

mgr farm. Ewelina Russjan

Ocena wpływu hybrydy PK20 na nadreaktywność oskrzeli i proces zapalny w mysim modelu astmy nieatopowej

Rozprawa na stopień doktora
Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie: nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Katarzyna Kaczyńska, prof. IMDiK



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2020

*Składam serdeczne podziękowania Pani Dr hab. Katarzynie Kaczyńskiej
za możliwość rozwoju naukowego, wszechstronną opiekę merytoryczną
na każdym etapie powstawania niniejszej pracy,
wiele cennych uwag i ogromną życzliwość.*

*Dziękuję moim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Fizjologii Oddychania
za okazaną pomoc i wspólnie spędzony czas.*

*Pragnę również podziękować mojej Rodzinie, w szczególności Mężowi,
za cierpliwość, wsparcie i nieustającą wiarę w moje możliwości.*

Badania stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej były finansowane z grantu przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN/2014/13/B/NZ7/02247).

Część uzyskanych wyników została opublikowana w pracy:

Russjan E., Andrzejewski K., Sulejczak D., Kleczkowska P., Kaczyńska K. Endomorphin-2- and Neurotensin- Based Chimeric Peptide Attenuates Airway Inflammation in Mouse Model of Nonallergic Asthma. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(23). IF = 4,183

Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	4
STRESZCZENIE.....	8
ABSTRACT.....	12
INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	16
1. WSTĘP	17
1.1. Definicja astmy oskrzelowej.....	17
1.2. Fenotypy astmy oskrzelowej	18
1.3. Farmakoterapia astmy oskrzelowej.....	21
1.3.1. Glikokortykosteroidy.....	21
1.3.2. Leki β_2 -adrenomimetyczne	23
1.3.3. Leki cholinolityczne.....	23
1.3.4. Leki przeciwleukotrienowe	24
1.3.5. Metyloksantyny	25
1.3.6. Przeciwciało monoklonalne anti-IgE.....	25
1.3.7. Przeciwciała monoklonalne anti-IL5, anti-IL5R, anti-IL4R	26
1.4. Wytyczne leczenia astmy oskrzelowej.....	26
1.5. Związki hybrydowe o aktywności przeciwzapalnej	27
1.6. Hybrydyzacja farmakoforów endomorfiny 2 i neurotensyny - chimera PK20.....	29
1.7. Endomorfina 2 - wyjściowy peptyd dla farmakoforu składowego hybrydy PK20.....	31
1.8. Neurotensyna - peptyd macierzysty dla farmakoforu stanowiącego element strukturalny hybrydy PK20	34
1.9. Mysie modele astmy oskrzelowej.....	37
1.10. Modele astmy oskrzelowej wywołane podaniem haptenów	39
1.10.1. Model indukowany TDI	41
1.10.2. Model wywołany TMA	42
1.10.3. Model indukowany PCL.....	43
1.10.4. Model wywołany DNFB.....	43
2. CEL PRACY	45
2.1. Ogólny cel pracy.....	45
2.2. Cele szczegółowe pracy.....	45
3. MATERIAŁY I METODY	46

3.1. Zwierzęta doświadczalne	46
3.2. Związki badane i odczynniki chemiczne	46
3.3. Mysi model astmy nieatopowej	47
3.4. Grupy eksperymentalne	48
3.5. Wyznaczenie dawki związku hybrydowego PK20.....	49
3.6. Pomiar nadreaktywności oskrzeli	50
3.7. Określenie całkowitej liczby komórek odpowiedzi zapalnej oraz liczby neutrofilów w płynie pęcherzykowo-oskrzelowym (BALF)	52
3.8. Pomiar stężenia białka całkowitego w BALF i homogenatach płuc	53
3.9. Pomiar stężenia albumin w BALF	53
3.10. Oznaczenie poziomu cytokin prozapalnych w BALF i homogenatach płuc	53
3.11. Oznaczenie stężenia mysiej proteazy komórek tucznych 1 (MCPT-1) w homogenatach płuc.....	54
3.12. Oznaczenie stężenia dialdehydu malonowego (MDA) w homogenatach płuc	55
3.13. Oznaczenie aktywności sekrecyjnej fosfolipazy A ₂ (sPLA ₂) w homogenatach płuc..	55
3.14. Wykonanie preparatów histologicznych tkanki płucnej	55
3.15. Ocena stopnia zaawansowania procesu zapalnego tkanki płucnej na podstawie preparatów histologicznych	56
3.16. Określenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-κB w tkance płucnej metodą immunohistochemiczną	56
3.17. Analiza statystyczna wyników	57
4. WYNIKI	58
4.1. Wpływ hybrydy PK20 na obrzęk uszu w modelu nadwrażliwości kontaktowej - wybór dawki badanego związku	58
4.2. Wpływ hybrydy PK20 na proces zapalny w mysim modelu astmy niealergiczej. Porównanie aktywności hybrydy z działaniem mieszaniny jej obu farmakoforów i deksametazonu.....	60
4.2.1. Wpływ hybrydy PK20 na nadreaktywność oskrzeli	61
4.2.2. Wpływ hybrydy PK20 na liczbę komórek odpowiedzi zapalnej w płynie pęcherzykowo-oskrzelowym (BALF) i tkance płucnej	62
4.2.3. Wpływ hybrydy PK20 na poziom cytokin prozapalnych w BALF i homogenatach płuc	65
4.2.4. Wpływ hybrydy PK20 na stężenie mysiej proteazy komórek tucznych 1 (MCPT-1) w homogenatach płuc	70
4.2.5. Wpływ hybrydy PK20 na stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w homogenatach płuc	71

4.2.6. Wpływ hybrydy PK20 na aktywność sekrecyjnej fosfolipazy A ₂ (sPLA ₂) w homogenatach płuc	72
4.2.7. Wpływ hybrydy PK20 na stężenie albumin w BALF	73
4.2.8. Wpływ hybrydy PK20 na ekspresję jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB) w tkance płucnej	74
4.3. Udział poszczególnych ścieżek receptorowych (opiodowej i neurotensynowej) w działaniu przeciwzapalnym hybrydy PK20 na podstawie wybranych parametrów ...	76
4.3.1. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na działanie hybrydy PK20 i jej wpływ na nadreaktywność oskrzeli.....	77
4.3.2. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na aktywność hybrydy PK20 i infiltrację komórek odpowiedzi zapalnej do płynu pęcherzykowo-oskrzelowego (BALF).....	78
4.3.3. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na aktywność hybrydy PK20 i poziom cytokin prozapalnych w BALF i homogenatach płuc.....	79
4.3.4. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na aktywność hybrydy PK20 i stężenie mysiej proteazy komórek tucznych 1 (MCPT-1) w homogenatach płuc .	84
4.3.5. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na aktywność hybrydy PK20 i stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w homogenatach płuc	85
4.3.6. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na przeciwzapalne działanie hybrydy PK20 i aktywność sekrecyjnej fosfolipazy A ₂ (sPLA ₂) w homogenatach płuc	86
5. DYSKUSJA	87
5.1. Ocena wpływu hybrydy PK20 i mieszaniny jej farmakoforów na nadreaktywność oskrzeli w mysim modelu astmy niealergiczej	87
5.2. Ocena przeciwzapalnego potencjału hybrydy PK20 i mieszaniny jej farmakoforów w mysim modelu astmy niealergiczej	90
5.3. Ocena zaangażowania farmakoforu endomorfiny 2 i farmakoforu neurotensyny w przeciwzapalną aktywność hybrydy PK20 i jej wpływ na nadreaktywność oskrzeli	101
6. WNIOSKI	106
APPENDIX I	107
APPENDIX II	108
LITERATURA.....	109

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACh - acetylocholina (ang. *acetylcholine*)

AdPLA - fosfolipaza swoista dla adipocytów (ang. *adipose phospholipase*)

AHR - nadreaktywność dróg oddechowych (ang. *airway hyperresponsiveness*)

ANOVA - analiza wariancji (ang. *analysis of variance*)

APC - komórki prezentujące antygen (ang. *antigen presenting cells*)

ATP - adenozy-no-5'-trifosforan (ang. *adenosine 5'-triphosphate*)

BALF - płyn pęcherzykowo-oskrzelowy (ang. *bronchoalveolar lavage fluid*)

cAMP - cykliczny adenozy-no-3',5'-monofosforan (ang. *3', 5'-cyclic adenosine monophosphate*)

cGMP - cykliczny guanozy-no-3',5'-monofosforan (ang. *3', 5'-cyclic guanosine monophosphate*)

CGRP - peptyd związany z genem kalcytoniny (ang. *calcitonin gene-related peptide*)

COX-2 - cyklooksygenaza-2 (ang. *cyclooxygenase 2*)

cPLA₂ - cytozolowa fosfolipaza A₂ (ang. *cytosolic phospholipase A₂*)

CTMC - komórki tuczne tkanki łącznej (ang. *connective tissue mast cells*)

CXCL1 - chemokina grupy CXC 1 (ang. *C-X-C motif chemokine ligand 1*)

CysLT₁ - receptor leukotrienowy typu 1 (ang. *cysteinyl leukotriene receptor 1*)

CysLT₂ - receptor leukotrienowy typu 2 (ang. *cysteinyl leukotriene receptor 2*)

CZDA - czysty do analizy (ang. *analytical reagent grade*)

DAG - diacyloglicerol (ang. *diacylglycerol*)

DNCB - dinitrochlorobenzen (ang. *dinitrochlorobenzene*)

DNFB - dinitrofluorobenzen (ang. *dinitrofluorobenzene*)

DNS - kwas dinitrobenzenosulfonowy (ang. *dinitrobenzene sulphonic acid*)

DOP - receptor opioidowy delta (ang. *delta opioid receptor*)

DSS - siarczan dekstranu sodu (ang. *dextran sodium sulfat*)

DTH - nadwrażliwości typu późnego (ang. *delayed type hypersensitivity*)

EGF - naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*)

ELISA - test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EM 1 - endomorfina 1 (ang. *endomorphin 1*)

EM 2 - endomorfina 2 (ang. *endomorphin 2*)

FcεRI - receptor o wysokim powinowactwie do immunoglobuliny E (ang. *high-affinity IgE receptor*)

FEV₁ - natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa (ang. *forced expiratory volume in one second*)

FVC - natężona pojemność życiowa płuc (ang. *forced vital capacity*)

GINA - Światowa Inicjatywa na Rzecz Zwalczenia Astmy (ang. *Global Initiative for Asthma*)

GPCR - receptor sprzężony z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptor*)

GR - receptor glikokortykosteroidowy (ang. *glucocorticoid receptor*)

GRE - miejsce odpowiedzi na glikokortykosteroidy (ang. *glucocorticoid response element*)

HDAC - deacetylaza histonowa (ang. *histone deacetylase*)

HRP - peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)

i.p. - podanie dootrzewnowe (ang. *intraperitoneal*)

ICAM-1 - międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1 (ang. *intercellular adhesion molecule 1*)

Ig - immunoglobulina (ang. *immunoglobulin*)

IKK - kinaza inhibitora κ B (ang. *I κ B kinase*)

IL - interleukina (ang. *interleukin*)

iNOS - indukowalna syntaza tlenku azotu (ang. *inducible nitric oxide synthase*)

IP₃ - trifosforan inozytolu (ang. *inositol trisphosphate*)

iPLA₂ - fosfolipaza A₂ niezależna od jonów Ca²⁺ (ang. *Ca²⁺-independent phospholipase A₂*)

IUPAC - Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (ang. *The International Union of Pure and Applied Chemistry*)

KOP - receptor opioidowy kappa (ang. *kappa opioid receptor*)

LABA - β_2 -adrenomimetyki długo działające (ang. *long-acting beta₂-agonists*)

LPLA₂ - lizosomalna fosfolipaza A₂ (ang. *lysosomal phospholipase A₂*)

LTA₄/LTB₄/LTC₄/LTD₄/LTE₄ - leukotrien A₄/B₄/C₄/D₄/E₄ (ang. *leukotriene A₄/B₄/C₄/D₄/E₄*)

LTRA - antagoniści receptora leukotrienowego (ang. *leukotriene receptor antagonists*)

MC-CPA - karboksypeptydaza A (ang. *mast cell carboxypeptidase A*)

MCPT-1 - mysia proteaza komórek tucznych 1 (ang. *mouse mast cells protease 1*)

MDA - dialdehyd malonowy (ang. *malondialdehyde*)

mGR - błonowy receptor glikokortykosteroidowy (ang. *membrane glucocorticoid receptor*)

MMC - komórki tuczne błon śluzowych (ang. *mucosal mast cells*)

MOP - receptor opioidowy mi (ang. *mu opioid receptor*)

MPO - mieloperoksydaza (ang. *myeloperoxidase*)

NF- κ B - jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NLPZ - niesteroidowe leki przeciwzapalne (ang. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)

NMDA - kwas N-metylo-D-asparaginowy (ang. *N-Methyl-D-aspartic acid*)

NOP - receptor nociceptynowy (ang. *nociceptin opioid receptor*)

NT - neurotensyna (ang. *neurotensin*)

NTR1/ 2/ 3/ 4 - receptor neurotensynowy 1/ 2/ 3/ 4 (ang. *neurotensin receptor 1/ 2/ 3/ 4*)

OVA - owalbumina (ang. *ovalbumin*)

PAF-AH - acetylohydrolaza czynnika aktywującego płytki (ang. *platelet activating factor acetylhydrolase*)

PBS - roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami (ang. *phosphate-buffered saline*)

PBST - PBS z dodatkiem Tritonu X-100 (*phosphate buffered saline with Triton X-100*)

PCL - chlorek pikrylu (ang. *picryl chloride*)

PDE - fosfodiesteraza (ang. *phosphodiesterase*)

Penh - pauza wydłużona (ang. *enhanced pause*)

PEP - szczytowy przepływ wydechowy (ang. *peak expiratory pressure*)

PGE₂ - prostaglandyna E₂ (ang. *prostaglandin E₂*)

PIP - szczytowy przepływ wdychowy (ang. *peak inspiratory pressure*)

PLA₂ - fosfolipaza A₂ (ang. *phospholipase A₂*)

pro-NT/NN - precursor neurotensyny i neuromedyny N (ang. *neurotensin/neuromedin N precursor*)

PSA - kwas pikrylosulfonowy (ang. *picryl sulphonic acid*)

PUFAs - wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *polyunsaturated fatty acids*)

RANTES - chemokina regulowana poprzez aktywację, ekspresjonowana i wydzielana przez limfocyty T (ang. *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*)

R_L - opór płucny (ang. *lung resistance*)

ROS - reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

SABA - β_2 -adrenomimetyki krótko działające (ang. *short-acting beta₂-agonists*)

SCF - czynnik komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*)

SEM - błąd standardowy średniej (ang. *standard error of the mean*)

SP - substancja P (ang. *substance P*)

sPLA₂ - sekrecyjna fosfolipaza A₂ (ang. *secretory phospholipase A₂*)

SPPS - synteza peptydów na fazie stałej (ang. *solid phase peptide synthesis*)

TDI - diizocyjanian toluenu (ang. *toluene diisocyanate*)

T_e - czas wydechu (ang. *expiratory time*)

Th - limfocyty T pomocnicze (ang. *T helper cells*)

T_i - czas wdechu (ang. *inspiratory time*)

TMA - bezwodnik kwasu trimelitowego (ang. *trimellitic anhydride*)

TNF- α - czynnik martwicy nowotworu α (ang. *tumor necrosis factor α*)

T_r - czas relaksacji (ang. *relaxation time*)

TRPV1 - receptory waniloidowe aktywowane przejściowym potencjałem (ang. *transient receptor potential vanilloid 1*)

VCAM-1 - naczyniowa cząsteczka adhezyjna 1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*)

VEH - nośnik/rozpuszczalnik (ang. *vehicle*)

wGKS - glikokortykosteroidy w postaci wziewnej (ang. *inhaled glucocorticoids*)

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

STRESZCZENIE

Astma oskrzelowa jest chorobą przewlekłą, cechującą się stanem zapalnym i zmienną obturacją dróg oddechowych, z których wynikają charakterystyczne objawy takie jak świszczący oddech, uczucie ucisku w klatce piersiowej, duszność i kaszel. Dokładne mechanizmy leżące u podstaw choroby nie zostały dotąd w pełni wyjaśnione. Według szacunków WHO astma dotyka ponad 300 milionów ludzi na świecie, co sprawia, że jest ona problemem zdrowotnym o charakterze globalnym. Trudności w opanowaniu objawów potęguje fakt, iż astma jest chorobą o niejednorodnej etiologii, cechującą się różnymi postaciami. Jedną z nich jest niealergiczny fenotyp astmy, charakteryzujący się negatywnymi wynikami alergicznych testów skórnych oraz brakiem wzrostu stężenia przeciwciał klasy IgE w surowicy krwi. Pomimo podobnych objawów klinicznych postać niealergiczna ma zazwyczaj cięższy przebieg i wiąże się z koniecznością stosowania większych dawek glikokortykosteroidów wziewnych w celu kontroli choroby. W związku z powyższym, trwają prace nad poszukiwaniem związków o potencjale przeciwzapalnym, które mogą zostać wykorzystane w leczeniu astmy oskrzelowej.

Skutecznym rozwiązaniem tego problemu mogłyby być związki hybrydowe tj. cząsteczki zawierające w swojej strukturze co najmniej dwie, różniące się od siebie, aktywne biologicznie substancje. Hybryda PK20, będąca przedmiotem niniejszych badań, łączy w sobie dwa strukturalne elementy: farmakofor endomorfiny 2 i farmakofor neurotensyny. Endomorfiny to grupa endogennych tetrapeptydów, obecnych w strukturach układu odpornościowego, wykazująca wysokie powinowactwo do receptora opioidowego μ . Przeciwzapalne działanie endomorfiny 2, zarówno w modelu ostrego jak i chronicznego zapalenia, potwierdzono w piśmiennictwie naukowym. Neurotensyna z kolei to oligopeptyd, który jest zaangażowany w immunoregulację i procesy zapalne. Dane literaturowe na temat neurotensyny nie są jednoznaczne, jednak część prac wskazuje na jej korzystne działanie w przebiegu zapalenia.

Celem podjętych badań była ocena przeciwzapalnego potencjału hybrydy PK20 i porównanie go z aktywnością równomolowej mieszaniny obu jej farmakoforów oraz aktywnością związku odniesienia - deksametazonu, a także ustalenie, który z farmakoforów hybrydy w większym stopniu odpowiada za obserwowane efekty. Badania przeprowadzono w mysim modelu astmy niealergicznej wywołanej podaniem haptenu. Myszy szczepu Balb/c

uczulano przez kolejne dwa dni, przy użyciu roztworu dinitrofluorobenzenu, miejscowo na ogoloną skórę brzucha i na powierzchnię wewnętrzną łap. Po pięciu dniach dochodziło do ponownego kontaktu z haptenem, który podawany dotchawiczo wywoływał reakcję zapalną. Po 2 i 8 godzinach od wywołania zapalenia hybrydę PK20 lub inne badane związki podawano dootrzewnowo. Po upływie 24 godzin wykonywano pomiar nadreaktywności oskrzeli w odpowiedzi na kurczące działanie nebulizowanej metacholiny, a następnie pobierano płyn pęcherzykowo-oskrzelowy (BALF) i płuca do dalszych analiz.

W pierwszym etapie badań, doświadczenia przeprowadzano w pięciu grupach eksperymentalnych. W grupie, która stanowiła kontrolę negatywną, zwierzęta nieuczulane otrzymywały dotchawiczo hapten, a następnie dootrzewnowo 0,9% roztwór NaCl. W pozostałych grupach zwierzęta uczulone, po dotchawicznym wywołaniu reakcji otrzymywały kolejno: 0,9% roztwór NaCl (kontrola pozytywna), hybrydę PK20, mieszaninę jej obu farmakoforów lub deksametazon. W drugim etapie badań, dootrzewnowe podanie hybrydy poprzedzono podaniem związków antagonistycznych wobec receptorów opioidowych (chlorowodoru naloksonu) lub receptorów neurotensynowych (SR 142948), co pozwoliło na ocenę ich zaangażowania w przeciwwzapalną aktywność chimery PK20.

Zarówno hybryda PK20, jak i mieszanina jej obu farmakoforów wykazały wyraźną tendencję do zmniejszania nadreaktywności oskrzeli w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę pozytywną. Nie były one jednak tak skuteczne jak deksametazon, po zastosowaniu którego nie zaobserwowano znamiennych różnic pomiędzy grupą myszy otrzymującą lek, a zwierzętami nieuczulanymi. Hybryda PK20 zmniejszyła także całkowitą liczbę komórek odpowiedzi zapalnej w BALF, w tym liczbę neutrofilów. Podanie mieszaniny farmakoforów związku również ograniczyło napływ komórek, efekty te były jednak znacznie słabsze niż po zastosowaniu hybrydy. Co więcej, nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy grupą zwierząt, która otrzymała hybrydę PK20, a zwierzętami u których zastosowano deksametazon. Podobne zmiany zaobserwowano w preparatach histologicznych płuc - myszy otrzymujące hybrydę PK20, mieszaninę jej obu strukturalnych elementów lub deksametazon cechowały się mniejszą liczbą leukocytów w tkance płucnej, przy czym najslabszy efekt przeciwwzapalny widoczny był w grupie zwierząt leczonych mieszaniną farmakoforów hybrydy.

Podanie chimery PK20 zredukowało także podwyższony poziom cytokin prozapalnych: interleukin IL-1 α , IL-2, IL-13 i TNF- α w BALF. Zastosowanie równomolowej mieszaniny jej obu strukturalnych elementów w niewielkim stopniu obniżyło stężenie badanych związków - efekt ten był istotny jedynie dla IL-2. W homogenach płuc, zarówno hybryda PK20, jak i deksametazon zmniejszyły stężenie IL-1 β , IL-12p40, IL-17A, CXCL1 i RANTES u uczulanych zwierząt. Mieszanina farmakoforów wykazała korzystny wpływ wyłącznie na poziom IL-12p40 i RANTES.

W analizie stężenia dialdehydu malonowego (MDA), będącego markerem stresu oksydacyjnego, po podaniu hybrydy PK20, mieszaniny jej farmakoforów i deksametazonu zaobserwowano spadek poziomu MDA w porównaniu ze zwierzętami uczulonymi, u których zastosowano fizjologiczny roztwór soli. We wszystkich trzech badanych grupach zaobserwowano także obniżenie aktywności sekrecyjnej fosfolipazy A₂, która zapoczątkowuje szlak przemian kwasu arachidonowego będącego źródłem mediatorów zapalnych, oraz zmniejszenie stężenia albumin w BALF, których podwyższony poziom może świadczyć o przesięku makromolekuł z mikrokrążenia płucnego do przestrzeni pęcherzykowo-oskrzelowej. Z kolei zwiększone stężenie mysiej proteazy komórek tłuszczowych, markera stanu zapalnego magazynowanego i wydzielanego przez komórki tłuszczowe, zostało znamienne obniżone jedynie po podaniu hybrydy PK20 i deksametazonu.

Kolejnym parametrem analizowanym w doświadczeniach była ekspresja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF- κ B) w tkance płucnej. U myszy traktowanych jako kontrola pozytywna oraz zwierząt leczonych przy użyciu mieszaniny farmakoforów zaobserwowano zwiększoną intensywność wyznakowania od podjednostek p50 i p65 NF- κ B, w porównaniu z pozostałymi grupami doświadczalnymi. W przeciwieństwie do mieszaniny farmakoforów, podanie hybrydy PK20 i deksametazonu osłabiło znacząco znakowanie.

W drugim etapie badań, analizowano efekt zastosowania związków antagonistycznych na przeciwzapalną aktywność hybrydy PK20 i jej wpływ na nadreaktywność oskrzeli. Eksperymenty te miały pozwolić na ocenę, która ze ścieżek receptorowych (opiodowa czy neurotensynowa) jest silniej zaangażowana w działanie badanej chimery. Podczas pomiarów nadreaktywności oskrzeli w odpowiedzi na metacholinę zaobserwowano, iż zastosowanie zarówno chlorowodoru naloksonu, jak i związku SR 142948 nie spowodowało ograniczenia aktywności hybrydy PK20. Doświadczenia

określające akumulację komórek odpowiedzi zapalnej w BALF wykazały z kolei, że zablokowanie receptorów opioidowych nie wywiera niekorzystnego wpływu na efekt chimery, co może sugerować, iż aktywność hybrydy PK20 wynika w przeważającej mierze z pobudzenia receptorów neurotensynowych. Kolejne eksperymenty nie przyniosły jednak jednoznacznego rozstrzygnięcia. W części analiz zahamowanie obu ścieżek receptorowych spowodowało ograniczenie przeciwzapalnego działania chimery. W innych analizach m.in. dla IL-13, CXCL1, MDA uzyskano stężenia porównywalne do poziomu w grupie leczonej hybrydą PK20 niezależnie od tego, które z receptorów były blokowane. Wydaje się zatem, że oba strukturalne komponenty mają istotne znaczenie dla aktywności związku hybrydowego.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń potwierdzono, iż hybryda PK20 wykazuje potencjał przeciwzapalny w mysim modelu astmy niealergiczej wywołanej podaniem haptenu, porównywalny do aktywności deksametazonu. Wykazuje ona jednak mniejszy wpływ na nadreaktywność dróg oddechowych w odpowiedzi na nebulizację metacholiny niż deksametazon. Związek hybrydowy cechuje się także silniejszą aktywnością przeciwzapalną niż równomolowa mieszanina jego obu farmakoforów podanych jednocześnie, a aktywacja zarówno receptorów opioidowych, jak i receptorów neurotensynowych wydaje się być niezbędna do wywoływania pełnego efektu przeciwzapalnego badanej hybrydy.

ABSTRACT

Effect of the hybrid peptide PK20 on airway hyperreactivity and inflammatory process in a murine model of non-atopic asthma.

Bronchial asthma is a chronic disease, characterized by inflammation and variable airway obstruction, resulting in typical symptoms such as wheezing, chest tightness, shortness of breath and cough. The exact mechanisms underlying the disease have not yet been fully elucidated. According to estimates published by WHO, asthma affects over 300 million people worldwide and is regarded as a global health problem. Successful control of the symptoms is limited by the fact that asthma is a heterogeneous disease, characterized by many different phenotypes. One of them is the non-atopic (nonallergic) asthma, in which negative allergic skin tests and no increase in the level of IgE antibodies in blood serum are observed. Despite similar clinical symptoms to atopic asthma, the nonallergic phenotype is usually more severe and requires higher doses of inhaled glucocorticosteroids to control the disease. Given the above, there is a need to search for new compounds with the potential anti-inflammatory activity that may be used in the treatment of bronchial asthma.

An effective solution to this problem could be hybrid compounds - molecules containing in their structure at least two biologically active, differing from each other substances. The PK20 hybrid, which is the subject of the present study, combines two structural elements: the endomorphin 2 and neurotensin pharmacophores. Endomorphins are a group of endogenous tetrapeptides distributed in the central nervous system and in immune tissues, that exhibit a high affinity for the μ opioid receptor. There are numerous reports confirming the anti-inflammatory activity of endomorphin 2, both in the acute and chronic inflammation models. Neurotensin, in turn, is an oligopeptide that is involved in immunoregulation and inflammatory processes. Although the literature data are not conclusive, a part of them indicates its beneficial effect in the course of inflammation.

The purpose of the present study was the assessment of the anti-inflammatory potency of PK20 hybrid, comparison with the activity of the equimolar mixture of its both pharmacophores and the reference compound - dexamethasone, as well as a determination which of the hybrid structural elements stronger contribute to the observed effects. The research was carried out in the mouse model of nonallergic asthma induced by the

haptens. According to the experimental protocol, Balb/c mice were sensitized for two consecutive days, locally on the shaved skin of the abdomen and the inner surface of the paws, using dinitrofluorobenzene solution. After five days, contact with haptens occurred again via intratracheal instillation, resulting in the development of inflammation. 2 and 8 hours after induction of inflammation, PK20 hybrid or another tested compound was administered intraperitoneally. After 24 hours, airway hyperresponsiveness (AHR) was measured using nebulization of increasing doses of methacholine, followed by a collection of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lungs for further analyses.

In the first part of the study, the experiments were carried out in five experimental groups. In the negative control group, non-sensitized animals received haptens intratracheally, which was followed by intraperitoneal 0.9% NaCl solution injection. In other groups sensitized and intratracheally challenged animals received: 0.9% NaCl (positive control), hybrid PK20, a mixture of its both pharmacophores or dexamethasone. In the second stage of experiments intraperitoneal administration of the hybrid was preceded by the administration of antagonists to opioid receptors (naloxone hydrochloride) or neurotensin receptors (SR 142948), which allowed to assess their involvement in the anti-inflammatory activity of the chimera.

Both the hybrid peptide and mixture of its pharmacophores showed an evident tendency to reduce airway hyperresponsiveness compared to the positive control group. However, they were not as effective as dexamethasone - no significant differences between mice treated with dexamethasone and the group of non-sensitized animals (negative control) were observed. The PK20 hybrid also reduced the total number of inflammatory cells in BALF, including the number of neutrophils. Administration of the mixture of pharmacophores also limited the influx of cells, but its effect was found to be weaker in comparison to hybrid treatment. Furthermore, no significant differences were observed between the group of mice that received PK20 and the animals treated with dexamethasone. Similar changes were observed in lung histological studies - mice receiving hybrid, a mixture of both structural elements and dexamethasone were characterized by a reduced number of leukocytes in the lung tissue, however the weakest anti-inflammatory effect was shown in the group of animals treated with the mixture of pharmacophores.

The administration of PK20 also decreased the elevated levels of pro-inflammatory cytokines: IL-1 α , IL-2, IL-13 and TNF- α in BALF. The use of an equimolar mixture of its two structural elements slightly reduced the concentration of examined compounds, but the significant effect was shown solely for IL-2. In lung homogenates, both the PK20 hybrid and dexamethasone reduced the concentration of IL-1 β , IL-12p40, IL-17A, CXCL1 and RANTES in sensitized animals. The mixture of pharmacophores exhibited a beneficial effect only on IL-12p40 and RANTES levels.

In the analysis of the malondialdehyde (MDA) concentration, which is a biomarker of oxidative stress, administration of PK20, the mixture of its pharmacophores and dexamethasone, decreased the level of MDA in comparison to sensitized animals, which received physiological saline. A beneficial effect in all three groups was also shown in the study of lung tissue activity of secretory phospholipase A₂, that initiates the pathway of arachidonic acid metabolism, and for the level of albumin in BALF, which high concentration may indicate an increased lung permeability. On the contrary, the elevated concentration of mouse mast cell protease, a marker of inflammation secreted by mast cells, was markedly reduced only by injection of the PK20 hybrid and dexamethasone. After the administration of a mixture of pharmacophores, the enzyme level was not significantly different from the positive control group.

In the subsequent immunohistochemistry experiments, the expression of nuclear transcription factor NF- κ B in lung tissue was measured. Increased staining intensity from NF- κ B p50 and p65 subunits were observed in the positive control group and animals treated with a mixture of pharmacophores. In contrast, the administration of PK20 hybrid and dexamethasone significantly reduced the examined parameters.

In the second stage of the study, the effect of antagonistic compounds on anti-inflammatory activity of the PK20 hybrid was analyzed to assess the involvement of the opioid and neurotensin receptor pathways. Measurement of airway hyperreactivity in response to methacholine has demonstrated, that the use of naloxone hydrochloride or SR 142948 before PK20 administration did not reduce its impact on AHR. On the other hand, studies determining the accumulation of inflammatory cells in BALF have shown, that blocking of opioid receptors did not adversely affect the action of the PK20 hybrid, which may suggest that the activity of the tested compound is predominantly

caused by the stimulation of neurotensin receptors. Subsequent experiments, however, failed to provide an unequivocal answer. In a part of analyses, inhibition of both the opioid and neurotensin pathways resulted in a reduction of the anti-inflammatory effect of the chimera, as it was observed in IL-2, TNF- α or IL-17A levels. In other analyses, such as IL-13, CXCL1 and MDA, measured concentrations were comparable to those shown in the PK20 group, regardless of which receptors were blocked. Therefore, it seems that both structural components are important for the activity of the hybrid compound.

Based on the present study, it has been proved that the PK20 hybrid shows anti-inflammatory potential in a mouse model of nonallergic asthma. Additionally, the anti-inflammatory effect of the hybrid is comparable to dexamethasone activity. However, compared to dexamethasone, it is less effective in reducing airway hyperreactivity in response to methacholine nebulization. The hybrid compound has also stronger anti-inflammatory activity in comparison to an equimolar mixture of its two pharmacophores injected simultaneously. Activation of both opioid and neurotensin receptors seems to be necessary to induce the full anti-inflammatory effect of the tested chimera.

INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawione w niniejszej rozprawie badania przyczyniły się do dokładniejszego poznania czynników zaangażowanych w rozwój astmy niealergiczej w mysim modelu choroby. Należy nadmienić, że wiedza o tych czynnikach w modelach niealergiczych jest ograniczona, bowiem naukowcy pracują głównie na modelach astmy alergicznej wywoływanej owalbuminą. Patofizjologia samej astmy nieatopowej nie została jak dotąd w pełni wyjaśniona, a ze względu na trudności w opanowaniu objawów choroby, stanowi ona nadal poważny problem zdrowotny. Zastosowanie hybrydy PK20 o udowodnionym działaniu przeciwbólowym, która wykazuje dodatkowo działanie przeciwzapalne potwierdziło, iż związki hybrydowe mogłyby stanowić ważną alternatywę dla klasycznej terapii skojarzonej, obejmującej równoczesne stosowanie kilku różnych leków. W ramach niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, iż:

- hybrydyzacja farmakoforów endomorfiny 2 i neurotensyny prowadzi do powstania związku, który wykazuje korzystny wpływ na nadreaktywność oskrzeli i parametry świadczące o rozwoju stanu zapalnego w mysim modelu astmy nieatopowej,
- związek hybrydowy PK20 i mieszanina jego obu farmakoforów podanych jednocześnie cechują się różną siłą działania przeciwzapalnego, co wskazuje, iż aktywność związku hybrydowego nie jest prostą sumą aktywności poszczególnych części składowych,
- w działanie chimery PK20 zaangażowane są oba komponenty strukturalne: endomorficzny oraz neurotensynowy, i pobudzenie obu ścieżek receptorowych wydaje się być niezbędne do uzyskania pełnej aktywności przeciwzapalnej związku.

1. WSTĘP

1.1. Definicja astmy oskrzelowej

Astma oskrzelowa to choroba niejednorodna, cechująca się przewlekłym zapaleniem dróg oddechowych, diagnozowana na podstawie charakterystycznych objawów takich jak uczucie ucisku w klatce piersiowej, świszczący oddech lub też wydłużenie fazy wydechu, duszność i kaszel. Objawom tym mogącym zmieniać się w czasie i mieć różne nasilenie, towarzyszy zmienna obturacja dróg oddechowych [GINA, 2020]. Uważa się, iż istotną rolę w rozwoju astmy odgrywają predyspozycje genetyczne i czynniki środowiskowe, jednak dokładne mechanizmy komórkowe i molekularne choroby nie zostały dotąd w pełni wyjaśnione. Potwierdzono, że w przebiegu reakcji zapalnej, toczącej się w dolnych drogach oddechowych bierze udział szereg komórek m.in. eozynofile, limfocyty T, komórki tuczne, neutrofile, makrofagi, komórki nabłonka oraz wiele endogennych mediatorów zapalnych, takich jak histamina, leukotrieny cysteinyłowe czy cytokiny. Długotrwały proces zapalny prowadzi do przebudowy dróg oddechowych, tzw. remodelingu, który obejmuje przerost mięśni gładkich oskrzeli, depozycję kolagenu i włóknienie podnabłonkowe, a także przerost gruczołów śluzowych w błonie podśluzowej i zwiększoną produkcję śluzu. Równocześnie rozwija się nadreaktywność oskrzeli, nieproporcjonalna do intensywności działającego bodźca, objawiająca się nadmierną reakcją skurczową w odpowiedzi na czynniki fizyczne lub chemiczne [King, 1999; Mims, 2015].

Pomimo postępów w zrozumieniu patomechanizmów leżących u podstaw choroby i opracowywaniu coraz skuteczniejszych metod terapeutycznych szacuje się, że astma oskrzelowa dotyczy ponad 300 milionów ludzi na całym świecie, co sprawia, iż jest ona traktowana jako problem zdrowotny o charakterze globalnym [WHO, 2007]. Nakłady na leczenie chorych cierpiących na astmę oskrzelową są wysokie i rosną wraz ze wzrostem stopnia ciężkości choroby [Godard i wsp., 2002]. Ze względu na chroniczny charakter astmy wiąże się ona z obniżeniem jakości życia chorych, wywiera negatywny wpływ na ich sprawność fizyczną, stan emocjonalny i relacje społeczne [Schmier i wsp., 1998]. U większości astmatyków diagnozuje się jednocześnie alergiczny nieżyt nosa, a współwystępowanie obu tych schorzeń utrudnia prawidłową kontrolę astmy oskrzelowej [Bousquet i wsp., 2005]. W przypadku astmy o ciężkim przebiegu, astmy nieleczonej

lub nieprawidłowo leczonej może dojść do trwałych zmian w drogach oddechowych, zagrażających życiu zaostrzeń, a nawet śmierci. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia astma oskrzelowa jest przyczyną blisko 250 tys. zgonów rocznie. Dotyczy to przede wszystkim krajów, w których dostęp do niezbędnych leków jest ograniczony [WHO, 2007]. Trudności w skutecznym opanowaniu choroby potęguje fakt, iż astma jako choroba heterogenna, cechuje się wieloma różnymi postaciami.

1.2. Fenotypy astmy oskrzelowej

Mechanizmy patofizjologiczne, obserwacje kliniczne oraz metody leczenia astmy oskrzelowej zostały po raz pierwszy szczegółowo opisane w 1860 r. przez angielskiego lekarza Henry'ego Saltera w monografii „On Asthma: Its Pathology and Treatment” [Salter, 1860]. Autor zastosował w niej pojęcie „astmy wewnątrzpochodnej” (ang. *intrinsic asthma*), odnoszące się do pacjentów, u których objawy choroby wynikały z działania substancji drażniących drogi oddechowe. Właściwy podział na astmę wewnątrz- i zewnątrzpochodną (ang. *extrinsic asthma*) wprowadził w 1947 r. Francis Rackemann. Badacz dokonał obserwacji, iż u części pacjentów cierpiących na astmę oskrzelową możliwa jest identyfikacja zewnętrznych czynników wyzwalających symptomy choroby, u pozostałych zaś, bezpośrednia przyczyna pojawienia się objawów astmy pozostaje nieuchwytna (astma wewnątrzpochodna). Według Rackemann'a astma wewnątrzpochodna charakteryzowała się cięższym przebiegiem, pierwsze objawy pojawiały się w późniejszym okresie życia (tj. po 30. - 40. r.ż.) i częściej występowały u kobiet [Rackemann, 1947]. Obecnie rozróżnienie pomiędzy tymi dwiema postaciami astmy dokonuje się na podstawie wyniku alergicznych testów skórnych przy użyciu zestawu standaryzowanych wyciągów alergenowych [Pillai i wsp., 2011]. Wedle aktualnie przyjętej nomenklatury, terminy „astma zewnątrzpochodna” i „astma wewnątrzpochodna” nie powinny być dłużej stosowane i zaleca się zastępowanie je określeniami „astma alergiczna” i „astma niealergiczna” [Johansson i wsp., 2001]. Astma o podłożu alergicznym nazywana jest również astmą atopową, gdzie atopię definiuje się jako genetycznie uwarunkowaną skłonność do zwiększonej produkcji specyficznych immunoglobulin E (IgE) w odpowiedzi na ekspozycję na alergeny środowiskowe, przede wszystkim wziewne i pokarmowe [Vennera i Picado, 2014]. Astma nieatopowa (niealergiczna) cechuje się zatem negatywnym wynikiem punktowych testów skórnych, a także brakiem podwyższonego poziomu IgE w surowicy krwi, zarówno puli

całkowitej, jak i IgE specyficznych dla danego alergenów. Nie obserwuje się również predyspozycji rodzinnych do występowania astmy lub alergii [Menz i wsp., 1998]. Pomimo podobnych objawów klinicznych do astmy alergicznej, postać nieatopowa charakteryzuje się cięższym przebiegiem, co odzwierciedla się m.in. w obniżonych parametrach natężonej pojemności życiowej płuc (ang. *forced vital capacity*; FVC) i natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej (ang. *forced expiratory volume in one second*; FEV₁) oraz w szybkim skurczu oskrzeli w odpowiedzi na podanie metacholiny i dłuższym czasie powrotu do rozkurczu po teście metacholinowym. Konsekwencją pogorszenia funkcji płuc jest konieczność stosowania większych dawek glikokortykosteroidów wziewnych w celu kontroli choroby [Ownby i Joseph, 2007; Barnes, 2009]. Czynniki predysponującymi do wystąpienia astmy niealergicznej są nawracające infekcje wirusowe i bakteryjne dróg oddechowych. Zaostrzenie choroby może nastąpić pod wpływem zimnego powietrza, zanieczyszczeń drobnocząsteczkowych w powietrzu lub drażniących substancji wziewnych. W nieatopowej postaci choroby częściej diagnozuje się współwystępowanie polipów nosa oraz nadwrażliwości na kwas acetylosalicylowy [Menz i wsp., 1998; Ownby i Joseph, 2007]. Romanet-Manent i wsp. wykazali, że czynnikami zwiększającymi ryzyko rozwoju astmy nieatopowej są: przebycie zabiegu polipektomii, płeć żeńska, FEV₁ poniżej 80% wartości należącej i zaawansowany wiek, podczas gdy występowanie kataru siennego, sezonowych zaostrzeń astmy i dłuższy czas trwania astmy zwiększają ryzyko choroby o podłożu alergicznym [Romanet-Manent i wsp., 2002].

Oba warianty astmy oskrzelowej różnią się także pod względem rodzaju komórek zaangażowanych w reakcję zapalną w drogach oddechowych. Charakterystyczną cechą astmy atopowej jest dominująca aktywacja limfocytów Th2, co skutkuje zwiększoną produkcją IL-4, IL-5 czy IL-13. W przypadku astmy nieatopowej profil cytokin nie jest jednoznacznie ukierunkowany, obserwuje się bowiem wzrost wytwarzania zarówno IL-5, jak i IL-2, produkowanej przez limfocyty Th1 [Comi i wsp., 2007]. Źródłem IL-5 u atopowych astmatyków są przede wszystkim komórki T CD4+, natomiast w formie niealergicznej komórki T CD4+ i CD8+ [Shiota i wsp., 2002]. Analizując materiał biopsyjny pochodzący z oskrzeli chorych na astmę alergiczną zaobserwowano zwiększoną liczbę eozynofiliów, komórek tucznych (mastocytów) i limfocytów T. U pacjentów cierpiących na nieatopową postać choroby znamienne był wzrost liczby neutrofilów i komórek tucznych [Amin i wsp., 2000].

Podobne wyniki uzyskano podczas badań płwociny indukowanej pochodzącej od dzieci chorych na astmę oskrzelową. U 81% dzieci cierpiących na alergiczną postać choroby zaobserwowano eozynofilię, definiowaną jako zwiększenie liczby eozynofiliów powyżej wartości 3% wszystkich leukocytów w płwocinie. W grupie niealergicznym astmatyków znaczący odsetek granulocytów kwasochłonnych był widoczny jedynie u 24% chorych. Co więcej, w tej grupie procentowy udział i liczba bezwzględna neutrofilów w płwocinie była znacząco wyższa niż u chorych na astmę alergiczną i w grupie kontrolnej, którą stanowiły dzieci niechorujące na astmę i niewykazujące cech atopii [Drews i wsp., 2009]. Istotną rolę neutrofilów w patogenezie astmy oskrzelowej potwierdzają badania, które wskazują na ich zwiększoną liczbę we krwi obwodowej i płynie pęcherzykowo-oskrzelowym (ang. *bronchoalveolar lavage fluid*; BALF) u pacjentów z astmą o ciężkim przebiegu, astmą oporną na leczenie glikokortykosteroidami, w zaostrzeniach choroby i określonych formach astmy zawodowej [Cowburn i wsp., 2008].

Pomimo wielu odrębności pozwalających na klasyfikację astmy oskrzelowej, wśród części badaczy panuje przekonanie, iż astma atopowa i astma nieatopowa mają ze sobą więcej podobieństw niż różnic. Sprzeczne dane literaturowe dotyczą także kwestii częstości występowania astmy niealergicznym w populacji. Niektórzy autorzy wskazują na blisko 10% udział nieatopowych astmatyków wśród wszystkich chorujących [Barnes, 2009]. Inni, w oparciu o dostępne dane epidemiologiczne, szacują, że astma związana z atopią stanowi zazwyczaj mniej niż połowę przypadków, a samo znaczenie atopii w patogenezie astmy oskrzelowej może być przeceniane [Pearce i wsp., 1999]. W dużym wieloośrodkowym badaniu, obejmującym ponad 8 tys. dorosłych osób pomiędzy 18. a 60. r.ż. wykazano, że 1/3 wszystkich przypadków astmy miała charakter niealergicznym [Wüthrich i wsp., 1995]. Wątpliwości budzi również fakt, iż u części pacjentów chorujących na astmę nieatopową zaobserwowano wzrost całkowitego stężenia IgE w surowicy krwi. Wyniki te wspierają pogląd, że wysoki poziom IgE jest czynnikiem ryzyka rozwoju astmy oskrzelowej, niezależnie od jej postaci oraz zmieniają postrzeganie astmy niealergicznym, której do tej pory nie wiązano z przeciwciałami IgE [Humbert i wsp., 1999; Beeh i wsp., 2000]. Co więcej, istnieją doniesienia wskazujące na miejscową syntezę IgE w drogach oddechowych nieatopowych astmatyków, pomimo negatywnego wyniku alergicznych testów skórnych i braku obecności specyficznych IgE w surowicy krwi [Ying i wsp., 2001; Mouthuy i wsp., 2011]. Sugeruje

to lokalny proces zapalny mediowany przez IgE, który jest niemożliwy do wykrycia podczas badań ogólnoustrojowych. Możliwym wytłumaczeniem rozbieżności związanych z astmą niealergiczną jest hipoteza według której pacjenci określani jako nieatopowi, w rzeczywistości są uczuleni, ale na alergeny, które do tej pory nie zostały zidentyfikowane. Zakres potencjalnych czynników uczulających jest bowiem znacznie szerszy niż dostępne obecnie odczynniki diagnostyczne [Vennera i Picado, 2014]. Część badaczy podziela również pogląd, że w patogenezę astmy nieatopowej mogą być zaangażowane mechanizmy autoimmunologiczne. Wskazują na to eksperymenty, w których wykazano obecność autoprzeciwciał IgG skierowanych przeciwko komórkom nabłonka w oskrzelach u części pacjentów chorujących na astmę niealergiczną [Nahm i wsp., 2000]. Potwierdzenie poszczególnych hipotez wymaga jednak dalszych badań, a dokładne mechanizmy leżące u podstaw astmy nieatopowej nadal pozostają niewyjaśnione. Niezależnie jednak od stopnia w jakim różnią się od siebie oba fenotypy astmy oskrzelowej, faktem jest, że leczenie astmy nieatopowej sprawia wiele trudności i konieczne są prace prowadzące do poznania nowych związków, mogących mieć potencjalne zastosowanie w farmakoterapii tego schorzenia.

