opisie w pracy drobnoustroju wskazane byłoby umieszczenie pełnej nazwy rodzaju i gatunku drobnoustroju, w kolejnym opisie można użyć skrótu literowego. Drobne błędy literowe na stronach 9, 12, 21 oraz zastosowany rodzaj czcionki stopni temperatury nie zmniejszają mojej bardzo pozytywnej oceny tego wprowadzenia.

W celu pracy Doktorantka uzasadnia podjęte badania oraz jasno precyzuje cele szczegółowe dotyczące porównania aktywności chloro- i bromaminy tauryny z pochodną dimetylową bromaminy tauryny (612Br). Po przedstawieniu celu pracy można zapoznać się z dorobkiem naukowym Doktorantki w postaci 9 prac oryginalnych, jednej pracy poglądowej z zakresu tauryny oraz licznymi doniesieniami na konferencjach krajowych i zagranicznych. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka jest współautorką wielu prac dotyczących badań pochodnych tauryny prowadzonych w Katedrze Immunologii kierowanej przez Pana Profesora Janusza Marcinkiewicza, opublikowanych w czasopiśmie z wysokim współczynnikiem

oddziaływania IF. Potwierdza to bardzo dobre przygotowanie merytoryczne do pracy naukowej. Jednocześnie uzyskane wcześniej wyniki umożliwiły określenie kolejnych celów badawczych w rozprawie doktorskiej.

Opisy metod badawczych i materiałów są kompletne, merytoryczne i nie budzą moich zastrzeżeń. Przy dalszym opracowywaniu materiału do druku należałoby uzupełnić w metodyce poświęconej drobnoustrojom, informacje o sposobie inaktywacji drobnoustrojów wykorzystanych do stymulacji neutrofilów. Sposób inaktywacji może mieć wpływ na strukturę antygenów obecnych na drobnoustrojach.

Zakres przeprowadzonych badań jest bardzo szeroki. Dotyczy syntezy pochodnych chloraminy i bromaminy tauryny, stabilności badanych roztworów haloamin tauryny w temperaturze 4°C i 22°C w okresie 84 dni, badań spektrofotometrycznych przy różnym pH, oraz badań biologicznych z wykorzystaniem wzorcowych drobnoustrojów do oceny MIC i MBC, mysich makrofagów linii J774.A1, ludzkich keratynocytów linii HaCaT oraz mysich, otrzewnowych neutrofilów i makrofagów. Kontrolę żywotności komórek w hodowli oceniano metodą z użyciem MTT. Do pomiarów stężenia cytokin w pracy zastosowano metodę ELISA, a pomiar uwalniania tlenu azotu oceniano ilościowo pośrednią metodą Griessa. Ekspresję COX-2, HO-1, iNOS oceniano metodą Western blot, a aktywność neutrofilów do produkcji reaktywnych form tlenu mierzono metodą chemiluminescencji.

Uzyskane wyniki są przedstawione czytelnie w tabelach i na licznych rycinach oraz poddawane ocenie w kontekście innych badań w rozdziale dyskusji. Wykorzystane w pracy piśmiennictwo jest dobrane w sposób właściwy i w dużej liczbie pochodzi z ostatnich lat. W dyskusji Doktorantka wykazała szeroką wiedzę w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętność obiektywnej oceny wartości badań. Podsumowaniem badań są wnioski w liczbie 7.

W pracy wykazano wyższą skuteczność pochodnej metylowej bromaminy tauryny (612Br) przy jednoczesnej większej stabilności jej roztworu w czasie przechowywania. Duży wpływ na aktywność tej pochodnej mają grupy metylowe. Haloaminy tauryny są hydrofilne, a budowa chemiczna 612Br wskazuje na większą lipofilność spowodowaną grupami metylowymi. Wyższa lipofilność mogłaby zwiększyć transport tej pochodnej tauryny do błon komórkowych. Można rozważyć oznaczenie wartości dla tej pochodnej pK_a i współczynnika podziału n-oktanol – woda, co umożliwiłoby obliczenie współczynnika dystrybucji.

Doktorantka w swoich badaniach wykonała już badania spektrofotometryczne przy różnym pH, uzyskując przecięcia krzywych w punktach izobestycznych, co pozwala obliczyć pK_a .

Podsumowując uważam, że oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalną pracę naukową o wysokiej wartości merytorycznej i spełnia wszystkie kryteria stawiane tego typu opracowaniom oraz mam zaszczyt wnioskować do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum o dopuszczenie mgr Marii Walczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zwracam się również do Wysokiej Rady Wydziału o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny pracy, co uzasadniam wysoką wartością naukową i oryginalnością przeprowadzonych badań oraz szeroką wiedzą przedstawioną w sposób usystematyzowany po względem merytorycznym i edytorskim.

Z poważaniem

PROFESOR NADZWYCZAJNY
Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Immunologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
dr hab. n. med. Zenon Czuba prof. nadzw. SUM