

## Streszczenie pracy doktorskiej mgr Marii Walczewskiej pt.: „Porównanie właściwości biologicznych haloamin tauryny, jako potencjalnych leków w schorzeniach zapalnych i infekcyjnych”

### 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

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 $\alpha$ , 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 przeciwzapalny 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).

## Summary

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

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 $\alpha$ , 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 PGE<sub>2</sub>, 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).