1.3. Farmakoterapia astmy oskrzelowej

W farmakoterapii astmy oskrzelowej należy wyróżnić dwie grupy leków: leki kontrolujące przebieg choroby i leki stosowane doraźnie. Leki kontrolujące przyjmowane są regularnie i długotrwale, co pozwala na kontrolę objawów astmy, przede wszystkim ze względu na ich działanie przeciwzapalne. Leki podawane doraźnie stosowane są w celu szybkiego zmniejszenia dolegliwości poprzez rozkurcz mięśni gładkich oskrzeli i w konsekwencji rozszerzenie światła oskrzeli. Preparaty o działaniu przeciwastmatycznym podawane są różnymi drogami: w postaci inhalacji, doustnie lub poprzez iniekcję. Najbardziej zalecaną formą jest podanie wziewne, ponieważ substancja czynna dostarczana jest bezpośrednio do dróg oddechowych, co zapewnia jej wysokie miejscowe stężenie i znacząco ogranicza ogólnoustrojowe działania niepożądane [GINA, 2012]. Szczegółowe informacje o lekach stosowanych w terapii astmy zostały zawarte w Appendix I.

1.3.1. Glikokortykosteroidy

Glikokortykosteroidy w postaci wziewnej (wGKS) stanowią obecnie najbardziej skuteczną grupę leków przeciwzapalnych, kontrolujących przebieg astmy oskrzelowej.

Jedynie w szczególnie ciężkich przypadkach można rozważyć ich podanie doustne lub dożylnie, mając na uwadze, że terapia taka powinna być prowadzona przez krótki czas, ponieważ ich długotrwałe stosowanie wiąże się z wysokim ryzykiem poważnych działań niepożądanych takich jak zahamowanie czynności kory nadnerczy, osteoporoza, zaćma, cukrzyca i nadciśnienie [GINA, 2020]. Mechanizm działania GKS jest wielokierunkowy, uważa się jednak, że najważniejszą rolę odgrywają mechanizmy genomowe. Polegają one na wiązaniu się leku ze specyficznym receptorem glikokortykosteroidowym (GR), umiejscowionym w cytoplazmie komórkowej. Przy nieobecności GKS receptor jest połączony z białkami szoku cieplnego: Hsp40, Hsp56, Hsp70 i Hsp90, natomiast na skutek przyłączenia GKS do receptora dochodzi do jego uwolnienia z połączeń białkowych, a powstały kompleks lek-receptor wnika do jądra komórkowego, gdzie w formie homodimeru wiąże się ze swoistym obszarem DNA leżącym w rejonie promotorowym i odpowiadającym na GKS (ang. *glucocorticoid response element*; GRE). Wynikiem tej interakcji jest zahamowanie lub pobudzenie transkrypcji genów wrażliwych na GKS, co w konsekwencji powoduje nasilenie lub zablokowanie syntezy określonych białek [Barnes i wsp., 1998; Stahn i wsp., 2007]. Mechanizmy niegenomowe odpowiadające za szybki efekt działania GKS nie zostały jeszcze dokładnie opisane, przypuszcza się jednak, że mogą obejmować nieswoiste fizykochemiczne oddziaływania leku z błoną komórkową oraz swoiste wiązanie z błonowym receptorem glikokortykosteroidowym (mGR). Być może pewną rolę w mechanizmie działania GKS odgrywają także białka uwolnione z kompleksu receptorowego po związaniu receptora z ligandem [Stahn i wsp., 2007]. Największe zagęszczenie receptorów GR w układzie oddechowym stwierdzono w komórkach nabłonka dróg oddechowych i komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych oskrzeli [Adcock i wsp., 1996].

Efektom oddziaływania GKS z receptorem GR jest obniżenie transkrypcji genów kodujących cytokiny prozapalne (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α), chemokiny (IL-8, RANTES), indukowalną syntazę tlenku azotu (iNOS), cyklooksygenazę-2 (COX-2), cytozoolową fosfolipazę A₂ (cPLA₂) oraz molekuly adhezyjne takie jak międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1 (ang. *intercellular adhesion molecule*; ICAM-1) czy naczyniowa cząsteczka adhezyjna 1 (ang. *vascular cell adhesion molecule*; VCAM-1). Na poziomie komórkowym GKS zmniejszają liczbę komórek odpowiedzi zapalnej m.in. eozynofiliów, limfocytów T, komórek tucznych i makrofagów. Ponadto GKS zwiększają ekspresję receptorów β_2 -adrenergicznych

w komórkach mięśni gładkich oskrzeli, co ma istotne znaczenie przy jednoczesnym stosowaniu związków β_2 -adrenomimetycznych [Barnes, 2010].

1.3.2. Leki β_2 -adrenomimetyczne

Receptory β_2 -adrenergiczne są szeroko rozpowszechnione w drogach oddechowych, przede wszystkim w komórkach mięśni gładkich oskrzeli, a także w znacznie mniejszej liczbie w komórkach nabłonka, śródbłonka naczyń oraz w pneumocytach typu II [Barnes i wsp., 2004]. Wśród leków z tej grupy wyróżnia się β_2 -adrenomimetyki krótko działające (ang. *short-acting beta₂-agonists*; SABA) oraz leki długo działające (ang. *long-acting beta₂-agonists*; LABA). Związki te łączą się z receptorem β_2 -adrenergicznym, co powoduje wzrost aktywności cykazy adenylowej, która przekształca adenozy-5'-trifosforan (ATP) w cykliczny adenozy-3',5'-monofosforan (cAMP). cAMP poprzez aktywację kinazy białkowej A pobudza fosforylację swoistych białek zaangażowanych w kontrolę napięcia mięśni. Działanie cAMP związane jest również z blokowaniem uwalniania jonów Ca^{2+} z miejsc ich magazynowania w komórce, ograniczeniem wnikania tych jonów ze środowiska zewnątrzkomórkowego do wnętrza komórki i sekwestracją jonów Ca^{2+} wewnątrzkomórkowych, co w konsekwencji wywołuje rozkurcz mięśni gładkich oskrzeli [Johnson, 2006].

1.3.3. Leki cholinolityczne

Acetylocholina (ACh) jest neuroprzekaźnikiem uwalnianym z zakończeń nerwów przywspółczulnego układu nerwowego, który reguluje napięcie i kurczliwość mięśni oraz sekrecję śluzu w drogach oddechowych poprzez wpływ na receptory muskarynowe. Udowodniono, że trzy spośród pięciu dotychczas opisanych typów receptorów muskarynowych występują w płucach i drzewie oskrzelowym. Receptory typu M_1 rozmieszczone są przede wszystkim w części obwodowej płuc, w ścianach pęcherzyków płucnych, podczas gdy receptory M_2 zlokalizowano w komórkach mięśni gładkich oskrzeli, fibroblastach i na zakończeniach neuronów cholinergicznym, gdzie pełnią funkcję autoreceptorów. Receptory muskarynowe typu M_3 znajdują się w przeważającej części w komórkach mięśni gładkich oskrzeli, odpowiadając za ich skurcz zależny od ACh, a także w gruczołach w obrębie błony podśluzowej, gdzie ich stymulacja nasila wydzielanie śluzu [Bonini i Scichilone, 2017]. Molekularny mechanizm pobudzenia receptorów M_1 i M_3 polega

na aktywacji fosfolipazy C, która katalizuje hydrolizę 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu do trifosforanu inozytolu (IP₃) i diacyloglicerolu (DAG). IP₃ uwalnia wewnątrzkomórkową pulę jonów Ca²⁺ oraz otwiera kanały wapniowe w błonie komórkowej, co w konsekwencji powoduje skurcz mięśni [Karakulakis i Roth, 2012]. Leki cholinolityczne, zarówno krótko jak i długo działające, podane w postaci wziewnej wykazują działanie antagonistyczne wobec receptorów muskarynowych i blokują działanie ACh, co pośrednio prowadzi do rozkurczu mięśni gładkich oskrzeli [Buhl i Hamelmann, 2019].

1.3.4. Leki przeciwleukotrienowe

Leukotrieny są aktywnymi biologicznie związkami, należącymi do grupy eikozanoidów, które powstają w szlaku przemian kwasu arachidonowego katalizowanym przez enzym lipooksygenazę. Pod wpływem fosfolipazy A₂ (PLA₂) dochodzi do hydrolizy wiązania estrowego glicerofosfolipidów obecnych w błonach komórkowych, w wyniku czego zostaje uwolniony kwas arachidonowy. Jest on następnie przekształcany przy udziale białka aktywującego FLAP i 5-lipooksygenazy do leukotrienu A₄ (LTA₄), z którego pod wpływem hydrolazy LTA₄ powstaje leukotrien B₄ (LTB₄), a pod wpływem syntazy LTC₄ leukotrien C₄. LTC₄ jest kolejno przekształcany przez γ -glutamylotranspeptydazę do leukotrienu D₄ (LTD₄) i w dalszej kolejności przy udziale dipeptydazy do leukotrienu E₄ (LTE₄) [Folco i Murphy, 2006].

Leukotrieny LTC₄, LTD₄ i LTE₄, określane jako leukotrieny cysteinylowe ze względu na obecność aminokwasu cysteiny w ich strukturze, aktywują dwa podtypy receptorów: receptor leukotrienowy typu 1 (CysLT₁) i typu 2 (CysLT₂). Większość niekorzystnych działań tej grupy związków wynika z pobudzenia receptorów CysLT₁, które są licznie rozmieszczone w komórkach biorących udział w reakcji zapalnej (m.in. monocytach, makrofagach, granulocytach czy komórkach tucznych), a także komórkach mięśni gładkich oskrzeli, fibroblastach oskrzelowych i komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych [Montuschi, 2010]. Efektem pobudzenia receptorów leukotrienowych jest silny skurcz oskrzeli, wzmożenie produkcji śluzu i nasilenie napływu komórek odpowiedzi zapalnej do dróg oddechowych. Mechanizm działania leków przeciwleukotrienowych wykorzystywanych w terapii astmy oskrzelowej jest dwójaki i polega na blokowaniu receptorów CysLT₁ (ang. *leukotriene receptor antagonists*; LTRA) bądź na hamowaniu aktywności enzymu 5-lipooksygenazy [Krawiec i Jarjour, 2002].

1.3.5. Metyloksantyny

Związkiem należącym do grupy metyloksantyn jest teofilina, stosowana w leczeniu od kilkadziesiąt lat. W stężeniu terapeutycznym od 10 do 20 µg/ml teofilina wykazuje działanie bronchodylatoryjne, wynikające z nieselektywnego zahamowania enzymów z grupy fosfodiesteraz (ang. *phosphodiesterase*; PDE), a dokładnie PDE typu III, IV i V, co prowadzi do wzrostu stężenia cAMP i cGMP (cyklicznego guanozyno-3',5'-monofosforanu) w komórkach, a w konsekwencji powoduje rozkurcz mięśni gładkich oskrzeli [Rabe i wsp., 1995]. Teofilina jest również silnym antagonistą receptorów adenozynowych A₁, A_{2a} i A_{2b} hamującym aktywność adenozyliny, która pośrednio poprzez zwiększenie uwalniania histaminy i leukotrienów z mastocytów dróg oddechowych wywołuje skurcz oskrzeli u astmatyków [Björck i wsp., 1992]. Znany jest także molekularny mechanizm przeciwzapalnego działania teofiliny, obserwowany przy małych stężeniach związku oraz niezależny od hamowania PDE i antagonizmu wobec receptorów adenozynowych. Polega on na zwiększaniu aktywności deacetylaz histonowych (ang. *histone deacetylase*; HDAC), których poziom zostaje obniżony w przebiegu astmy ciężkiej i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. HDAC na drodze deacetylacji rdzenia histonów, obniżają ekspresję genów dla mediatorów zapalnych, nasiloną przez prozapalne czynniki takie jak jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-κB [Barnes, 2003].

1.3.6. Przeciwciało monoklonalne anty-IgE

Omalizumab jest rekombinowanym humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym, skierowanym przeciwko ludzkiej immunoglobulinie IgE. Mechanizm działania związku polega na wybiórczym wiązaniu się z fragmentem Fc IgE. Omalizumab tworzy w ten sposób kompleksy z krążącymi przeciwciałami, obniża poziom wolnej puli IgE i uniemożliwia ich wiązanie z receptorami o wysokim powinowactwie (FcεRI), znajdującymi się na powierzchni komórek tucznych i bazofilów, co w konsekwencji hamuje uwolnienie mediatorów reakcji alergicznej. W efekcie zapobiega napływowi komórek (przede wszystkim eozynofików) do drzewa oskrzelowego, przebudowie tkanek i zmianom funkcjonalnym w drogach oddechowych. Stosowanie leku prowadzi także do obniżenia ekspresji receptorów dla IgE na powierzchni komórek odpowiedzi zapalnej [Holgate i wsp., 2009; Thomson i Chaudhuri, 2012].

1.3.7. Przeciwciała monoklonalne anty-IL5, anty-IL5R, anty-IL4R

Wśród nowych leków stosowanych w leczeniu astmy oskrzelowej wyróżnia się przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko IL-5 oraz przeciwciało przeciwko receptorowi IL-5, które łączy się z podjednostką α receptora prowadząc do apoptozy eozynofiliów. Stosowane jest także przeciwciało skierowane przeciwko receptorowi α IL-4, którego mechanizm działania polega na blokowaniu szlaku sygnałowego dla IL-4 i IL-13 [GINA, 2020].

1.4. Wytyczne leczenia astmy oskrzelowej

Aktualne wytyczne dotyczące leczenia astmy oskrzelowej zostały opracowane przez ekspertów ze Światowej Inicjatywy na Rzecz Zwalczenia Astmy, określanej akronimem GINA (ang. *Global Initiative for Asthma*) i obejmują pięć stopni leczenia choroby, zależnych od jej zaawansowania (Ryc. 1). Astma łagodna może być kontrolowana za pomocą leczenia stopnia 1 i 2, astma umiarkowana wymaga leczenia stopnia 3, natomiast leczenie stopnia 4 i 5 zarezerwowane jest dla chorych na astmę ciężką lub astmę nie poddającą się kontroli. Stopień ciężkości astmy oskrzelowej nie jest cechą stałą i może ulegać zmianie na przestrzeni miesięcy i lat. Jeśli zastosowana terapia pozwala na utrzymanie kontroli choroby przez okres dłuższy niż 3 miesiące, można rozważyć zmniejszenie intensywności leczenia, w celu ustalenia najmniejszej dawki leków, skutecznej u danego pacjenta [GINA, 2020].

	STOPIEŃ 1	STOPIEŃ 2	STOPIEŃ 3	STOPIEŃ 4	STOPIEŃ 5
PREFEROWANE LECZENIE KONTROLUJĄCE	mała dawka wGKS + formoterol w razie potrzeby	codzienna mała dawka wGKS lub mała dawka wGKS + formoterol w razie potrzeby	mała dawka wGKS + LABA	średnia dawka wGKS + LABA	duża dawka wGKS + LABA, ocena fenotypu astmy, dołączenie tiotropium lub przeciwciała anty-IgE, anty-IL5/IL5R, anty-IL4R
OPCJONALNE LECZENIE KONTROLUJĄCE	mała dawka wGKS przy każdym stosowaniu SABA	LTRA lub mała dawka wGKS przy każdym stosowaniu SABA	średnia dawka wGKS lub mała dawka wGKS + LTRA	duża dawka wGKS, dołączenie tiotropium lub LTRA	dołączenie małych dawek GKS doustnych
PREFEROWANE LECZENIE DORAŻNE	mała dawka wGKS + formoterol w razie potrzeby		mała dawka wGKS + formoterol w razie potrzeby*		
OPCJONALNE LECZENIE DORAŻNE	SABA w razie potrzeby				

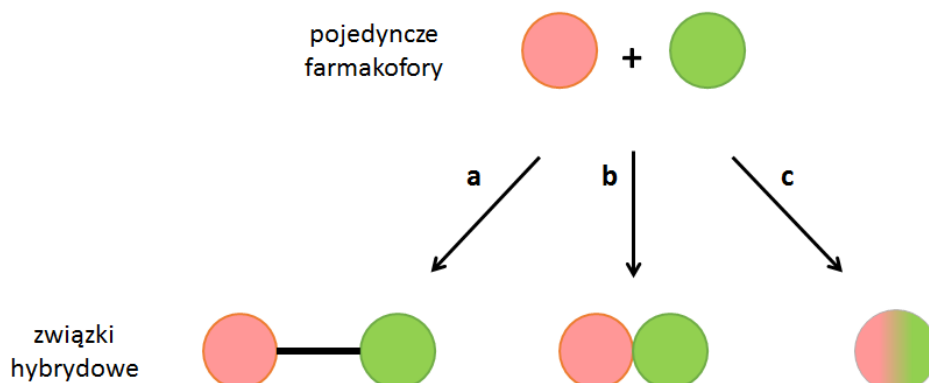
Ryc. 1. Stopnie intensywności leczenia astmy oskrzelowej u dorosłych i dzieci powyżej 12 r.ż. [na podstawie wytycznych GINA, 2020]. *mała dawka wGKS i formoterolu jest leczeniem doraźnym dla pacjentów przyjmujących budezonid-formoterol lub beklometazon-formoterol jako leczenie regularnie i doraźnie.

Niestety, pomimo ciągłego postępu we wdrażaniu nowych metod terapeutycznych, astma oskrzelowa nadal pozostaje dużym wyzwaniem dla współczesnej nauki i medycyny. Liczba chorych stale rośnie, u części z nich zastosowanie leczenia o maksymalnej intensywności nie pozwala na kontrolę objawów choroby. Szczególnie trudności przysparza leczenie astmy nieatopowej, której złożony patomechanizm nie został dotąd w pełni wyjaśniony, a dostępne leki m.in. wGKS nie przynoszą oczekiwanych rezultatów. Istotny problem stanowią także działania niepożądane leków przeciwastmatycznych, jak również niekorzystne interakcje w jakie wchodzi z innymi, jednocześnie przyjmowanymi preparatami. Konieczne zatem wydaje się poszukiwanie nowych szlaków sygnałowych, mogących odgrywać znaczącą rolę w rozwoju astmy oskrzelowej, a w dalszym etapie opracowywanie nowych związków mających korzystny wpływ na składowe reakcji zapalnej w drogach oddechowych.

1.5. Związki hybrydowe o aktywności przeciwzapalnej

Jednym ze skutecznych rozwiązań problemu niekorzystnych interakcji lekowych oraz działań niepożądanych mogą być związki hybrydowe, nazywane również chimerami, związkami bi- lub wielofunkcyjnymi, które zawierają w swojej strukturze co najmniej dwie, różniące się od siebie, aktywne biologicznie substancje. Technika hybrydyzacji jako strategia projektowania leków pozwala na osiągnięcie większej aktywności i selektywności związku przy ograniczeniu niekorzystnych skutków jego stosowania [Bérubé, 2016]. Hybryda jako nowa cząsteczka charakteryzuje się specyficznym profilem farmakokinetycznym i w zależności od elementów składowych może w jednym czasie pobudzać lub hamować różne ścieżki receptorowe. Chimery, w porównaniu z podawaniem pojedynczych związków, cechują się także większym powinowactwem do konkretnych receptorów w organizmie. Na etapie ich projektowania możliwe jest wprowadzenie modyfikacji, które pozwolą na poprawę stabilności enzymatycznej oraz wpłyną korzystnie na inne istotne parametry takie jak biodostępność związku czy zdolność do przekraczania selektywnej bariery krew-mózg [Kleczkowska i wsp., 2013]. Zaletami stosowania chimer jest niewątpliwie możliwość ograniczenia działań niepożądanych, wynikająca z faktu, iż wprowadzenie określonej części składowej do hybrydy, może równoważyć niekorzystne efekty pochodzące od innego składnika, a w przypadku zahamowania rozwoju tolerancji, zniweluje konieczność zwiększania dawki leku [Diētis i wsp., 2009; Largent-Milnes i wsp., 2010].

Elementami strukturalnymi związków hybrydowych są farmakofory, które według precyzyjnej definicji IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) stanowią zbiór cech sterycznych i elektronowych związku, niezbędnych do jego oddziaływania ze specyficznym receptorem i koniecznych do wyzwolenia lub zahamowania odpowiedzi biologicznej [Wermuth i wsp., 1998]. Zgodnie z koncepcją przyjętą przez Morphy'ego i Rankovic'a związki hybrydowe można podzielić ze względu na ich konstrukcję (Ryc. 2). Wyróżnia się zatem chimery, w których dwa farmakofory są ze sobą połączone za pomocą łącznika bądź przylegają do siebie bez żadnych dodatkowych elementów. Elementy strukturalne mogą również częściowo na siebie nachodzić, tworząc część wspólną [Morphy i Rankovic, 2006].



Ryc. 2. Typy połączeń farmakoforów w związkach hybrydowych; (a) połączone za pomocą łącznika tzw. linkera, (b) bez dodatkowych elementów, (c) posiadające wspólną część [na podstawie pracy Morphy i Rankovic, 2006].

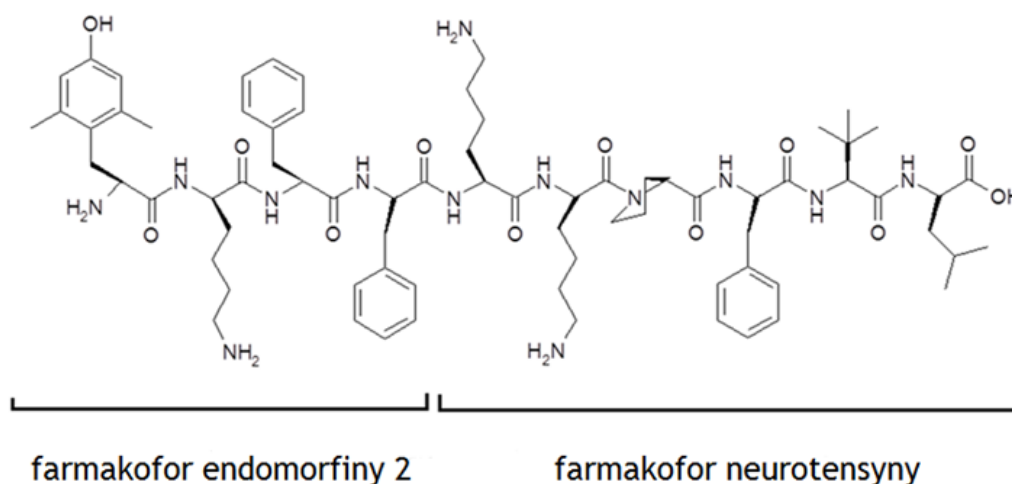
Potencjał terapeutyczny hybryd analizowano w modelach eksperymentalnych wielu schorzeń, m.in. w chorobach nowotworowych [Guerrant i wsp., 2012; Ling i wsp., 2015], neurodegeneracyjnych [Korth i wsp., 2013; Morrioni i wsp., 2019; Duarte i wsp., 2019] czy w farmakoterapii bólu [Kleczkowska i wsp., 2010; Guillemyn i wsp., 2016; Micheli i wsp., 2019]. W ostatnich latach prowadzono także badania nad chimerami o działaniu przeciwzapalnym, z których wiele zawiera w swojej strukturze leki z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). W jednej z prac badano skuteczność połączenia terpenów z ibuprofenem lub naproksenem w modelach obrzęku uszu u myszy, wywołanych podaniem kwasu arachidonowego lub pochodnej forbolu. Część zsyntetyzowanych hybryd wykazywała silniejsze miejscowe działanie przeciwzapalne i mniejszą toksyczność niż wyjściowe związki

terpenowe [Theoduloz i wsp., 2015]. W kolejnych badaniach udowodniono silne działanie przeciwbólowe w odniesieniu do bodźca termicznego i chemicznego oraz działanie przeciwzapalne dla chimery złożonej z tomoksirolu i naproksenu [Hosseinzadeh i wsp., 2017], a także działanie przeciwzapalne i przeciwartretyczne połączeń estrów kwasów bosweliowych i związków z grupy NLPZ [Shenvi i wsp., 2015]. Działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne wykazano dla chimer składających się z resweratrolu i salicylanów [Aldawsari i wsp., 2016], podobnie jak dla hybryd złożonych z nitroksydów i NLPZ, zarówno w przypadku zastosowania konstrukcji z łącznikiem rozszczepialnym (wiązanie estrowe bądź amidowe), nierozszczepialnym, jak i przy scaleniu obu elementów strukturalnych związku [Thomas i wsp., 2018]. Znane są również chimery, których składowe stanowią leki z grupy NLPZ i antybiotyki makrolidowe oraz połączenia makrolidów z glikokortykosteroidami. Związki te wykazują wysoką aktywność przeciwzapalną w zwierzęcych modelach zapalenia jelit, reumatoidalnego zapalenia stawów i eozynofilii płucnej, cechując się zwiększonym bezpieczeństwem stosowania w odniesieniu do macierzystych GKS [Paljetak i wsp., 2017]. Przykładem hybrydy jest także połączenie budezonidu i cząsteczki będącej donorem tlenu azotu NO. Zsyntetyzowany związek powoduje, porównywaną do budezonidu, poprawę parametrów oddechowych u pacjentów astmatycznych, wykazując przy tym korzystniejszy profil farmakokinetyczny i dodatkowo zmniejszając liczbę neutrofilów w płwocinie chorych [Boulet i wsp., 2009]. Związkiem o potencjalnie korzystnym wpływie na przebieg reakcji zapalnej w dolnych drogach oddechowych wydaje się być także hybryda PK20, która stanowi temat niniejszej rozprawy.

1.6. Hybrydyzacja farmakoforów endomorfiny 2 i neurotensyny - chimera PK20

Hybryda PK20 jest związkiem, który łączy w swojej strukturze farmakofory dwóch, fizjologicznie występujących neuropeptydów: endomorfiny 2 i neurotensyny (Ryc. 3). Zwiększenie stabilności enzymatycznej i powinowactwa receptorowego chimery uzyskano poprzez wprowadzenie do jej szkieletu dodatkowych aminokwasów. Zmiany w łańcuchu peptydowym w C-końcowym odcinku, którego podstawę stanowił aktywny fragment neurotensyny, objęły zastąpienie przez lizynę (Lys) pierwotnie występujących reszt argininowych Arg⁸ i Arg⁹, a także zamianę znajdującej się w pozycji dwunastej izoleucyny Ile¹² na tert-leucynę (Tle). W przypadku N-końcowej części chimery odpowiadającej endomorfinie 2, tyrozyna w pozycji pierwszej Tyr¹ została zastąpiona przez

2,6-dimetylotyrozynę (Dmt), z kolei prolina w pozycji drugiej Pro² przez D-lizynę (D-Lys) [Kleczkowska i wsp., 2010].



PK20: H-Dmt-D-Lys-Phe-Phe-Lys-Lys-Pro-Phe-Thr-Leu-OH

Ryc. 3. Wzór strukturalny hybrydy PK20 [Kleczkowska i wsp., 2010; za zgodą autora]. Rozwinięcie trójliterowych skrótów nazw aminokwasów zawarte jest w Appendix II.

Aktywność hybrydy PK20 była dotychczas analizowana w kilku modelach eksperymentalnych. Hybryda charakteryzuje się silnym działaniem przeciwbólowym, zarówno po podaniu ośrodkowym, jak i obwodowym. Ponadto zastosowanie antagonisty receptorów opioidowych naltreksonu, prowadzi jedynie do częściowego zmniejszenia potencjału analgetycznego chimery, co wskazuje na udział części neurotensynowej w wyzwalaniu działania przeciwbólowego [Kleczkowska i wsp., 2010]. Badania *in vitro* w modelu ekscytotoksycznego uszkodzenia hipokampa pod wpływem NMDA (kwasu N-metylo-D-asparaginowego) wykazały z kolei działanie neuroprotekcjne związku, w które zaangażowane były oba elementy strukturalne chimery [Kleczkowska i wsp., 2015]. Co więcej, wstępne badania wskazują, iż hybryda PK20 podana miejscowo ogranicza reakcję zapalną wywołaną dinitrofluorobenzenem w eksperymentalnym mysim modelu nadwrażliwości kontaktowej [Kaczyńska i wsp., 2016].

Obok skuteczności każdego nowego związku, także hybrydowego, istotną kwestię stanowią działania niepożądane jakie może on powodować. Analizowano zatem wpływ zastosowania hybrydy PK20 na parametry krążeniowo-oddechowe u zwierząt

laboratoryjnych. Podanie hybrydy w bolusie drogą dożylną u szczurów w stanie anestezji spowodowało krótkie bezdechy i zmiany w ciśnieniu krwi o charakterze dwufazowym, które obejmowały przejściowy wzrost ciśnienia, a następnie hipotensję. Co ważne, podanie dootrzewnowe hybrydy PK20 u zwierząt nieuśpionych nie wywoływało żadnych istotnych zmian w oddychaniu i ciśnieniu krwi [Kaczyńska i wsp., 2017].

Właściwości hybrydy PK20 obejmujące bezpieczeństwo i skuteczność działania, zarówno w kontekście jej aktywności przeciwbólowej, jak i przeciwzapalnej, wynikają z obecności w strukturze dwóch różnych farmakoforów: endomorfiny 2 i neurotensyny. W badaniach nad zdolnością chimery do wiązania się z receptorami opioidowymi wykazano, iż charakteryzuje się ona znacznie większym powinowactwem do receptora μ ($K_i = 1,36$ nM) aniżeli receptora δ ($K_i = 124,8$ nM) [Kleczkowska i wsp., 2013a]. Ponadto analizy aktywności względem poszczególnych receptorów wskazują, iż jest ona pełnym agonistą zarówno wobec receptora opioidowego μ ($E_{max} = 149,1 \pm 2,9\%$; $EC_{50} = 70,09 \pm 0,08$), jak i receptora neurotensynowego NTR1 ($E_{max} = 141,3 \pm 3,8\%$; $EC_{50} = 66,6 \pm 0,24$) [Kleczkowska i wsp., 2015].

1.7. Endomorfina 2 - wyjściowy peptyd dla farmakoforu składowego hybrydy PK20

Wśród receptorów opioidowych wyróżnia się trzy typy: μ (mi), δ (delta) i κ (kappa), które zgodnie z przyjętą nomenklaturą oznaczane są także jako receptory MOP, DOP i KOP [Cox i wsp., 2015]. Ich endogenne ligandy stanowią peptydy opioidowe wywodzące się z trzech białek prekursorowych: proopiomelanokortyny, prodynorfiny i proenkefaliny. Blisko spokrewniony z receptorami opioidowymi jest również receptor nocyceptynowy/orfaninowy FQ (NOP), który pomimo niewielkiego powinowactwa do klasycznych peptydów opioidowych i niewrażliwości na antagonistyczne działanie naltreksonu, cechuje się bardzo podobną strukturą i funkcją do receptorów μ , δ i κ [Cox i wsp., 2015].

W 1997 r. Zadina i wsp. odkryli i wyizolowali z mózgu bydłowego dwa nowe endogenne ligandy opioidowe - endomorfiny, które cechują się wysokim powinowactwem i selektywnością wobec receptora μ . Endomorfina 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂; EM 1) i endomorfina 2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂; EM 2) są tetrapeptydami, różniącymi się między sobą zaledwie jednym aminokwasem [Zadina i wsp., 1997]. Co istotne, dotychczas nie udało się zidentyfikować prohormonu, z którego powstają, jednak różnice w dystrybucji endomorfina w organizmie nie wykluczają istnienia dwóch różnych prekursorów lub dwóch odrębnych

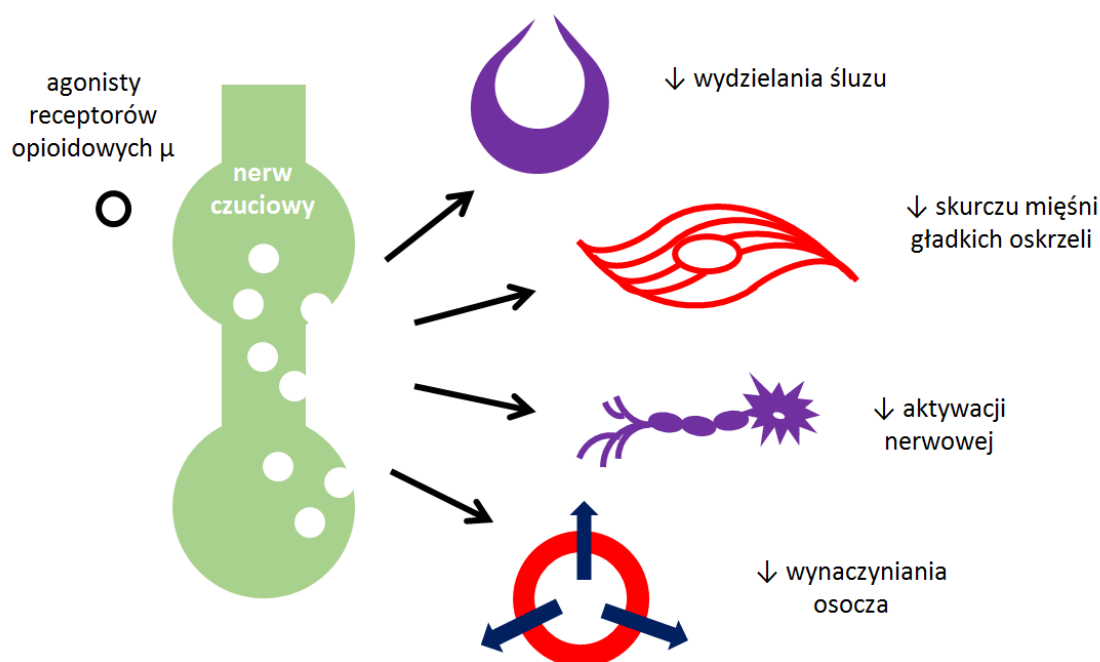
ścieżek przemian tego samego prekursora [Fichna i wsp., 2007]. Receptor μ , który pobudza endomorfiny, należy do grupy receptorów sprzężonych z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors*; GPCRs) typu G_i/G_o i jest zbudowany z siedmiu domen przezbłonowych, trzech pętli zewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowego N-końca oraz trzech pętli wewnątrzkomórkowych i C-końcowego fragmentu skierowanego do wnętrza komórki [Minami i Satoh, 1995]. Pobudzenie receptora poprzez związanie agonisty prowadzi do zmian na poziomie molekularnym obejmujących zamykanie zależnych od potencjału kanałów wapniowych Ca^{2+} , aktywację kanałów potasowych K^+ i obniżenie poziomu cAMP, co skutkuje zahamowaniem aktywności komórki i odpowiada za działanie analgetyczne opioidów [Horvath, 2000]. Istnieją jednak dowody, iż peptydy opioidowe mogą powodować także efekty pobudzające, które obejmują wówczas stymulację syntezy cAMP, aktywację fosfolipazy C oraz wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} i być może odgrywają istotną rolę w rozwoju tolerancji na leki opioidowe [Harrison i wsp., 1998].

Endomorfiny, obok silnego działania przeciwbólowego [Zadina i wsp., 1997], charakteryzują się także działaniem przeciwzapalnym, zarówno w modelu ostrego, jak i przewlekłego zapalenia [Jessop, 2006]. Badania potwierdziły, iż receptory opioidowe obecne są na wielu komórkach biorących udział w reakcjach immunologicznych organizmu m.in. limfocytach, makrofagach, monocytach i granulocytach [Sharp, 2006], a endogenne opioidy wpływają na proces proliferacji komórek, zjawisko chemotaksji, produkcję cytokin czy wolnych rodników tlenowych [Vacarino i Kastin, 2001]. Azuma i wsp. [2000; 2002] wykazali, iż preinkubacja z endomorfina 1 i endomorfina 2 w znaczący sposób hamuje produkcję anionów nadtlenkowych z neutrofilów aktywowanych estrem forbolu, endomorfina 2 zaś moduluje produkcję $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-10$ i $IL-12$ oraz zmienia funkcje makrofagów związane z odpornością wrodzoną. Kolejne badania wskazują na zwiększoną ekspresję endomorfina w tkankach obwodowych w szczurzym modelu zapalenia stawów [Jessop i wsp., 2002], jak również w tkance pacjentów cierpiących na chorobę zwyrodnieniową stawów i reumatoidalne zapalenie stawów. Co więcej, wykazano, iż endomorfiny hamują sekrecję cytokin prozapalnych ($IL-6$, $IL-8$) w tkance chorych objętej stanem zapalnym [Straub i wsp., 2008]. Wpływ pobudzenia receptorów opioidowych analizowany był również w zwierzęcych modelach zapalenia jelit. W modelu wywołanym podaniem kwasu 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowego, agonisty receptora μ znacząco

zredukowały stan zapalny jelit, a ich protekcyjne znaczenie potwierdza fakt, iż u myszy z niedoborem receptorów μ ($MOR^{-/-}$) doszło do niemal trzykrotnego wzrostu śmiertelności w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi [Philippe i wsp., 2003]. Badania te są zgodne z wynikami kolejnych eksperymentów w których potwierdzono, że aktywacja receptorów μ łagodzi w fazie ostrej (choć nie w fazie przewlekłej) zapalenie jelit indukowane podaniem siarczanu dekstranu sodu (ang. *dextran sodium sulfate*; DSS) poprzez redukcję poziomu cytokin prozapalnych m.in. na drodze supresji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [Anselmi i wsp., 2015]. Inne prace wskazują na korzystny efekt endogennych peptydów na proces gojenia się ran, zaobserwowano bowiem, że wspomagają one odbudowę uszkodzonego nabłonka i regenerację tkanki [Bigliardi i wsp., 2002]. Ponadto udowodniono przeciwwysiękowe działanie agonistów receptorów μ i delta, które ograniczają wynaczynianie osocza w wywołanym karagenem modelu ostrego zapalenia łapy u szczura [Romero i wsp., 2005].

Obecność receptorów opioidowych wykazano również w układzie oddechowym, uwzględniając tchawicę, oskrzela główne, płuca i tętnice płucne [Bhargava i wsp., 1997], a także obwodowe neurony unerwiające drogi oddechowe. Neuropeptydy uwalniane z zakończeń nerwów czuciowych, takie jak neurokinina A, substancja P (SP), czy peptyd związany z genem kalcytoniny (ang. *calcitonin gene-related peptide*; CGRP), prowadzą do szeregu zjawisk określanych wspólnie mianem zapalenia neurogennego, które może przyczyniać się do nasilenia odpowiedzi zapalnej w przebiegu astmy oskrzelowej [Barnes, 1992]. Badania wskazują, iż pobudzenie receptorów μ w drogach oddechowych (Ryc. 4) prowadzi do zahamowania aktywacji nerwów i redukcji skurczu mięśni gładkich oskrzeli zależnego od przekąźnictwa tachykinergicznego i cholinergicznego [Belvisi i wsp., 1990; Belvisi i wsp., 1992; Fischer i Udem, 1999], a także do zmniejszania wydzielania śluzu z komórek kubkowych nabłonka dróg oddechowych [Kuo i wsp., 1992] i ograniczenia wynaczyniania osocza poprzez zablokowanie presynaptycznego uwalniania neuropeptydów [Belvisi i wsp., 1989]. Wyniki te potwierdzają eksperymenty Börzsei'a i wsp. [2008], którzy wykazali, iż endomorfina 1 będąca selektywnym agonistą receptorów opioidowych μ , w sposób dawkozależny hamuje wywołane stymulacją polem elektrycznym uwalnianie prozapalnych neuropeptydów SP i CGRP z izolowanej tchawicy szczura, co może skutecznie

ograniczać proces zapalenia neurogennego, mający istotne znaczenie w rozwoju chorób zapalnych dróg oddechowych.



Ryc. 4. Wpływ pobudzenia receptorów opioidowych μ na funkcjonowanie dróg oddechowych [na podstawie pracy Groneberg i Fischer, 2001].

1.8. Neurotensyna - peptyd macierzysty dla farmakoforu stanowiącego element strukturalny hybrydy PK20

Neurotensyna (NT) jest oligopeptydem o działaniu hipotensyjnym, który został po raz pierwszy odkryty i wyizolowany z podwzgórza bydlęcego przez Carraway'a i Leeman'a w 1973 r. [Carraway i Leeman, 1973]. Ten złożony z trzynastu aminokwasów związek (pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH) [Carraway i Leeman, 1975], podobnie jak wiele innych neuropeptydów, działa jako neuroprzebieznik lub neuromodulator w obrębie mózgu i jako hormon w obwodowych tkankach organizmu [Vincent, 1995]. Jedne z pierwszych badań nad neurotensyną wykazały, iż powoduje ona obniżenie temperatury ciała [Bissette i wsp., 1976] oraz hamuje odpowiedź na bodźce bólowe u zwierząt doświadczalnych [Clineschmidt i McGuffin, 1977]. Kolejne eksperymenty udowodniły wpływ neurotensyny na funkcjonowanie przewodu pokarmowego [Kitabgi,

1982] oraz regulację wydzielania hormonów przedniego płata przysadki mózgowej [McCann i Vijayan, 1992].

Neurotensyna wywodzi się z większego prekursora (pro-NT/NN), który zawiera również zbliżony do niej budową heksapeptyd - neuromedynę N. Oba związki są zlokalizowane w C-końcowej domenie wspólnego prekursora i oddzielone od siebie trzema sekwencjami aminokwasowymi Lys-Arg [Kitabgi, 2010]. Przypuszcza się, iż za aktywność neurotensyny odpowiada jej końcowy odcinek obejmujący aminokwasy w pozycji 8-13, co może być zaskakujące, biorąc pod uwagę fakt, iż fragment ten nie jest produktem degradacji NT w warunkach *in vivo* [Tyler-McMahon i wsp., 2000]. Udowodniono jednak, że jest on rozpoznawany przez wszystkie dotychczas poznane receptory neurotensynowe [Vincent i wsp., 1999]. Receptor o wysokim powinowactwie do NT (NTR1) został po raz pierwszy sklonowany u szczura i jak się wkrótce okazało, charakteryzuje się 84% homologią z receptorem ludzkim. NTR1, który odpowiada za większość efektów obserwowanych po podaniu neurotensyny, należy do grupy receptorów sprzężonych z białkiem G zawierających siedem domen przezbłonowych [Tanaka i wsp., 1990; Vita i wsp., 1993]. Pobudzenie receptora NTR1 prowadzi do szeregu zjawisk takich jak wzrost stężenia cAMP, cGMP i IP₃ oraz aktywacji kinazy proteinowej C i napływu jonów wapnia Ca²⁺ do wnętrza komórki [Boules i wsp., 2013]. Do rodziny GPCRs należy także receptor o niskim powinowactwie do NT (NTR2), który prezentuje 64% zgodności sekwencji aminokwasowej z receptorem NTR1. W przeciwieństwie do NTR1, NTR2 charakteryzuje się zdolnością wiązania lewokabastyny, antagonisty receptora histaminowego H1, co pozwala na eksperymentalne rozróżnienie pomiędzy tymi dwoma receptorami [Chalon i wsp., 1996]. Rola NTR2 w szlaku sygnałowym NT pozostaje jednak dyskusyjna, bowiem różne badania wskazują, iż NT może działać jako agonista, odwrotny agonista lub antagonistą tego receptora [Kleczkowska i Lipkowski, 2013b]. Trzeci znany receptor neurotensyny (NTR3) ma budowę odmienną niż dwa poprzednie, nie jest związany z białkiem G i stanowi receptor wewnątrzkomórkowy z pojedynczą domeną przezbłonową. Co więcej, NTR3 jest identyczny z wcześniej sklonowanym białkiem gp95/sortiliną i z tego powodu jest często określany jako NTR3/sortilina [Mazella i wsp., 1998]. Pewne podobieństwa stwierdza się również pomiędzy NTR3 i ostatnim zidentyfikowanym receptorem NT, znanym jako NTR4 lub SorLA/LR11. NTR4 to mozaikowe białko, które podobnie jak NTR3, jest syntetyzowane jako proreceptor,

a następnie ulega modyfikacjom w aparacie Golgiego [Jacobsen i wsp., 2001], jednakże jego rola w działaniu neurotensyny nie została jak dotąd wyjaśniona.

Faktem jest, iż neurotensyna może oddziaływać na komórki układu odpornościowego takie jak limfocyty, makrofagi czy komórki tuczne, pełniąc w ten sposób funkcję immunomodulatorową [Katsanos i wsp., 2008]. Wątpliwości budzi jednak jej rzeczywista rola w przebiegu reakcji zapalnej, dostępne dane literaturowe nie są bowiem jednoznaczne. Piliponsky i wsp. [2008] wykazali wzrost stężenia NT w jamie otrzewnej i osoczu krwi w mysim modelu sepsy. Co więcej, podanie antagonisty receptora NTR1 lub zastosowanie myszy pozbawionych genu dla NT ($Nt^{-/-}$) znacznie zredukowało śmiertelność w badanym modelu. Przeciwnie wyniki uzyskano w prospektywnym badaniu analizującym molekularne aspekty sepsy, gdzie zaobserwowano spadek poziomu niektórych neuropeptydów, w tym także NT, w przebiegu wstrząsu septycznego. Efekt ten był interpretowany jako mechanizm protekcyjny, zapobiegający dalszemu szerzeniu się stanu zapalnego w organizmie [da Silva i wsp., 2014]. Szereg badań poświęcono również ocenie wpływu neurotensyny na proces zapalny w jelitach. W jednej z prac zaobserwowano wzrost ekspresji NT i receptora NTR1 w błonie śluzowej okrężnicy u szczurów, którym podano toksynę A wydzielaną przez laseczkę *Clostridium difficile*, wywołującą u ludzi rzekomobłoniste zapalenie jelit. Zastosowanie antagonisty receptora neurotensynowego SR 48692 zahamowało zmiany w przepuszczalności błony śluzowej i uszkodzenie tkanek [Castagliuolo i wsp., 1999]. Kolejne badania przyniosły jednak odmienne rezultaty i wskazują na dwojaką rolę, a nawet korzystne działanie NT w przebiegu odpowiedzi zapalnej w jelitach.

Udowodniono, iż NT może nasilać stan zapalny o charakterze ostrym, działając wówczas jako neuropeptyd prozapalny, jednak w przebiegu zapalenia przewlekłego sprzyja regeneracji błony śluzowej jelit [Zhao i Pothoulakis, 2006; Margolis i Gershon, 2009]. Protekcyjne działanie NT wykazano w modelu zapalenia wywołanym podaniem DSS, gdzie korzystny wpływ na proces gojenia się ran był prawdopodobnie związany z migracją komórek nabłonka spowodowaną przez zwiększone uwalnianie COX-2 i prostaglandyny E_2 (PGE_2). Ponadto dootrzewnowe podanie antagonisty SR 48642 nasiliło proces zapalny i owrzodzenie błony śluzowej [Brun i wsp., 2005]. Wyniki te są spójne z kolejnymi doświadczeniami, w których analizowano efekt zastosowania NT i bombezyny w zapaleniu jelit indukowanym kwasem trinitrobenzenosulfonowym. Oba neuropeptydy wykazały działanie przeciwzapalne,

obniżając poziom IL-6 i TNF- α w osoczu krwi, redukując stężenie mieloperoksydazy (MPO) i aldehydu dimalonowego (MDA) w homogenatach tkanki okrężnicy oraz pobudzając regenerację błony śluzowej jelit [Akcan i wsp., 2008]. Właściwości NT potwierdziły również badania, w których myszom z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą podawano matryce kolagenowe zawierające NT. Ich zastosowanie przyspieszyło proces gojenia się ran, obniżyło ekspresję prozapalnych cytokin TNF- α i IL-1 β , a także ograniczyło napływ komórek odpowiedzi zapalnej w miejsce zranienia [Moura i wsp., 2014]. W kolejnych eksperymentach wykazano także, iż NT ogranicza prozapalną aktywność fibroblastów i komórek dendrytycznych skóry oraz zwiększa ekspresję naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor*; EGF), który odgrywa istotną rolę w procesie gojenia się ran i proliferacji komórek [da Silva i wsp., 2011; Pereira da Silva i wsp., 2014].

Obecność neurotensyny i jej receptorów została wykazana w płucach i błonie śluzowej dróg oddechowych [Robbins i wsp., 1995], a także na presynaptycznych cholinergicznym zakończeniach nerwowych i mięśniach gładkich oskrzeli [Aas i Helle, 1982], co może wskazywać na potencjalne miejsca jej działania. Najnowsze doniesienia wskazują, iż neurotensyna zmniejsza nadreaktywność oskrzeli wywołaną podaniem związków o małej masie cząsteczkowej w mysim modelu astmy niealergiczej poprzez aktywację receptora NTR1 [Russjan i Kaczyńska, 2019].

Mając na uwadze rozmieszczenie receptorów neurotensynowych i opioidowych w drogach oddechowych, a także ich obecność na komórkach biorących udział w odpowiedzi zapalnej, zasadnym wydaje się ocena wpływu hybrydy PK20 na proces zapalny w eksperymentalnym modelu astmy oskrzelowej. W tym celu posłużono się mysim modelem astmy nieatopowej, w którym reakcja zapalna w drogach oddechowych została wywołana dotchawiczym podaniem haptenu u uczulonych uprzednio zwierząt.

1.9. Mysie modele astmy oskrzelowej

Zwierzęce modele chorób stanowią istotne narzędzie pozwalające na pełniejsze zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw wielu schorzeń, a także na poszukiwanie nowych związków leczniczych, mogących mieć zastosowanie w ich terapii. Do najczęściej wybieranych zwierząt doświadczalnych w badaniach przedklinicznych nad astmą należą myszy. Jest to uzasadnione istnieniem wielu kompleksowo opisanych szczepów wsobnych

myszy, a także możliwością otrzymywania zwierząt transgenicznych, u których modyfikacje genetyczne pozwalają na określenie roli konkretnych czynników w patofizjologii choroby [Lloyd, 2007]. Poza tym dostępnych jest szereg odczynników immunologicznych takich jak przeciwciała skierowane przeciwko konkretnym cytokinom, czynnikom wzrostu czy markerom powierzchniowym komórek, co umożliwia zbadanie szczegółowych mechanizmów reakcji zapalnych w drogach oddechowych. Ponadto okres ciąży u myszy jest krótki, hodowla stosunkowo łatwa i relatywnie niedroga [Shin i wsp., 2009]. Wśród wad wykorzystywania myszy jako zwierząt doświadczalnych, poza oczywistymi różnicami w budowie anatomicznej układu oddechowego u ludzi i myszy, wymienia się przede wszystkim brak odpowiedzi na histaminę, która silnie kurczy oskrzela człowieka. Trudności przysparza także opracowanie modelu przewlekłego choroby, który w dokładniejszy sposób naśladowałby zmiany jakie zachodzą w drogach oddechowych pacjentów cierpiących na astmę oskrzelową [Patel i Chorawala, 2011].

Zdecydowanie najlepiej poznany jest fenotyp astmy o charakterze alergicznym, co związane jest poniekąd z wielością i różnorodnością modeli eksperymentalnych. Najczęściej wykorzystywanym alergenem jest owalbumina (OVA), stanowiąca główną białko jaja kurzego [Yamamoto i wsp., 1997]. Związek ten w fazie uczulania podawany jest drogą dootrzewnową, a następnie po kilku lub kilkunastu dniach, reakcja zapalna wywoływana jest poprzez aplikację OVA donosowo lub w formie aerozolu [Patel i Chorawala, 2011]. Zazwyczaj stosuje się również dodatkowy związek tzw. adjuwant, którym może być wodorotlenek glinu $Al(OH)_3$, wzmagający odpowiedź mediowaną przez limfocyty Th typu 2. Procedury bez zastosowania adjuwantu są również skuteczne, jednak wymagają większej liczby ekspozycji na alergen w celu uzyskania odpowiedniego stopnia uczulenia [Smit i wsp., 2003]. W modelu owalbuminowym obserwuje się szereg objawów charakterystycznych dla astmy alergicznej takich jak nadreaktywność oskrzeli, napływ komórek odpowiedzi zapalnej (głównie eozynofiliów) do BALF, wzrost poziomu cytokin prozapalnych związanych z limfocytami Th2 (IL-4, IL-5 i IL-13) oraz zwiększone stężenie przeciwciał IgE w surowicy krwi [Zhang i wsp., 2017; Venturini i wsp., 2018; Wang i wsp., 2019]. Znacznie rzadziej stosowane są inne modele eksperymentalne, w których czynniki uczulające stanowią alergeny pochodzące od *Dermatophagoides farinae* i *Dermatophagoides*

pteronyssinus (roztocze kurzu domowego) lub *Blattella germanica* (karaczan prusak) [Sarpong i wsp., 2003; Ulrich i wsp., 2008; Zoltowska i wsp., 2016].

1.10. Modele astmy oskrzelowej wywołane podaniem haptenu

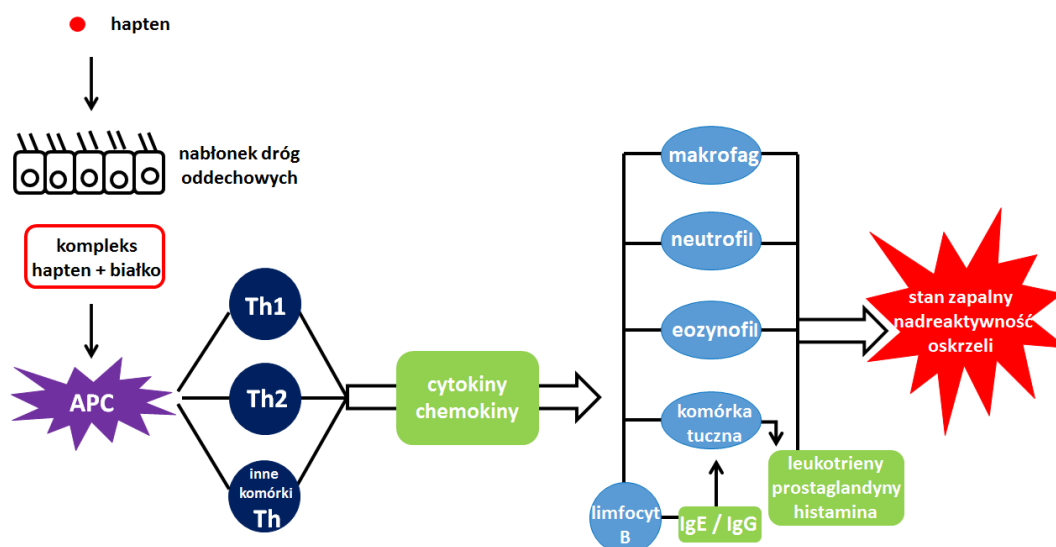
W modelach zwierzęcych w celu wywołania astmy o charakterze nieatopowym stosowane są związki o małej masie cząsteczkowej (< 5 kDa), określane mianem haptenu, które posiadają cechę antygenowości definiowaną jako zdolność do swoistego wiązania się z immunoglobulinami (wolnymi lub stanowiącymi receptory dla limfocytów B) oraz z receptorami limfocytów T. Haptenu nie są jednak zdolne do wyzwalania przeciw sobie swoistej odpowiedzi immunologicznej, a zatem nie wykazują immunogenności. Cechę tę zyskują dopiero po przyłączeniu się za pomocą wiązań kowalencyjnych do odpowiedniego nośnika, który może stanowić cząsteczka białka [Gołąb i wsp., 2017]. Aspekty molekularne tworzenia połączenia z nośnikiem nie są dla większości haptenu dokładnie opisane, wiadomo jednak, że związki takie jak dinitrofluorobenzen czy dinitrochlorobenzen wiążą się z końcowymi grupami aminowymi reszt lizynowych białka [Kalish i Askenase, 1999].

Przypuszcza się, iż reakcja zapalna w przebiegu astmy o podłożu niealergicznym może mieć charakter nadwrażliwości typu późnego (ang. *delayed type hypersensitivity*; DTH), określanej także jako nadwrażliwości typu IV, według podziału Gell'a i Combs'a wprowadzonego w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku [Gell i Coombs, 1963]. Typowym przykładem DTH jest reakcja nadwrażliwości kontaktowej, rozwijająca się po ekspozycji skóry lub błon śluzowych na działanie haptenu i cechująca się m.in. obrzękiem oraz zaczerwienieniem w miejscu podania [Majewska i Szczepanik, 2009]. Co więcej, związki o małej masie cząsteczkowej były pierwotnie klasyfikowane jako czynniki wywołujące reakcje na skórze bądź w drogach oddechowych. Obecnie wiadomo, iż takie rozróżnienie nie jest właściwe, bowiem odpowiedź po zastosowaniu danego związku uczulającego nie musi być ograniczona do konkretnego organu. Wykazano, iż podanie haptenu na skórę zwierząt w fazie uczulenia, a następnie wywołanie reakcji poprzez miejscowe wprowadzenie haptenu do dróg oddechowych powoduje nadreaktywność tchawicy w odpowiedzi na karbachol i akumulację limfocytów w BALF [Buckley i Nijkamp, 1994]. Zaobserwowano także zjawisko odwrotne, gdzie ekspozycja dróg oddechowych na haptenu (na drodze podania

dotchawiczego lub donosowego) może skutkować wystąpieniem reakcji nadwrażliwości na skórze [Ebino i wsp., 2001].

Obserwacje u pacjentów astmatycznych potwierdzają pogląd wskazujący na zależność pomiędzy ekspozycją na związki o dużej masie cząsteczkowej i ryzykiem wystąpienia astmy atopowej oraz powiązanie astmy nieatopowej z ekspozycją na związki o małej masie cząsteczkowej [Wang i wsp., 2010]. Należy jednak zauważyć, iż hapteny nie są grupą jednorodną, część z nich wywołuje reakcje o charakterze niealergicznym, niektóre jednak powodują odpowiedź o typie mieszanym lub z przewagą cech zapalenia alergicznego. Ponadto doświadczenia z użyciem modeli zwierzęcych sugerują, iż fenotyp choroby może zależeć nie tylko od natury zastosowanego związku uczulającego, ale także od długości trwania fazy uczulania. Przewlekłe podawanie haptenu przez okres kilku tygodni może doprowadzić do rozwoju astmy alergicznej, natomiast podanie krótkoterminowe i wywołanie reakcji po kilku dniach powoduje wystąpienie astmy o charakterze niealergicznym [van Houwelingen i wsp., 2002].

Do związków o małej masie cząsteczkowej, które wykorzystywane są w modelach eksperymentalnych astmy należą: diizocyjanian toluenu (ang. *toluene diisocyanate*; TDI), bezwodnik kwasu trimelitowego (ang. *trimellitic anhydride*; TMA), chlorek pikrylu (ang. *picryl chloride*; PCL) oraz dinitrofluorobenzen (ang. *dinitrofluorobenzene*; DNFB). W przypadku konieczności podania dotchawiczego lub donosowego związków bardzo trudno rozpuszczalnych w wodzie stosuje się ich pochodne cechujące się dobrą rozpuszczalnością takie jak kwas dinitrobenzenosulfonowy (ang. *dinitrobenzene sulphonic acid*; DNS) czy kwas pikrylosulfonowy (ang. *picryl sulphonic acid*; PSA). Hipotetyczny mechanizm rozwoju astmy indukowanej podaniem haptenu (Ryc. 5) polega na opisanym uprzednio połączeniu związku z nośnikiem białkowym, który jest następnie przetwarzany przez komórki prezentujące antygen (ang. *antigen presenting cells*; APC), tworząc kompleksy rozpoznawane przez limfocyty pomocnicze, w konsekwencji czego dochodzi do ich proliferacji i różnicowania. Limfocyty Th uwalniają następnie cytokiny i chemokiny, które z kolei powodują rekrutację i aktywację komórek odpowiedzi zapalnej i mogą także pobudzać limfocyty B. Komórki te wytwarzają przeciwciała klasy IgE/IgG, które stymulują komórki tuczne do uwalniania mediatorów zapalnych, nasilając tym samym proces zapalny w drogach oddechowych i skurcz oskrzeli.



Ryc. 5. Hipotetyczny mechanizm rozwoju astmy oskrzelowej wywołanej podaniem związku o charakterze haptenu. DNFB powoduje aktywację komórek tucznych i wzrost liczby neutrofilów, podczas gdy TDI i TMA indukują astmę z przewagą eozynofików, neutrofilów lub typ mieszany, w zależności od zastosowanego protokołu. Ponadto TMA i w części przypadków TDI zwiększają produkcję przeciwciał klasy IgE [Russjan i Kaczyńska, 2018].

1.10.1. Model indukowany TDI

Diizocyjaniany są silnie reaktywnymi związkami, stosowanymi w produkcji tworzyw poliuretanowych. Stanowią one jedną z najczęstszych przyczyn występowania astmy zawodowej, definiowanej jako fenotyp astmy rozwijający się w odpowiedzi na szkodliwe czynniki znajdujące się w miejscu pracy [Bardana, 2003]. Szacuje się, iż choroba dotyka od 5 do 15% narażonych pracowników, u części z nich objawy nie ustępują nawet w przypadku zaprzestania ekspozycji [Redlich i Karol, 2002]. Diizocyjanian toluenu stanowi najczęściej stosowany związek w modelach zwierzęcych [Świerczyńska-Machura i wsp., 2012].

Dotychczas opracowano wiele modeli astmy indukowanej podaniem TDI, różniących się między sobą czasem trwania fazy uczulania i schematem wywołania reakcji. W części z nich zwiększenie stężenia cytokin prozapalnych charakterystycznych dla limfocytów Th2, w szczególności IL-4 oraz wzrost poziomu przeciwciał IgE w surowicy krwi, mogą świadczyć o alergicznym mechanizmie obserwowanych zjawisk [Sun i wsp., 2007]. Niemniej wysunięcie jednoznacznych wniosków nie jest możliwe, bowiem inne badania wskazują odpowiedź mediowaną zarówno przez limfocyty Th2, jak i Th1, i dominującą rolę neutrofilów w reakcji zapalnej [Tarkowski i wsp., 2007; Pollaris i wsp., 2016], czy mechanizm niezależny od przeciwciał IgE [Jones i wsp., 2006; Maestrelli i wsp., 2009].

Matheson i wsp. [2005] opisali dwa modele eksperymentalne, w których porównywali efekty występujące po podaniu TDI w niskich dawkach przez dłuższy czas i po ekspozycji na wysoką dawkę w modelu ostrym. U myszy poddanych schematowi przewlekłemu wystąpiła odpowiedź o charakterze alergicznym, która obejmowała zapalenie dróg oddechowych cechujące się eozynofilią, ekspresją cytokin o profilu mieszanym wydzielanych przez limfocyty Th1/Th2, wzrostem całkowitego stężenia IgE i IgG specyficznych dla TDI w surowicy krwi oraz nadreaktywnością dróg oddechowych (ang. *airway hyperresponsiveness*; AHR). W modelu ostrym również zaobserwowano AHR i zwiększone stężenie swoistych IgG, nie doszło natomiast do wzrostu liczby eozynofiliów, cytokin prozapalnych czy poziomu przeciwciał klasy IgE [Matheson i wsp., 2005]. Podobne wnioski nasuwają się z innych eksperymentów, w których porównywano pojedyncze i wielokrotne podanie TDI drogą donosową po wcześniejszym skórnym uczuleniu tym związkiem. W obu przypadkach zaangażowane były limfocyty Th1 i Th2, różnice dotyczyły jednak rodzaju komórek odpowiedzi zapalnej obecnych w BALF. W modelu z pojedynczą aplikacją TDI zaobserwowano stan zapalny z przewagą neutrofilów. Z kolei napływ eozynofiliów widoczny był jedynie w modelu, w którym hapten podawano wielokrotnie [Vanoirbeek i wsp., 2009].

1.10.2. Model wywołany TMA

Bezwodnik kwasu trimelitowego to związek wykorzystywany w przemyśle tworzyw sztucznych i farb, który podobnie jak TDI, jest czynnikiem wywołującym astmę zawodową [Regal i wsp., 2007]. Wiele badań potwierdza podobieństwa pomiędzy astmą wywołaną przez TMA i związki o dużej masie cząsteczkowej. Myszy, którym podawano TMA cechowały się zwiększoną liczbą eozynofiliów w BALF i wzrostem zawartości peroksydazy eozynofilowej w homogenatach tkanki płucnej, a obserwowana eozynofilia była porównywalna z odpowiedzią po zastosowaniu OVA w takim samym schemacie doświadczalnym [Regal i wsp., 2001]. Podobne wyniki uzyskano w eksperymencie, gdzie miejscowe podanie na skórę uszu, a następnie inhalacje TMA zwiększało liczbę granulocytów kwasochłonnych, któremu towarzyszył wzrost stężenia cytokin prozapalnych wydzielanych przez limfocyty typu 2 i wzrost całkowitego stężenia IgE [Nishino i wsp., 2016]. Wniosek, iż w astmie indukowanej podaniem TMA pośredniczą jedynie limfocyty typu 2 nie wydaje się być jednak uprawniony, istnieją bowiem badania wskazujące na udział zarówno limfocytów Th2, jak i Th1

w wywoływaniu stanu zapalnego w drogach oddechowych [Sailstad i wsp., 2003; Vanoirbeek i wsp., 2006]. Co więcej, w obu przytoczonych pracach opisujących udział limfocytów o profilu mieszanym, zaobserwowano dominujący napływ neutrofilów do BALF i brak obecności lub minimalną liczbę eozynofiliów, co może być związane z faktem pojedynczego podania haptenu w fazie wywołania reakcji, w przeciwieństwie do prac Regal'a i Nishino [Regal i wsp., 2001; Nishino i wsp., 2016], gdzie TMA podawany był przez trzy kolejne dni, powodując wystąpienie eozynofilii.

1.10.3. Model indukowany PCL

Chlorek pikrylu to inna nazwa 2,4,6-trinitrochlorobenzenu, który już od dawna badany był pod kątem właściwości uczulających po ekspozycji na skórę i drogi oddechowe [Enander i wsp., 1983]. Podanie naskórne PCL, a następnie wywołanie reakcji poprzez donosowe wprowadzenie PSA skutkowało skurczem oskrzeli, infiltracją podśluzówkową limfocytów (jednak nie eozynofiliów) i nadreaktywnością dróg oddechowych po podaniu metacholiny. AHR nie wystąpił po transferze swoistych antygenowo przeciwciał IgE u zwierząt nieuczulonych, co sugeruje nieatopowy charakter odpowiedzi [Geba i wsp., 1997]. W innym eksperymencie uczulenie i wywołanie reakcji za pomocą PCL zostało zaklasyfikowane jako nadreaktywność typu późnego (DTH). Wykazano, iż nadreaktywność dróg oddechowych jest reakcją zależną od limfocytów T, bowiem u myszy pozbawionych grasicy (myszy atymiczne) nie zaobserwowano zwiększonej reaktywności izolowanej tchawicy w odpowiedzi na działanie karbacholu [Garssen i wsp., 1991]. Przeprowadzono także badania, w których u myszy uczulonych PCL, zastosowano donosowe podanie DNS (w miejsce homologicznego haptenu PSA). W tym przypadku nie doszło do reakcji zapalnej, co jednoznacznie wskazuje na antygenowo specyficzny mechanizm reakcji DTH w drogach oddechowych [Garssen i wsp., 1989].

1.10.4. Model wywołany DNFB

Choć pochodne dinitrobenzenu uważane były niegdyś za typowe związki powodujące uczulenia skórne, niezdolne do wywołania stanu zapalnego w drogach oddechowych [Dearman i Kimber, 1991], obecnie wiadomo, iż miejscowe podanie DNFB na skórę, a następnie wywołanie reakcji poprzez donosowe lub dotchawicze wprowadzenie haptenu

proceeds to a hypersensitive response with features of non-allergic asthma [van Houwelingen et al., 2002].

Van der Kleij et al. developed an experimental model in which mice were sensitized to DNFB, and then challenged with a related antigen, DNS, which caused a biphasic reaction. In the early phase, which lasted up to 3 hours after challenge, there was bronchoconstriction and mast cell activation, but no IgE specific for the challenge antigen. The late phase (24 - 48 hours after challenge) involved re-activation of mast cells, airway edema, infiltration of mononuclear cells and neutrophils around blood vessels and bronchioles, hyperreactivity to methacholine *in vivo* and increased reactivity of isolated trachea to carbacol *in vitro*. The results clearly demonstrate that mechanisms other than eosinophilic inflammation or atopy can be involved in the pathophysiology of asthma [van der Kleij et al., 2004]. An important role for mast cells in the initiation of a hypersensitive response of non-atopic type in the airways was also confirmed in other studies using mice genetically predisposed to mastocytosis (W/W^v), using the same experimental model. In these animals, there was a reduced response or complete lack of response to challenge with DNFB, both in terms of the early phase symptoms and the late phase reaction. Moreover, reconstitution of mast cells in W/W^v mice caused the appearance of bronchoconstriction, hyperreactivity *in vitro* and the presence of neutrophils in BALF, observed after sensitization with DNFB and challenge with DNS [Kraheveld et al., 2002].

Despite the fact that literature data on the topic of asthma induced by sensitization to dinitrobenzene derivatives are scarce, recent reports confirm that this is a reproducible model capable of reproducing characteristic features of asthma on a non-allergic background such as a significant increase in the number of macrophages and neutrophils in BALF during the hypersensitive reaction [Bozkurt et al., 2016; Russjan et al., 2019]. For this reason, the experimental model based on skin application of DNFB and intratracheal challenge with DNS was chosen for the study of the potential effect of the hybrid PK20.

2. CEL PRACY

Astma oskrzelowa stanowi poważny problem zdrowotny, a szczególnie nieatopowy fenotyp choroby, w którym dostępna farmakoterapia nie przynosi oczekiwanych rezultatów. Uzasadnione zatem są działania mające na celu poszukiwanie nowych związków, które mogłyby odegrać istotną rolę w opanowaniu lub łagodzeniu objawów towarzyszącym chorobie. Przedmiotem badań w niniejszej pracy jest chimera PK20, łącząca w swojej strukturze dwa farmakofory: endomorfiny 2 i neurotensyny, oba mające udowodnione działanie przeciwzapalne lub immunomodulatorowe. Obecność receptorów opioidowych μ i receptorów neurotensynowych NTR1, zarówno w obrębie dróg oddechowych, jak i na komórkach biorących udział w odpowiedzi zapalnej, sugeruje korzystny wpływ hybrydy na proces chorobowy w przebiegu astmy oskrzelowej. Ocena potencjalnej aktywności przeciwzapalnej hybrydy PK20 stanowi zatem główny cel niniejszej rozprawy. Porównanie aktywności hybrydy z prostą mieszaniną jej farmakoforów pozwoli z kolei na określenie wpływu procesu hybrydyzacji na właściwości nowo zsyntetyzowanego związku. Doświadczenia z użyciem antagonistów poszczególnych receptorów stanowią natomiast próbę ustalenia, która część składowa hybrydy PK20 w większym stopniu odpowiada za efekty obserwowane po jej podaniu.

2.1. Ogólny cel pracy

Weryfikacja hipotezy o korzystnym wpływie związku hybrydowego PK20 na nadreaktywność oskrzeli i proces zapalny w drogach oddechowych w mysim modelu astmy nieatopowej indukowanej podaniem haptenu.

2.2. Cele szczegółowe pracy

- Porównanie aktywności chimery PK20 z działaniem mieszaniny jej obu farmakoforów (farmakoforu endomorfiny 2 i farmakoforu neurotensyny) podanych jednocześnie oraz z aktywnością deksametazonu - syntetycznego glikokortykosteroidu o silnym działaniu przeciwzapalnym.
- Określenie udziału opioidowej i neurotensynowej ścieżki receptorowej w efekcie przeciwzapalnym wywołanym podaniem badanej hybrydy.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Zwierzęta doświadczalne

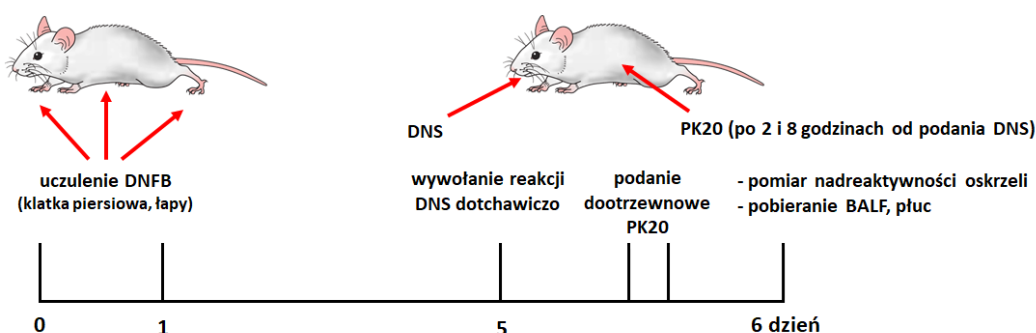
Badania wykonano na podstawie zgody IV Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (nr pozwolenia 57/2014). Zwierzęta pozyskano ze Zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. Eksperymenty przeprowadzono z użyciem 7-8 tygodniowych samców myszy szczepu BALB/c o masie ok. 30 g. Zwierzęta w trakcie doświadczenia przetrzymywano w jednakowych warunkach z zachowaniem cyklu dobowego (13 godzin dzień/ 11 godzin noc). Wszystkie otrzymywały standardową paszę i wodę *ad libitum*.

3.2. Związki badane i odczynniki chemiczne

Hybryda PK20 (H-Dmt-D-Lys-Phe-Phe-Lys-Lys-Pro-Phe-Tle-Leu-OH) została zsyntetyzowana i oczyszczona w Zakładzie Neuropeptydów, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, przy użyciu metody syntezy peptydów na fazie stałej (ang. *Solid Phase Peptide Synthesis*; SPPS) opisanej przez Merrifield'a z wykorzystaniem metody Fmoc [Merrifield, 1963]. Z tego samego źródła pozyskano części strukturalne hybrydy: farmakofor endomorfiny 2 i farmakofor neurotensyny. Chlorowodorek ketaminy (Bioketan), chlorowodorek ksylazyny (Sedazin) oraz mieszanina pentobarbitalu i pentobarbitalu sodowego (Morbital) zostały zakupione w Biowet Puławy (Puławy, Polska). 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (DNFB), kwas 2,4-dinitrobenzenosulfonowy (DNS), deksametazon, chlorek metacholiny, roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami (PBS), aceton, oliwa z oliwek, koktajl inhibitorów proteaz, Triton X-100, paraformaldehyd, ksylen i barwnik Hoechst zostały zakupione w Sigma-Aldrich (Poznań, Polska). Chlorowodorek naloksonu i SR 142948 zostały pozyskane z Tocris Bioscience (Bristol, UK), zestaw do barwienia preparatów Hemastain i odczynnik TÜRKA z Analab (Warszawa, Polska), alkohol etylowy 96% CZDA i alkohol etylowy bezwodny 99,8% CZDA z POCH (Gliwice, Polska), sacharoza z Chempur (Piekary Śląskie, Polska), medium do zamykania preparatów histologicznych DPX z Fluka Chemie (Buchs, Szwajcaria), eozyna Y i hematoksylina z Merck (Warszawa, Polska), medium do mikroskopii fluorescencyjnej Vectashield Mounting Medium z Vector Laboratories Inc. (Burlingame, USA).

3.3. Mysi model astmy nieatopowej

Astma nieatopowa została wywołana u myszy według procedur opisanych uprzednio przez van der Kleij i wsp. [2004]. Zwierzęta przez kolejne dwa dni uczulano przy użyciu haptenu - 0,5% roztworu dinitrofluorobenzenu (DNFB), rozpuszczonego w mieszaninie acetonu i oliwy z oliwek (w stosunku 4:1 v/v), lub rozpuszczalnika (VEH), które nanoszono miejscowo na ogoloną skórę klatki piersiowej (50 μ l) i na powierzchnię wewnętrzną łap (50 μ l podzielone na cztery łapy). Drugiego dnia związek podawano jedynie na powierzchnię klatki piersiowej (50 μ l). Po pięciu dniach dochodziło do ponownego kontaktu z haptenem, co powodowało rozwój stanu zapalnego. Haptenem wywołującym reakcję zapalną był 0,6% wodny roztwór kwasu dinitrobenzenosulfonowego (DNS) - związek pokrewny antygenowo wobec DNFB, który podawano dotchawiczo (50 μ l). Procedura uczulania i wywoływania reakcji odbywała się w narkozie, z zastosowaniem mieszaniny ketaminy (70 mg/kg) i ksylazyny (10 mg/kg), podawanej w iniekcji domięśniowej. Po 2 i po 8 godzinach od zastosowania DNS, hybrydę PK20, mieszaninę jej farmakoforów lub deksametazon podawano w iniekcji dootrzewnowej (i.p.). W przypadku badań z użyciem antagonistów: receptorów opioidowych (chlorowodoru naloksonu) i receptorów neurotensynowych (SR 142948) odstęp pomiędzy podaniem antagonisty, a zastosowaniem hybrydy PK20 wynosił 30 minut. Po upływie 24 godzin dokonywano pomiaru nadreaktywności oskrzeli w mysiej komorze pletyzmograficznej z zastosowaniem wzrastających dawek metacholiny. Po wykonaniu pomiaru zwierzęta poddano eutanazji poprzez dootrzewnowe podanie pentobarbitalu sodu (150-200 mg/kg). Następnie pobierano płyn pęcherzykowo-oskrzelowy (ang. *bronchoalveolar lavage fluid*; BALF) i płuca do dalszych analiz (Ryc. 6).



Ryc. 6. Schemat przebiegu doświadczeń dla grupy otrzymującej hybrydę PK20. W takim samym schemacie podawano mieszaninę farmakoforów oraz deksametazon. Związki antagonistyczne aplikowane były 30 minut przed podaniem hybrydy PK20. DNFB - dinitrofluorobenzen; DNS - kwas dinitrobenzenosulfonowy; BALF - płyn pęcherzykowo-oskrzelowy.

3.4. Grupy eksperymentalne

Eksperymenty zostały zaplanowane w dwóch etapach. W pierwszym etapie badań analizowano wpływ hybrydy PK20, mieszaniny jej obu strukturalnych farmakoforów (farmakoforu endomorfiny 2 i farmakoforu neurotensyny) oraz deksametazonu na objawy stanu zapalnego w drogach oddechowych i nadreaktywność oskrzeli. Dawka hybrydy PK20 wyniosła 7,4 $\mu\text{mol/kg}$ i została wybrana na podstawie eksperymentów z zastosowaniem modelu nadwrażliwości kontaktowej (*vide* punkt 3.5). Składniki mieszaniny (farmakofor endomorfiny 2 i farmakofor neurotensyny) podawano w dawkach stanowiących ilości równomolowe wobec hybrydy (7,4 $\mu\text{mol/kg}$). Dawkę deksametazonu - 10,2 $\mu\text{mol/kg}$ - wybrano na podstawie dostępnej literatury [Gurusamy i wsp., 2016]. Rozpuszczalnikiem dla wszystkich badanych związków był fizjologiczny roztwór soli (0,9% NaCl). W doświadczeniach zaplanowano także dwie grupy kontrolne. Pierwsza grupa stanowiła kontrolę negatywną, w której myszom w fazie uczulenia aplikowano na skórę jedynie rozpuszczalnik bez zastosowania haptenu. Grupę drugą traktowano jako kontrolę pozytywną, w której zwierzęta uczulano miejscowo z użyciem DNFB. W obu grupach kontrolnych, po dotchawiczej prowokacji reakcji zapalnej z zastosowaniem DNS, podawano dootrzewnowo iniekcję fizjologicznego roztworu soli.

W drugim etapie badań oceniano zaangażowanie poszczególnych składowych związku hybrydowego na wywoływany przez niego efekt przeciwzapalny. Badania wykonano z zastosowaniem antagonisty receptorów opioidowych (chlorowodoru naloksonu) w dawce 5,5 $\mu\text{mol/kg}$ i antagonisty receptora neurotensynowego NTR1 w dawce 2,9 $\mu\text{mol/kg}$ podawanych 30 minut przed zastosowaniem hybrydy PK20. Dawki antagonistów wybrano w oparciu o wyniki wcześniejszych badań, z uwzględnieniem wyższej dawki hybrydy PK20 stosowanej w obecnych eksperymentach [Kaczyńska i wsp., 2017]. Poszczególne grupy doświadczalne przedstawiono w Tabeli 1.

Oznaczenie	Faza uczulenia	Faza wywołania	Podawany związek
Kontrola negatywna	VEH	DNS	0,9% NaCl i.p.
Kontrola pozytywna	DNFB	DNS	0,9% NaCl i.p.
Hybryda PK20	DNFB	DNS	PK20 i.p.
Mieszanina farmakoforów	DNFB	DNS	Farmakofory EM 2 i NT i.p.
Deksametazon	DNFB	DNS	Deksametazon i.p.
Nalokson HCl + hybryda PK20	DNFB	DNS	Nalokson HCl + PK20 i.p.
SR 142948 + hybryda PK20	DNFB	DNS	SR 142948 + PK20 i.p.

Tab. 1. Grupy zwierząt doświadczalnych zaplanowane w badaniach. VEH - rozpuszczalnik; DNFB - dinitrofluorobenzen; DNS - kwas dinitrobenzenosulfonowy; EM 2 - endomorfina 2, NT - neurotensyna; i.p. - podanie dootrzewnowe.

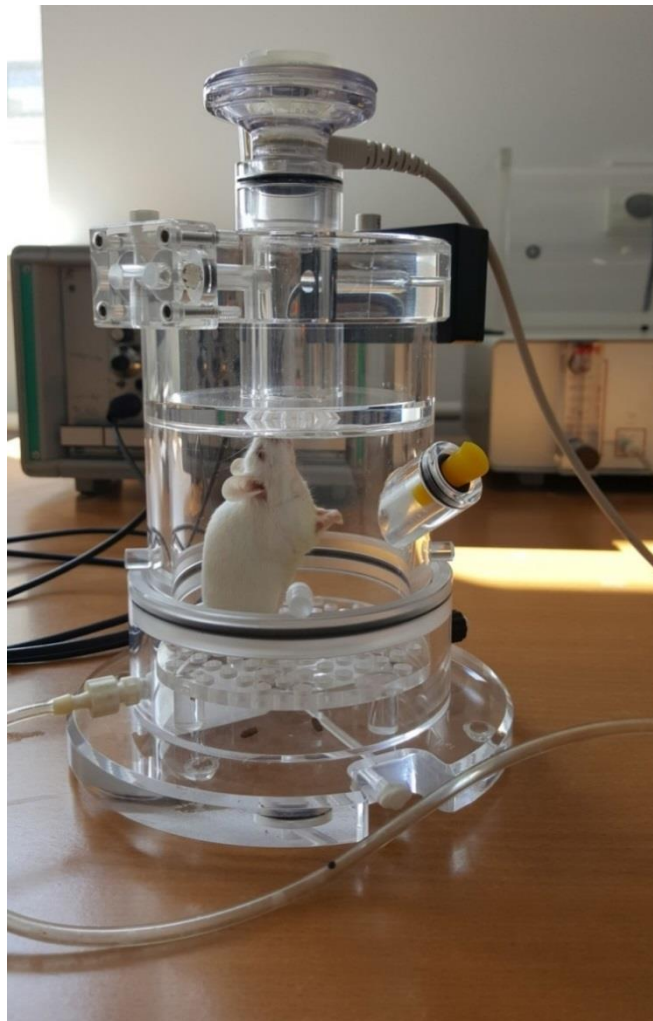
3.5. Wyznaczenie dawki związku hybrydowego PK20

Wybór dawki hybrydy PK20 został dokonany na podstawie eksperymentów z zastosowaniem modelu nadwrażliwości kontaktowej. Możliwość wyboru dawki w oparciu o tę metodę, wynika z faktu, iż u podstaw astmy nieatopowej i nadwrażliwości kontaktowej leży ten sam mechanizm nadwrażliwości typu późnego. W modelu nadwrażliwości kontaktowej (podobnie jak w modelu astmy) zwierzęta uczulano dwukrotnie miejscowo na ogoloną skórę klatki piersiowej (50 µl) i powierzchnię wewnętrzną łap (50 µl podzielone na cztery łapy) za pomocą 0,5% roztworu DNFB rozpuszczonego w mieszaninie acetonu i oliwy z oliwek (4:1). Drugiego dnia związek podawany był wyłącznie na powierzchnię klatki piersiowej (50 µl). Po pięciu dniach dochodziło do wywołania stanu zapalnego. Reakcja zapalna nie została jednak indukowana w drogach oddechowych, ale na skórze uszu badanych zwierząt - 0,2% roztwór DNFB podawany był na ucho prawe (obustronnie po 10 µl na każdą stronę), natomiast na ucho lewe (kontrolne) наносzono wyłącznie rozpuszczalnik (mieszanina acetonu i oliwy z oliwek). Następnie hybrydę PK20 w dawce 0,7, 3,7 lub 7,4 µmol/kg podawano dwukrotnie drogą dootrzewnową: po 2 i 8 godzinach od zastosowania haptenu. Po upływie 24 godzin przeprowadzono pomiary obrzęku uszu przy użyciu mikrometru automatycznego (Mitutoyo, Japan). Pomiary wykonywane były w trzech różnych miejscach w obrębie badanego ucha, a uzyskane wyniki uśredniono. Różnice grubości uszu obliczano poprzez odjęcie od wartości uzyskanej dla ucha uczulanego, wartości uzyskanej dla ucha kontrolnego. Procedura uczulania i wywoływania reakcji zapalnej, a także pomiar grubości uszu odbywały się w narkozie domięśniowej (mieszanina ketaminy i ksylazyny).

3.6. Pomiar nadreaktywności oskrzeli

Pomiary nadreaktywności oskrzeli wykonywane były w mysiej komorze pletyzmoграфicznej o objętości 450 ml (Buxco DSI, USA; Ryc. 7), 24 godziny po dotchawicznym podaniu DNS. Zwierzęta umieszczano w komorze i po 10 minutach aklimatyzacji podawano im w formie aerozolu kontrolny fizjologiczny roztwór NaCl. Następnie, co 20 minut, wprowadzano roztwory metacholiny o wzrastającym stężeniu (5, 10, 20 i 40 mg/ml). Metacholina jest pochodną choliny i należy do związków o działaniu parasympatykomimetycznym. Jej wziewne podanie powoduje skurcz oskrzeli, dlatego jest powszechnie stosowana w diagnostyce astmy w tzw. próbach prowokacyjnych.

Po podaniu każdej z badanych dawek, rejestrowano czynności dróg oddechowych przez okres 10 minut. Do analiz zostały wybrane wyniki z przedziału od 4 do 7 minuty, licząc od momentu rozpoczęcia nebulizacji związku.



Ryc. 7. Fotografia przedstawiająca mysz podczas pomiaru w komorze pletyzmoграфicznej.

Miarą nadreaktywności oskrzeli jest tzw. pauza wydłużona (ang. *enhanced pause*; Penh). Jest to bezjednostkowy parametr, obliczany ze wzoru, który uwzględnia: szczytowy przepływ wydechowy (PEP), szczytowy przepływ wdechowy (PIP), czas wydechu (T_e) i tzw. czas relaksacji (T_r). W trakcie skurczu oskrzeli zmiany podczas wydechu są silniej zaznaczone niż zmiany podczas wdechu, dlatego też zwężenie dróg oddechowych odzwierciedla się we wzroście wartości Penh (Ryc. 8).

$$\text{Penh} = \text{PEP}/\text{PIP} \times \text{pause}$$

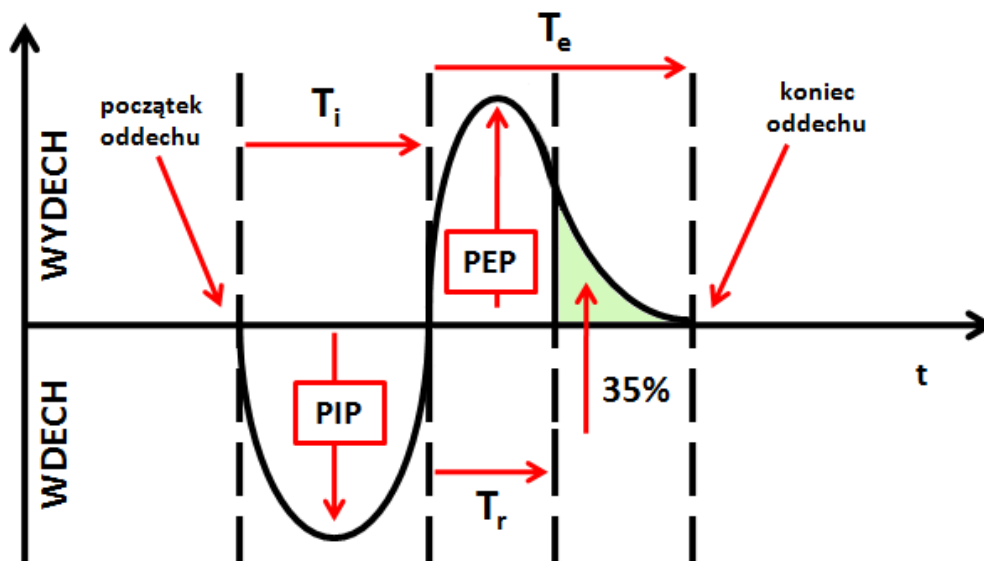
$$\text{pause} = (T_e - T_r)/T_r$$

PEP – szczytowy przepływ wydechowy

PIP – szczytowy przepływ wdechowy

T_e – czas wydechu

T_r – czas relaksacji



Ryc. 8. Graficzne przedstawienie parametrów służących do obliczania wartości Penh. T_i oznacza czas wdechu. T_r definiowane jest jako czas potrzebny na wydech 65% objętości powietrza wdychanego.

3.7. Określenie całkowitej liczby komórek odpowiedzi zapalnej oraz liczby neutrofilów w płynie pęcherzykowo-oskrzelowym (BALF)

Po wykonaniu pomiaru nadreaktywności oskrzeli, zwierzęta poddano eutanazji, a następnie przygotowano do pobierania BALF. W tym celu wypreparowano tchawicę i umieszczono w niej kaniulę, poprzez którą czterokrotnie wprowadzano i wyprowadzano 1 ml PBS. Pierwszy 1 ml PBS zawierał koktajl inhibitorów proteaz i został przeznaczony do pomiaru poziomu markerów stanu zapalnego. Uzyskaną próbkę odwirowano przy użyciu wirówki (MPW-375, MPW Med. Instruments, Poland (160 x g, 10 minut, 4 °C)), a powstały supernatant zebrano i umieszczono w temperaturze -80 °C. Otrzymany pellet komórek został dołączony do pozostałych 3 ml PBS. Całkowitą próbkę BALF zebraną od jednego osobnika odwirowano przy takich samych parametrach jak poprzednio (160 x g, 10 minut, 4 °C), a uzyskany osad komórkowy został zawieszony w 150 µl 0,9% NaCl. Do 50 µl zawiesiny dodano 100 µl odczynnika Türka i w tak przygotowanej próbce oznaczono całkowitą liczbę komórek odpowiedzi zapalnej za pomocą komory zliczeniowej Bürkera, według metody opisanej przez Gunetti z niewielkimi modyfikacjami [Gunetti i wsp., 2012]. Komora Bürkera składa się z 9 dużych kwadratów (o powierzchni 1 mm² każdy) podzielonych przez podwójne linie (oddalone od siebie o 0,05 mm) na 16 mniejszych kwadratów grupowych. Podwójne linie tworzą małe kwadraty o powierzchni 0,0025 mm². Głębokość komory wynosi 0,1 mm. Komórki zliczono w każdym z 5 dużych kwadratów, a następnie uśredniono wynik z 5 odczytów i obliczono stężenie komórek według poniższego wzoru. Wyniki zostały wyrażone jako liczba komórek odpowiedzi zapalnej znajdująca się 1 ml BALF.

$$\left[\frac{\text{liczba komórek}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{liczba komórek w pięciu kwadratach}}{5} \times \text{współczynnik rozcieńczenia} \times 10^4$$

Pozostałą część zawiesiny rozcieńczono w 200 µl NaCl, w celu uzyskania odpowiedniego rozproszenia komórek w preparacie, a następnie odwirowano za pomocą wirówki cytologicznej (Cytospin 4, Thermofisher Scientific, USA; (41 x g, 5 minut, temp. pokojowa)). Uzyskane w ten sposób preparaty komórkowe pozostawiono do wyschnięcia, a następnie barwiono zestawem barwników (Hemastain, Analab) i za pomocą mikroskopu świetlnego (Nikon Eclipse E200LED, Nikon, Japan; powiększenie 100x) określano liczbę komórek jednojądrzastych (makrofagów i limfocytów) oraz liczbę

neutrofilów przypadającą na 500 kolejnych komórek w preparacie. W oparciu o liczbę komórek w całej próbce i procent neutrofilów w preparacie obliczono liczbę neutrofilów w danej próbce przypadającą na 1 ml BALF.

3.8. Pomiar stężenia białka całkowitego w BALF i homogenatach płuc

Stężenie białka całkowitego oznaczano za pomocą zestawu Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Warszawa, Polska) wykorzystując metodę Bradford'a [Bradford, 1976]. Procedura oznaczania wykorzystuje zjawisko wiązania barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 do grup aminowych białek. Powstanie kompleksu białko - barwnik skutkuje zmianą długość fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika z 465 nm do 595 nm. Wartość absorbancji jest proporcjonalna do zawartości białka w roztworze. Wzorzec białka stanowiła albumina surowicy bydlęcej. Pomiar przeprowadzono przy użyciu czytnika płytek mikrotitracyjnych (Epoch, BioTek Instruments, USA). Stężenia białka całkowitego wyrażono w mg białka na 1 ml BALF lub 1 ml homogenatu płuc.

3.9. Pomiar stężenia albumin w BALF

Poziom albumin określano przy użyciu zestawu Mouse Albumin ELISA kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) według zaleceń dostarczonych przez producenta. W metodzie immunoenzymatycznej (ang. *sandwich ELISA* - test podwójnego wiązania) wykorzystano przeciwciało anty-mysie przeciwko albuminie, biotynylowane przeciwciało detekcyjne, streptawidynę skoniugowaną z peroksydazą chrzanową (ang. *horseradish peroxidase*; HRP) i tetrametylobenzydynę. Pomiar został wykonany za pomocą czytnika płytek (Epoch, BioTek Instruments, USA). Wyniki zostały przedstawione w postaci ilości albumin w przeliczeniu na miligram białka całkowitego.

3.10. Oznaczenie poziomu cytokin prozapalnych w BALF i homogenatach płuc

Pierwszy 1 ml BALF przeznaczony do analizy poziomu cytokin prozapalnych został odwirowany, a uzyskany supernatant zebrano i przechowywano w temp. = -80 °C (*vide* punkt 3.7). Po pobraniu całkowitej próbki BALF, płuca badanych zwierząt zostały wyizolowane i również przeniesione do temp. = -80 °C. W celu dalszych badań płuca zhomogenizowano w ciekłym azocie i zawieszono w 500 µl PBS z dodatkiem koktajlu inhibitorów proteaz i 1% Tritonu X-100. Następnie próbkę odwirowano (15000 x g, 10 minut, 4 °C), a uzyskany

supernatant użyto do analizy poziomu cytokin. Pomiar poziomu cytokin w BALF oraz w homogenatach płuc przeprowadzono przy użyciu Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Assay (Bio-Rad) za pomocą platformy Bio-Plex 200 (Luminex, Bio-Rad, Warszawa, Polska). System Bio-Plex Pro wykorzystuje mikrosfery magnetyczne (ang. *magnetic beads*), które powstają poprzez zastosowanie dwóch barwników fluorescencyjnych w różnym stosunku. Dzięki temu każda mikrosfera ma odrębny kod kolorystyczny tzw. adres spektralny, co umożliwia ich rozróżnienie i identyfikację. Zasada działania analizy jest podobna do testu podwójnego wiązania ELISA (ang. *sandwich ELISA*). Przeciwciała wychwytyjące, skierowane przeciwko konkretnym markerom są kowalencyjnie sprzężone z mikrosferami. Opłaszczony mikrosferą reagują z próbką, jeżeli ta zawiera badany marker. Po serii płukań, które usuwają niezwiązane białko, do dołka dodawane jest biotynylowane przeciwciało wykrywające, specyficzne dla epitopów na badanych cząsteczkach. W końcowym etapie wprowadza się oznakowaną fluorescencyjnie streptawidynę (koniugat streptawidyna + fikoerytryna), która wiąże się z wyznakowanymi biotyną przeciwciałami wykrywającymi. Czytnik początkowo klasyfikuje mikrosfery według ich adresu spektralnego, a następnie mierzy intensywność sygnału znacznika. Uzyskane wyniki zostały wyrażone jako stężenie cytokin w 1 ml BALF, a przypadku analiz homogenatów płuc jako stężenie cytokin w przeliczeniu na miligram białka całkowitego w danej próbce.

3.11. Oznaczenie stężenia mysiej proteazy komórek tucznych 1 (MCPT-1) w homogenatach płuc

Określenie poziomu MCPT-1 w homogenatach płuc badanych zwierząt wykonano przy użyciu zestawu Mouse MCPT-1 ELISA Ready-SET-go kit (eBioscience, San Diego, CA, USA) zgodnie z wytycznymi producenta, a pomiar wykonano za pomocą czytnika płytek mikrotitracyjnych (Epoch, BioTek Instruments, USA). W metodzie immunoenzymatycznej ELISA wykorzystano oczyszczone przeciwciało anty-mysiej MCPT-1 (przeciwciało wychwytyjące), skoniugowane z biotyną przeciwciało anty-mysiej MCPT-1 (przeciwciało detekcyjne), awidynę skoniugowaną z enzymem HRP i tetrametylobenzydynę, stanowiącą substrat reakcji. Wyniki zostały przedstawione jako ilość MCPT-1 przypadająca na miligram białka całkowitego.

3.12. Oznaczenie stężenia dialdehydu malonowego (MDA) w homogenatach płuc

Określenie stężenia MDA w homogenatach płuc wykonano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA, wykorzystując komercyjnie dostępny zestaw do analiz (OxiSelect MDA, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA), przy zastosowaniu czytnika (Epoch, BioTek Instruments, USA). Zestaw zawierał: poliklonalne przeciwciało przeciwko MDA, drugorzędowe przeciwciało skoniugowane z HRP i roztwór substratu reakcji. Wyniki analizy przedstawiono jako ilość MDA w odniesieniu do miligrama białka całkowitego w próbce.

3.13. Oznaczenie aktywności sekrecyjnej fosfolipazy A₂ (sPLA₂) w homogenatach płuc

Analiza została wykonana przy użyciu zestawu sPLA₂ Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) według instrukcji dołączonej przez producenta. W analizie wykorzystano analog diheptanylu fosfatydylocholiny, zawierający w cząsteczce dwa atomy siarki. Związek ten stanowi substrat dla większości fosfolipaz A₂, za wyjątkiem fosfolipazy cytozolowej. Podczas hydrolizy wiązania tioestrowego w pozycji *sn*-2 przy udziale fosfolipazy A₂ dochodzi do wytworzenia wolnych związków tiolowych, które są następnie wykrywane przy użyciu kwasu 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesowego). Pomiar aktywności fosfolipazy A₂ prowadzony był za pomocą czytnika płytek (Epoch, BioTek Instruments, USA), co 1 minutę przez okres 10 minut, przy długości fali $\lambda = 414$ nm. Wyniki zostały przedstawione w przeliczeniu na miligram białka całkowitego w danej próbce.

3.14. Wykonanie preparatów histologicznych tkanki płucnej

Po pobraniu BALF z dróg oddechowych, płuca części zwierząt zostały przygotowane do badań histologicznych. W tym celu tkankę płucną opłukano w fizjologicznym roztworze soli, a następnie umieszczono w 4% roztworze paraformaldehydu w PBS i przechowywano w temp. = 4 °C przez okres 7 dni. Po 7 dniach płuca przeniesiono do roztworów sacharozy o wzrastającym stężeniu, kolejno: 10, 20 i 30% sacharozy (w/v) w PBS. Kolejnym krokiem było umieszczenie tkanki w suchym lodzie, a następnie przeniesienie do temp. = -80 °C. Po zamrożeniu materiału ze wszystkich badanych grup, płuca zostały pocięte na kriostacie (Leica CM1850 UV, Niemcy) na skrawki o grubości 20 μ m i umieszczone na silanizowanych szkiełkach. W kolejnym etapie uzyskane preparaty zostały wybarwione z użyciem eozyny Y i hematoksyliny. Hematoksylina, jako związek o odczynie zasadowym, przyłącza się do

struktur o charakterze kwasowym np. do chromatyny jądra komórkowego, zabarwiając je na granatowo. Z kolei, eozyna Y ma odczyn kwasowy i wiąże się ze strukturami kwasochłonnymi np. białkami cytoplazmatycznymi, nadając im barwę różową. Procedura barwienia uwzględniała odwodnienie za pomocą szeregu roztworów alkoholi o wzrastającym stężeniu, zastosowanie w końcowym etapie roztworu ksylenu, zamknięcie preparatów szkiełkiem nakrywkowym przy użyciu DPX i pozostawienie tak wykonanych preparatów do wyschnięcia.

3.15. Ocena stopnia zaawansowania procesu zapalnego tkanki płucnej na podstawie preparatów histologicznych

Preparaty analizowano pod mikroskopem świetlnym (Nikon Eclipse E200LED, Nikon, Japan) w powiększeniu 4- i 10-krotnym. Stopień zaawansowania stanu zapalnego w tkance płucach określono za pomocą metody opisanej przez Tournoy i wsp. [2000]. Preparaty histologiczne oceniano na podstawie napływu komórek odpowiedzi zapalnej wokół oskrzeli i naczyń krwionośnych. Zastosowano skalę od 0 do 3, gdzie 0 oznaczało brak widocznych zmian zapalnych, 1 - pojedyncze komórki odpowiedzi zapalnej, 2 - stan, w którym większość oskrzeli i naczyń krwionośnych otoczona jest przez cienką warstwę komórek odpowiedzi zapalnej (1 - 5 warstw komórek), 3 - stan, w którym większość oskrzeli i naczyń krwionośnych otoczona jest przez grubą warstwę komórek odpowiedzi zapalnej (powyżej 5 warstw komórek). Wyniki zostały wyrażone jako średnia z ocen uzyskanych dla danej grupy badanej.

3.16. Określenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-κB w tkance płucnej metodą immunohistochemiczną

Do oceny ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-κB wykorzystano tkankę płucną pociętą na kriostacie według procedury opisanej powyżej (*vide* punkt 3.14). Otrzymane preparaty zostały poddane podwójnemu znakowaniu w kierunku peptydów NF-κB p50 i NF-κB p65. Po wstępnej inkubacji z 3% normalnym roztworem surowicy koziej w PBS z dodatkiem 0,2% Tritonu X-100 (PBST), próbki inkubowano przez 1 godzinę w 37 °C z roztworem PBST zawierającym 1% normalny roztwór surowicy koziej i przeciwciała pierwszorzędowe: mysie monoklonalne przeciwciała przeciwko NF-κB p65 (nr kat. sc-8008; Santa Cruz Biotechnology, USA; rozcieńczenie 1: 300) i królicze poliklonalne przeciwciała przeciwko NF-κB p50 (nr kat. sc-114; Santa Cruz Biotechnology, USA; rozcieńczenie 1: 3400). Następnie skrawki przemywano trzykrotnie roztworem PBS i inkubowano przez 1 godzinę

w 37 °C z mieszaniną przeciwciał drugorzędowych, sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym: przeciwciało kozie anti-mysie Alexa Fluor 594 (nr kat. A11020; Invitrogen-Molecular Probes, USA; rozcieńczenie 1: 100) i przeciwciało kozie anti-królicze Alexa Fluor 488 (nr kat. A11070; Invitrogen-Molecular Probes, USA; rozcieńczenie 1: 100). Na koniec próbki opłukano trzykrotnie roztworem PBS i pozostawiono do wyschnięcia. W kolejnym etapie znakowane skrawki przemywano w PBS i inkubowano w roztworze barwnika Hoechst w PBS (1 µg/ml) przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Nadmiar barwnika został usunięty, a preparaty zamknięto szkiełkiem nakrywkowym za pomocą Vectashield Mounting Medium do mikroskopii fluorescencyjnej. Następnie skrawki analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon, Japonia) i fotografowano przy identycznym oświetleniu preparatu za pomocą kamery CCD (Nikon, Japonia). Specyficzność znakowania immunohistochemicznego zweryfikowano wykonując barwienie metodą kontroli negatywnej, w której nie dodano przeciwciała pierwszorzędowego do mieszaniny inkubacyjnej. W żadnej z próbek należącej do kontroli negatywnej nie zaobserwowano barwienia immunohistochemicznego. Badacz oceniający preparaty nie miał wiedzy, która grupę doświadczalną analizuje. Intensywność barwienia została następnie wyrażona jako wartość gęstości optycznej w skali szarości (skala 8-bitowa), przy użyciu oprogramowania komputerowego Scion (NIH, Frederick, MD, USA). Analizę przeprowadzono poprzez obrysowywanie fragmentów skrawka płuca widocznych w polu obserwacyjnym mikroskopu. We wszystkich grupach badanych, dla każdej myszy wykonano trzy preparaty, z kolei dla każdego preparatu zostały wykonane trzy obrysy tkanki płuc (z pominięciem pustych przestrzeni pęcherzykowych). Pomiarzy densytometryczne były każdorazowo wykonywane z odjęciem tła widocznego na zdjęciu. Wyniki zostały wyrażone jako średnia wartość ze wszystkich pomiarów dla danej grupy.

3.17. Analiza statystyczna wyników

Wyniki przedstawiono jako średnia \pm błąd standardowy średniej (SEM). Liczebność zwierząt w grupach doświadczalnych została podana w opisach do poszczególnych rycin. Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa lub testem Duncana oraz test T-Studenta. Wyniki uznawano za znamienne, gdy poziom istotności p był mniejszy niż 0,05. Do wykonania obliczeń zastosowano oprogramowanie STATISTICA 12 (StatSoft, Kraków, Polska).

4. WYNIKI

Eksperymenty zostały przeprowadzone w dwóch etapach, co przedstawiono w Tabeli 2. W pierwszym etapie grupy badawcze stanowiły myszy otrzymujące hybrydę PK20, mieszaninę jej obu farmakoforów podanych jednocześnie lub deksametazon. Grupy te zostały porównane ze zwierzętami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. Drugi etap obejmował zwierzęta, u których przed zastosowaniem hybrydy, podawano związki antagonistyczne: chlorowodorek naloksonu lub SR 142948. Uzyskane wyniki odniesiono do myszy otrzymujących wyłącznie badaną chimerę i myszy uczulonych otrzymujących fizjologiczny roztwór soli (kontrola pozytywna). Doświadczenia poprzedzono eksperymentem z zastosowaniem modelu nadwrażliwości kontaktowej, który pozwolił na wybór dawki chimery PK20.

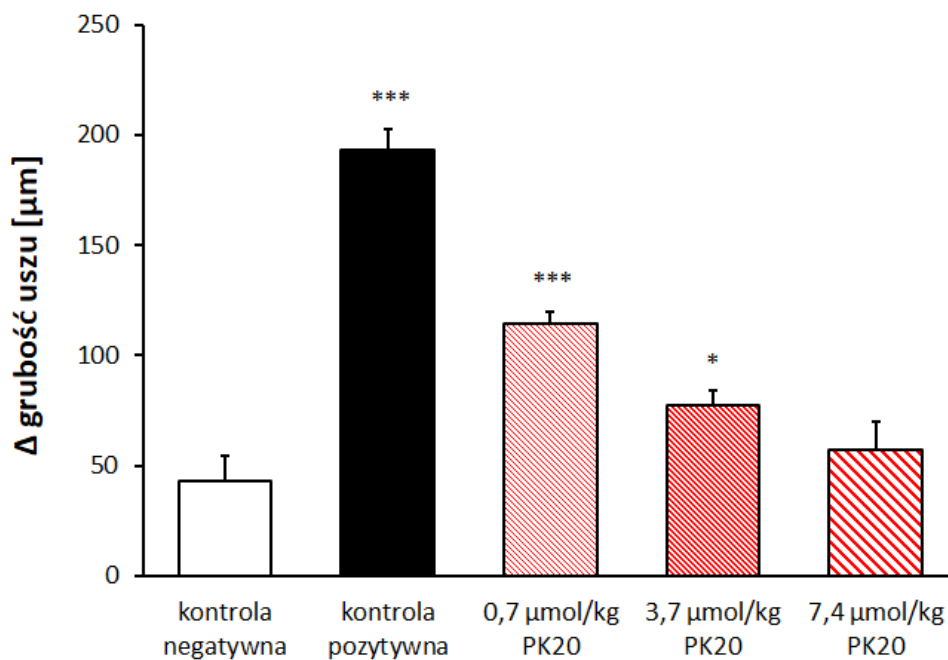
ETAP I		ETAP II
KONTROLA NEGATYWNA		
KONTROLA POZYTYWNA	→	KONTROLA POZYTYWNA
HYBRYDA PK20	→	HYBRYDA PK20
MIESZANINA FARMAKOFORÓW		
DEKSAMETAZON		
NALOKSON HCl + HYBRYDA PK20		
SR 142948 + HYBRYDA PK20		

Tab. 2. Grupy zwierząt doświadczalnych analizowane w poszczególnych etapach badań.

4.1. Wpływ hybrydy PK20 na obrzęk uszu w modelu nadwrażliwości kontaktowej - wybór dawki badanego związku

Wyznaczenia dawki hybrydy PK20, stosowanej następnie w dalszych eksperymentach, dokonano przy wykorzystaniu modelu nadwrażliwości kontaktowej. Wywołanie reakcji nadwrażliwości za pomocą DNFB spowodowało ponad czterokrotne zwiększenie grubości uszu u myszy uczulonych (kontrola pozytywna) w porównaniu z grupą

myszy nieuczulanych haptenem, stanowiących kontrolę negatywną. Dootrzewnowa aplikacja hybrydy PK20 (w dawkach: 0,7, 3,7 lub 7,4 $\mu\text{mol/kg}$) w sposób dawkozależny zmniejszyła obrzęk uszu u badanych zwierząt (Ryc. 9). Po zastosowaniu największej dawki chimery grubość uszu powróciła niemal do wartości początkowych - nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą zwierząt otrzymujących hybrydę PK20 w dawce 7,4 $\mu\text{mol/kg}$, a zwierzętami stanowiącymi kontrolę negatywną ($p = 0,44$). W związku z tym, powyższa dawka została wybrana do dalszych badań.



Ryc. 9. Wielkość obrzęku uszu po 24 godzinach od wywołania reakcji zapalnej. Efekt po podaniu hybrydy PK20 w dawkach: 0,7, 3,7 lub 7,4 $\mu\text{mol/kg}$. Różnice grubości uszu obliczono poprzez odjęcie wartości uzyskanej dla ucha kontrolnego od wartości uzyskanej dla ucha uczulanego. Porównanie z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. Analizę statystyczną wykonano za pomocą testu T-Studenta. N = 6-8 myszy w grupie. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs kontrola negatywna.

4.2. Wpływ hybrydy PK20 na proces zapalny w mysim modelu astmy niealergiczej. Porównanie aktywności hybrydy z działaniem mieszaniny jej obu farmakoforów i deksametazonu

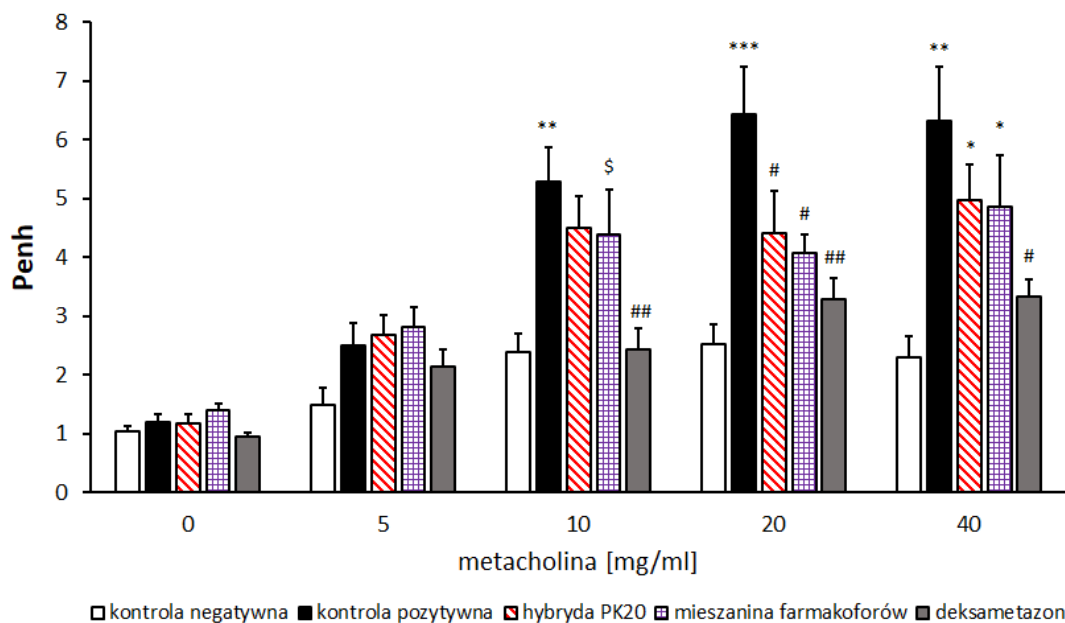
Wartości liczbowe wyników dla I etapu badań zostały zestawione w Tabeli 3.

parametr \ grupa	kontrola negatywna	kontrola pozytywna	hybryda PK20	mieszanina farmakoforów	deksametazon
Penh NaCl	1,04 ± 0,09	1,19 ± 0,14	1,18 ± 0,15	1,39 ± 0,13	0,94 ± 0,08
5 mg/ml	1,49 ± 0,29	2,51 ± 0,37	2,68 ± 0,34	2,82 ± 0,32	2,14 ± 0,30
10 mg/ml	2,38 ± 0,33	5,29 ± 0,57	4,49 ± 0,55	4,39 ± 0,77	2,43 ± 0,36
20 mg/ml	2,51 ± 0,33	6,44 ± 0,80	4,40 ± 0,72	4,07 ± 0,31	3,29 ± 0,35
40 mg/ml	2,30 ± 0,35	6,31 ± 0,94	4,97 ± 0,60	4,86 ± 0,87	3,34 ± 0,28
całkowita liczba komórek x10 ⁵	3,25 ± 0,59	8,68 ± 1,08	4,33 ± 0,70	6,36 ± 0,77	5,18 ± 0,37
liczba neutrofilów x10 ⁵	0,03 ± 0,01	0,45 ± 0,12	0,07 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,06 ± 0,02
skala stanu zapalnego	1,21 ± 0,14	2,83 ± 0,09	1,53 ± 0,11	2,25 ± 0,16	1,42 ± 0,14
IL-1α [pg/ml]	4,45 ± 0,90	8,61 ± 0,57	5,15 ± 0,92	7,22 ± 0,90	5,66 ± 0,43
IL-2 [pg/ml]	2,84 ± 0,47	6,18 ± 0,78	2,90 ± 0,37	3,10 ± 0,54	3,30 ± 0,34
IL-13 [pg/ml]	35,67 ± 7,85	66,78 ± 7,04	38,76 ± 4,96	67,86 ± 12,88	45,27 ± 2,38
TNF-α [pg/ml]	21,84 ± 1,80	39,30 ± 3,29	21,81 ± 2,29	34,75 ± 3,81	21,29 ± 2,62
IL-1β [pg/mg]	1184,60 ± 52,04	1490,76 ± 50,13	1121,90 ± 84,55	1313,86 ± 177,47	1158,35 ± 89,87
IL-17A [pg/mg]	64,42 ± 2,70	83,11 ± 3,88	56,39 ± 3,54	69,65 ± 11,22	46,72 ± 4,29
CXCL1 [pg/mg]	553,18 ± 54,16	1089,19 ± 111,28	578,04 ± 66,39	870,59 ± 99,31	581,92 ± 67,43
IL-12p40 [pg/mg]	186,91 ± 17,25	503,30 ± 76,16	161,77 ± 31,13	82,91 ± 7,15	71,04 ± 6,06
RANTES [pg/mg]	912,36 ± 302,67	2233,92 ± 169,64	696,29 ± 110,20	720,88 ± 102,47	667,52 ± 106,67
MCPT-1 [ng/mg]	1,80 ± 0,15	2,41 ± 0,14	1,82 ± 0,17	1,94 ± 0,33	1,74 ± 0,15
MDA [μg/mg]	2,19 ± 0,28	5,30 ± 0,81	2,01 ± 0,40	2,48 ± 0,56	2,17 ± 0,59
sPLA ₂ [μmol/min/mg]	16,78 ± 4,09	35,70 ± 2,00	19,37 ± 3,10	15,06 ± 4,24	22,12 ± 5,00
albuminy [μg/mg]	1,00 ± 0,19	2,75 ± 0,34	1,66 ± 0,34	1,18 ± 0,13	1,44 ± 0,28
NF-κB p50	27,38 ± 1,09	120,59 ± 3,76	28,04 ± 0,93	115,82 ± 2,16	27,41 ± 0,93
NF-κB p65	19,94 ± 0,53	110,69 ± 4,42	19,73 ± 0,70	106,61 ± 3,11	19,32 ± 0,77

Tab. 3. Zestawienie wyników otrzymanych w I etapie doświadczeń. Wyniki przedstawiono jako średnia ± błąd standardowy średniej (SEM). Różnice statystycznie istotne zostały oznaczone na rycinach 10, 11, 13-19, 20B i 20C.

4.2.1. Wpływ hybrydy PK20 na nadreaktywność oskrzeli

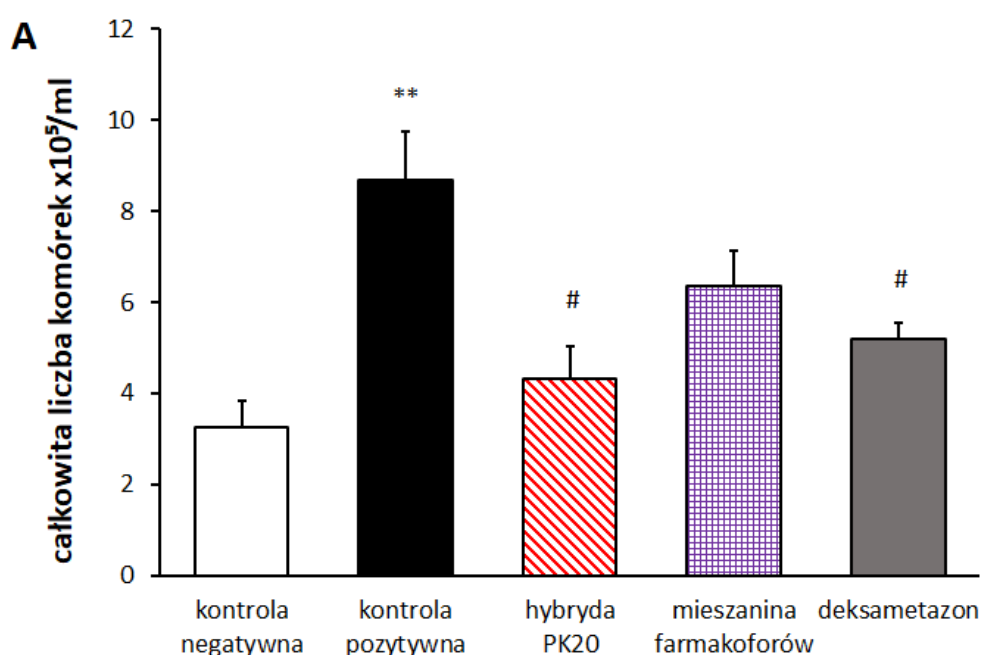
Pomiary skurczu oskrzeli zostały przeprowadzone w mysiej komórce pletyzmograficznej i wyrażone poprzez parametr pauzy wydłużonej (Penh). Naskórne podanie DNFB i dotchawicza prowokacja DNS skutkowały wystąpieniem nadreaktywności oskrzeli w odpowiedzi na inhalacje metacholiny o wzrastającym stężeniu (5, 10, 20 i 40 mg/ml), co znalazło odzwierciedlenie we wzroście wartości Penh. Istotnie statystycznie różnice pomiędzy grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną widoczne były począwszy od dawki metacholiny równej 10 mg/ml (Ryc. 10). Po dwukrotnej, dootrzewnowej iniekcji zarówno hybrydy PK20, jak i mieszaniny jej obu farmakoforów zaobserwowano wyraźną tendencję do zmniejszania nadreaktywności oskrzeli w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę pozytywną. Efekt ten osiągnął istotność statystyczną przy dawce metacholiny 20 mg/ml. Nie zaobserwowano natomiast znamiennych różnic pomiędzy zwierzętami nieuczulanymi (kontrola negatywna), a grupą uczulaną, u której zastosowano związek odniesienia - deksametazon ($p = 0,26$ dla najwyższej dawki metacholiny).

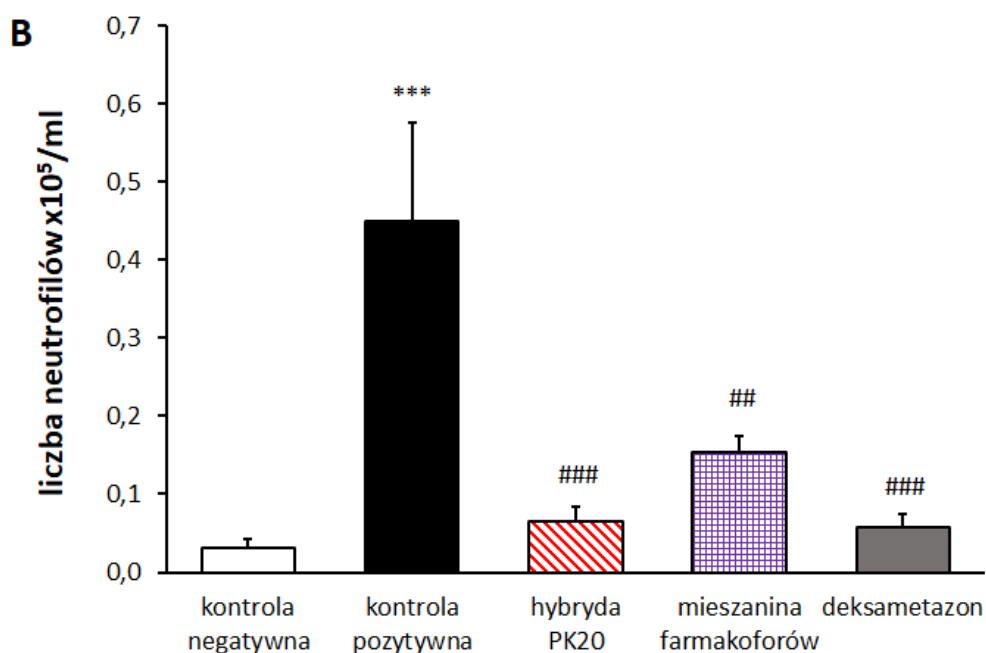


Ryc. 10. Nadreaktywność dróg oddechowych wyrażona jako wartość Penh, w odpowiedzi na zastosowanie wzrastających dawek metacholiny, po 24 godzinach od dotchawicznej prowokacji DNS. Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszaniny jej obu farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newman-Keulsa. $N = 7-8$ myszy w grupie. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs kontrola negatywna. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs kontrola pozytywna. \$ $p < 0,05$ vs deksametazon.

4.2.2. Wpływ hybrydy PK20 na liczbę komórek odpowiedzi zapalnej w płynie pęcherzykowo-oskrzelowym (BALF) i tkance płucnej

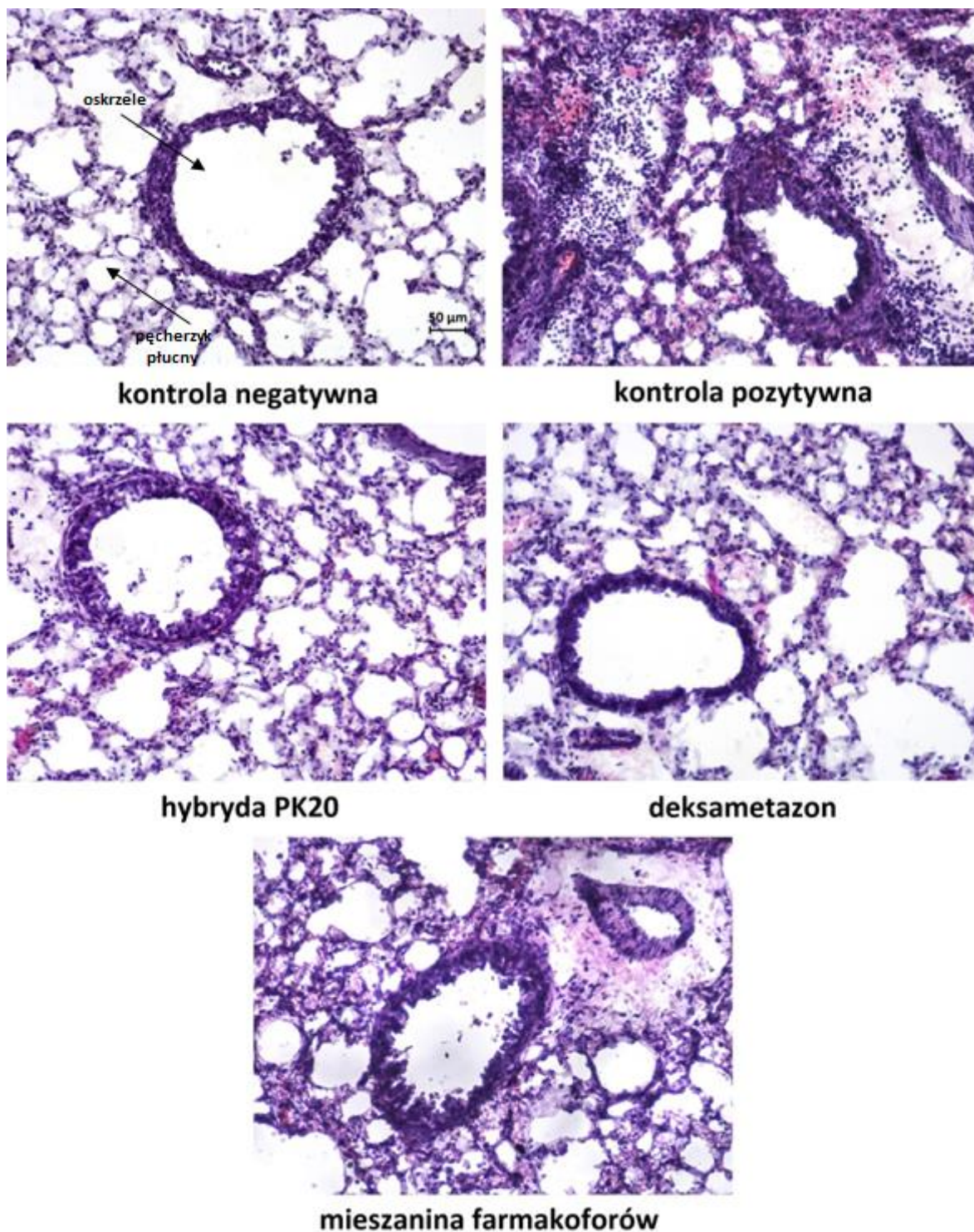
Liczbę komórek wskazujących na rozwój stanu zapalnego analizowano zarówno w płynie pęcherzykowo-oskrzelowym, jak i w preparatach histologicznych tkanki płucnej pobranej od zwierząt doświadczalnych. Wywołanie odpowiedzi zapalnej za pomocą DNS u myszy uczulonych uprzednio DNFB spowodowało infiltrację komórek odpowiedzi zapalnej do BALF. Na komórki napływające do dróg oddechowych w przebiegu zapalenia składały się przede wszystkim makrofagi, neutrofile i w najmniejszym stopniu limfocyty, przy czym zwiększony odsetek neutrofilów stanowi cechę charakterystyczną dla astmy nieatopowej. Dootrzewnowe podanie hybrydy PK20 zmniejszyło całkowitą liczbę komórek odpowiedzi zapalnej (Ryc. 11A), w tym także liczbę neutrofilów (Ryc. 11B) w BALF w porównaniu z grupą myszy uczulanych, u których zastosowano fizjologiczny roztwór soli. Co więcej, nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupą zwierząt, która otrzymała chimerę, a zwierzętami u których zastosowano deksametazon. Podanie mieszaniny farmakoforów związku PK20 również ograniczyło napływ leukocytów, efekty te były jednak słabsze niż po zastosowaniu hybrydy, szczególnie w przypadku całkowitej liczby komórek, gdzie analiza statystyczna nie wykazała znamiennych różnic w odniesieniu do myszy traktowanych jako kontrola pozytywna ($p = 0,07$).



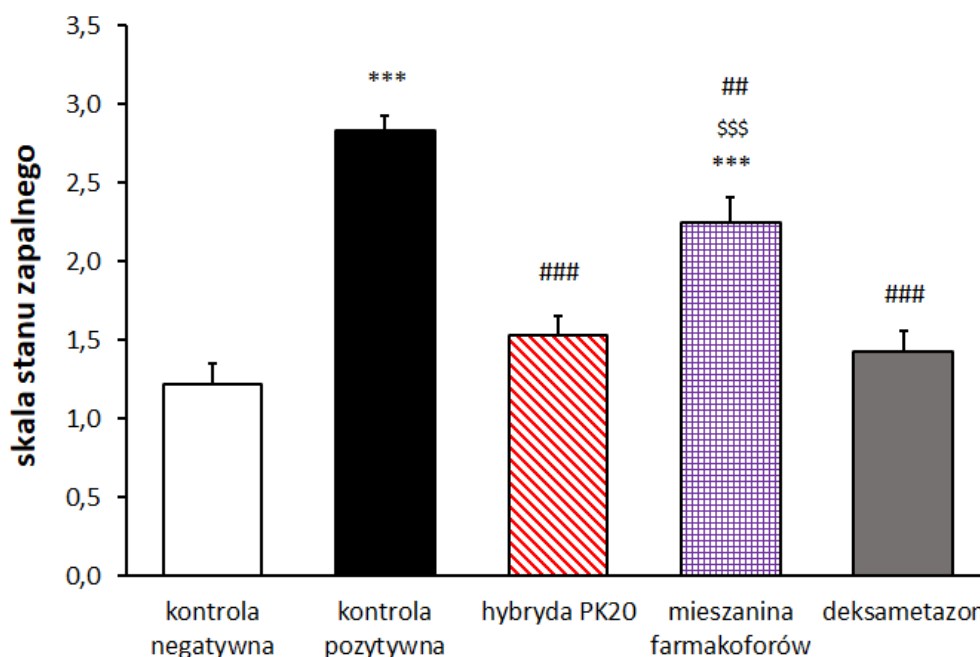


Ryc. 11. Całkowita liczba komórek odpowiedzi zapalnej (A) i neutrofilów (B) w BALF 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszaniny jej farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. N = 6-9 myszy w grupie. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs kontrola negatywna. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs kontrola pozytywna.

Podobnie zmiany zaobserwowano w preparatach histologicznych płuc, które ujawniły znaczną akumulację komórek odpowiedzi zapalnej w obszarach okołoskrzelowych w grupie zwierząt stanowiących kontrolę pozytywną (Ryc. 12). Obserwacje te zostały ilościowo wyrażone przy użyciu skali stopnia zaawansowania stanu zapalnego (Ryc. 13). Myszy otrzymujące hybrydę PK20, mieszaninę jej obu strukturalnych elementów i deksametazon cechowały się zmniejszoną liczbą leukocytów w tkance płucnej, przy czym zdecydowanie najniższy efekt przeciwzapalny widoczny był w grupie zwierząt leczonych mieszaniną farmakoforów hybrydy ($p < 0,001$ względem hybrydy PK20).



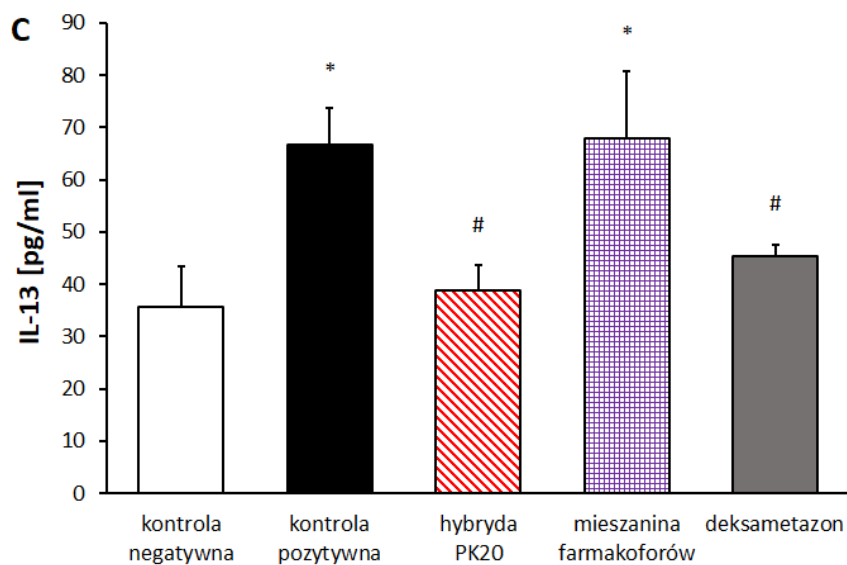
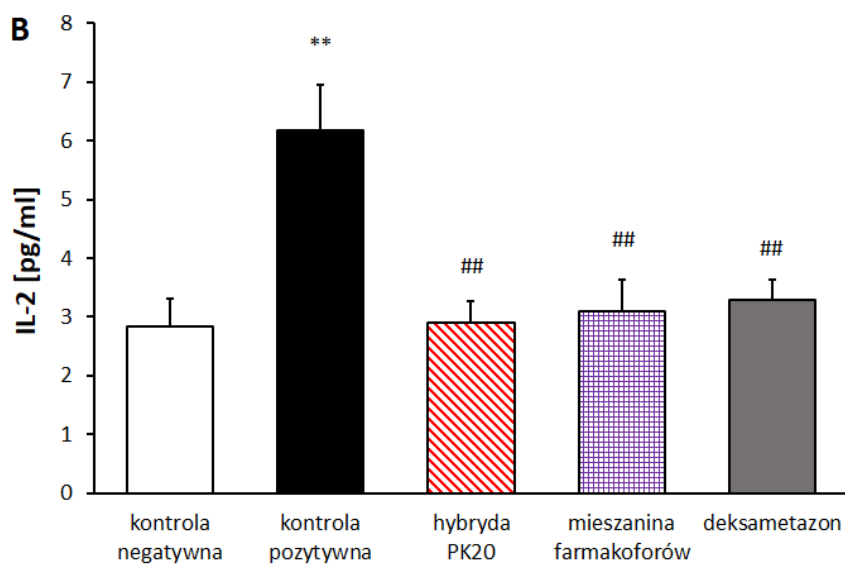
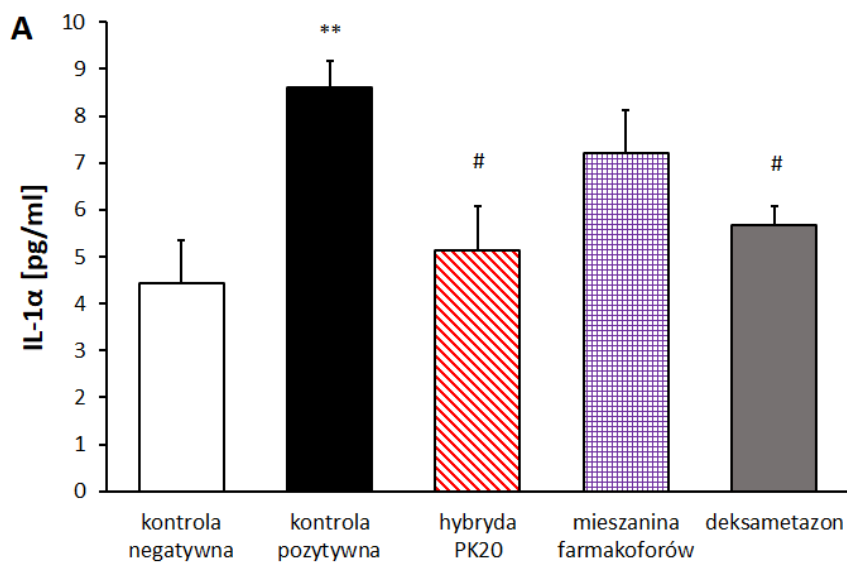
Ryc. 12. Analiza histologiczna tkanki płucnej z zastosowaniem barwienia eozyną i hematoksyliną: zdjęcia wykonane po 24 godzinach od dotchawiczej prowokacji DNS (powiększenie 10-krotne). Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszaniny jej obu farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną.

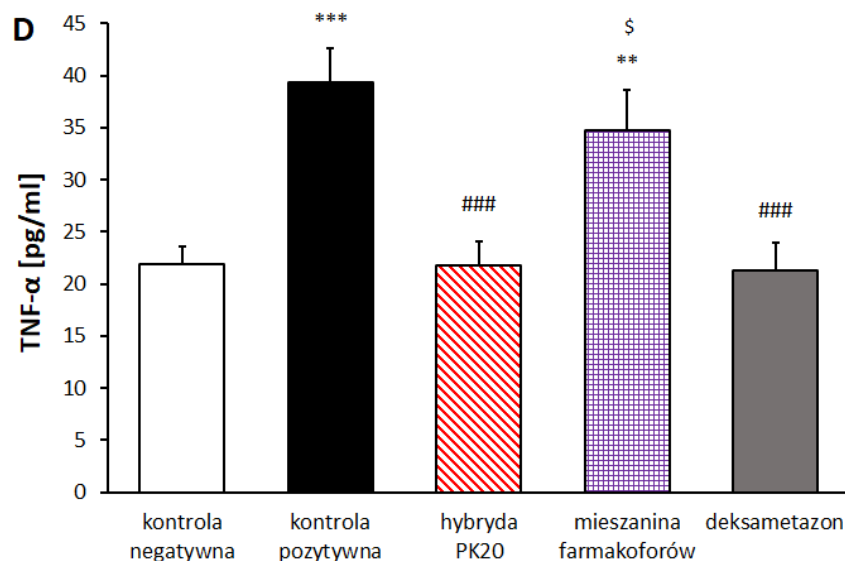


Ryc. 13. Skala stopnia zaawansowania stanu zapalnego na podstawie preparatów histologicznych tkanki płucnej pobranej 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszanki jej farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. N = 4 myszy w grupie. *** $p < 0,001$ vs kontrola negatywna. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs kontrola pozytywna. \$\$\$ $p < 0,001$ vs deksametazon.

4.2.3. Wpływ hybrydy PK20 na poziom cytokin prozapalnych w BALF i homogenatach płuc

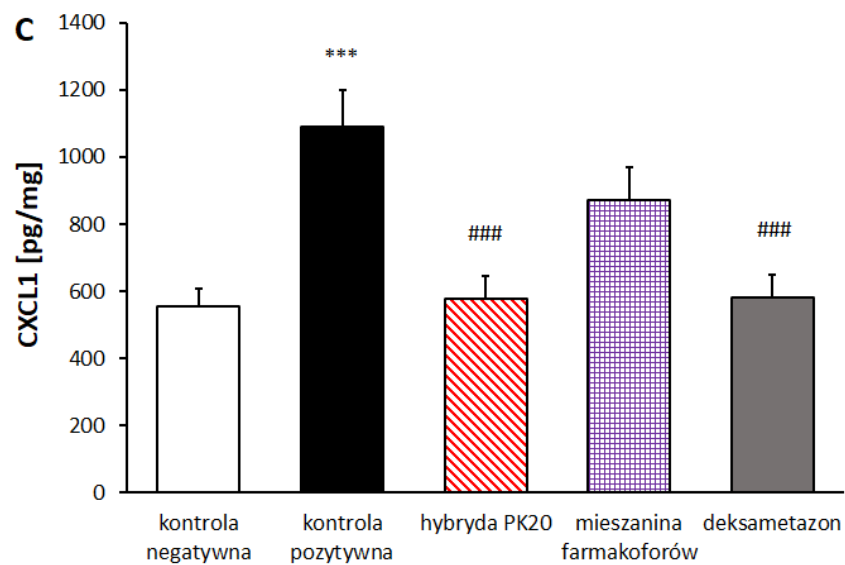
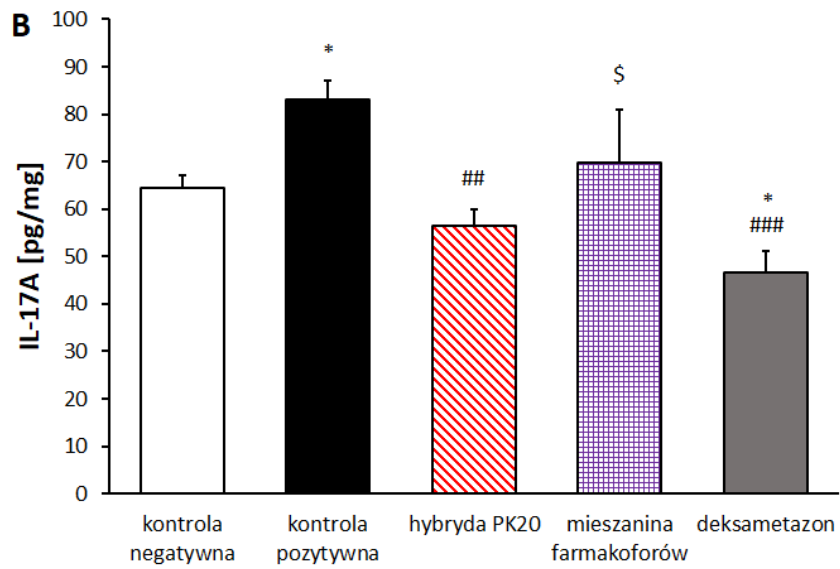
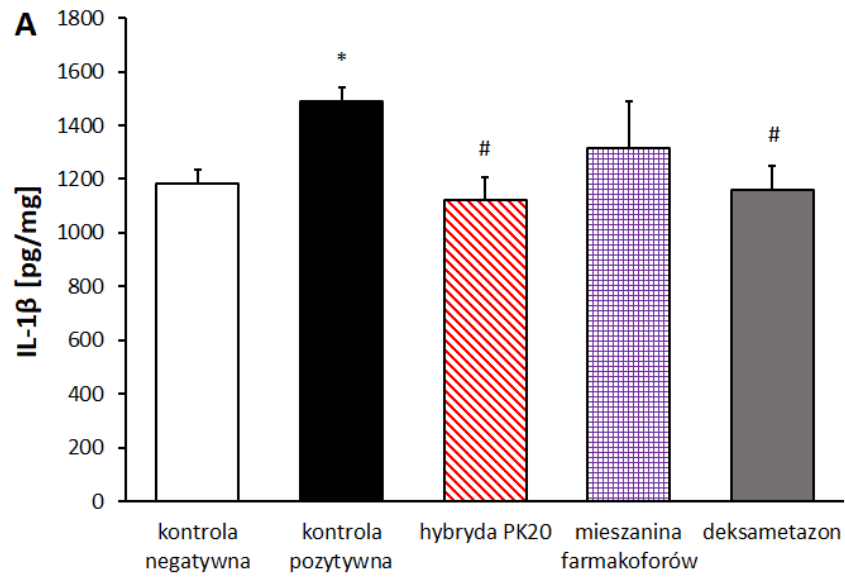
Stężenie cytokin prozapalnych w BALF i homogenatach tkanki płucnej było znacząco wyższe u zwierząt uczulonych otrzymujących fizjologiczny roztwór soli (kontrola pozytywna) w zestawieniu z grupą nieuczuloną stanowiącą kontrolę negatywną. Zastosowanie zarówno chimery PK20, jak i deksametazonu istotnie zredukowało poziom IL-1 α , IL-2, IL-13 i TNF- α w BALF (Ryc. 14), podczas gdy równomolowa mieszanka farmakoforów hybrydy w niewielkim stopniu obniżyła stężenie badanych cytokin - efekt ten był znamieny statystycznie jedynie dla IL-2. Istotną różnicę pomiędzy zwierzętami otrzymującymi hybrydę PK20 i mieszankę jej strukturalnych składowych zaobserwowano dla IL-13 ($p = 0,03$) i TNF- α ($p = 0,01$).

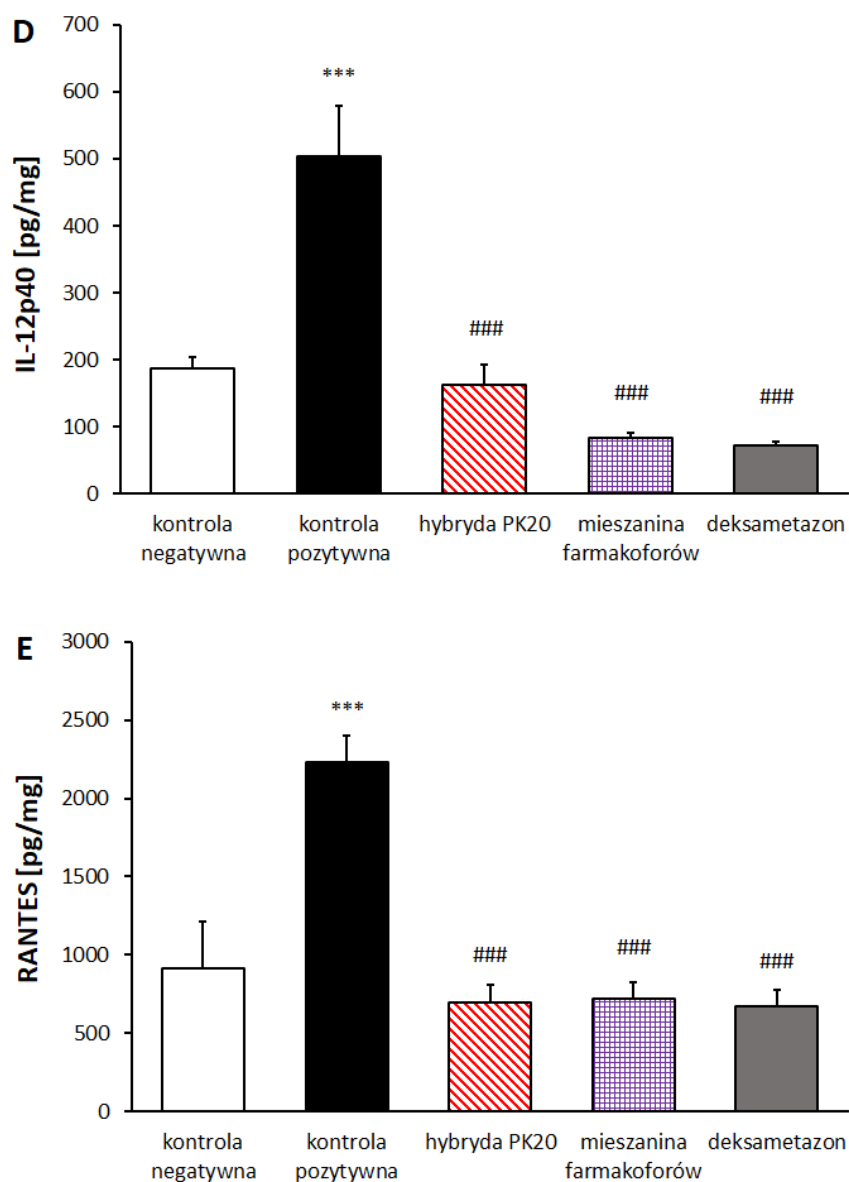




Ryc. 14. Stężenie cytokin prozapalnych: IL-1 α (A), IL-2 (B), IL-13 (C) i TNF- α (D) w BALF 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszaniny jej farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. N = 5-9 myszy w grupie. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs kontrola negatywna. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs kontrola pozytywna. \$ $p < 0,05$ vs deksametazon.

W przypadku analizy poziomu cytokin w homogenach płuc hybryda PK20 i deksametazon w podobnym stopniu zmniejszyły stężenie cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-17A, CXCL1, IL-12p40 i RANTES u uczulanych zwierząt w porównaniu z grupą traktowaną jako kontrola pozytywna. Z kolei mieszanina elementów strukturalnych hybrydy wykazała korzystny wpływ jedynie na poziom RANTES i IL-12p40 (Ryc. 15). Pomimo iż wartość stężenia IL-12p40 u zwierząt leczonych mieszaniną farmakoforów była niemal dwukrotnie niższa w odniesieniu do myszy otrzymujących chimerę PK20, nie wykazano znamiennej różnicy statystycznej między tymi dwoma grupami ($p = 0,17$).

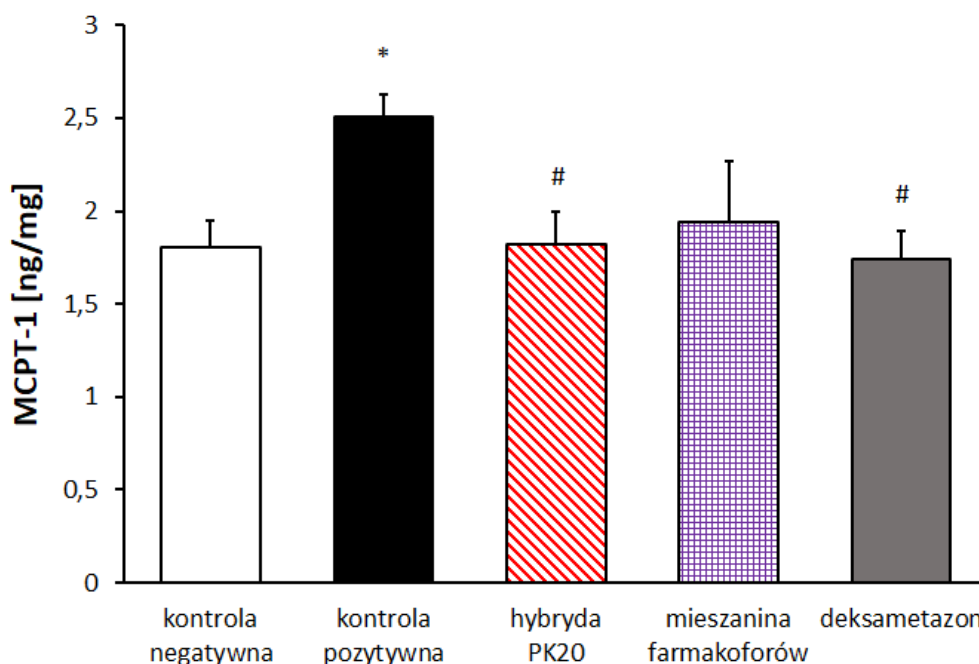




Ryc. 15. Stężenie cytokin prozapalnych: IL-1 β (A), IL-17A (B), CXCL1 (C), IL-12p40 (D) i RANTES (E) w homogenatach płuc 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszaniny jej farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Duncana (IL-1 β , IL-17A) lub testem Newmana-Keulsa (CXCL1, IL-12p40, RANTES). N = 5-7 myszy w grupie. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs kontrola negatywna. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs kontrola pozytywna. \S $p < 0,05$ vs deksametazon.

4.2.4. Wpływ hybrydy PK20 na stężenie mysiej proteazy komórek tłuszczowych 1 (MCPT-1) w homogenatach płuc

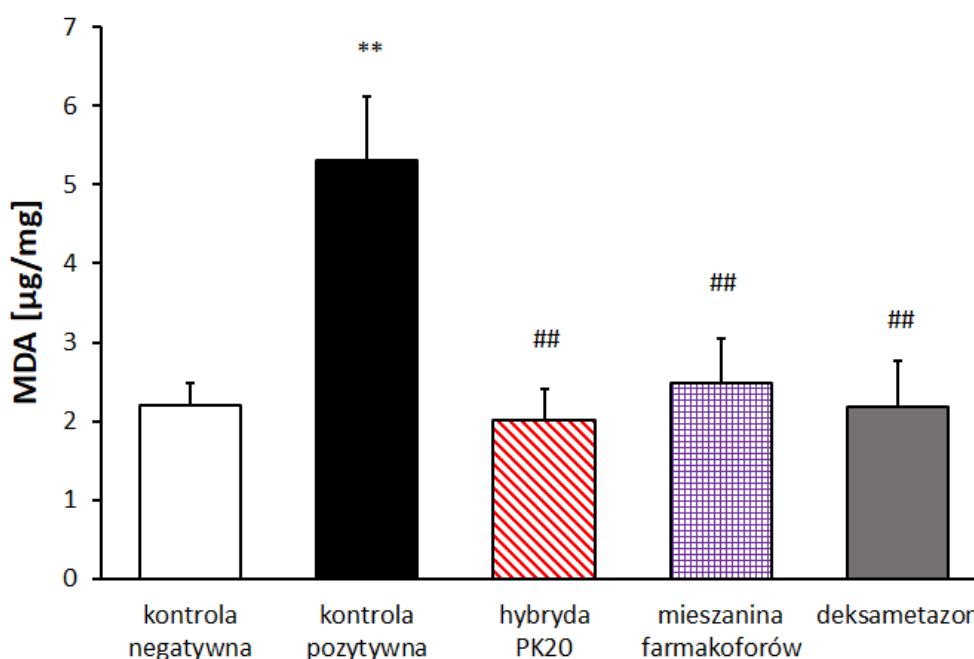
W grupie myszy, u których wywołano reakcję zapalną i podawano 0,9% roztwór NaCl, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia MCPT-1 - markera stanu zapalnego, magazynowanego i wydzielanego przez komórki tłuszczowe. Dootrzewnowe podanie chimery PK20 i deksametazonu zredukowało znamienne poziomy badanej proteazy (Ryc. 16). W przypadku mieszanki farmakoforów poziom enzymu nie różnił się w sposób istotny statystycznie od grupy stanowiącej kontrolę pozytywną ($p = 0,06$).



Ryc. 16. Stężenie mysiej proteazy komórek tłuszczowych 1 (MCPT-1) w homogenatach tkanki płucnej 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszanki jej farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Duncana. N = 5-7 myszy w grupie. * $p < 0,05$ vs kontrola negatywna. # $p < 0,05$ vs kontrola pozytywna.

4.2.5. Wpływ hybrydy PK20 na stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w homogenatach płuc

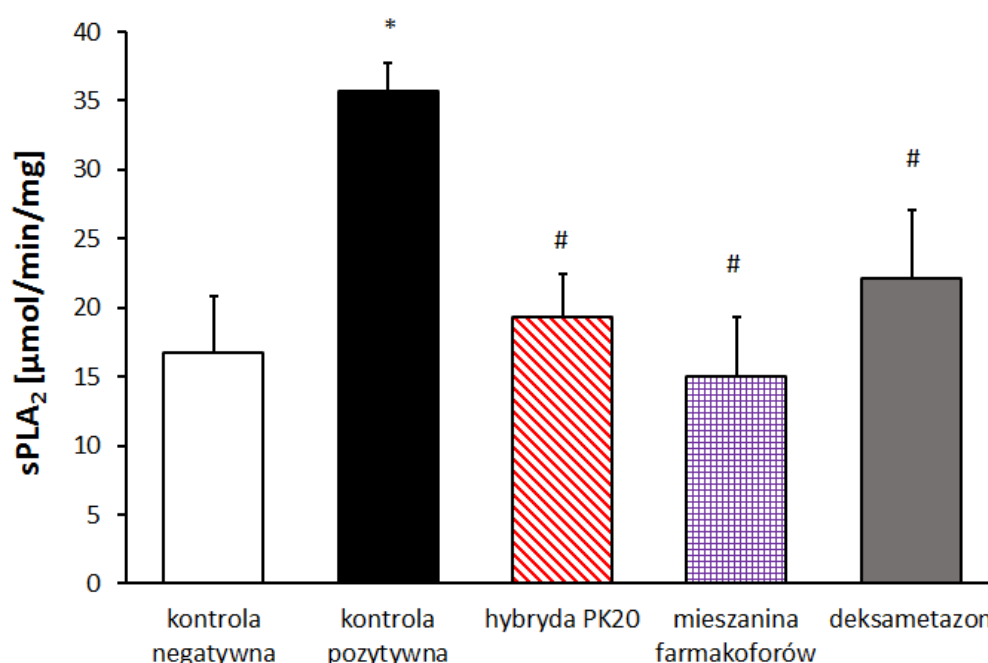
Uczulenie i wywołanie reakcji za pomocą DNFB/DNS skutkowało zwiększeniem stężenia dialdehydu malonowego, będącego produktem peroksydacji lipidów i wskaźnikiem stresu oksydacyjnego, który towarzyszy procesom zapalnym. W przeprowadzonych doświadczeniach, we wszystkich trzech grupach: po podaniu hybrydy PK20, mieszaniny jej farmakoforów i deksametazonu zaobserwowano ponad dwukrotny spadek poziomu MDA w odniesieniu do zwierząt uczulanych, u których zastosowano fizjologiczny roztwór soli (Ryc. 17). Wartość stężenia MDA pomiędzy poszczególnymi grupami badanymi nie różniła się sposób w znamienny.



Ryc. 17. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w homogenatach płuc 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszaniny jej farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. N = 5-8 myszy w grupie. ** $p < 0,01$ vs kontrola negatywna. ## $p < 0,01$ vs kontrola pozytywna.

4.2.6. Wpływ hybrydy PK20 na aktywność sekrecyjnej fosfolipazy A₂ (sPLA₂) w homogenatach płuc

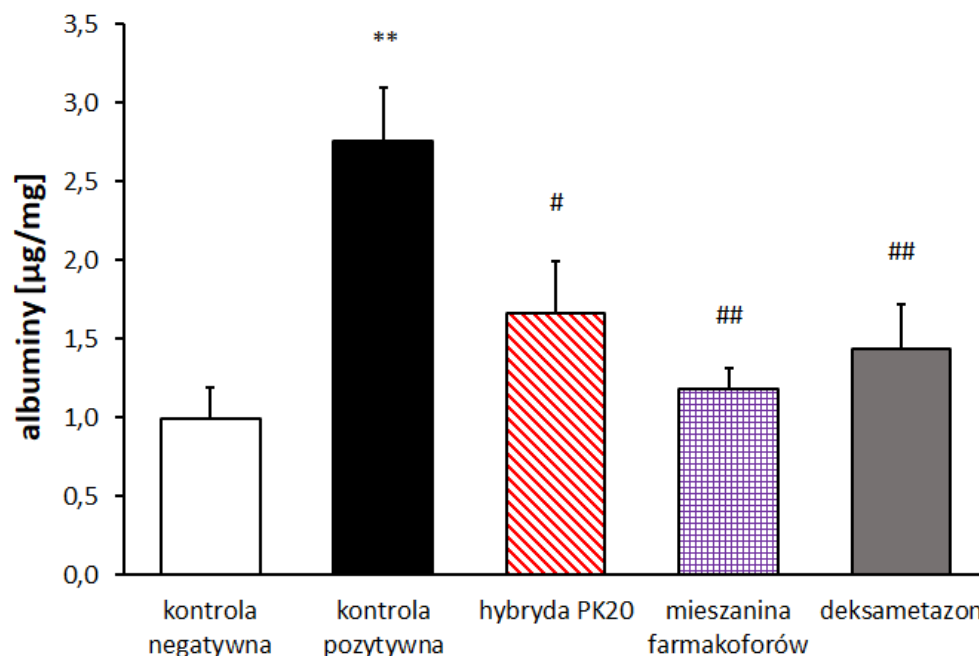
Grupa myszy traktowanych jako kontrola pozytywna cechowała się zwiększoną aktywnością sekrecyjnej fosfolipazy A₂, która zapoczątkowuje szlak przemian kwasu arachidonowego, będącego źródłem mediatorów zapalnych. Dwukrotna iniekcja hybrydy PK20, mieszaniny elementów strukturalnych związku i deksametazonu spowodowały obniżenie aktywności badanego parametru (Ryc. 18). Uzyskane wyniki były porównywalne z aktywnością fosfolipazy w grupie zwierząt nieuczulanych (kontrola negatywna). Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy myszami otrzymującymi chimerę PK20 i mieszaninę jej obu farmakoforów ($p = 0,88$).



Ryc. 18. Aktywność sekrecyjnej fosfolipazy A₂ (sPLA₂) w homogenatach płuc 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszaniny jej farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. N = 4-5 myszy w grupie. * $p < 0,05$ vs kontrola negatywna. # $p < 0,05$ vs kontrola pozytywna.

4.2.7. Wpływ hybrydy PK20 na stężenie albumin w BALF

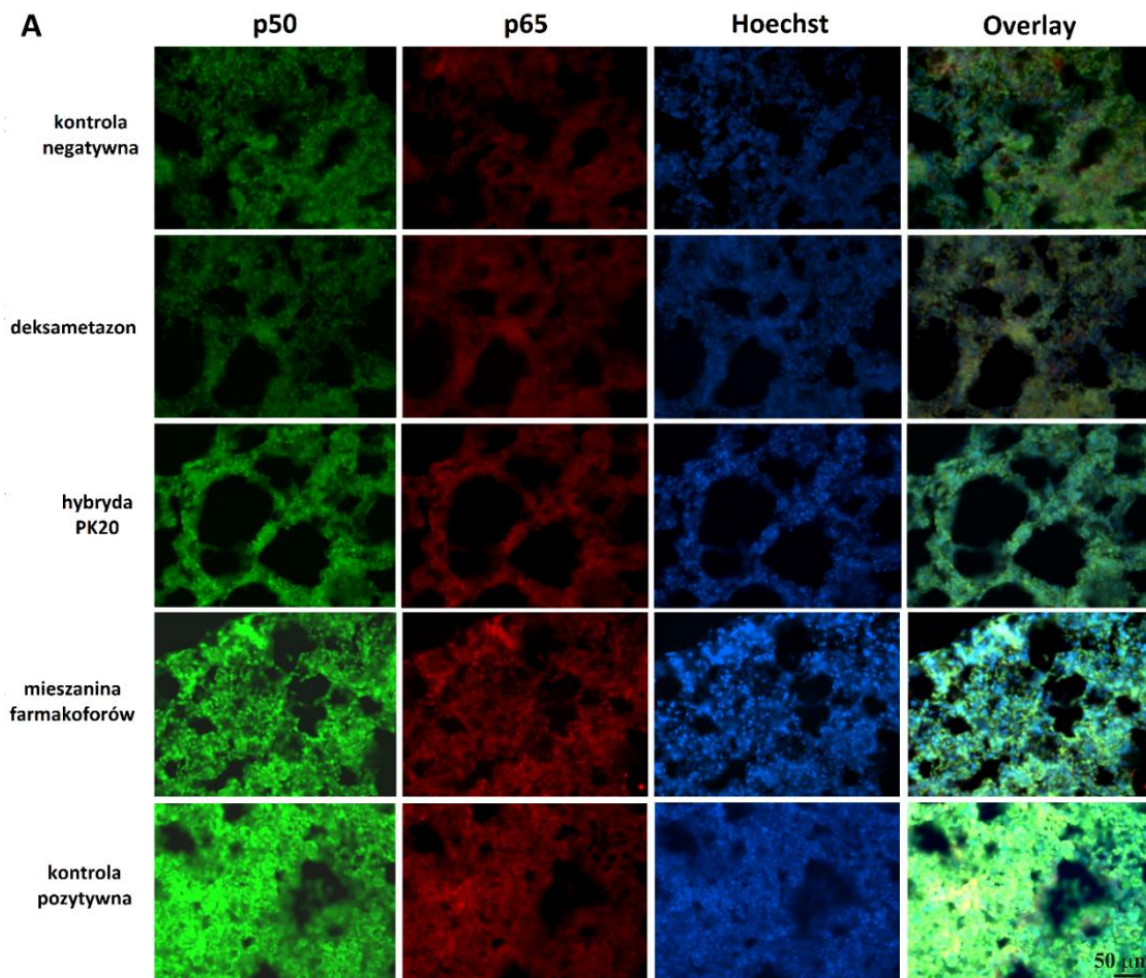
Znaczny wzrost stężenia albumin, który może świadczyć o przejściu makromolekuł z mikrokrążenia płucnego do przestrzeni pęcherzykowo-oskrzelowej, był widoczny u myszy uczulonych otrzymujących fizjologiczny roztwór soli w odniesieniu do zwierząt nieuczulonych (kontrola negatywna). Korzystny wpływ na ten parametr zaobserwowano we wszystkich trzech badanych układach: hybryda PK20, mieszanina jej farmakoforów oraz deksametazon obniżyły stosunek albuminy/ białko całkowite w BALF w porównaniu z grupą traktowaną jako kontrola pozytywna (Ryc. 19). Analiza statystyczna nie ujawniła znamienych różnic pomiędzy zwierzętami leczonymi hybrydą PK20 i myszami, u których farmakofory podawano w postaci mieszaniny ($p = 0,47$).

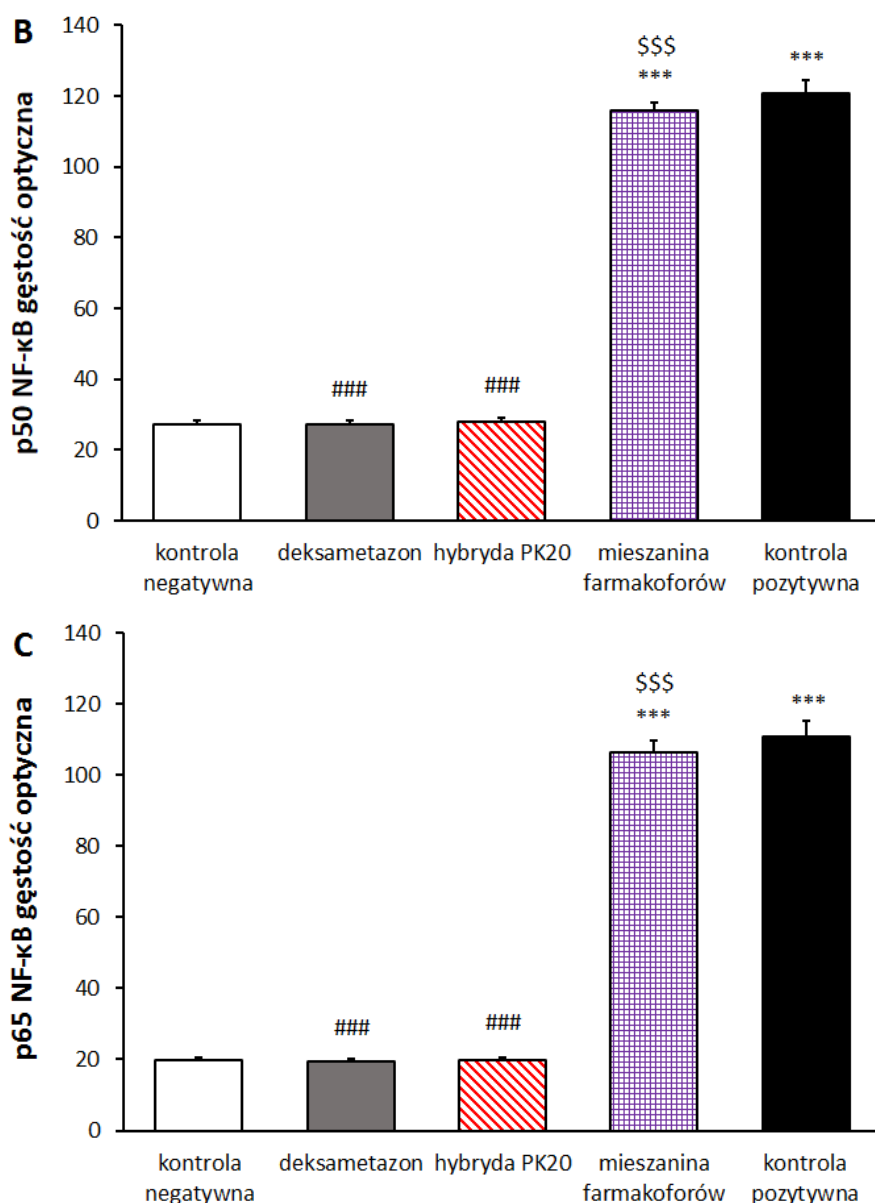


Ryc. 19. Stężenie albumin przypadające na mg białka całkowitego w BALF 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszaniny jej farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. N = 6-8 myszy w grupie. ** $p < 0,01$ vs kontrola negatywna. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs kontrola pozytywna.

4.2.8. Wpływ hybrydy PK20 na ekspresję jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB) w tkance płucnej

Uczulenie myszy za pomocą DNFB, a następnie aplikacja DNS do dróg oddechowych skutkowało istotnym wzrostem intensywności sygnału fluorescencji dla NF-κB w tkance płucnej w odniesieniu do zwierząt uczulonych jedynie roztworem rozpuszczalnika, stanowiących kontrolę negatywną. U myszy traktowanych jako kontrola pozytywna oraz zwierząt leczonych przy użyciu mieszaniny farmakoforów zaobserwowano znaczne pogrubienie przegrody międzypęcherzykowej (Ryc. 20A), a także zwiększoną intensywność barwienia pochodzącą od podjednostek p50 i p65 NF-κB (Ryc. 20B, 20C) w porównaniu z pozostałymi grupami doświadczalnymi. W przeciwieństwie do mieszaniny farmakoforów, podanie hybrydy PK20 i deksametazonu osłabiło znacząco rejestrowany sygnał, co może wskazywać, iż zahamowanie szlaku sygnałowego NF-κB odgrywa istotną rolę w aktywności przeciwzapalnej obu związków ($p < 0,001$ pomiędzy grupami otrzymującymi chimerę PK20 i mieszaninę jej farmakoforów).





Ryc. 20. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego NF-κB 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu hybrydy PK20, mieszanki jej farmakoforów i deksametazonu w porównaniu z grupami stanowiącymi kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną. Barwienie immunofluorescencyjne: podjednostki p50 NF-κB (kolor zielony), p65 NF-κB (kolor czerwony) oraz barwnik Hoechst wskazujący jądra komórkowe w preparatach tkanki płucnej (A). Intensywność barwienia immunofluorescencyjnego mierzona w skali szarości dla p50 NF-κB (B) i p65 NF-κB (C). W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. N = 4 myszy w grupie. *** $p < 0,001$ vs kontrola negatywna. ### $p < 0,001$ vs kontrola pozytywna. \$\$\$ $p < 0,001$ vs deksametazon.

4.3. Udział poszczególnych ścieżek receptorowych (opiodowej i neurotensynowej) w działaniu przeciwzapalnym hybrydy PK20 na podstawie wybranych parametrów

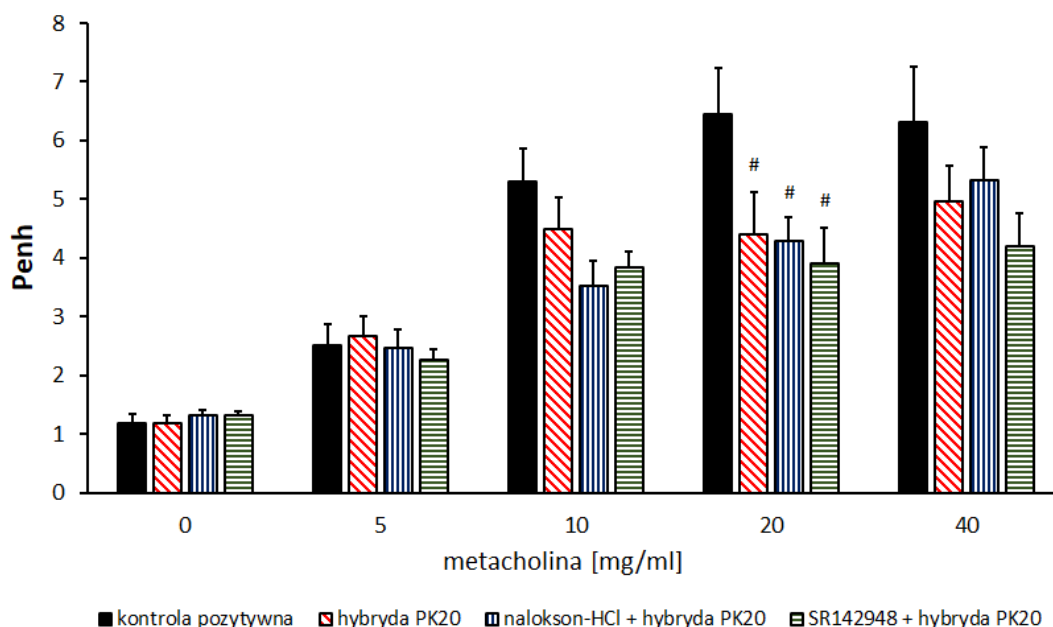
Wartości liczbowe wyników dla II etapu badań zostały zestawione w Tabeli 4.

parametr \ grupa	kontrola pozytywna	hybryda PK20	nalokson-HCl + hybryda PK20	SR 142948 + hybryda PK20
Penh NaCl	1,19 ± 0,14	1,18 ± 0,15	1,31 ± 0,10	1,33 ± 0,06
5 mg/ml	2,51 ± 0,37	2,68 ± 0,34	2,46 ± 0,33	2,26 ± 0,18
10 mg/ml	5,29 ± 0,57	4,49 ± 0,55	3,53 ± 0,42	3,84 ± 0,27
20 mg/ml	6,44 ± 0,80	4,40 ± 0,72	4,29 ± 0,39	3,91 ± 0,62
40 mg/ml	6,31 ± 0,94	4,97 ± 0,60	5,32 ± 0,56	4,20 ± 0,56
całkowita liczba komórek x10 ⁵	8,68 ± 1,08	4,33 ± 0,70	4,89 ± 0,83	5,72 ± 1,29
liczba neutrofilów x10 ⁵	0,45 ± 0,12	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,19 ± 0,06
IL-1α [pg/ml]	8,61 ± 0,57	5,15 ± 0,92	5,25 ± 0,52	7,07 ± 0,96
IL-2 [pg/ml]	6,18 ± 0,78	2,90 ± 0,37	6,75 ± 0,24	6,61 ± 0,29
IL-13 [pg/ml]	66,78 ± 7,04	38,76 ± 4,96	27,68 ± 3,20	32,23 ± 6,68
TNF-α [pg/ml]	39,30 ± 3,29	21,81 ± 2,29	39,47 ± 2,06	32,65 ± 2,51
IL-1β [pg/mg]	1490,76 ± 50,13	1121,90 ± 84,55	1327,99 ± 46,10	1286,69 ± 46,89
IL-17A [pg/mg]	83,11 ± 3,88	56,39 ± 3,54	87,72 ± 6,35	84,47 ± 5,73
CXCL1 [pg/mg]	1089,19 ± 111,28	578,04 ± 66,39	787,60 ± 73,49	672,42 ± 22,67
IL-12p40 [pg/mg]	503,30 ± 76,16	161,77 ± 31,13	270,21 ± 41,17	352,60 ± 41,89
RANTES [pg/mg]	2233,92 ± 169,64	696,29 ± 110,20	1695,53 ± 153,57	1060,92 ± 99,92
MCPT-1 [ng/mg]	2,41 ± 0,14	1,82 ± 0,17	2,54 ± 0,18	2,21 ± 0,15
MDA [μg/mg]	5,30 ± 0,81	2,01 ± 0,40	2,19 ± 0,08	2,08 ± 0,16
sPLA ₂ [μmol/min/mg]	35,70 ± 2,00	19,37 ± 3,10	17,37 ± 2,15	35,79 ± 5,68

Tab. 4. Zestawienie wyników otrzymanych w II etapie doświadczeń. Wyniki przedstawiono jako średnia ± błąd standardowy średniej (SEM). Różnice statystycznie istotne zostały oznaczone na rycinach 21-27.

4.3.1. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na działanie hybrydy PK20 i jej wpływ na nadreaktywność oskrzeli

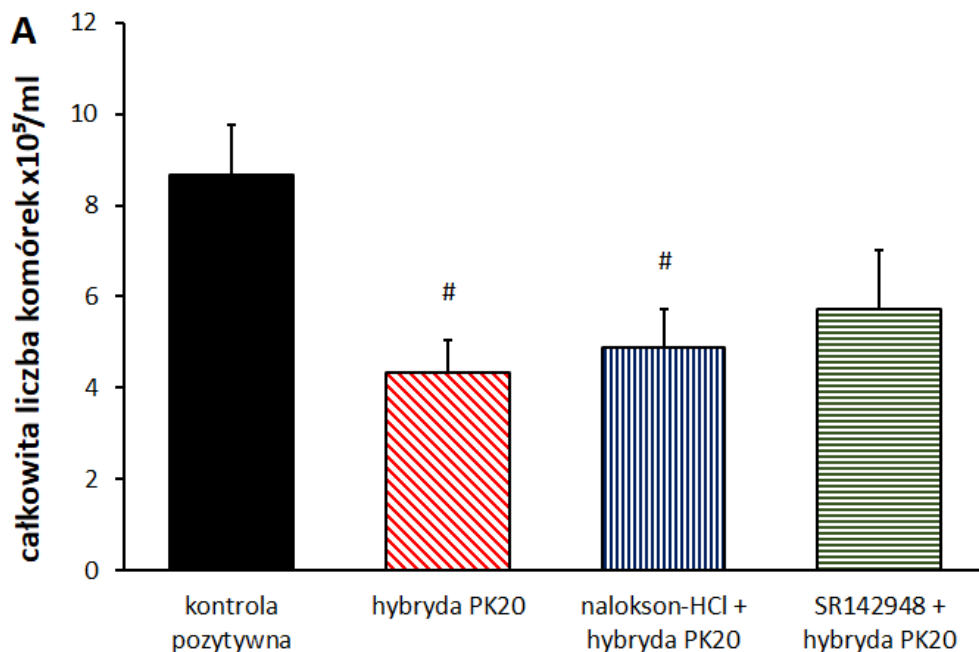
Podanie chlorowodoru naloksonu lub SR 142948 nie spowodowało zmian w potencjale przeciwzapalnym hybrydy PK20 wobec nadreaktywności dróg oddechowych. W całym zakresie stosowanych dawek metacholiny nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy grupą zwierząt leczonych wyłącznie badaną hybrydą, a myszami u których podanie chimery poprzedzone było iniekcją antagonisty poszczególnych receptorów (Ryc. 21). Podobnie jak dla hybrydy PK20, w grupach otrzymujących związki antagonistyczne, efekt znamieny statystycznie wystąpił jedynie przy dawce metacholiny 20 mg/ml.

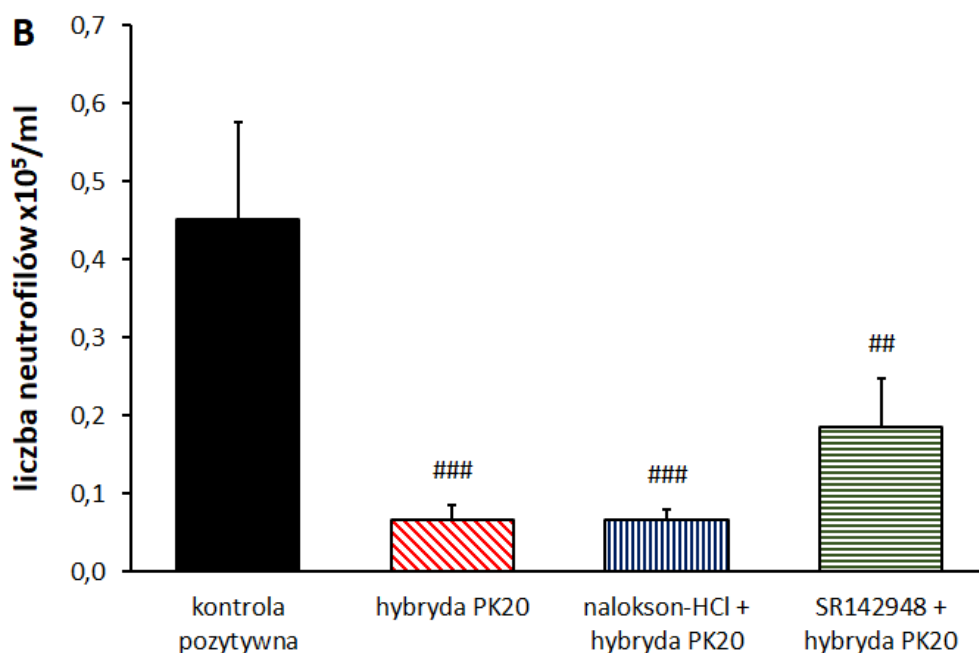


Ryc. 21. Nadreaktywność dróg oddechowych wyrażona jako wartość Penh, w odpowiedzi na zastosowanie wzrastających dawek metacholiny, 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu chlorowodoru naloksonu + hybrydy PK20 lub SR 142948 + hybrydy PK20 w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę pozytywną i grupą otrzymującą wyłącznie hybrydę PK20. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. N = 6-8 myszy w grupie. [#] $p < 0,05$ vs kontrola pozytywna.

4.3.2. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na aktywność hybrydy PK20 i infiltrację komórek odpowiedzi zapalnej do płynu pęcherzykowo-oskrzelowego (BALF)

Badania określające całkowitą liczbę komórek odpowiedzi zapalnej (w tym liczbę neutrofilów) w BALF wykazały, iż blokada receptorów opioidowych poprzez zastosowanie chlorowodoru naloksonu nie wywarła niekorzystnego wpływu na efekt działania hybrydy PK20 (Ryc. 22A, 22B), co mogłoby sugerować, iż aktywność badanego związku wynika w przeważającej mierze z pobudzenia receptorów neurotensynowych. Podanie antagonisty receptorów neurotensynowych spowodowało natomiast częściowe osłabienie działania chimery. Dla całkowitej liczby komórek (Ryc. 22A) analiza statystyczna nie ujawniła istotnych różnic pomiędzy grupą zwierząt otrzymujących SR 142948 + hybrydę PK20, a myszami stanowiącymi kontrolę pozytywną ($p > 0,05$). W przypadku badań neutrofilów obserwowana różnica była już znacznie bardziej zaznaczona ($p = 0,005$), nadal jednak liczba neutrofilów w tej grupie pozostała ponad 2,5-krotnie większa w porównaniu ze zwierzętami otrzymujących hybrydę PK20 lub chlorowodorek naloksonu + hybrydę PK20 (Ryc. 22B).



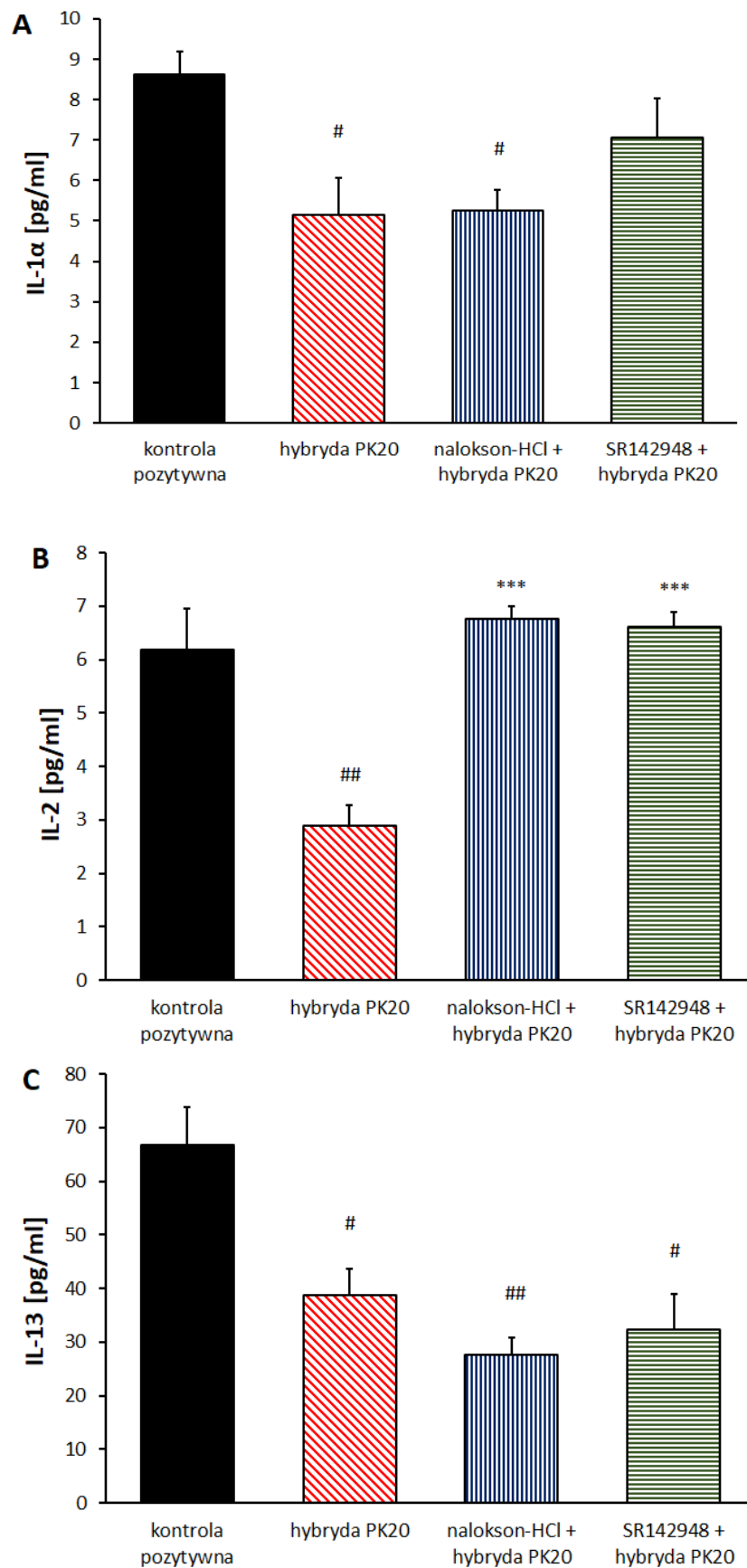


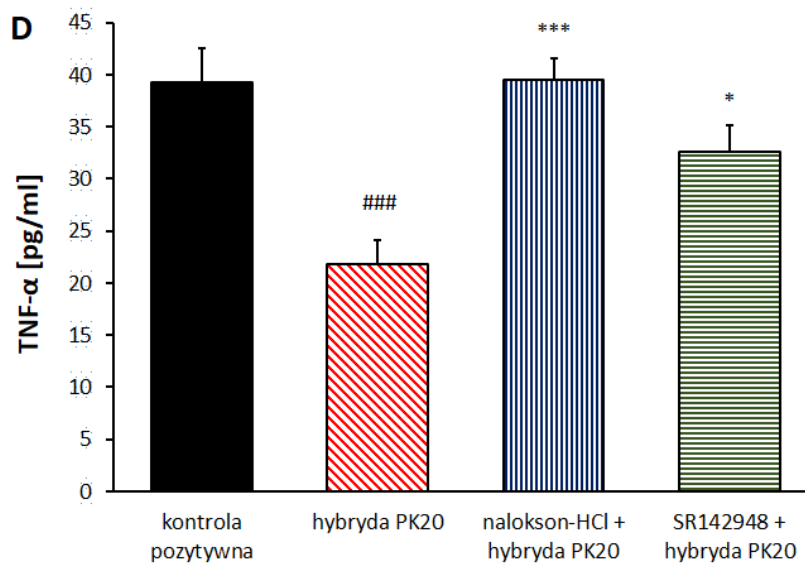
Ryc. 22. Całkowita liczba komórek odpowiedzi zapalnej (A) i neutrofilów (B) w BALF 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu chlorowodoru naloksonu + hybrydy PK20 lub SR 142948 + hybrydy PK20 w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę pozytywną i grupą otrzymującą wyłącznie hybrydę PK20. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. N = 6-9 myszy w grupie. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs kontrola pozytywna.

4.3.3. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na aktywność hybrydy PK20 i poziom cytokin prozapalnych w BALF i homogenatach płuc

Podanie antagonistów receptorów opioidowych lub neurotensynowych przed zastosowaniem hybrydy PK20 miało różnoraki wpływ na aktywność badanej chimery wobec stężenia cytokin prozapalnych w BALF. W przypadku IL-1 α (Ryc. 23A) nie zaobserwowano znamienych różnic pomiędzy zwierzętami traktowanymi jako kontrola pozytywna, a myszami u których podanie hybrydy PK20 poprzedzone było iniekcją SR 142948 ($p = 0,35$). W grupie otrzymującej chlorowodorek naloksonu poziom badanej interleukiny był istotnie różny w odniesieniu do grupy stanowiącej kontrolę pozytywną i bardzo zbliżony do stężenia IL-1 α u myszy, u których zastosowano jedynie hybrydę PK20. Odmienne wyniki uzyskano dla IL-13, gdzie we wszystkich trzech badanych grupach odnotowano stężenie istotnie niższe w porównaniu ze zwierzętami uczulanymi otrzymującymi fizjologiczny roztwór soli (Ryc. 23C). Z kolei dla IL-2 i TNF- α zablokowanie zarówno ścieżki receptorowej opioidowej,

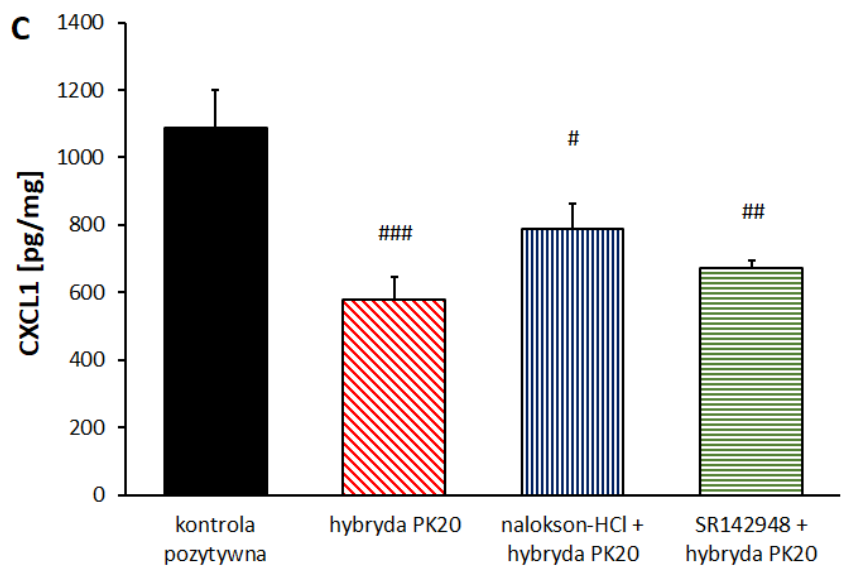
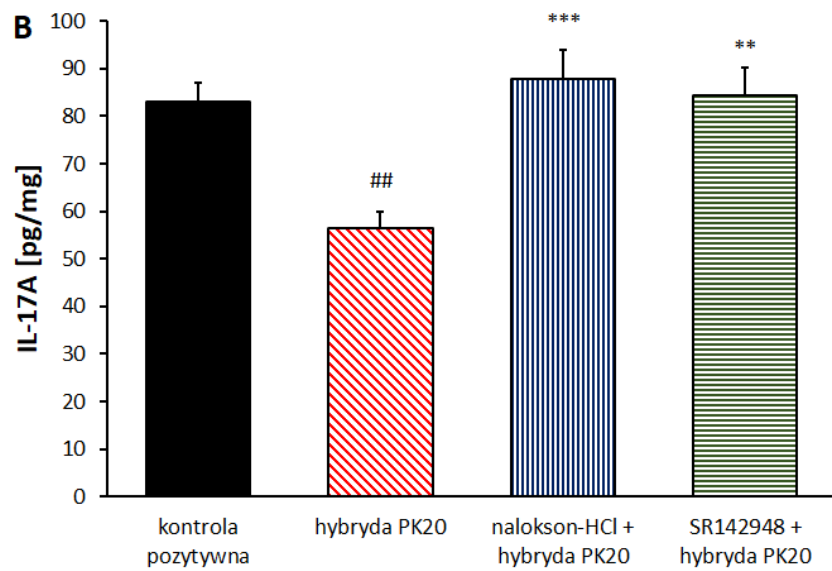
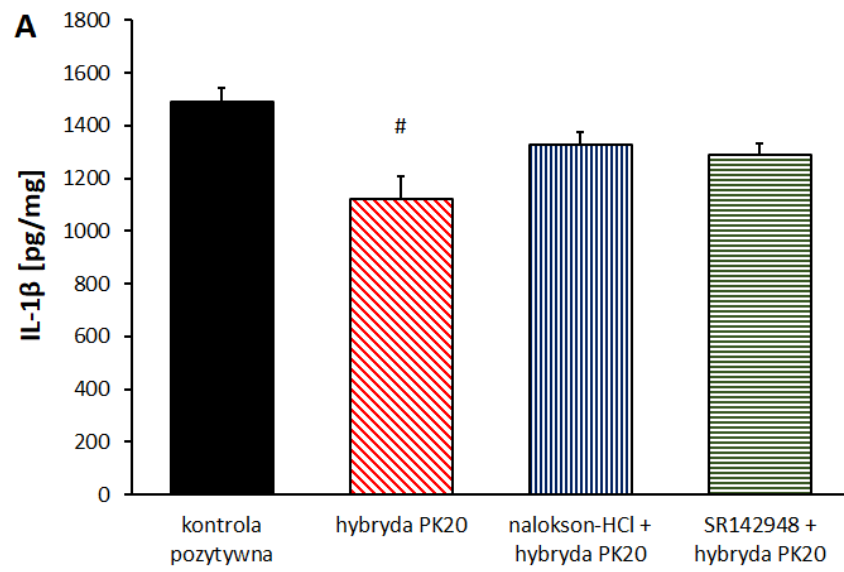
jak i neurotensynowej spowodowało zahamowanie przeciwzapalnego działania chimery (Ryc. 23B, 23D), sugerując, iż oba farmakofory mają istotne znaczenie dla jej aktywności.

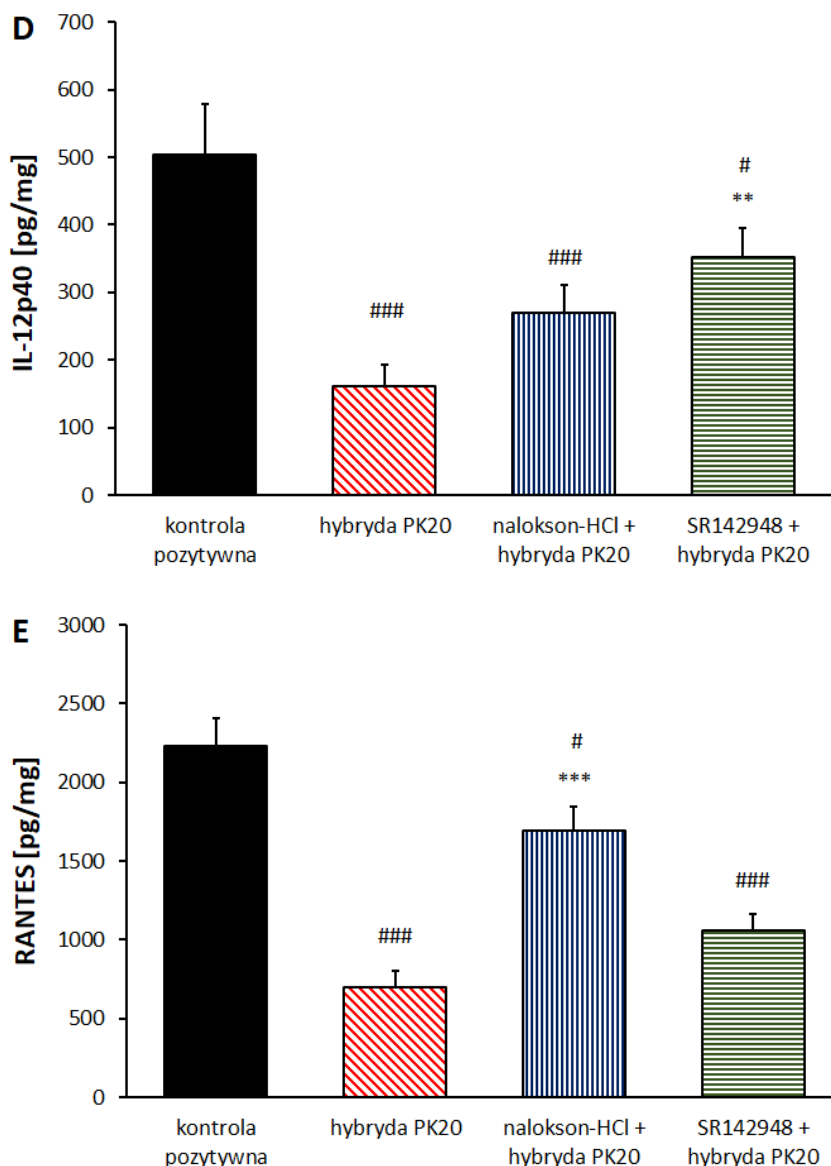




Ryc. 23. Stężenie cytokin prozapalnych: IL-1 α (A), IL-2 (B), IL-13 (C) i TNF- α (D) w BALF 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu chlorowodorku naloksonu + hybrydy PK20 lub SR 142948 + hybrydy PK20 w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę pozytywną i grupą otrzymującą wyłącznie hybrydę PK20. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. N = 5-9 myszy w grupie. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs hybryda PK20. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs kontrola pozytywna.

Wyniki pochodzące z analiz poziomów cytokin prozapalnych w homogenatach tkanki płucnej również nie pozwalają na wysunięcie jednoznacznych wniosków. W przypadku IL-1 β i IL-17A (podobnie jak dla IL-2 i TNF- α w BALF) zastosowanie chlorowodorku naloksonu lub SR 142948 znacząco ograniczyło aktywność hybrydy PK20, a obserwowane stężenia nie różnią się istotnie od grupy traktowanej jako kontrola pozytywna (Ryc. 24A, 24B). Przeciwnie zależności otrzymano dla pozostałych cytokin: CXCL1, IL-12p40 i RANTES, gdzie pomimo osłabienia działania hybrydy w grupach otrzymujących związki antagonistyczne, w każdym z trzech badanych układów uzyskano stężenia znamienne różne od kontroli pozytywnej, niezależnie od tego, które z receptorów były blokowane (Ryc. 24C, 24D, 24E). W przypadku IL-12p40 (Ryc. 24D) znaczące obniżenie aktywności chimery PK20 było rezultatem blokady receptorów neurotensynowych ($p = 0,007$ względem grupy otrzymującej wyłącznie hybrydę), podczas gdy ograniczenie działania przeciwzapalnego chimery wobec RANTES (Ryc. 24E) wynikało przede wszystkim z zahamowania opioidowej ścieżki receptorowej ($p < 0,001$ vs hybryda).

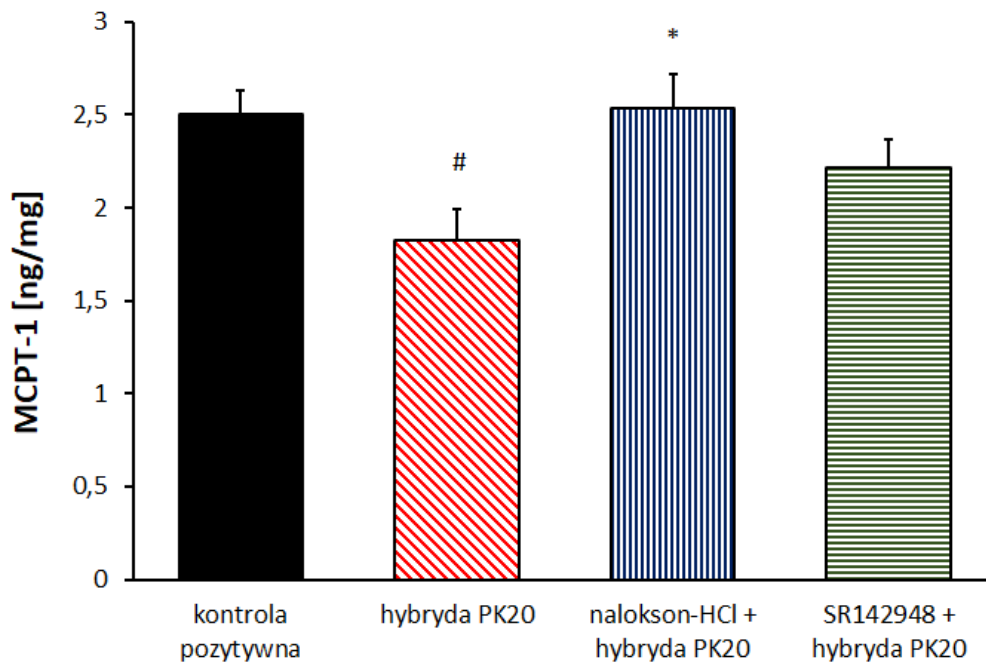




Ryc. 24. Stężenie cytokin prozapalnych: IL-1 β (A), IL-17A (B), CXCL1 (C), IL-12p40 (D) i RANTES (E) w homogenatach płuc 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu chlorowodoru naloksonu + hybrydy PK20 lub SR 142948 + hybrydy PK20 w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę pozytywną i grupą otrzymującą wyłącznie hybrydę PK20. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Duncana (IL-1 β , IL-17A) lub testem Newman-Keulsa (CXCL1, IL-12p40, RANTES). N = 5-7 myszy w grupie. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs hybryda PK20. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs kontrola pozytywna.

4.3.4. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na aktywność hybrydy PK20 i stężenie mysiej proteazy komórek tłuszczowych 1 (MCPT-1) w homogenatach płuc

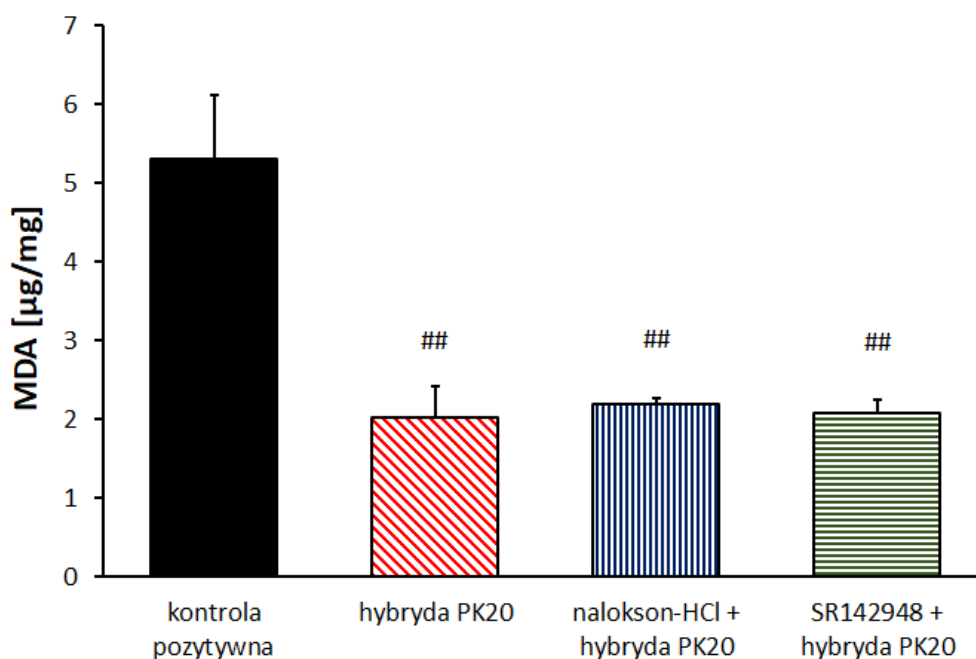
Zastosowanie chlorowodoru naloksonu lub SR 142948 miało niekorzystny wpływ na aktywność hybrydy PK20 wobec stężenia mysiej proteazy komórek tłuszczowych (MCPT-1) w homogenatach tkanki płucnej, co zostało odzwierciedlone w braku istotnych różnic pomiędzy grupami otrzymującymi związki antagonistyczne i zwierzętami stanowiącymi kontrolę pozytywną (Ryc. 25). Efekt ten jest szczególnie widoczny w przypadku blokady receptorów opioidowych. Podanie antagonisty receptorów neurotensynowych również osłabiło działanie chimery, analiza statystyczna nie ujawniła jednak znamiennych różnic pomiędzy myszami otrzymującymi wyłącznie badaną hybrydę i myszami u których podanie hybrydy poprzedzone było iniekcją SR 142948 ($p = 0,19$).



Ryc. 25. Stężenie mysiej proteazy komórek tłuszczowych 1 (MCPT-1) w homogenatach tkanki płucnej 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu chlorowodoru naloksonu + hybrydy PK20 lub SR 142948 + hybrydy PK20 w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę pozytywną i grupą otrzymującą wyłącznie hybrydę PK20. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Duncana. N = 5-6 myszy w grupie. * $p < 0,05$ vs hybryda PK20. # $p < 0,05$ vs kontrola pozytywna.

4.3.5. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na aktywność hybrydy PK20 i stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w homogenatach płuc

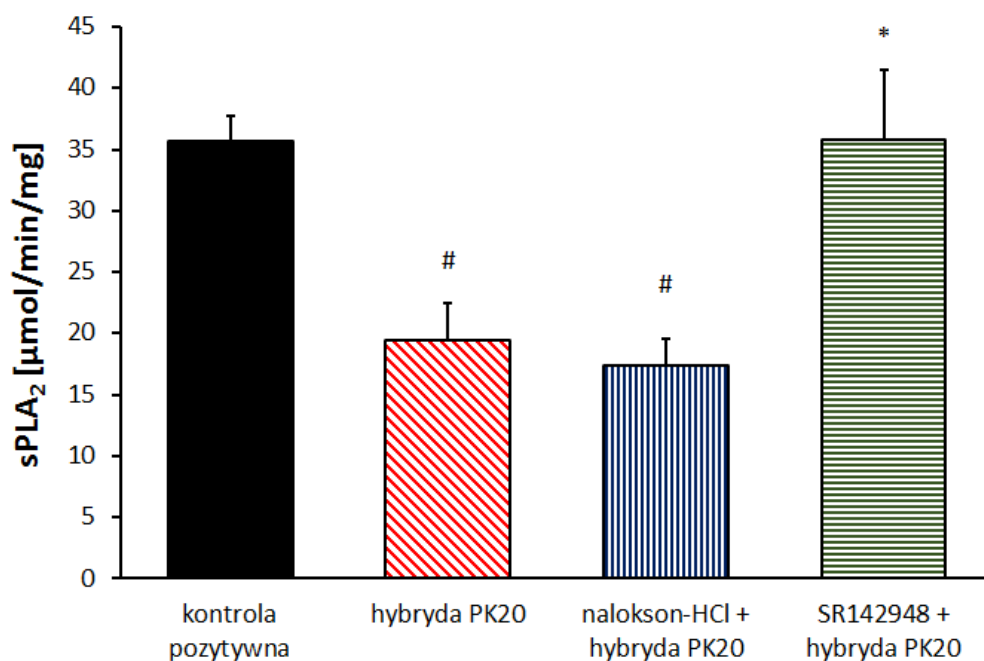
Wyniki eksperymentów dotyczących poziomu dialdehydu malonowego (MDA) w homogenatach płuc ujawniły, iż zastosowanie związków antagonistycznych, zarówno wobec receptorów opioidowych, jak i receptorów neurotensynowych nie wywołało niekorzystnego wpływu na przeciwzapalną aktywność hybrydy PK20 polegającą na redukcji stężenia MDA. Poziom markera stresu oksydacyjnego był niemal jednakowy we wszystkich grupach badanych i znacząco niższy w odniesieniu do zwierząt stanowiących kontrolę pozytywną (Ryc. 26).



Ryc. 26. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w homogenatach płuc 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu chlorowodorku naloksonu + hybrydy PK20 lub SR 142948 + hybrydy PK20 w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę pozytywną i grupą otrzymującą wyłącznie hybrydę PK20. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa. $N = 6-8$ myszy w grupie. $##p < 0,01$ vs kontrola pozytywna.

4.3.6. Efekt zastosowania związków antagonistycznych na przeciwzapalne działanie hybrydy PK20 i aktywność sekrecyjnej fosfolipazy A₂ (sPLA₂) w homogenatach płuc

Badania poziomu aktywności sekrecyjnej fosfolipazy A₂ (sPLA₂) w homogenatach tkanki płucnej wskazały, że podanie związku antagonistycznego SR 142948 hamuje działanie hybrydy PK20 wobec tego enzymu, co może sugerować, iż efekt przeciwzapalny hybrydy wynika w dominującym stopniu z pobudzenia receptorów neurotensynowych. Przeciwnie wyniki zaobserwowano dla grupy otrzymującej chlorowodorek naloksonu, w której uzyskane wartości nie różniły się w sposób istotny od grupy otrzymującej wyłącznie chimerę (Ryc. 27).



Ryc. 27. Aktywność sekrecyjnej fosfolipazy A₂ (sPLA₂) w homogenatach płuc 24 godziny po dotchawiczej prowokacji DNS. Efekt po podaniu chlorowodoru naloksonu + hybrydy PK20 lub SR 142948 + hybrydy PK20 w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę pozytywną i grupą otrzymującą wyłącznie hybrydę PK20. W obliczeniach statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keuls. N = 4-5 myszy w grupie. * $p < 0,05$ vs hybryda PK20. # $p < 0,05$ vs kontrola pozytywna.

5. DYSKUSJA

Astma oskrzelowa, w szczególności astma o ciężkim przebiegu, pozostaje bez wątplenia jednym z palących problemów współczesnej medycyny. W ostatnim czasie podejmowano badania nad nowymi związkami, które mogłyby w znaczący sposób zmniejszyć objawy i poprawić jakość życia u osób cierpiących na tę przewlekłą chorobę. Rozpoczęte starania zaowocowały wprowadzeniem do leczenia nowych leków, których mechanizm działania związany jest z zablokowaniem konkretnych elementów w skomplikowanej sieci mediatorów zapalnych, odpowiedzialnych za rozwój procesu chorobowego w drogach oddechowych. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi GINA piąty, najwyższy stopień leczenia astmy oskrzelowej obejmuje, poza dużymi dawkami glikokortykosteroidów wziewnych i długo działającymi β_2 -adrenomimetykami, dołączenie do terapii przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko immunoglobulinie IgE (omalizumab), interleukinie IL-5 (mepolizumab, reslizumab), receptorowi IL-5 (benralizumab) czy receptorowi IL-4, prowadząc do zablokowania szlaku sygnałowego dla IL-4 i IL-13 (dupilumab) [GINA, 2020]. O ile zatem w przypadku astmy o charakterze alergicznym lub astmy cechującej się silną eozynofilią wachlarz możliwości terapeutycznych stopniowo się poszerza, o tyle dla pozostałych pacjentów perspektywy leczenia nadal pozostają ograniczone. Nie jest wobec tego zaskoczeniem, iż trwają prace nad identyfikacją kolejnych szlaków sygnałowych, mogących mieć istotne znaczenie w patogenezie astmy i projektowaniem nowych cząsteczek, które mogłyby stać się skutecznym orężem w walce z chorobą. Z pomocą przychodzą zwierzęce modele eksperymentalne, które stanowią niezwykle ważne narzędzie pozwalające na poznanie właściwości nowo zsyntetyzowanych związków.

5.1. Ocena wpływu hybrydy PK20 i mieszaniny jej farmakoforów na nadreaktywność oskrzeli w mysim modelu astmy niealergiczej

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy wskazują, iż połączenie farmakoforu endomorfiny 2 i farmakoforu neurotensyny prowadzi do powstania związku hybrydowego, który obok udowodnionego działania przeciwbólowego [Kleczkowska i wsp., 2010], cechuje się również aktywnością przeciwzapalną w mysim modelu astmy niealergiczej indukowanej podaniem haptenu. Uzyskane dane pozwalają jednoznacznie stwierdzić, iż hybryda PK20 podana dootrzewnowo w uprzednio wyznaczonej

dawce 7,4 $\mu\text{mol/kg}$, wykazuje korzystny wpływ na szereg parametrów świadczących o stanie zapalnym toczącym się w drogach oddechowych. Co więcej, w przeważającej części analiz, badana chimera charakteryzuje się aktywnością porównywalną do deksametazonu - glikokortykosteroidu o udokumentowanym działaniu przeciwzapalnym. W trakcie doświadczeń wykazano także, iż zastosowanie związku hybrydowego wywołuje silniejszy efekt przeciwzapalny niż podanie prostej mieszaniny jego obu farmakoforów, co potwierdza hipotezę, iż hybrydyzacja dwóch pojedynczych elementów strukturalnych w jedną cząsteczkę może prowadzić do uzyskania związku o korzystniejszych właściwości terapeutycznych.

Jednym z charakterystycznych objawów towarzyszących astmie oskrzelowej jest nadreaktywność dróg oddechowych (AHR), która może zostać zmierzona przy zastosowaniu komory pletyzmograficznej i następnie wyrażona jako wartość pauzy wydłużonej (Penh). W przedstawionych badaniach parametr AHR oceniany był poprzez podanie wziewne wzrastających dawek metacholiny, która powoduje silny skurcz oskrzeli i traktowana jest jako standardowy związek prowokacyjny w diagnostyce astmy. Użyteczność nieinwazyjnej metody pletyzmograficznej, wykonywanej u zwierząt swobodnie poruszających się, budzi jednak wśród badaczy pewne zastrzeżenia. Część z nich podziela pogląd, iż wartość Penh służy raczej do odzwierciedlenia zmian we wzorcu oddechowym aniżeli jest właściwym wskaźnikiem funkcji płuc [Adler i wsp., 2004]. Ponadto na mierzony sygnał mogą mieć wpływ różne czynniki takie jak stres badanego zwierzęcia [Hoymann, 2007], czy też temperatura lub wilgotność panujące w komorze podczas doświadczeń [Lundblad i wsp., 2002]. Alternatywę może stanowić metoda inwazyjnego pomiaru oporu płucnego (ang. *lung resistance*; R_L), jednak i ta technika nie jest doskonała, wymaga bowiem wprowadzenia zwierzęcia w stan anestezji i wykonania zabiegu tracheostomii. Badane zwierzę jest wentylowane w sposób sztuczny, co może zaburzać homeostazę w drogach oddechowych. Wykazano na przykład, że mechaniczna wentylacja w znaczącym stopniu podwyższa liczbę komórek odpowiedzi zapalnej [Cannizzaro i wsp., 2011; Verheijden i wsp., 2014]. Ponadto niemożliwe staje się wykonanie powtórnego pomiaru u tego samego osobnika [Glaab i wsp., 2007]. Należy jednak zauważyć, iż dostępnych jest wiele prac, w których autorzy otrzymywali podobne zmiany w wartościach Penh i R_L , stosując porównawczo obie metody w tym samym modelu doświadczalnym [Nakae i wsp., 2007; Tarkowski i wsp., 2007; Verheijden i wsp., 2014]. Zatem pomimo iż nieinwazyjny pomiar Penh jest odzwierciedleniem wartości oporu płuc

tylko w pewnym zakresie [Finkelman, 2008], w przypadku prawidłowo zaprojektowanego eksperymentu, zawierającego niezbędne grupy kontrolne, może posłużyć jako miara nadreaktywności dróg oddechowych [Tarkowski i wsp., 2007].

W przeprowadzonych doświadczeniach, podczas testu metacholinowego, znaczący wzrost wartości Penh zaobserwowano w grupie myszy uczulonych otrzymujących fizjologiczny roztwór soli (kontrola pozytywna) w porównaniu ze zwierzętami traktowanymi jako kontrola negatywna. Dootrzewnowe podanie deksametazonu skutecznie złagodziło nadreaktywność oskrzeli, co jest zgodne z doniesieniami innych badaczy stosujących ten lek w modelu astmy alergicznej wywołanej podaniem owalbuminy [Trifilieff i wsp., 2000; Chung i wsp., 2013]. W przypadku hybrydy PK20 i mieszaniny jej obu farmakoforów efekt istotny statystycznie widoczny był jedynie przy dawce metacholiny równej 20 mg/ml, wskazując na ich mniejszy potencjał osłabiający nadreaktywność oskrzeli w zestawieniu z deksametazonem. Wyniki te mogą okazać się pewnym zaskoczeniem, biorąc pod uwagę fakt, iż pozostałe markery zapalenia takie jak: napływ komórek odpowiedzi zapalnej do BALF czy stężenie prozapalnych markerów w homogenatach płuc, bezspornie potwierdziły przeciwzapalną aktywność hybrydy PK20. Obecnie wiadomo jednak, iż nie ma jednoznacznej korelacji pomiędzy nadmierną reaktywnością oskrzeli na czynniki kurczące, a procesem zapalnym w drogach oddechowych [De Vooght i wsp., 2010; Kumar i Foster, 2012]. Co więcej, Tränkner i wsp. [2014] udowodnili, iż skurcz oskrzeli wynikający z ich nadreaktywności może być całkowicie niezależny od komponentu immunologicznego. Do jego wystąpienia niezbędna jest natomiast specyficzna populacja neuronów czuciowych, obecnych w zwojach nerwu błędnego, wykazujących ekspresję receptorów waniloidowych aktywowanych przejściowym potencjałem (ang. *transient receptor potential vanilloid 1*; TRPV1). Ablacja lub genetyczne wyciszenie owej grupy neuronów prowadzi do zniesienia nadreaktywności oskrzeli, nawet w obecności pełnoobjawowej reakcji zapalnej w płucach [Tränkner i wsp., 2014]. W świetle tych doniesień prawdopodobne jest zatem, iż hybryda PK20, pomimo potencjału przeciwzapalnego, jedynie w sposób częściowy łagodzi nadreaktywność oskrzeli wywołaną nebulizacją metacholiny.

5.2. Ocena przeciwzapalnego potencjału hybrydy PK20 i mieszaniny jej farmakoforów w mysim modelu astmy niealergiczej

Wątpliwości nie budzi natomiast wpływ badanej chimery na infiltrację leukocytów do płynu pęcherzykowo-oskrzelowego i tkanki płucnej w przebiegu reakcji zapalnej. Analiza histologiczna z zastosowaniem barwienia hematoksyliną i eozyną ujawniły, iż hybryda PK20 wykazuje znacznie większą skuteczność w ograniczaniu napływu komórek odpowiedzi zapalnej do płuc niż równomolowa mieszanina jej obu składowych. Wyniki badań histologicznych korespondują z danymi pochodzącymi z analizy płynu pęcherzykowo-oskrzelowego. Rezultatem dotchawiczego podania DNS u zwierząt uczulonych uprzednio roztworem DNFB, był wzrost całkowitej liczby komórek, jak również zwiększenie odsetka neutrofilów w BALF. Parametry te zostały następnie zredukowane u zwierząt otrzymujących hybrydę PK20 i w mniejszym stopniu, u myszy leczonych mieszaniną farmakoforów. Znamienne zwiększenie liczby granulocytów obojętnochłonnych jest zjawiskiem charakterystycznym dla astmy o podłożu niealergicznym i może być z powodzeniem obserwowane przy użyciu opisanego schematu doświadczalnego, co znajduje potwierdzenie w wynikach badań innych autorów stosujących model astmy nieatopowej wywołanej podaniem DNFB/DNS [Kraneveld i wsp., 2002; van der Kleij i wsp., 2004].

Neutrofile odgrywają istotną rolę w nieswoistym układzie odpornościowym, stanowiąc pierwszą linię obrony przeciwko czynnikom chorobotwórczym. Obecnie wiadomo, iż poza zdolnością do fagocytozy i sekrecją szeregu związków cytotoksycznych, są także zdolne do wydzielania różnorodnych mediatorów, które mogą nasilać stan zapalny w drogach oddechowych astmatyków [Monteseirín, 2009]. Zwiększona liczba neutrofilów obserwowana jest w ciężkiej, przewlekłej astmie [Jatakanon i wsp., 1999], w zaostrzeniach choroby [Fahy i wsp., 1995], jak również u pacjentów narażonych na działanie diizocyjanianów [Paggiaro i wsp., 1990; Lemière i wsp., 2002]. Ostatnie prace podkreślają silny związek pomiędzy występowaniem neutrofilów w drogach oddechowych, a fenotypem astmy opornym na działanie glikokortykosteroidów [Nabe, 2020].

Wiele z poznanych dotychczas cytokin i chemokin wykazuje działanie chemotaktyczne w stosunku do neutrofilów, przyciągając je do miejsca toczącego się procesu zapalnego. Należy w tym miejscu wymienić IL-1 β , CXCL1, CXCL8 (IL-8) i IL-17A. Co więcej, część z nich wydzielana jest przez komórki nabłonka oskrzeli [Bruijnzeel i wsp., 2015]. Warto zaznaczyć,

iz myszy nie wykazują ekspresji genu dla IL-8, jednak jako jej funkcjonalne odpowiedniki traktowane są chemokiny CXCL1 (u myszy określana także jako KC; ang. *keratinocyte-derived chemokine*), CXCL2 i CXCL5¹ [Hol i wsp., 2010]. W opisanych doświadczeniach zaobserwowano, iż spadek stężenia IL-1 β , IL-17A i CXCL1 w homogenatach tkanki płucnej koreluje ze zmniejszeniem liczby neutrofilów w grupie zwierząt uczulonych, otrzymujących chimerę PK20. Doświadczenia innych autorów, w modelu nadwrażliwości typu późnego wskazują, że u uczulonych uprzednio myszy podanie antygeny prowadzi do wzrostu produkcji CXCL1 i CXCL5, które pobudzają makrofagi i komórki tuczne do wydzielania TNF- α , a ten z kolei powoduje napływ neutrofilów do miejsca toczącej się reakcji zapalnej [Vieira i wsp., 2009]. Co więcej, zwiększoną ekspresję TNF- α , chemokin typu CXCL i CCL, oraz interleukin takich jak IL-6, IL-1 α i IL-1 β zaobserwowano na makrofach pochodzących z płynu pęcherzykowo-oskrzelowego u pacjentów cierpiących na astmę oporną na leczenie glikokortykosteroidami [Goleva i wsp., 2008]. W badaniach potwierdzono, że cytokiny należące do rodziny IL-1 są zaangażowane w procesy immunologiczne i reakcje zapalne w drogach oddechowych [Dinarello, 2009]. Udowodniono iż, u myszy pozbawionych receptora IL-1 typu I lub po zastosowaniu przeciwciał skierowanych przeciwko IL-1 α i IL-1 β dochodzi do osłabienia AHR i zmniejszenia odpowiedzi zapalnej w modelu astmy indukowanej podaniem TDI [Johnson i wsp., 2005]. Wykazano także, iż dotchawicze podanie IL-1 β szczurom powoduje wzrost liczby neutrofilów w BALF, któremu towarzyszy wzmożona odpowiedź oskrzeli na kurczące działanie bradykininy [Tsukagoshi i wsp., 1994]. Niedawne badania wskazują, iż wysoka ekspresja receptora IL-1 na komórkach uzyskanych z płwociny chorych może być czynnikiem prognozującym astmę neutrofilową i pogorszenie funkcji płuc [Evans i wsp., 2018].

Silnym chemoatraktantem dla granulocytów obojętnochłonnych jest także IL-17, której podwyższony poziom obserwowany w grupie stanowiącej kontrolę pozytywną, został znamienne zredukowany przez hybrydę PK20. IL-17 powoduje niewrażliwość na działanie GKS w ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli [Zijlstra i wsp., 2012] i komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej [Vazquez-Tello i wsp., 2013]. Cytokina ta produkowana jest przez podklasę limfocytów pomocniczych, odrębną od dotychczas opisywanych komórek

¹ Chemokiny należy oznaczać dużą literą w przypadku chemokin ludzkich (CXCL) i małą (Cxc1) dla chemokin mysich [Zlotnik i wsp., 2006], jednak dla uproszczenia w niniejszej pracy wszystkie chemokiny zapisywane są dużą literą.

Th1 i Th2, która została odkryta w 2003 r. i określona później jako limfocyty Th17 [Aggarwal i wsp., 2003]. W skład rodziny IL-17 wchodzi sześć cząsteczek, oznaczonych kolejnymi literami alfabetu (IL-17A-F), przy czym IL-17E znana jest również jako IL-25 [Kolls i Lindén, 2004]. W modelach zwierzęcych, poza udowodnionym udziałem IL-17 w zapaleniu dróg oddechowych z dominacją neutrofilów [Hoshino i wsp., 2000; Hellings i wsp., 2003], wykazano także zaangażowanie limfocytów Th17 w proces remodelingu [Zhao i wsp., 2013] i nadreaktywność oskrzeli [Wilson i wsp., 2009]. Obserwacje te są zgodne z badaniami z udziałem chorych, w których przedstawiono związek pomiędzy wzrostem stężenia IL-17 w płwocinie, a nadmierną reakcją skurczową oskrzeli w odpowiedzi na podanie metacholiny [Barczyk i wsp., 2003]. Zwiększoną ekspresję IL-17A i IL-17F potwierdzono również w materiale biopsyjnym u pacjentów ze zdiagnozowaną astmą o ciężkim przebiegu [Al-Ramli i wsp., 2009].

W przeciwieństwie do IL-1 β , IL-17A i CXCL1, których poziom w homogenatach płuc został istotnie obniżony jedynie poprzez podanie hybrydy PK20, spadek stężenia RANTES i IL-12p40 zaobserwowano zarówno po zastosowaniu chimery, jak i mieszaniny jej obu farmakoforów. RANTES (ang. *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*), określana także jako CCL5, jest chemoatraktantem dla eozynofiliów, limfocytów T i monocytów/makrofagów [Berkman i wsp., 1996]. Istnieją doniesienia, iż wykazuje właściwości chemotaktyczne również wobec neutrofilów [Pan i wsp., 2000]. Zwiększone stężenie RANTES obserwowano w kondensacie wydychanego powietrza u pacjentów z astmą niestabilną [Zietkowski i wsp., 2008], a także w BALF u pacjentów chorujących na astmę niealergiczną w porównaniu z cierpiącymi na alergiczny fenotyp choroby [Novak i Bieber, 2003].

Właściwości prozapalne zostały opisane także dla IL-12, która produkowana jest przez aktywowane monocyty, neutrofile, makrofagi oraz komórki dendrytyczne i stymuluje różnicowanie limfocytów T w kierunku komórek typu Th1 [Trinchieri i wsp., 2003]. Aktywna biologicznie IL-12 jest heterodimerem, składającym się z dwóch połączonych kowalencyjnie podjednostek p35 i p40 [Metys i wsp., 2006]. IL-12p40 może być wydzielana jako monomer, wykazuje także zdolność do tworzenia homodimeru (IL-12p80), który wiąże się z receptorem IL-12R β 1 powodując jego blokadę i zahamowanie efektów wywołanych przez IL-12. Wyniki kolejnych badań sugerują jednak, że IL-12p40 może być traktowana jako niezależny czynnik

inicjujący reakcję zapalną [Cooper i Khader, 2007]. Mogłoby to wyjaśniać fakt, iż w wielu badaniach *in vivo* dotyczących procesów autoimmunizacyjnych, sepsy czy zakażeń patogenami odnotowano podwyższony poziom IL-12p40, podczas gdy stężenie pełnej formy IL-12 było nieistotne [Abdi, 2002]. Zwiększoną sekrecję IL-12p40 zaobserwowano m.in. w komórkach węzłów chłonnych u myszy poddanych miejscowej ekspozycji na 2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB) [Warbrick i wsp., 1999]. Co więcej, nadekspresję IL-12p40 wykazano także w komórkach nabłonka dróg oddechowych u pacjentów astmatycznych, co wiązało się jednocześnie z akumulacją makrofagów w drogach oddechowych [Walter i wsp., 2001]. Obserwacje te są zgodne z wynikami badań własnych, gdzie wzrost stężenia IL-12p40 towarzyszył zwiększeniu liczby komórek odpowiedzi zapalnej, wśród których większość stanowiły makrofagi.

W przypadku cytokin analizowanych w płynie pęcherzykowo-oskrzelowym, podwyższony poziom IL-1 α , IL-2, IL-13 i TNF- α , wykryty w grupie zwierząt traktowanych jako kontrola pozytywna, został istotnie zredukowany po zastosowaniu hybrydy PK20. Mieszanina farmakoforów chimery wykazała korzystny wpływ jedynie na stężenie IL-2. Główne źródło IL-2 stanowią zaktywowane limfocyty Th1, a efektem jej działania jest wzrost oraz różnicowanie limfocytów T, limfocytów B i komórek NK, a także nasilona sekrecja przeciwciał przez limfocyty B [Rogała i wsp., 2015]. Zwiększony poziom IL-2 zaobserwowano u pacjentów z astmą niealergiczną [Walker i wsp., 1992], natomiast zwiększoną ekspresję mRNA kodującego IL-2 wykazano w komórkach BALF u chorych opornych na leczenie glikokortykosteroidami [Leung i wsp., 1995]. Niedawne badania potwierdzają, iż IL-2 obniża odpowiedź komórek Th2 na działanie GKS, wydłużając czas ich przeżycia i nasilając właściwości prozapalne, co przyczynia się do pogorszenia stopnia ciężkości astmy [Kanagalingam i wsp., 2019]. Udowodniono także, iż IL-2 indukuje produkcję IL-13 [Hashimoto i wsp., 2006], która jest kolejną cytokiną odgrywającą istotną rolę w patogenezie astmy oskrzelowej, w szczególności astmy o podłożu alergicznym.

IL-13, wydzielana przez zaktywowane limfocyty Th2, komórki tuczne i eozynofile [Barnes, 2008], cechuje się wielokierunkowym działaniem w procesie zapalnym. W doświadczalnych modelach zwierzęcych wykazano, iż pobudza ona limfocyty B do wydzielania immunoglobuliny IgE, nasila napływ eozynofiliów do dróg oddechowych, stymuluje proliferację fibroblastów, zwiększa produkcję śluzu i nadreaktywność oskrzeli

[Hansbro i wsp., 2011]. IL-13 posiada właściwości biologiczne zbliżone do IL-4, co znalazło odzwierciedlenie w strukturze ich receptorów, obie interleukiny do wykazania działania wymagają bowiem tej samej podjednostki IL-4R α , która jest częścią heterodimerskiego kompleksu receptorowego [Mueller i wsp., 2002]. Pomimo że IL-13 uważana jest za kluczową cytokinę w rozwoju astmy alergicznej, związaną z limfocytami Th2, istnieją doniesienia, iż jej działanie może być niezależne od przeciwciał IgE i eozynofiliów [Wills-Karp i wsp., 1998]. Ponadto podwyższony poziom mRNA kodującego IL-13 obserwowany był w błonie śluzowej oskrzeli pacjentów chorujących zarówno na atopowy, jak i nieatopowy fenotyp astmy [Humbert i wsp., 1997].

Niezmiernie ważne miejsce w złożonej sieci związków prozapalnych przypisuje się także czynnikowi martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor α* ; TNF- α). TNF- α jest cytokiną charakteryzującą się działaniem plejotropowym, obejmującym szereg aspektów istotnych w rozwoju procesu zapalnego. Wykazano, iż TNF- α stanowi czynnik chemotaktyczny dla neutrofilów oraz eozynofiliów [Lukacs i wsp., 1995], jest zaangażowany w aktywację limfocytów T i uwalnianie przez nie innych cytokin [Scheurich i wsp., 1987], zwiększa także ekspresję cząsteczek adhezyjnych takich jak ICAM-1, VCAM-1 czy selektyna E [Thomas, 2001], ułatwiających migrację komórek odpowiedzi zapalnej do tkanki płucnej. W zastosowanym modelu astmy niealergicznej wywołanym podaniem DNFB/DNS zaobserwowano niemal dwukrotny wzrost poziomu TNF- α w BALF w porównaniu z grupą zwierząt nieuczulanych haptenem, co koreluje z wynikami wcześniejszych badań [van der Kleij i wsp., 2004]. Z kolei korzystny wpływ deksametazonu na poziom wybranych cytokin obserwowany w przedstawionych doświadczeniach, znajduje potwierdzenie w eksperymentalnym modelu astmy indukowanym owoalbuminą, w którym lek ten obniżał ekspresję mRNA kodującego IL-17A, IL-13, jak również TNF- α [Herbert i wsp., 2008]. W przypadku badań z udziałem ludzi, podanie wziewne rekombinowanego ludzkiego TNF- α (rh-TNF- α), zarówno u zdrowych ochotników, jak i pacjentów chorujących na astmę łagodną spowodowało infiltrację neutrofilów do dróg oddechowych oraz nadreaktywność oskrzeli, określoną na podstawie testu prowokacji metacholiną [Thomas i wsp., 1995; Thomas i Heywood, 2002]. Kolejne badania udowodniły, iż główne źródło TNF- α w płucach zwierząt z eksperymentalnie wywołaną astmą oskrzelową stanowią komórki tuczne, mające decydujący udział w rozwoju mediowanej przez TNF- α późnej fazy AHR [Kim i wsp., 2007].

TNF- α w komórkach tucznych może pochodzić z puli wcześniej zmagazynowanej czyli być mediatorem preformowanym, uwalnianym w ciągu pierwszych 10 minut po stymulacji mastocytu, bądź zostać zsyntetyzowany *de novo*, co odpowiada za późniejszą sekrecję związku w dalszych etapach odpowiedzi zapalnej [Olejnik i Brzezińska-Błaszczak, 1998].

Komórki tuczne, odgrywające istotną rolę w reakcjach zapalnych, powstają z komórek progenitorowych w szpiku kostnym, a ich dojrzewanie zachodzi w tkankach obwodowych pod wpływem wielu bodźców obecnych w środowisku pozakomórkowym takich jak czynnik komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*; SCF), IL-3, IL-4, IL-6 czy IL-9 [Nauta i wsp., 2008]. W przeciwieństwie do neutrofilów czy eozynofilów są one obecne w wielu tkankach w warunkach fizjologicznych, występując często w sąsiedztwie naczyń krwionośnych, naczyń limfatycznych i nerwów [Dai i Korthuis, 2011]. Komórki tuczne zawierają specyficzne proteazy, wśród których należy wyróżnić metaloproteazę posiadającą jon cynku w miejscu aktywnym - karboksypeptydazę A (ang. *mast cell carboxypeptidase A*; MC-CPA) oraz proteazy serynowe: chymazy i tryptazy [Pejler i wsp., 2010]. Mysie mastocyty można zaklasyfikować także do dwóch subpopulacji: komórki tuczne tkanki łącznej (ang. *connective tissue mast cells*; CTMC) oraz komórki tuczne błon śluzowych (ang. *mucosal mast cells*; MMC). Z MMC związane są z kolei dwa typy β -chymaz, MCPT-1 i MCPT-2 [Dai i Korthuis, 2011], z których pierwsza była przedmiotem analizy w przedstawionej pracy. W grupie zwierząt traktowanych jako kontrola pozytywna zaobserwowano wzrost stężenia MCPT-1 w homogenatach tkanki płucnej w porównaniu z myszami stanowiącymi kontrolę negatywną. Dootrzewnowe podanie hybrydy PK20 lub deksametazonu spowodowało obniżenie poziomu badanej proteazy. Podobny efekt uzyskano po zastosowaniu mieszaniny farmakoforów chimery, jednak w tym przypadku analiza statystyczna nie wykazała istotnej różnicy w odniesieniu do grupy będącej kontrolą pozytywną.

Udział komórek tucznych w patogenezie astmy o charakterze alergicznym jest dobrze poznany i opisany [Amin, 2012; Méndez-Enríquez i Hallgren, 2019], obecnie wiadomo jednak, że odgrywają one także istotną rolę w nieatopowym fenotypie choroby. Kraneveld i wsp. [2002] wykazali, iż komórki tuczne inicjują kaskadę reakcji prowadzących do rozwoju nadwrażliwości w drogach oddechowych. W mysim modelu astmy niealergiczej wywołanej podaniem haptenu udowodnili oni, iż aktywacja mastocytów następuje bezpośrednio po donosowym podaniu DNS u zwierząt uczulonych uprzednio roztworem DNFB i związana jest

z nagłym skurczem oskrzeli oraz zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych. Zwiększony przesiek makrocząsteczek z mikrokrążenia płucnego do przestrzeni pęcherzykowo-oskrzelowej jest kolejnym zjawiskiem występującym w przebiegu astmy oskrzelowej i może zostać odzwierciedlony m.in. we wzroście stężenia albumin w BALF [van Vyve i wsp., 1995]. Podwyższony poziom albumin w BALF zaobserwowano u pacjentów z astmą stabilną w porównaniu z osobami zdrowymi [van de Graaf i wsp., 1991], a także w modelu mysim, w którym zwiększonej przepuszczalności bariery nabłonkowej towarzyszył napływ neutrofilów do dróg oddechowych [Kantrow i wsp., 2009]. W przeprowadzonych eksperymentach wywołanie reakcji zapalnej u uczulonych wcześniej zwierząt skutkowało wzrostem stężenia albumin w płynie pęcherzykowo-oskrzelowym i zostało znamienne obniżone zarówno po zastosowaniu deksametazonu, hybrydy PK20, jak i mieszaniny jej obu strukturalnych elementów.

We wszystkich trzech badanych grupach zaobserwowano także obniżenie poziomu dialdehydu malonowego w tkance płucnej, który może być traktowany jako biomarker stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny definiowany jest jako stan zakłóconej równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, cechujący się nasileniem reakcji utleniania i mogący w znaczący sposób przyczyniać się do rozwoju stanu zapalnego. Jedną z przyczyn takiego zaburzenia jest nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*; ROS), które wytwarzane są przez aktywowane komórki odpowiedzi zapalnej takie jak neutrofile, eozynofile, makrofagi czy monocyty [Sadowska-Woda i Bieszczad-Bedrejczuk, 2011]. ROS, do których należą m.in. nadtlenek wodoru, anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy [Szlagatys-Sidorkiewicz i wsp., 2007], powstają w warunkach fizjologicznych w wyniku przemian metabolicznych zachodzących w żywych komórkach, jednakże ich zwiększony poziom może być przyczyną zmian o charakterze chorobowym. Badania wskazują, iż uszkodzenia w strukturze kwasów nukleinowych, lipidów czy białek, powstałe w wyniku nadmiernego wytwarzania ROS, prowadzą do zwiększonej odpowiedzi zapalnej w drogach oddechowych [Henricks i Nijkamp, 2001]. Udowodniono, iż pod wpływem ROS dochodzi do nadreaktywności dróg oddechowych w odpowiedzi na kurczące działanie metacholiny [de Boer i wsp., 2001], zwiększonej sekrecji śluzu [Adler i wsp., 1990], zaburzenia funkcji receptorów β_2 -adrenergicznych [Nijkamp i Henricks, 1990], uszkodzenia śródbłonna i w konsekwencji wzrostu przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych

[McQuaid i wsp., 1996], a prawdopodobnie także do remodelingu dróg oddechowych i zaostrzeń astmy [Ciepiela i wsp., 2015]. Pośrednią metodą analizy poziomu stresu oksydacyjnego jest pomiar stężenia produktów powstających w wyniku działania reaktywnych form tlenu, co często koreluje ze stopniem ciężkości choroby [Nadeem i wsp., 2014].

Jednym z takich związków jest dialdehyd malonowy, powstający w procesie peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *polyunsaturated fatty acids*; PUFAs), które są podatne na uszkodzający wpływ ROS. Do PUFAs należą m.in. kwas eikozapentaenowy czy kwas dokozaheksaenowy, stanowiące składniki lipidów błon komórkowych [Sadowska-Woda i Bieszczad-Bedrejczuk, 2011]. Zwiększony poziom MDA odnotowano zarówno w kondensacie powietrza wydychanego [Antczak i wsp., 1997], jak i w osoczu krwi [Rai i Phadke, 2006] u pacjentów cierpiących na astmę oskrzelową. Obserwacje te są zgodne z badaniami przeprowadzonymi na zwierzętach, w których wzrost stężenia MDA zaobserwowano w homogenatach tkanki płucnej szczura w modelu astmy wywołanej prowokacją TDI [Muti i wsp., 2016], a także w mysim modelu astmy alergicznej indukowanej podaniem OVA [Abdelaziz i wsp., 2018]. W doświadczeniach własnych obniżony poziom MDA korelował ze zmniejszoną liczbą komórek odpowiedzi zapalnej w płynie pęcherzykowo-oskrzelowym, które jak uprzednio wspomniano, generują powstawanie ROS [Nadeem i wsp., 2003; Marçal i wsp., 2004] oraz był zgodny ze spadkiem stężenia cytokin prozapalnych takich jak IL-1, TNF- α i RANTES, które także powodują nasilenie produkcji związków o właściwościach utleniających [Joseph i wsp., 1993; Chihara i wsp., 1998; Hattorii i wsp., 2005]. Co więcej, redukcja poziomu MDA w homogenatach tkanki płuc korespondowała ze zmniejszeniem aktywności sekrecyjnej fosfolipazy A₂, odgrywającej istotną rolę w inicjowaniu procesów zapalnych i nasilaniu stresu oksydacyjnego [Chalimoniuk, 2012].

Fosfolipaza A₂ jest enzymem, który hydrolizuje wiązanie estrowe w pozycji *sn*-2 glicerofosfolipidów błony komórkowej z uwolnieniem nienasyconych kwasów tłuszczowych, m.in. kwasu arachidonowego. Kwas arachidonowy ulega przemianom, których produktami są lipidowe mediatory zapalne. Pod wpływem cyklooksygenaz dochodzi do powstania prostaglandyn i tromboksanów, z kolei efektem reakcji z udziałem 5-lipooksygenazy są leukotrieny [Diaz i Arm, 2003]. Dotychczas zidentyfikowano sześć klas fosfolipaz A₂, w tym

fosfolipazy sekrecyjne (sPLA₂), fosfolipazy cytozolowe (cPLA₂), fosfolipazy niezależne od jonów Ca²⁺ (iPLA₂), a także acetylohydrolazy czynnika aktywującego płytki (ang. *platelet activating factor acetylhydrolase*; PAF-AH), fosfolipazę lizosomalną (LPLA₂) i fosfolipazę swoistą dla adipocytów (AdPLA) [Dennis i wsp., 2011]. W rodzinie sekrecyjnych fosfolipaz A₂ wyodrębniono kilka grup i podgrup, z których udział w generowaniu czynników zapalnych przypisuje się sPLA₂-IIA, -V i -X [Peebles, 2019]. Badania z zastosowaniem specyficznego inhibitora dla tej fosfolipazy ujawniły, iż sPLA₂ i cPLA₂ wykazują przeciwstawne działanie w drogach oddechowych. Aktywność sPLA₂ związana jest bowiem z produkcją leukotrienów cysteinylowych, które powodują skurcz mięśni gładkich oskrzeli, podczas gdy cPLA₂ sprzyja powstawaniu prostaglandyny PGE₂ o właściwościach bronchodylatacyjnych [Offer i wsp., 2005]. W kolejnych doświadczeniach zaobserwowano zwiększenie ekspresji mRNA kodującego sPLA₂-X w homogenach tkanki płuc u myszy w modelu alergicznego zapalenia oskrzeli wywołanego podaniem owalbuminy [Mruwat i wsp., 2013]. Zarówno w modelu mysim, jak i w badaniach z udziałem ludzi udowodniono również, iż wzrost aktywności sPLA₂-X w drogach oddechowych może być wywołany wziewnym podaniem alergenu [Nolin i wsp., 2017]. Wzrost aktywności sPLA₂-X zaobserwowano także w makrofagach oraz komórkach nabłonka dróg oddechowych u osób cierpiących na astmę oskrzelową, co może wiązać się ze wzrostem wytwarzania prozapalnych eikozanoidów i rozwojem nadreaktywności oskrzeli [Hallstrand i wsp., 2007; Hallstrand i wsp., 2013]. Ponadto wykazano, iż ekspresja sPLA₂ ulega nasileniu pod wpływem cytokin zaangażowanych w proces zapalny takich jak TNF- α , IL-1 β , IL-13 i IL-17 [Hallstrand i wsp., 2013], co jest zgodne z wynikami przedstawionych eksperymentów, w których zastosowanie hybrydy PK20 lub deksametazonu spowodowało spadek stężenia wymienionych cytokin i towarzyszące temu zmniejszenie aktywności sPLA₂.

Chimera PK20 oraz deksametazon zmniejszyły także ekspresję jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF- κ B) w tkance płucnej myszy uczulanych DNFB, w porównaniu ze zwierzętami przechodzącymi tę samą procedurę uczulenia i wywołania reakcji, lecz otrzymującymi dootrzewnowo fizjologiczny roztwór soli. Hamujący wpływ deksametazonu na poziom immunoreaktywności NF- κ B został wcześniej udowodniony w mysim modelu astmy wywołanym podaniem owalbuminy [Kumar i wsp., 2003; Nader, 2015]. Zupełnie nieskuteczna w tym zakresie okazała się natomiast mieszanina

farmakoforów, co zostało potwierdzone metodą barwienia immunofluorescencyjnego, w tym również ilościowym pomiarem intensywności barwienia. NF-κB (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za regulację ekspresji wielu genów zaangażowanych we wzrost i różnicowanie komórek, proces apoptozy czy reakcje zapalne [Chauhan i wsp., 2018]. Zwiększona aktywność NF-κB odgrywa kluczową rolę w rozwoju astmy oskrzelowej, poprzez nasilenie transkrypcji genów kodujących m.in. cytokiny prozapalne, chemokiny i molekuly adhezyjne [Christman i wsp., 2000]. Do rodziny czynnika NF-κB należy pięć, strukturalnie spokrewnionych białek, określanych jako: NF-κB1/p50, NF-κB2/p52, RelA/p65, RelB i c-Rel. Najczęściej występującym kompleksem jest heterodimer złożony z podjednostek p50 i p65, jednak pozostałe białka również mogą tworzyć homo- lub heterodimeryczne połączenia [Desmet i wsp., 2004]. W formie nieaktywnej kompleks NF-κB występuje w cytoplazmie, gdzie jest związany z białkami inhibitorowymi IκB, przede wszystkim IκB-α, które hamują jego translokację do jądra komórkowego. Pod wpływem różnorodnych sygnałów białko IκB ulega fosforylacji przy udziale kinazy IKK (ang. *IκB kinase*), ubikwitynacji i ostatecznie degradacji w proteasomie, co umożliwia przemieszczenie się NF-κB do jądra, związanie ze specyficznymi sekwencjami DNA i rozpoczęcie transkrypcji właściwych genów [Bureau i wsp., 2000; Poynter i wsp., 2002]. Jednym z bodźców aktywujących NF-κB jest stres oksydacyjny [Lu i Wahl, 2005], ulegający nasileniu w przebiegu procesów zapalnych w drogach oddechowych. Zwiększoną aktywność tego czynnika transkrypcyjnego zaobserwowano w komórkach nabłonka dróg oddechowych, zarówno w modelach zwierzęcych choroby, jak i u pacjentów cierpiących na astmę oskrzelową [Hart i wsp., 1998; Poynter i wsp., 2002].

W przedstawionych doświadczeniach ekspresja NF-κB mierzona była jedynie metodą immunohistochemiczną, co nie pozwala jednoznacznie ustalić czy działanie hybrydy PK20 obejmuje zahamowanie szlaku sygnałowego jądrowego czynnika transkrypcyjnego. Takie stwierdzenie wymagałoby bowiem przeprowadzenia badań odzwierciedlających aktywację czynnika NF-κB takich jak degradacja białka inhibitorowego IκB czy translokacja podjednostek NF-κB do jądra komórkowego. Jednakże otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z pozostałymi analizami. Obniżona ekspresja NF-κB koreluje ze zmniejszonym poziomem markera stresu oksydacyjnego MDA i spadkiem stężenia prozapalnych cytokin m.in. TNF-α, których wytwarzanie mediowane jest przez NF-κB [Park i wsp., 2009], a to z kolei ogranicza

napływ komórek odpowiedzi zapalnej do dróg oddechowych. Nie jest zatem wykluczone, iż ścieżka sygnałowa NF- κ B może być zaangażowana w przeciwzapalny efekt działania hybrydy PK20 w modelu astmy niealergiczej wywołanej podaniem haptenu, jednak potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych badań.

Przeprowadzone doświadczenia dowodzą, iż aktywność związku hybrydowego nie jest prostą sumą aktywności poszczególnych części składowych, które posłużyły do jego syntezy. Hybryda PK20 cechuje się silniejszym potencjałem przeciwzapalnym niż równomolowa mieszanina jej obu farmakoforów, co było szczególnie widoczne w przypadku analizy liczby komórek odpowiedzi zapalnej w BALF, poziomu cytokin prozapalnych, m.in. IL-13 i TNF- α oraz ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i badań histologicznych tkanki płucnej. W części doświadczeń mieszanina farmakoforów hybrydy nie wykazała znamiennej korzystnego wpływu na badane parametry w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę pozytywną, w innych charakteryzowała się działaniem zbliżonym do chimery PK20, w żadnej z analiz nie ujawniła jednak istotnego statystycznie, silniejszego efektu przeciwzapalnego niż badana hybryda. Obserwowane wyniki mogą być rezultatem m.in. zwiększenia stabilności enzymatycznej hybrydy PK20, co zostało osiągnięte poprzez wprowadzenie dodatkowych aminokwasów do jej szkieletu peptydowego [Kleczkowska i wsp., 2010].

Badania porównujące aktywność związku hybrydowego i mieszaniny jego strukturalnych elementów zostały przeprowadzone także dla [Ile⁹]PK20 - cząsteczki, która różni się od hybrydy PK20 obecnością izoleucyny w pozycji 9 [Kleczkowska i wsp., 2016]. Eksperymenty dotyczyły właściwości przeciwbólowych związku, a uzyskane wyniki wskazały, iż mieszania farmakoforów hybrydy cechuje się silniejszym działaniem analgetycznym niż sama hybryda. Należy mieć jednak na uwadze, iż badania dotyczyły całkowicie odmiennego modelu doświadczalnego, część z nich przeprowadzana była na szczurach, a badany związek podawany był dooponowo [Kleczkowska i wsp., 2016]. Wymienione różnice nie pozwalają zatem odnosić ich bezpośrednio do wyników będących przedmiotem niniejszej dysertacji. Istotny wydaje się jednak fakt, iż mieszanina farmakoforów chimery powodowała znaczące upośledzenie koordynacji ruchowej u badanych szczurów, określanej przy pomocy testu bieżni obrotowej (ang. *rotarod test*). Takiego niekorzystnego efektu nie zaobserwowano natomiast po podaniu hybrydy [Kleczkowska i wsp., 2016], co wspiera założenie, iż metoda

hybrydyzacji umożliwia projektowanie i syntezę związków o ograniczonych działaniach niepożądanych w porównaniu z tymi, które wynikają ze stosowania prostej mieszaniny części składowych związku hybrydowego.

5.3. Ocena zaangażowania farmakoforu endomorfiny 2 i farmakoforu neurotensyny w przeciwzapalną aktywność hybrydy PK20 i jej wpływ na nadreaktywność oskrzeli

W pierwszym etapie doświadczeń dowiedziono, iż hybryda PK20 charakteryzuje się silniejszym potencjałem przeciwzapalnym niż mieszanina jej obu farmakoforów. Kolejnym krokiem, będącym próbą dokładniejszego zdefiniowania cech badanego związku hybrydowego, było określenie, który z jego komponentów w większym stopniu odpowiada za obserwowane efekty. W tym celu przeprowadzono eksperymenty, w których podanie hybrydy PK20 poprzedzone było zastosowaniem antagonisty receptorów opioidowych (chlorowodoru naloksonu) lub antagonisty receptorów neurotensynowych (SR 142948).

Chlorowodorek naloksonu jest związkiem stosowanym w leczeniu m.in. w przypadku przedawkowania leków opioidowych, nie wykazuje przy tym potencjału uzależniającego. Po podaniu doustnym jest szybko metabolizowany, przez co nie osiąga wystarczającego stężenia we krwi, dlatego też powinien być podawany drogą pozajelitową [Brunton i wsp., 2005]. Chlorowodorek naloksonu cechuje się nieselektywnym i kompetycyjnym antagonizmem wobec receptorów opioidowych, przejawia jednak zróżnicowaną zdolność do wiązania się z poszczególnymi typami receptorów - największe powinowactwo wykazuje do receptorów μ , mniejsze do receptorów κ i najmniejsze do receptorów δ [Brunton i wsp., 2005]. W przypadku receptorów neurotensynowych natomiast, pierwszym zsyntetyzowanym związkiem antagonistycznym był SR 48692, niepeptydowa cząsteczka, która cechuje się znacznie większym powinowactwem do receptora NTR1 niż NTR2, może zatem stanowić przydatne narzędzie w badaniach nad zaangażowaniem receptorów NTR1 w efekty wywoływane przez neurotensynę [Gully i wsp., 1993]. SR 48692 nie powoduje jednak zahamowania hipotermii i analgezji wywołanej przez ośrodkowe podanie NT [Dubuc i wsp., 1994], w przeciwieństwie do innego antagonisty - SR 142948, który charakteryzuje się szerszym spektrum działania, obejmującym również zablokowanie indukowanego przez NT wynaczyniania osocza i zmian w ciśnieniu krwi [Schaeffer i wsp., 1998; Kaczyńska i wsp., 2017]. Pomimo iż SR 142948 wykazuje działanie

antagonistyczne wobec obu typów receptorów neurotensynowych [Betancur i wsp., 1998], nadal cechuje się blisko 10-krotnie większym powinowactwem do receptora NTR1 aniżeli NTR2 [Tyler-McMahon i wsp., 2000]. Warto zaznaczyć, iż zbadanie zaangażowania receptora NTR2 w modelu mysim nie jest możliwe, ze względu na brak selektywnego blokera dla tego receptora. Lewokabastyna, rozpoznawana przez NTR2, cechuje się bowiem zmiennym charakterem w zależności od gatunku - działa jako agonista u myszy i jako antagonistą u ludzi [St-Gelais i wsp., 2006].

W kontekście badań nad właściwościami przeciwzapalnymi hybrydy PK20 w modelu astmy niealergiczej, istotne jest, iż udowodniono obecność receptorów neurotensynowych i opioidowych w drogach oddechowych, uwzględniając płuca [Bhargava i wsp., 1997; Robbins i wsp., 1995] i włókna unerwiające drzewo oskrzelowe [Aas i Helle, 1982; Krajnik i wsp., 2014], jak również na komórkach biorących udział w reakcji zapalnej takich jak limfocyty, makrofagi, granulocyty czy mastocyty [Sharp, 2006; Katsanos i wsp., 2008]. Ważny jest także fakt, iż hybryda PK20 została sklasyfikowana jako pełny agonista, zarówno w stosunku do receptora neurotensynowego NTR1, jak i receptora opioidowego μ [Kleczkowska i wsp., 2015].

Podczas doświadczeń określających wpływ zablokowania poszczególnych ścieżek receptorowych, zaobserwowano, iż zastosowanie związków antagonistycznych nie wywarło niekorzystnego efektu na potencjał PK20 osłabiający nadreaktywność dróg oddechowych. Wydają się więc, że zarówno pobudzenie receptorów opioidowych, jak i neurotensynowych odpowiada za działanie hybrydy. W grupie myszy otrzymujących chlorowoderek naloksonu doszło do blokady receptorów opioidowych, wskutek czego, obserwowany efekt powinien wynikać z pobudzenia receptorów neurotensynowych. Dane literaturowe dotyczące wpływu neurotensyny na nadreaktywność dróg oddechowych pozostają sprzeczne. Doświadczenia *in vitro* przy użyciu wyizolowanych preparatów oskrzeli szczura i świnki morskiej wskazują na kurczące działanie NT na mięśnie gładkie dróg oddechowych [Aas i Helle, 1982; Djokic i wsp., 1989]. Przeciwnie wnioski płyną z kolejnych badań, w których zaobserwowano hamujące działanie NT na cholinergiczną i niecholinergiczną kurczliwość oskrzeli wywołaną stymulacją elektryczną, a uzyskany efekt był odwracany przy zastosowaniu selektywnego antagonisty receptora neurotensynowego - SR 48692 [Martin i wsp., 1994]. Wyniki najnowszych doświadczeń wskazują na korzystny wpływ NT na nadreaktywność oskrzeli

w mysim modelu astmy niealergiczej, który został częściowo zahamowany poprzez zastosowanie antagonisty SR 142948 [Russjan i Kaczyńska, 2019]. Należy mieć jednak na uwadze, że w przytoczonych badaniach analizowano właściwości całej cząsteczki neurotensyny, podczas gdy w prezentowanych eksperymentach jedynie jej fragment częściowo zmodyfikowany, stanowiący komponent składowy chimery. Z kolei zablokowanie receptorów NTR poprzez podanie związku SR 142948, ujawniło zaangażowanie receptorów opioidowych w efekt działania hybrydy PK20 na AHR, w szczególności przy wyższych dawkach nebulizowanej metacholiny. Badania innych autorów potwierdzają, iż endomorfiny pobudzając receptory μ , osłabiają kurczliwość mięśni gładkich tchawicy na drodze zahamowania przekaźnictwa cholinergicznego, a efekt ten zostaje zniesiony poprzez zastosowanie naloksonu [Patel i wsp., 1999]. W tym przypadku również należy uwzględnić, iż w eksperymentach własnych za obserwowany efekt odpowiada fragment endomorfiny hybrydy, który uległ pewnym modyfikacjom w stosunku do pierwotnej cząsteczki endomorfiny 2, pozostając jednak równocześnie silnym agonistą receptorów opioidowych μ [Kleczkowska i wsp., 2013a].

W trakcie kolejnych doświadczeń, analiza płynu pęcherzykowo-oskrzelowego wykazała, iż zastosowanie antagonisty receptorów neurotensynowych SR 142948 skutkowało częściowym osłabieniem działania chimery PK20, zarówno w badaniach całkowitej liczby komórek odpowiedzi zapalnej, jak i liczby neutrofilów. Odmienne rezultaty uzyskano dla grupy zwierząt otrzymującej chlorowoderek naloksonu - zastosowanie antagonisty receptorów opioidowych nie spowodowało bowiem zmian w aktywności badanej hybrydy. Poczynione obserwacje mogą zatem sugerować, iż dla wystąpienia korzystnego działania hybrydy PK20 wobec napływu komórek odpowiedzi zapalnej do dróg oddechowych niezbędne jest pobudzenie receptorów neurotensynowych.

Niejednoznaczne wyniki uzyskano natomiast w badaniach oceniających wpływ związków antagonistycznych na zdolność chimery PK20 do redukcji poziomu cytokin prozapalnych w płynie pęcherzykowo-oskrzelowym i homogenatach tkanki płucnej. W przeważającej części analiz zastosowanie zarówno chlorowodoru naloksonu, jak i SR 142948, doprowadziło do ograniczenia aktywności badanej hybrydy, tak jak miało to miejsce w przypadku IL-1 β , a nawet do całkowitego zahamowania jej działania, co odnotowano dla IL-2 oraz IL-17A. Podobne wyniki otrzymano dla TNF- α , przy czym

blokada receptorów opioidowych skutkowała całkowitym, a blokada receptorów neurotensynowych częściowym zmniejszeniem aktywności chimery PK20. W przypadku dwóch cytokin: IL-13 i CXCL1 zaobserwowano jednak przeciwne zależności - ich stężenia były porównywalne z tymi uzyskanymi dla hybrydy PK20, niezależnie do tego, które z receptorów zostały zablokowane. Dla IL-1 α i IL-12p40 zahamowanie ścieżki neurotensynowej okazało się bardziej niekorzystne w porównaniu z blokadą receptorów opioidowych. Z kolei w przypadku RANTES zastosowanie chlorowodoru naloksonu zdecydowanie bardziej osłabiło działanie hybrydy niż podanie związku SR 142948, co wskazywałoby na silniejsze zaangażowanie komponentu endomorfinowego w obserwowane efekty.

Udział części opioidowej wydaje się mieć także bardzo istotne znaczenie dla aktywności chimery wobec stężenia mysiej proteazy komórek tucznych w homogenatach tkanki płuc. Nieselektywne zablokowanie receptorów μ , κ i δ spowodowało bowiem całkowite zahamowanie działania związku hybrydowego, podczas gdy blokada receptorów NTR ograniczyła aktywność chimery tylko w pewnym stopniu. Odwrotny efekt zaobserwowano w doświadczeniach analizujących aktywność sekrecyjnej fosfolipazy A₂, gdzie zablokowanie receptorów neurotensynowych skutkowało zupełnym pozbawieniem korzystnego działania hybrydy PK20, zaś podanie chlorowodoru naloksonu nie zmieniło w sposób istotny jej aktywności. Z kolei w przypadku badań nad poziomem markera stresu oksydacyjnego MDA, podobnie jak w analizach stężenia IL-13 i CXCL1, wcześniejsze podanie chlorowodoru naloksonu lub SR 142948 nie wpłynęło w sposób niekorzystny na efekt wywoływany przez związek hybrydowy.

W świetle wyników otrzymanych w badaniach własnych trudno jednoznacznie stwierdzić, który z farmakoforów chimery PK20 w większym stopniu odpowiada za jej działanie przeciwzapalne. Wydaje się jednak, iż pobudzenie obu ścieżek receptorowych ma istotne znaczenie dla uzyskania pełnej aktywności hybrydy. Zaangażowanie poszczególnych farmakoforów hybrydy analizowano także w kontekście jej oddziaływania na parametry oddechowe i sercowo-naczyniowe u szczurów, stosując te same związki antagonistyczne jak w prezentowanych doświadczeniach. Tak jak uprzednio wspomniano, podanie chimery PK20 drogą dożylną u zwierząt uśpionych skutkowało wystąpieniem krótkich bezdechów i hipotensji. Iniekcja SR 142948 przed zastosowaniem chimery skutecznie zahamowała spadek ciśnienia krwi, podczas gdy zmiany oddechowe zostały zniesione zarówno poprzez

podanie SR 142948, jak i chlorowodoru naloksonu. Jest zatem prawdopodobne, iż wystąpienie krótkotrwałej depresji oddechowej po dożylnym podaniu hybrydy wynikało z jednoczesnego pobudzenia receptorów μ i receptorów NTR1 [Kaczyńska i wsp., 2017]. Obserwacje te pozostają w zgodzie z doświadczeniami oceniającymi potencjał przeciwbólowy chimery. W badaniach tych zastosowanie związków antagonistycznych, naltreksonu i SR 48692, pozwoliło udowodnić, iż w indukowanej przez hybrydę PK20 analgezji, podobnie jak w efekcie przeciwzapalnym, uczestniczą zarówno receptory opioidowe, jak i receptory neurotensynowe [Kleczkowska i wsp., 2013a].

Doniesienia literaturowe na temat właściwości chimer o budowie podobnej do hybrydy PK20 są ograniczone. Przykładem może być jednak związek bifunkcyjny złożony z [Leu⁵]enkefaliną, będącej peptydem opioidowym i wykazującej powinowactwo do receptorów opioidowych μ oraz δ , która połączona została z aktywnym fragmentem neurotensyny (8-13) za pomocą specjalnego łącznika. Łącznik ten zbudowano z oligomeru sarkozyny o różnej długości łańcucha, co miało wpływ na powinowactwo badanej cząsteczki do poszczególnych receptorów. Dane uzyskane w przytoczonych doświadczeniach sugerują, iż nowo zsyntetyzowany związek pobudza jednocześnie dwie różne ścieżki receptorowe: opioidową i neurotensynową [Yano i wsp., 1998], co może mieć również miejsce w prezentowanych badaniach.

Podsumowując, w działanie badanej hybrydy PK20 są zaangażowane oba komponenty strukturalne: endomorficzny oraz neurotensynowy, i jednoczesne pobudzenie obu ścieżek receptorowych wydaje się być konieczne do uzyskania pełnej aktywności przeciwzapalnej związku.

6. WNIOSKI

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły ocenić przeciwzapalne działanie hybrydy PK20 i mieszaniny jej obu farmakoforów w eksperymentalnym modelu astmy nieatopowej, a także porównać uzyskane wyniki z aktywnością deksametazonu, traktowanego w tym modelu jako związek odniesienia. Podjęte badania były także próbą ustalenia, który z farmakoforów hybrydy w większym stopniu odpowiada za jej działanie przeciwzapalne. Wnioski płynące z przeprowadzonych eksperymentów stanowią odpowiedź na wyznaczone na wstępie cel ogólny i cele szczegółowe pracy.

- I. Hybryda PK20 wykazuje potencjał przeciwzapalny w mysim modelu astmy niealergiczej, w znaczący sposób zmniejszając objawy stanu zapalnego w drogach oddechowych, takie jak: napływ komórek odpowiedzi zapalnej do BALF i tkanki płucnej, nasiloną ekspresję jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, produkcja cytokin prozapalnych, zwiększenie poziomu albumin w BALF oraz wzrost stężenia mysiej proteazy komórek tucznych, dialdehydu malonowego i sekrecyjnej fosfolipazy A₂ w homogenatach tkanki płuc.
- II. Przeciwzapalny efekt działania hybrydy jest porównywalny do aktywności deksametazonu, jednak wykazuje ona mniejszy niż deksametazon wpływ na nadreaktywność dróg oddechowych w odpowiedzi na kurczące działanie metacholiny.
- III. Związek hybrydowy cechuje się silniejszą aktywnością przeciwzapalną niż równomolowa mieszanina jego obu farmakoforów podanych jednocześnie.
- IV. Aktywacja zarówno receptorów opioidowych, jak i receptorów neurotensynowych wydaje się być niezbędna do wywołania pełnego efektu przeciwzapalnego badanej hybrydy.

APPENDIX I. Leki stosowane w farmakoterapii astmy oskrzelowej

GRUPA LEKÓW	MECHANIZM DZIAŁANIA	NAZWY LEKÓW	STOSOWANIE / CHARAKTERYSTYKA	LITERATURA
Leki kontrolujące przebieg astmy oskrzelowej				
Glikokortykosteroidy stosowane wziewnie (wGKS)	Mechanizmy genomowe poprzez receptor GR i mechanizmy niegenomowe	budezonid, beklometazonu dipropionian, flutikazonu propionian, mometazonu furoinian, cyklezonid	- ograniczają proces zapalny w drogach oddechowych i nadreaktywność oskrzeli, poprawiają parametry funkcji płuc - zmniejszają częstość zaostrzeń choroby - polepszają jakość życia pacjentów	[Barnes i wsp., 1998; Stahn i wsp., 2007; GINA, 2012]
Długo działające leki β_2 -adrenomimetyczne (LABA)	Pobudzenie receptorów β_2 -adrenergicznych	formoterol, salmeterol	- stosowane w terapii skojarzonej z wGKS (formoterol + budezonid, formoterol + beklometazonu dipropionian, salmeterol + flutikazonu propionian, wilanterol + flutikazonu furoinian)	[Barnes, 2002; Johnson, 2006]
Długo działające leki cholinolityczne	Blokowanie receptorów muskarynowych M_1 i M_3	bromek tiotropium	- stosowany u pacjentów z zaawansowaną astmą oskrzelową, u których leczenie za pomocą średnich lub dużych dawek wGKS w połączeniu LABA nie pozwala na kontrolę objawów	[Buhl i wsp., 2019]
Leki przeciwleukotrienowe	Blokowanie receptorów leukotrienowych CysLT ₁ (LTRA)/ hamowanie aktywności enzymu 5-lipooksygenazy	montelukast/ zileuton	- w monoterapii astmy przewlekłej o łagodnym przebiegu i w astmie z nadwrażliwością na aspirynę - także jako lek dodatkowy u pacjentów z astmą umiarkowaną lub ciężką, pozwalający na zmniejszenie dawki wGKS	[Reiss i wsp., 1998; Löfdahl i wsp., 1999; Israel, 2000]
Metyloksantyny	Nieselektywne hamowanie fosodiesteraz III, IV, V, blokowanie receptorów adenyzynowych A_1 , A_{2a} , A_{2b} , zwiększanie aktywności deacytlaz histonowych	teofilina	- stosowana w ograniczonym zakresie ze względu na relatywnie niską skuteczność w astmie oskrzelowej - wąski indeks terapeutyczny - wysokie ryzyko działań niepożądanych	[Barnes, 2003; GINA, 2020]
Leki stosowane w astmie ciężkiej				
Glikokortykosteroidy stosowane ogólnoustrojowo	Mechanizmy genomowe poprzez receptor GR i mechanizmy niegenomowe	prednizon, prednizolon, metylopednizolon	- u pacjentów z astmą ciężką, w której objawy nie są kontrolowane pomimo dotychczasowego leczenia oraz w sytuacji nagłych, ciężkich zaostrzeń choroby - stosowanie wiąże się z wysokim ryzykiem poważnych działań niepożądanych	[Barnes i wsp., 1998; Stahn i wsp., 2007; GINA, 2020]
Przeciwciało monoklonalne anti-IgE	Wybiórcze wiązanie się z przeciwciałem IgE	omalizumab	- u pacjentów z ciężką, przewlekłą astmą alergiczną, u których duże dawki wGKS w skojarzeniu z LABA nie są skuteczne	[Thomson i wsp., 2012; GINA, 2012]
Przeciwciała monoklonalne anti-IL5, anti-IL5R, anti-IL4R	Wiązanie się z krążącą IL-5/ receptorem IL-5/ receptorem IL-4	mepolizumab, reslizumab/ benralizumab/ dupilumab	- stosowane u pacjentów z ciężką, niekontrolowaną astmą, cechującą się eozynofilią	[GINA, 2020]
Leki stosowane doraźnie w astmie oskrzelowej				
Krótko działające leki β_2 -adrenomimetyczne (SABA)	Pobudzenie receptorów β_2 -adrenergicznych	fenoterol, salbutamol	- stosowane doraźnie w nagłym skurczu oskrzeli, według aktualnych wytycznych jako leczenie alternatywne w skojarzeniu z małą dawką wGKS	[Johnson, 2006; GINA, 2020]
Krótko działające leki cholinolityczne	Blokowanie receptorów muskarynowych M_1 , M_2 i M_3	bromek ipratropium	- alternatywny lek rozszerzający oskrzela u pacjentów nie mogących stosować SABA lub w połączeniu z SABA podczas ciężkich zaostrzeń astmy	[GINA, 2012; Kirkland i wsp., 2017; Buhl i wsp., 2019]

APPENDIX II. Trójliterowe skróty nazw aminokwasów [Turner i wsp., 2011]

PEŁNA NAZWA AMINOKWASU	TRÓJLITEROWY SKRÓT NAZWY
Kwas asparaginowy	Asp
Kwas glutaminowy	Glu
Histydyna	His
Lizyna	Lys
Arginina	Arg
Seryna	Ser
Treonina	Thr
Asparagina	Asn
Glutamina	Gln
Cysteina	Cys
Glicyna	Gly
Alanina	Ala
Walina	Val
Leucyna	Leu
Izoleucyna	Ile
Metionina	Met
Prolina	Pro
Fenylalanina	Phe
Tyrozyna	Tyr
Tryptofan	Trp

LITERATURA

- Aas P., Helle K.B. Neurotensin receptors in the rat bronchi. *Regul. Pept.* 1982; 3(5-6):405-13.
- Abdi K. IL-12: the role of p40 versus p75. *Scand. J. Immunol.* 2002; 56(1):1-11.
- Abdelaziz R.R., Elmahdy M.K., Suddek G.M. Flavocoxid attenuates airway inflammation in ovalbumin-induced mouse asthma model. *Chem. Biol. Interact.* 2018; 292:15-23.
- Adcock I.M., Gilbey T., Gelder C.M., Chung K.F., Barnes P.J. Glucocorticoid receptor localization in normal and asthmatic lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154(3 Pt 1):771-82.
- Adler A., Cieslewicz G., Irvin C.G. Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airway responsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice. *J. Appl. Physiol.* (1985). 2004; 97(1):286-92.
- Adler K.B., Holden-Stauffer W.J., Repine J.E. Oxygen metabolites stimulate release of high-molecular-weight glycoconjugates by cell and organ cultures of rodent respiratory epithelium via an arachidonic acid-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 1990; 85(1):75-85.
- Aggarwal S., Ghilardi N., Xie M.H., de Sauvage F.J., Gurney A.L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(3):1910-4.
- Akcan A., Muhtaroglu S., Akgun H., Akyildiz H., Kucuk C., Sozuer E., Yurci A., Yilmaz N. Ameliorative effects of bombesin and neurotensin on trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis, oxidative damage and apoptosis in rats. *World J. Gastroenterol.* 2008; 14(8):1222-30.
- Aldawsari F.S., Aguiar R.P., Wiirzler L.A., Aguayo-Ortiz R., Aljuhani N., Cuman R.K., Medina-Franco J.L., Siraki A.G., Velázquez-Martínez C.A. Anti-inflammatory and antioxidant properties of a novel resveratrol-salicylate hybrid analog. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016; 26(5):1411-5.

- Al-Ramli W., Préfontaine D., Chouiali F., Martin J.G., Olivenstein R., Lemière C., Hamid Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 123(5):1185-7.
- Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir. Med.* 2012; 106(1):9-14.
- Amin K., Lúdvíksdóttir D., Janson C., Nettelbladt O., Björnsson E., Roomans G.M., Boman G., Sevéus L., Venge P. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162(6):2295-301.
- Anselmi L., Huynh J., Duraffourd C., Jaramillo I., Vegezzi G., Sacconi F., Boschetti E., Brecha N.C., De Giorgio R., Sternini C. Activation of μ opioid receptors modulates inflammation in acute experimental colitis. *Neurogastroenterol. Motil.* 2015; 27(4):509-23.
- Antczak A., Nowak D., Shariati B., Król M., Piasecka G., Kurmanowska Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur. Respir. J.* 1997; 10(6):1235-41.
- Azuma Y., Ohura K. Endomorphin-2 modulates productions of TNF-alpha, IL-1beta, IL-10, and IL-12, and alters functions related to innate immune of macrophages. *Inflammation.* 2002; 26(5):223-32.
- Azuma Y., Wang P.L., Shinohara M., Ohura K. Immunomodulation of the neutrophil respiratory burst by endomorphins 1 and 2. *Immunol. Lett.* 2000; 75(1):55-9.
- Barczyk A., Pierzchala W., Sozańska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir. Med.* 2003; 97(6):726-33.
- Bardana E.J. Jr. Occupational asthma and allergies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111(2 Suppl):S530-9.
- Barnes P.J. Distribution of receptor targets in the lung. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004; 1(4):345-51.
- Barnes P.J. Inhaled Corticosteroids. *Pharmaceuticals.* 2010; 3(3):514-540.

- Barnes P.J. Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens? *Clin. Exp. Allergy*. 2009; 39(8):1145-51.
- Barnes P.J. Neurogenic inflammation and asthma. *J. Asthma*. 1992; 29(3):165-80.
- Barnes P.J. Scientific rationale for inhaled combination therapy with long-acting beta2-agonists and corticosteroids. *Eur. Respir. J.* 2002; 19(1):182-91.
- Barnes P.J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(11):3546-56.
- Barnes P.J. Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167(6): 813-8.
- Barnes P.J., Pedersen S., Busse W.W. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 157(3 Pt 2):S1-53.
- Beeh K.M., Ksoll M., Buhl R. Elevation of total serum immunoglobulin E is associated with asthma in nonallergic individuals. *Eur. Respir. J.* 2000; 16(4):609-14.
- Belvisi M.G., Rogers D.F., Barnes P.J. Neurogenic plasma extravasation: inhibition by morphine in guinea pig airways in vivo. *J. Appl. Physiol. (1985)*. 1989; 66(1):268-72.
- Belvisi M.G., Stretton C.D., Barnes P.J. Modulation of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways by opioids. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 100(1):131-7.
- Belvisi M.G., Stretton C.D., Verleden G.M., Ledingham S.J., Yacoub M.H., Barnes P.J. Inhibition of cholinergic neurotransmission in human airways by opioids. *J. Appl. Physiol. (1985)*. 1992; 72(3):1096-100.
- Berkman N., Krishnan V.L., Gilbey T., Newton R., O'Connor B., Barnes P.J., Chung K.F. Expression of RANTES mRNA and protein in airways of patients with mild asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154(6 Pt 1):1804-11.
- Bérubé G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert Opin. Drug. Discov.* 2016; 11(3):281-305.

- Betancur C., Canton M., Burgos A., Labeeuw B., Gully D., Rostène W., Pélaprat D. Characterization of binding sites of a new neurotensin receptor antagonist, [3H]SR 142948A, in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 343(1):67-77.
- Bhargava H.N., Villar V.M., Cortijo J., Morcillo E.J. Binding of [3H][D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵] enkephalin, [3H][D-Pen², D-Pen⁵]enkephalin, and [3H]U-69,593 to airway and pulmonary tissues of normal and sensitized rats. *Peptides.* 1997; 18(10):1603-8.
- Bigliardi P.L., Büchner S., Rufli T., Bigliardi-Qi M. Specific stimulation of migration of human keratinocytes by mu-opiate receptor agonists. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2002; 22(1-4):191-9.
- Bissette G., Nemeroff C.B., Loosen P.T., Prange A.J. Jr., Lipton M.A. Hypothermia and intolerance to cold induced by intracisternal administration of the hypothalamic peptide neurotensin. *Nature.* 1976; 262(5569):607-9.
- Björck T., Gustafsson L.E., Dahlén S.E. Isolated bronchi from asthmatics are hyperresponsive to adenosine, which apparently acts indirectly by liberation of leukotrienes and histamine. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 145(5):1087-91.
- Bonini M., Scichilone N. Tiotropium in asthma: back to the future of anticholinergic treatment. *Clin. Mol. Allergy.* 2017; 15:20.
- Börzsei R., Pozsgai G., Bagoly T., Elekes K., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Z. Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience.* 2008; 152(1):82-8.
- Boules M., Li Z., Smith K., Fredrickson P., Richelson E. Diverse roles of neurotensin agonists in the central nervous system. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2013; 4:36.
- Boulet L.P., Lemièrre C., Gauvreau G., Olivenstein R., Loughheed D., Paradis B., O'Byrne P., Pageau R., Renzi P.M. Safety, pharmacodynamics and pharmacokinetics of TPI 1020 in smokers with asthma. *Respir. Med.* 2009; 103(8):1159-66.
- Bousquet J., Gaugris S., Kocevar V.S., Zhang Q., Yin D.D., Polos P.G., Bjermer L. Increased risk of asthma attacks and emergency visits among asthma patients with allergic rhinitis: a subgroup analysis of the improving asthma control trial. *Clin. Exp. Allergy.* 2005; 35(6):723-7.

- Bozkurt T.E., Kaya Y., Durlu-Kandilci N.T., Onder S., Sahin-Erdemli I. The effect of cannabinoids on dinitrofluorobenzene-induced experimental asthma in mice. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2016; 231:7-13.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-54.
- Bruijnzeel P.L., Uddin M., Koenderman L. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? *J. Leukoc. Biol.* 2015; 98(4):549-56.
- Brun P., Mastrotto C., Beggiao E., Stefani A., Barzon L., Sturniolo G.C., Palù G., Castagliuolo I. Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005; 288(4):G621-9.
- Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, USA, 2005.
- Buckley T.L., Nijkamp F.P. Airways hyperreactivity and cellular accumulation in a delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse. Modulation by capsaicin-sensitive nerves. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 149(2 Pt 1):400-7.
- Buhl R., Hamelmann E. Future perspectives of anticholinergics for the treatment of asthma in adults and children. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2019; 15:473-485.
- Bureau F., Delhalle S., Bonizzi G., Fiévez L., Dogné S., Kirschvink N., Vanderplasschen A., Merville M.P., Bours V., Lekeux P. Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J. Immunol.* 2000; 165(10):5822-30.
- Cannizzaro V., Hantos Z., Sly P.D., Zosky G.R. Linking lung function and inflammatory responses in ventilator-induced lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2011; 300, L112-L120.
- Carraway R., Leeman S.E. The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin. *J. Biol. Chem.* 1975; 250(5):1907-11.
- Carraway R., Leeman S.E. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J. Biol. Chem.* 1973; 248(19):6854-61.

- Castagliuolo I., Wang C.C., Valenick L., Pasha A., Nikulasson S., Carraway R.E., Pothoulakis C. Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *J. Clin. Invest.* 1999; 103(6):843-9.
- Chalimoniuk M. Secretory phospholipase A2 and its role in oxidative stress and inflammation. *Postepy Biochem.* 2012; 58(2):204-8.
- Chalon P., Vita N., Kaghad M., Guillemot M., Bonnin J., Delpech B., Le Fur G., Ferrara P., Caput D. Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett.* 1996; 386(2-3):91-4.
- Chauhan P.S., Singh D.K., Dash D., Singh R. Intranasal curcumin regulates chronic asthma in mice by modulating NF- κ B activation and MAPK signaling. *Phytomedicine.* 2018; 51:29-38.
- Chihara J., Yamada H., Yamamoto T., Kurachi D., Hayashi-Kameda N., Honda K., Kayaba H., Urayama O. Priming effect of RANTES on eosinophil oxidative metabolism. *Allergy.* 1998; 53(12):1178-82.
- Christman J.W., Sadikot R.T., Blackwell T.S. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. *Chest.* 2000; 117(5):1482-7.
- Chung H.S., Kim Y., Oh S.J., Kim H., Choi S.I., Zhang Y., Jeong J.H., Bae H. A synthetic compound, 4-acetyl-3-methyl-6-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione, ameliorates ovalbumin-induced asthma. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; 21(21):6359-65.
- Ciepiela O., Ostafin M., Demkow U. Neutrophils in asthma - a review. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2015; 209:13-6.
- Clineschmidt B.V., McGuffin J.C. Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur. J. Pharmacol.* 1977; 46(4):395-6.
- Comi A.L., Tedeschi A., Lorini M., Miadonna A. Novel clinical and serological aspects in non-allergic asthma. *Respir. Med.* 2007; 101(12):2526-33.
- Cooper A.M., Khader S.A. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol.* 2007; 28(1):33-8.

- Cowburn A.S., Condliffe A.M., Farahi N., Summers C., Chilvers E.R. Advances in neutrophil biology: clinical implications. *Chest*. 2008; 134(3):606-612.
- Cox B.M., Christie M.J., Devi L., Toll L., Traynor J.R. Challenges for opioid receptor nomenclature: IUPHAR Review 9. *Br. J. Pharmacol.* 2015; 172(2):317-23.
- da Silva F.P., Machado M.C., Sallet P.C., Zampieri F.G., Goulart A.C., Torggler Filho F., Barbeiro H.V., Velasco I.T., da Cruz Neto L.M., de Souza H.P. Neuropeptide downregulation in sepsis. *Inflammation*. 2014; 37(1):142-5.
- da Silva L., Neves B.M., Moura L., Cruz M.T., Carvalho E. Neurotensin downregulates the pro-inflammatory properties of skin dendritic cells and increases epidermal growth factor expression. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; 1813(10):1863-71.
- Dai H., Korthuis R.J. Mast Cell Proteases and Inflammation. *Drug Discov. Today Dis. Models*. 2011; 8(1):47-55.
- de Boer J., Meurs H., Flendrig L., Koopal M., Zaagsma J. Role of nitric oxide and superoxide in allergen-induced airway hyperreactivity after the late asthmatic reaction in guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 133(8):1235-42.
- De Vooght V., Vanoirbeek J.A., Luyts K., Haenen S., Nemery B., Hoet P.H. Choice of mouse strain influences the outcome in a mouse model of chemical-induced asthma. *PLoS One*. 2010; 5(9):e12581.
- Dearman R.J., Kimber I. Differential stimulation of immune function by respiratory and contact chemical allergens. *Immunology*. 1991; 72(4):563-70.
- Dennis E.A., Cao J., Hsu Y.H., Magrioti V., Kokotos G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 2011; 111(10):6130-85.
- Desmet C., Gosset P., Pajak B., Cataldo D., Bentires-Alj M., Lekeux P., Bureau F. Selective blockade of NF-kappa B activity in airway immune cells inhibits the effector phase of experimental asthma. *J. Immunol.* 2004; 173(9):5766-75.
- Diaz B.L., Arm J.P. Phospholipase A(2). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2003; 69(2-3):87-97.

- Dietis N., Guerrini R., Calo G., Salvadori S., Rowbotham D.J., Lambert D.G. Simultaneous targeting of multiple opioid receptors: a strategy to improve side-effect profile. *Br. J. Anaesth.* 2009; 103(1):38-49.
- Dinarello C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27:519-50.
- Djokic T.D., Dusser D.J., Borson D.B., Nadel J.A. Neutral endopeptidase modulates neurotensin-induced airway contraction. *J. Appl. Physiol.* 1989; 66(5):2338-43.
- Drews A.C., Pizzichini M.M., Pizzichini E., Pereira M.U., Pitrez P.M., Jones M.H., Sly P.D., Stein R.T. Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children. *Allergy.* 2009; 64(11):1597-601.
- Duarte Y., Fonseca A., Gutiérrez M., Adasme-Carreño F., Muñoz-Gutierrez C., Alzate-Morales J., Santana L., Uriarte E., Álvarez R., Matos M.J. Novel Coumarin-Quinoline Hybrids: Design of Multitarget Compounds for Alzheimer's Disease. *Chemistry Select.* 2019; 4(2):551-8.
- Dubuc I., Costentin J., Terranova J.P., Barnouin M.C., Soubrié P., Le Fur G., Rostène W., Kitabgi P. The nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* 1994; 112(2):352-4.
- Ebino K., Ueda H., Kawakatsu H., Shutoh Y., Kosaka T., Nagayoshi E., Lemus R., Karol M.H. Isolated airway exposure to toluene diisocyanate results in skin sensitization. *Toxicol. Lett.* 2001; 121(1):79-85.
- Enander I., Ahlstedt S., Nygren H., Björkstén B. Sensitizing ability of derivatives of picryl chloride after exposure of mice on the skin and in the lung. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1983; 72(1):59-66.
- Evans M.D., Esnault S., Denlinger L.C., Jarjour N.N. Sputum cell IL-1 receptor expression level is a marker of airway neutrophilia and airflow obstruction in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018; 142(2):415-423.
- Fahy J.V., Kim K.W., Liu J., Boushey H.A. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 1995; 95(4):843-52.

- Fichna J., Janecka A., Costentin J., Do Rego J.C. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol. Rev.* 2007; 59(1):88-123.
- Finkelman F.D. Use of unrestrained, single-chamber barometric plethysmography to evaluate sensitivity to cholinergic stimulation in mouse models of allergic airway disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 121(2):334-5.
- Fischer A., Udem B.J. Naloxone blocks endomorphin-1 but not endomorphin-2 induced inhibition of tachykinergic contractions of guinea-pig isolated bronchus. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 127(3):605-8.
- Folco G., Murphy R.C. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol. Rev.* 2006; 58(3):375-88.
- Garssen J., Nijkamp F.P., van Der Vliet H., van Loveren H. T-cell-mediated induction of airway hyperreactivity in mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144(4):931-8.
- Garssen J., Nijkamp F.P., Wagenaar S.S., Zwart A., Askenase P.W., van Loveren H. Regulation of delayed-type hypersensitivity-like responses in the mouse lung, determined with histological procedures: serotonin, T-cell suppressor-inducer factor and high antigen dose tolerance regulate the magnitude of T-cell dependent inflammatory reactions. *Immunology.* 1989; 68(1):51-8.
- Geba G.P., Wegner C.D., Wolyniec W.W., Li Y., Askenase P.W. Nonatopic asthma: in vivo airway hyperreactivity adoptively transferred to naive mice by THY-1(+) and B220(+) antigen-specific cells that lack surface expression of CD3. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(3):629-38.
- Gell P.G., Coombs R.R. The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical Aspects of Immunology.* Blackwell Science, Oxford, 1963.
- Glaab T., Taube C., Braun A., Mitzner W. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respir. Res.* 2007; 8:63.
- Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2012.
- Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2020.

- Godard P., Chanez P., Siraudin L., Nicoloyannis N., Duru G. Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study. *Eur. Respir. J.* 2002; 19(1):61-7.
- Gołąb J., Jakóbiński M., Lasek W., Stokłosa T. *Immunologia*. PWN, Warszawa, 2017.
- Goleva E., Hauk P.J., Hall C.F., Liu A.H., Riches D.W., Martin R.J., Leung D.Y. Corticosteroid-resistant asthma is associated with classical antimicrobial activation of airway macrophages. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 122(3):550-9.
- Groneberg D.A., Fischer A. Endogenous opioids as mediators of asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2001; 14(5):383-9.
- Guerrant W., Patil V., Canzoneri J.C., Oyelere A.K. Dual targeting of histone deacetylase and topoisomerase II with novel bifunctional inhibitors. *J. Med. Chem.* 2012; 55(4):1465-77.
- Guillemyn K., Starnowska J., Lagard C., Dyniewicz J., Rojewska E., Mika J., Chung N.N., Utard V., Kosson P., Lipkowski A.W., Chevillard L., Arranz-Gibert P., Teixidó M., Megarbane B., Tourwé D., Simonin F., Przewlocka B., Schiller P.W., Ballet S. Bifunctional Peptide-Based Opioid Agonist-Nociceptin Antagonist Ligands for Dual Treatment of Acute and Neuropathic Pain. *J. Med. Chem.* 2016; 59(8):3777-92.
- Gully D., Canton M., Boigegrain R., Jeanjean F., Molimard J.C., Poncelet M., Gueudet C., Heaulme M., Leyris R., Brouard A. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90(1):65-9.
- Gunetti M., Castiglia S., Rustichelli D., Mareschi K., Sanavio F., Muraro M., Signorino E., Castello L., Ferrero I., Fagioli F. Validation of analytical methods in GMP: the disposable Fast Read 102® device, an alternative practical approach for cell counting. *J. Transl. Med.* 2012; 10:112.
- Gurusamy M., Nasser S., Lee H., Jung B., Lee D., Khang G., Abraham W.M., Doods H., Wu D. Kinin B1 receptor antagonist BI13823 reduces allergen-induced airway inflammation and mucus secretion in mice. *Pharmacol. Res.* 2016; 104:132-9.

- Hallstrand T.S., Chi E.Y., Singer A.G., Gelb M.H., Henderson W.R. Jr. Secreted phospholipase A2 group X overexpression in asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 176(11):1072-8.
- Hallstrand T.S., Lai Y., Altemeier W.A., Appel C.L., Johnson B., Frevert C.W., Hudkins K.L., Bollinger J.G., Woodruff P.G., Hyde D.M., Henderson W.R. Jr., Gelb M.H. Regulation and function of epithelial secreted phospholipase A2 group X in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 188(1):42-50.
- Hansbro P.M., Kaiko G.E., Foster P.S. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma? *Br. J. Pharmacol.* 2011; 163(1):81-95.
- Harrison C., Smart D., Lambert D.G. Stimulatory effects of opioids. *Br. J. Anaesth.* 1998; 81(1):20-8.
- Hart L.A., Krishnan V.L., Adcock I.M., Barnes P.J., Chung K.F. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158(5 Pt 1):1585-92.
- Hashimoto T., Kobayashi N., Kajiyama Y., Kaminuma O., Suko M., Mori A. IL-2-induced IL-13 production by allergen-specific human helper T cell clones. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2006; 140(1 Suppl):51-4.
- Hattori H., Imai H., Furuhashi K., Sato O., Nakagawa Y. Induction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human polymorphonuclear neutrophils and HL60 cells stimulated with TNF-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 337(2):464-73.
- Hellings P.W., Kasran A., Liu Z., Vandekerckhove P., Wuyts A., Overbergh L., Mathieu C., Ceuppens J.L. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003; 28(1):42-50.
- Henricks P.A., Nijkamp F.P. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2001; 14(6):409-20.
- Herbert C., Hettiaratchi A., Webb D.C., Thomas P.S., Foster P.S., Kumar R.K. Suppression of cytokine expression by roflumilast and dexamethasone in a model of chronic asthma. *Clin. Exp. Allergy.* 2008; 38(5):847-56.

- Hol J., Wilhelmsen L., Haraldsen G. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 87(3):501-8.
- Holgate S., Buhl R., Bousquet J., Smith N., Panahloo Z., Jimenez P. The use of omalizumab in the treatment of severe allergic asthma: A clinical experience update. *Respir. Med.* 2009; 103(8):1098-113.
- Horvath G. Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous mu-opioid receptor agonists. *Pharmacol. Ther.* 2000; 88(3):437-63.
- Hoshino H., Laan M., Sjöstrand M., Lötvall J., Skoogh B.E., Linden A. Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 105(1 Pt 1):143-9.
- Hosseinzadeh H., Mazaheri F., Ghodsi R. Pharmacological effects of a synthetic quinoline, a hybrid of tomoxiprole and naproxen, against acute pain and inflammation in mice: a behavioral and docking study. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2017; 20(4):446-450.
- Hoymann H.G. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2007; 55(1):16-26.
- Humbert M., Durham S.R., Kimmitt P., Powell N., Assoufi B., Pfister R., Menz G., Kay A.B., Corrigan C.J. Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 99(5):657-65.
- Humbert M., Menz G., Ying S., Corrigan C.J., Robinson D.S., Durham S.R., Kay A.B. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol. Today.* 1999; 20(11):528-33.
- Israel E. The protective effects of leukotriene modifiers in aspirin-induced asthma. *Postgrad. Med.* 2000; 108(4 Suppl):40-4.
- Jacobsen L., Madsen P., Jacobsen C., Nielsen M.S., Gliemann J., Petersen C.M. Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(25):22788-96.

- Jatakanon A., Uasuf C., Maziak W., Lim S., Chung K.F., Barnes P.J. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160(5 Pt 1):1532-9.
- Jessop D.S., Richards L.J., Harbuz M.S. Opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2 in the immune system in humans and in a rodent model of inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 966:456-63.
- Jessop D.S. Endomorphins as agents for the treatment of chronic inflammatory disease. *BioDrugs.* 2006; 20(3):161-6.
- Johansson S.G., Hourihane J.O., Bousquet J., Brujnzeel-Koomen C., Dreborg S., Haahtela T., Kowalski M.L., Mygind N., Ring J., van Cauwenberge P., van Hage-Hamsten M., Wüthrich B. EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy.* 2001; 56(9):813-24.
- Johnson M. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117(1):18-24.
- Johnson V.J., Yucesoy B., Luster M.I. Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 116(4):851-8.
- Jones M.G., Floyd A., Nouri-Aria K.T., Jacobson M.R., Durham S.R., Taylor A.N., Cullinan P. Is occupational asthma to diisocyanates a non-IgE-mediated disease? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117(3):663-9.
- Joseph B.Z., Routes J.M., Borish L. Activities of superoxide dismutases and NADPH oxidase in neutrophils obtained from asthmatic and normal donors. *Inflammation.* 1993; 17(3):361-70.
- Kaczyńska K., Kogut E., Zając D., Jampolska M., Andrzejewski K., Sulejczak D., Lipkowski A.W., Kleczkowska P. Neurotensin-based hybrid peptide's anti-inflammatory activity in murine model of a contact sensitivity response. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016; 93:84-9.
- Kaczyńska K., Wojciechowski P., Jampolska M., Lipkowski A.W., Kleczkowska P. Cardiovascular and respiratory activity of PK20, opioid and neurotensin hybrid peptide in anesthetized and awake rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2017; 797:20-25.

- Kalish R.S., Askenase P.W. Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: implications for allergies, asthma, and autoimmunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 103(2 Pt 1):192-9.
- Kanagalingam T., Solomon L., Vijeyakumaran M., Palikhe N.S., Vliagoftis H., Cameron L. IL-2 modulates Th2 cell responses to glucocorticosteroid: A cause of persistent type 2 inflammation? *Immun. Inflamm. Dis.* 2019; 7(3):112-124.
- Kantrow S.P., Shen Z., Jagneaux T., Zhang P., Nelson S. Neutrophil-mediated lung permeability and host defense proteins. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2009; 297(4):L738-45.
- Karakiulakis G., Roth M. Muscarinic receptors and their antagonists in COPD: anti-inflammatory and antiremodeling effects. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012:409580.
- Katsanos G.S., Anogianaki A., Castellani M.L., Ciampoli C., De Amicis D., Orso C., Pollice R., Vecchiet J., Tetè S., Salini V., Caraffa A., Patruno A., Shaik Y.B., Kempuraj D., Doyle R., Antinolfi P.L., Cerulli G., Conti C.M., Fulcheri M., Neri G., Sabatino G. Biology of neurotensin: revisited study. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2008; 21(2):255-9.
- Kim Y.S., Ko H.M., Kang N.I., Song C.H., Zhang X., Chung W.C., Kim J.H., Choi I.H., Park Y.M., Kim G.Y., Im S.Y., Lee H.K. Mast cells play a key role in the development of late airway hyperresponsiveness through TNF-alpha in a murine model of asthma. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(4):1107-15.
- King T.E. Jr. A new look at the pathophysiology of asthma. *J. Natl. Med. Assoc.* 1999; 91(8 Suppl):9S-15S.
- Kirkland S.W., Vandenberghe C., Voaklander B., Nikel T., Campbell S., Rowe B.H. Combined inhaled beta-agonist and anticholinergic agents for emergency management in adults with asthma. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 1:CD001284.
- Kitabgi P. Effects of neurotensin on intestinal smooth muscle: application to the study of structure-activity relationships. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1982; 400:37-55.
- Kitabgi P. Neurotensin and neuromedin N are differentially processed from a common precursor by prohormone convertases in tissues and cell lines. *Results Probl. Cell Differ.* 2010; 50:85-96.

- Kleczkowska P., Bojnik E., Leśniak A., Kosson P., van den Eynde I., Ballet S., Benyhe S., Tourwé D., Lipkowski A.W. Identification of Dmt-D-Lys-Phe-Phe-OH as a highly antinociceptive tetrapeptide metabolite of the opioid-neurotensin hybrid peptide PK20. *Pharmacol. Rep.* 2013a; 65(4):836-46.
- Kleczkowska P., Hermans E., Kosson P., Kowalczyk A., Lesniak A., Pawlik K., Bojnik E., Benyhe S., Nowicka B., Bujalska-Zadrozny M., Misicka A., Lipkowski A.W. Antinociceptive effect induced by a combination of opioid and neurotensin moieties vs. their hybrid peptide [Ile(9)]PK20 in an acute pain treatment in rodents. *Brain Res.* 2016; 1648(Pt A):172-180.
- Kleczkowska P., Kawalec M., Bujalska-Zadrozny M., Filip M., Zablocka B., Lipkowski A.W. Effects of the Hybridization of Opioid and Neurotensin Pharmacophores on Cell Survival in Rat Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Neurotox. Res.* 2015; 28(4):352-60.
- Kleczkowska P., Kosson P., Ballet S., van den Eynde I., Tsuda Y., Tourwé D., Lipkowski A.W. PK20, a new opioid-neurotensin hybrid peptide that exhibits central and peripheral antinociceptive effects. *Mol. Pain.* 2010; 6:86.
- Kleczkowska P., Lipkowski A.W., Tourwé D., Ballet S. Hybrid opioid/non-opioid ligands in pain research. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19(42):7435-50.
- Kleczkowska P., Lipkowski A.W. Neurotensin and neurotensin receptors: characteristic, structure-activity relationship and pain modulation - a review. *Eur. J. Pharmacol.* 2013b; 716(1-3):54-60.
- Kolls J.K., Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004; 21(4):467-76.
- Korth C., Klingenstein R., Müller-Schiffmann A. Hybrid molecules synergistically acting against protein aggregation diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* 2013; 13(19):2484-90.
- Krajnik M., Jassem E., Sobanski P. Opioid receptor bronchial tree: current science. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* 2014; 8(3):191-9.
- Kraneveld A.D., van der Kleij H.P., Kool M., van Houwelingen A.H., Weitenberg A.C., Redegeld F.A., Nijkamp F.P. Key role for mast cells in nonatopic asthma. *J. Immunol.* 2002; 169(4):2044-53.

- Krawiec M.E., Jarjour N.J. Leukotriene receptor antagonists. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 23(4):399-410.
- Kumar R.K., Foster P.S. Are mouse models of asthma appropriate for investigating the pathogenesis of airway hyper-responsiveness? *Front. Physiol.* 2012; 3:312.
- Kumar R.K., Herbert C., Thomas P.S., Wollin L., Beume R., Yang M., Webb D.C., Foster P.S. Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 307(1):349-55.
- Kuo H.P., Rohde J.A., Barnes P.J., Rogers D.F. Differential inhibitory effects of opioids on cigarette smoke, capsaicin and electrically-induced goblet cell secretion in guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 105(2):361-6.
- Largent-Milnes T.M., Yamamoto T., Nair P., Moulton J.W., Hruby V.J., Lai J., Porreca F., Vanderah T.W. Spinal or systemic TY005, a peptidic opioid agonist/neurokinin 1 antagonist, attenuates pain with reduced tolerance. *Br. J. Pharmacol.* 2010; 161(5):986-1001.
- Lemièrè C., Romeo P., Chaboillez S., Tremblay C., Malo J.L. Airway inflammation and functional changes after exposure to different concentrations of isocyanates. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110(4):641-6.
- Leung D.Y., Martin R.J., Szeffler S.J., Sher E.R., Ying S., Kay A.B., Hamid Q. Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *J. Exp. Med.* 1995; 181(1):33-40.
- Ling Y., Wang X., Wang C., Xu C., Zhang W., Zhang Y., Zhang Y. Hybrids from Farnesylthiosalicylic Acid and Hydroxamic Acid as Dual Ras-Related Signaling and Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors: Design, Synthesis and Biological Evaluation. *ChemMedChem.* 2015; 10(6):971-6.
- Lloyd CM. Building better mouse models of asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2007; 7(3):231-6.
- Löfdahl C.G., Reiss T.F., Leff J.A., Israel E., Noonan M.J., Finn A.F., Seidenberg B.C., Capizzi T., Kundu S., Godard P. Randomised, placebo controlled trial of effect of a leukotriene receptor antagonist, montelukast, on tapering inhaled corticosteroids in asthmatic patients. *BMJ.* 1999; 319(7202):87-90.

- Lu Y., Wahl L.M. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J. Immunol.* 2005; 175(8):5423-9.
- Lukacs N.W., Strieter R.M., Chensue S.W., Widmer M., Kunkel S.L. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J. Immunol.* 1995; 154(10):5411-7.
- Lundblad L.K., Irvin C.G., Adler A., Bates J.H. A reevaluation of the validity of unrestrained plethysmography in mice. *J. Appl. Physiol. (1985).* 2002; 93(4):1198-207.
- Maestrelli P., Boschetto P., Fabbri L.M., Mapp C.E. Mechanisms of occupational asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 123(3):531-42.
- Majewska M., Szczepanik M. Contact sensitivity reaction, its mechanism and regulation. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2009; 63:47-57.
- Marçal L.E., Rehder J., Newburger P.E., Condino-Neto A. Superoxide release and cellular glutathione peroxidase activity in leukocytes from children with persistent asthma. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004; 37(11):1607-13.
- Margolis K.G., Gershon M.D. Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2009; 25(6):503-11.
- Martin C.A., Gully D., Naline E., Advenier C. Neurotensin modulates cholinergic and noncholinergic neurotransmission in guinea-pig main bronchi in vitro. *Neuropeptides.* 1994; 26(3):159-66.
- Matheson J.M., Johnson V.J., Vallyathan V., Luster M.I. Exposure and immunological determinants in a murine model for toluene diisocyanate (TDI) asthma. *Toxicol. Sci.* 2005; 84(1):88-98.
- Mazella J., Zsürger N., Navarro V., Chabry J., Kaghad M., Caput D., Ferrara P., Vita N., Gully D., Maffrand J.P., Vincent J.P. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(41):26273-6.
- McCann S.M., Vijayan E. Control of anterior pituitary hormone secretion by neurotensin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992; 668:287-97.

- McQuaid K.E., Smyth E.M., Keenan A.K. Evidence for modulation of hydrogen peroxide-induced endothelial barrier dysfunction by nitric oxide in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 307(2):233-41.
- Méndez-Enríquez E., Hallgren J. Mast Cells and Their Progenitors in Allergic Asthma. *Front. Immunol.* 2019; 10:821.
- Menz G., Ying S., Durham S.R., Corrigan C.J., Robinson D.S., Hamid Q., Pfister R., Humbert M., Kay A.B. Molecular concepts of IgE-initiated inflammation in atopic and nonatopic asthma. *Allergy.* 1998; 53(45 Suppl):15-21.
- Merrifield R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963; 85(14):2149-2154.
- Meyts I., Hellings P.W., Hens G., Vanaudenaerde B.M., Verbinen B., Heremans H., Matthys P., Bullens D.M., Overbergh L., Mathieu C., De Boeck K., Ceuppens J.L. IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma. *J. Immunol.* 2006; 177(9):6460-70.
- Micheli L., Bozdag M., Akgul O., Carta F., Guccione C., Bergonzi M.C., Bilia A.R., Cinci L., Lucarini E., Parisio C., Supuran C.T., Ghelardini C., Di Cesare Mannelli L. Pain Relieving Effect of-NSAIDs-CAIs Hybrid Molecules: Systemic and Intra-Articular Treatments against Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(8).
- Mims J.W. Asthma: definitions and pathophysiology. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2015; 5 (1 Suppl):S2-6.
- Minami M., Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.* 1995; 23(2):121-45.
- Monteseirín J. Neutrophils and asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2009; 19(5):340-54.
- Montuschi P. Role of Leukotrienes and Leukotriene Modifiers in Asthma. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010; 3(6):1792-1811.
- Morphy R., Rankovic Z. The physicochemical challenges of designing multiple ligands. *J. Med. Chem.* 2006; 49(16):4961-70.

- Morroni F., Sita G., Graziosi A., Ravegnini G., Molteni R., Paladini M.S., Dias K.S., Dos Santos A.F., Viegas C. Jr., Camps I., Pruccoli L., Tarozzi A., Hrelia P. PQM130, a Novel Feruloyl-Donepezil Hybrid Compound, Effectively Ameliorates the Cognitive Impairments and Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front. Pharmacol.* 2019; 10:658.
- Moura L.I., Dias A.M., Suesca E., Casadiegos S., Leal E.C., Fontanilla M.R., Carvalho L., de Sousa H.C., Carvalho E. Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1842(1):32-43.
- Mouthuy J., Detry B., Sohy C., Pirson F., Pilette C. Presence in sputum of functional dust mite-specific IgE antibodies in intrinsic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 184(2):206-14.
- Mruwat R., Yedgar S., Lavon I., Ariel A., Krinsky M., Shoseyov D. Phospholipase A2 in experimental allergic bronchitis: a lesson from mouse and rat models. *PLoS One.* 2013; 8(10):e76641.
- Mueller T.D., Zhang J.L., Sebald W., Duschl A. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1592(3):237-50.
- Muti A.D., Pârvu A.E., Muti L.A., Moldovan R., Mureşan A. Vitamin E effect in a rat model of toluene diisocyanate-induced asthma. *Clujul Med.* 2016; 89(4):499-505.
- Nabe T. Steroid-Resistant Asthma and Neutrophils. *Biol. Pharm. Bull.* 2020; 43(1):31-35.
- Nadeem A., Chhabra S.K., Masood A., Raj H.G. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111(1):72-8.
- Nadeem A., Siddiqui N., Alharbi N.O., Alharbi M.M. Airway and systemic oxidant-antioxidant dysregulation in asthma: a possible scenario of oxidants spill over from lung into blood. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2014; 29(1):31-40.
- Nader M.A. Inhibition of airway inflammation and remodeling by sitagliptin in murine chronic asthma. *Int. Immunopharmacol.* 2015; 29(2):761-769.

- Nahm D.H., Yim H., Lee H.J., Yim E.J., Choi E.A., Kim S.S., Lee S.K., Park H.S. Presence of circulating autoantibodies against bronchial epithelia cell in patients with nonatopic asthma. *J. Korean Med. Sci.* 2000; 15(6):631-4.
- Nakae S., Ho L.H., Yu M., Monteforte R., Iikura M., Suto H., Galli S.J. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 120(1):48-55.
- Nauta A.J., Engels F., Knippels L.M., Garssen J., Nijkamp F.P., Redegeld F.A. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 585(2-3):354-60.
- Nijkamp F.P., Henricks P.A. Receptors in airway disease. Beta-adrenoceptors in lung inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 141(3 Pt 2):S145-50.
- Nishino R., Fukuyama T., Watanabe Y., Kurosawa Y., Koasaka T., Harada T. Detection of respiratory allergies caused by environmental chemical allergen via measures of hyper-activation and degranulation of mast cells in lungs of NC/Nga mice. *J. Immunotoxicol.* 2016; 13(5):676-85.
- Nolin J.D., Lai Y., Ogden H.L., Manicone A.M., Murphy R.C., An D., Frevert C.W., Ghomashchi F., Naika G.S., Gelb M.H., Gauvreau G.M., Piliponsky A.M., Altemeier W.A., Hallstrand T.S. Secreted PLA2 group X orchestrates innate and adaptive immune responses to inhaled allergen. *JCI Insight.* 2017; 2(21).
- Novak N., Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112(2):252-62.
- Offer S., Yedgar S., Schwob O., Krinsky M., Bibi H., Eliraz A., Madar Z., Shoseyov D. Negative feedback between secretory and cytosolic phospholipase A2 and their opposing roles in ovalbumin-induced bronchoconstriction in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005; 288(3):L523-9.
- Olejnik A.K., Brzezińska-Błaszczyk E. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) modulates rat mast cell reactivity. *Immunol. Lett.* 1998; 64(2-3):167-71.
- Ownby D.R., Joseph C.L. Should nonatopic asthma get equal attention? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 120(5):1018-20.

- Paggiaro P., Bacci E., Paoletti P., Bernard P., Dente F.L., Marchetti G., Talini D., Menconi G.F., Giuntini C. Bronchoalveolar lavage and morphology of the airways after cessation of exposure in asthmatic subjects sensitized to toluene diisocyanate. *Chest*. 1990; 98(3):536-42.
- Paljetak H.C., Tomaskovic L., Matijasic M., Bukvic M., Fajdetic A., Verbanac D., Peric M. Macrolide Hybrid Compounds: Drug Discovery Opportunities in Anti- Infective and Anti-inflammatory Area. *Curr. Top. Med. Chem.* 2017; 17(8):919-940.
- Pan Z.Z., Parkyn L., Ray A., Ray P. Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential recruitment of neutrophils. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279(4):L658-66.
- Park H.S., Kim S.R., Lee Y.C. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*. 2009; 14(1):27-38.
- Patel H.J., Venkatesan P., Halfpenny J., Yacoub M.H., Fox A., Barnes P.J., Belvisi M.G. Modulation of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig and human trachea by endomorphin-1 and -2. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 374(1):21-4.
- Patel K.N., Chorawala M.R. Animal models of asthma. *J. Pharmaceut. Res. Opin.* 2011; 5:139–147.
- Pearce N., Pekkanen J., Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax*. 1999; 54(3):268-72.
- Peebles R.S. Jr. Prostaglandins in asthma and allergic diseases. *Pharmacol. Ther.* 2019; 193:1-19.
- Pejler G., Rönnberg E., Waern I., Wernersson S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood*. 2010; 115(24):4981-90.
- Pereira da Silva L., Miguel Neves B., Moura L., Cruz M.T., Carvalho E. Neurotensin decreases the proinflammatory status of human skin fibroblasts and increases epidermal growth factor expression. *Int. J. Inflamm.* 2014; 2014:248240.

- Philippe D., Dubuquoy L., Groux H., Brun V., Chuoï-Mariot M.T., Gaveriaux-Ruff C., Colombel J.F., Kieffer B.L., Desreumaux P. Anti-inflammatory properties of the mu opioid receptor support its use in the treatment of colon inflammation. *J. Clin. Invest.* 2003; 111(9):1329-38.
- Piliponsky A.M., Chen C.C., Nishimura T., Metz M., Rios E.J., Dobner P.R., Wada E., Wada K., Zacharias S., Mohanasundaram U.M., Faix J.D., Abrink M., Pejler G., Pearl R.G., Tsai M., Galli S.J. Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat. Med.* 2008; 14(4):392-8.
- Pillai P., Corrigan C.J., Ying S. Airway epithelium in atopic and nonatopic asthma: similarities and differences. *ISRN Allergy.* 2011:195846.
- Pollaris L., Devos F., De Vooght V., Seys S., Nemery B., Hoet P.H., Vanoirbeek J.A. Toluene diisocyanate and methylene diphenyl diisocyanate: asthmatic response and cross-reactivity in a mouse model. *Arch. Toxicol.* 2016; 90(7):1709-17.
- Poynter M.E., Irvin C.G., Janssen-Heininger Y.M. Rapid activation of nuclear factor-kappaB in airway epithelium in a murine model of allergic airway inflammation. *Am. J. Pathol.* 2002; 160(4):1325-34.
- Rabe K.F., Magnussen H., Dent G. Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants. *Eur. Respir. J.* 1995; 8(4):637-42.
- Rackemann F.M. A working classification of asthma. *Am. J. Med.* 1947; 3(5):601-6.
- Rai R.R., Phadke M.S. Plasma oxidant-antioxidant status in different respiratory disorders. *Indian J. Clin. Biochem.* 2006; 21(2):161-4.
- Redlich C.A., Karol M.H. Diisocyanate asthma: clinical aspects and immunopathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 2002; 2(2-3):213-24.
- Regal J.F., Greene A.L., Regal R.R. Mechanisms of occupational asthma: Not all allergens are equal. *Environ. Health Prev. Med.* 2007; 12(4):165-71.
- Regal J.F., Mohrman M.E., Sailstad D.M. Trimellitic anhydride-induced eosinophilia in a mouse model of occupational asthma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001; 175(3):234-42.

- Reiss T.F., Chervinsky P., Dockhorn R.J., Shingo S., Seidenberg B., Edwards T.B. Montelukast, a once-daily leukotriene receptor antagonist, in the treatment of chronic asthma: a multicenter, randomized, double-blind trial. Montelukast Clinical Research Study Group. *Arch. Intern. Med.* 1998; 158(11):1213-20.
- Robbins R.A., Nelson K.J., Gossman G.L., Rubinstein I. Neurotensin stimulates neutrophil adherence to bronchial epithelial cells in vitro. *Life Sci.* 1995; 56(16):1353-9.
- Rogala B., Bozek A., Gluck J., Jarzab J. Prevalence of IgE-mediated allergy and evaluation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with severe bronchial asthma. *Postepy Dermatol. Alergol.* 2015; 32(4):274-80.
- Romanet-Manent S., Charpin D., Magnan A., Lanteaume A., Vervloet D. EGEA Cooperative Group. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy.* 2002; 57(7):607-13.
- Romero A., Planas E., Poveda R., Sánchez S., Pol O., Puig M.M. Anti-exudative effects of opioid receptor agonists in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation of the paw. *Eur. J. Pharmacol.* 2005; 511(2-3):207-17.
- Russjan E., Kaczyńska K. Beneficial Effects of Neurotensin in Murine Model of Hapten-Induced Asthma. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(20).
- Russjan E., Kaczyńska K. Murine models of hapten-induced asthma. *Toxicology.* 2018; 410:41-48.
- Sadowska-Woda I., Bieszczad-Bedrejczuk E. Rola stresu oksydacyjnego w patogenezie astmy oskrzelowej. *Alergia Astma Immunologia.* 2011; 16(2):80-89.
- Sailstad D.M., Ward M.D., Boykin E.H., Selgrade M.K. A murine model for low molecular weight chemicals: differentiation of respiratory sensitizers (TMA) from contact sensitizers (DNFB). *Toxicology.* 2003; 194(1-2):147-61.
- Salter H.H. On Asthma: Its Pathology and Treatment. John Churchill, London, 1860. [https://archive.org/stream/b23984144/b23984144_djvu.txt dostęp: 03.06.2020]
- Sarpong S.B., Zhang L.Y., Kleeberger S.R. A novel mouse model of experimental asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 132(4):346-54.

- Schaeffer P., Laplace M.C., Bernat A., Prabonnaud V., Gully D., Lespy L., Herbert J.M. SR142948A is a potent antagonist of the cardiovascular effects of neurotensin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998; 31(4):545-50.
- Scheurich P., Thoma B., Ucer U., Pfizenmaier K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses. *J. Immunol.* 1987; 138(6):1786-90.
- Schmier J.K., Chan K.S., Leidy N.K. The impact of asthma on health-related quality of life. *J. Asthma.* 1998; 35(7):585-97.
- Sharp B.M. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav. Immun.* 2006; 20(1):9-14.
- Shenvi S., Kiran K.R., Kumar K., Diwakar L., Reddy G.C. Synthesis and biological evaluation of boswellic acid-NSAID hybrid molecules as anti-inflammatory and anti-arthritic agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2015; 98:170-8.
- Shin Y.S., Takeda K., Gelfand E.W. Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2009; 1(1):10-8.
- Shiota Y., Arikita H., Horita N., Hiyama J., Ono T., Yamakido M. Intracellular IL-5 and T-lymphocyte subsets in atopic and nonatopic bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109(2):294-8.
- Smit J.J., van Loveren H., Hoekstra M.O., van der Kant P.A., Folkerts G., Nijkamp F.P. Therapeutic treatment with heat-killed *Mycobacterium vaccae* (SRL172) in a mild and severe mouse model for allergic asthma. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; 470(3):193-9.
- Stahn C., Löwenberg M., Hommes D.W., Buttgerit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007; 275(1-2):71-8.
- St-Gelais F., Jomphe C., Trudeau L.E. The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J. Psychiatry Neurosci.* 2006; 31(4):229-45.

- Straub R.H., Wolff C., Fassold A., Hofbauer R., Chover-Gonzalez A., Richards L.J., Jessop D.S. Antiinflammatory role of endomorphins in osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and adjuvant-induced polyarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(2):456-66.
- Sun L.Z., Elsayed S., Bronstad A.M., van Do T., Irgens A., Aardal N.P., Aasen T.B. Airway inflammation and bronchial remodelling in toluene diisocyanate-exposed BALB/c mouse model. *Scand. J. Immunol.* 2007; 65(2):118-25.
- Świerczyńska-Machura D., Walusiak-Skorupa J., Nowakowska-Świrta E., Piasecka-Zelga J., Świercz R., Pałczyński C. Immunological determinants in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 2012; 25(4):492-8.
- Szlagatys-Sidorkiewicz A., Góra-Gębska M., Korzon M. Reaktywne formy tlenu i bariera antyoksydacyjna w astmie. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2007; 75:158-162.
- Tanaka K., Masu M., Nakanishi S. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron.* 1990; 4(6):847-54.
- Tarkowski M., Vanoirbeek J.A., Vanhooren H.M., De Vooght V., Mercier C.M., Ceuppens J., Nemery B., Hoet P.H. Immunological determinants of ventilatory changes induced in mice by dermal sensitization and respiratory challenge with toluene diisocyanate. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007; 292(1):L207-14.
- Theoduloz C., Delporte C., Valenzuela-Barra G., Silva X., Cádiz S., Bustamante F., Pertino M.W., Schmeda-Hirschmann G. Topical Anti-inflammatory Activity of New Hybrid Molecules of Terpenes and Synthetic Drugs. *Molecules.* 2015; 20(6):11219-35.
- Thomas K., Moody T.W., Jensen R.T., Tong J., Rayner C.L., Barnett N.L., Fairfull-Smith K.E., Ridnour L.A., Wink D.A., Bottle S.E. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid nitroxide-based non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Med. Chem.* 2018; 147:34-47.
- Thomas P.S., Heywood G. Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax.* 2002; 57(9):774-8.
- Thomas P.S., Yates D.H., Barnes P.J. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152(1):76-80.

- Thomas P.S. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol. Cell Biol.* 2001; 79(2):132-40.
- Thomson N.C., Chaudhuri R. Omalizumab: clinical use for the management of asthma. *Clin. Med. Insights Circ. Respir. Pulm. Med.* 2012; 6:27-40.
- Tournoy K.G., Kips J.C., Schou C., Pauwels R.A. Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Clin. Exp. Allergy.* 2000; 30(1):79-85.
- Tränkner D., Hahne N., Sugino K., Hoon M.A., Zuker C. Population of sensory neurons essential for asthmatic hyperreactivity of inflamed airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(31):11515-20.
- Trifilieff A., El-Hashim A., Bertrand C. Time course of inflammatory and remodeling events in a murine model of asthma: effect of steroid treatment. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279(6):L1120-8.
- Trinchieri G., Pflanz S., Kastelein R.A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003; 19(5):641-4.
- Tsukagoshi H., Sakamoto T., Xu W., Barnes P.J., Chung K.F. Effect of interleukin-1 beta on airway hyperresponsiveness and inflammation in sensitized and nonsensitized Brown-Norway rats. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 93(2):464-9.
- Turner P., McLennan A., Bates A., White M. Krótkie wykłady. *Biologia Molekularna.* PWN, Warszawa, 2011.
- Tyler-McMahon B.M., Boules M., Richelson E. Neurotensin: peptide for the next millennium. *Regul. Pept.* 2000; 93(1-3):125-36.
- Ulrich K., Hincks J.S., Walsh R., Wetterstrand E.M., Fidock M.D., Sreckovic S., Lamb D.J., Douglas G.J., Yeadon M., Perros-Huguet C., Evans S.M. Anti-inflammatory modulation of chronic airway inflammation in the murine house dust mite model. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2008; 21(4):637-47.
- Vaccarino A.L., Kastin A.J. Endogenous opiates: 2000. *Peptides.* 2001; 22(12):2257-328.

- van de Graaf E.A., Out T.A., Roos C.M., Jansen H.M. Respiratory membrane permeability and bronchial hyperreactivity in patients with stable asthma. Effects of therapy with inhaled steroids. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 143(2):362-8.
- van der Kleij H.P., Kraneveld A.D., van Houwelingen A.H., Kool M., Weitenberg A.C., Redegeld F.A., Nijkamp F.P. Murine model for non-IgE-mediated asthma. *Inflammation.* 2004; 28(3):115-25.
- van Houwelingen A.H., Kraneveld A.D., Nijkamp F.P. Hapten-induced hypersensitivity reactions in the airways: atopic versus non-atopic. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2002; 11(3-4):197-205.
- van Vyve T., Chanez P., Bernard A., Bousquet J., Godard P., Lauwerijs R., Sibille Y. Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 95(1 Pt 1):60-8.
- Vanoirbeek J.A., Tarkowski M., De Vooght V., Nemery B., Hoet P.H. Immunological determinants in a mouse model of chemical-induced asthma after multiple exposures. *Scand. J. Immunol.* 2009; 70(1):25-33.
- Vanoirbeek J.A., Tarkowski M., Vanhooren H.M., De Vooght V., Nemery B., Hoet P.H. Validation of a mouse model of chemical-induced asthma using trimellitic anhydride, a respiratory sensitizer, and dinitrochlorobenzene, a dermal sensitizer. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117(5):1090-7.
- Vazquez-Tello A., Halwani R., Hamid Q., Al-Muhsen S. Glucocorticoid receptor-beta up-regulation and steroid resistance induction by IL-17 and IL-23 cytokine stimulation in peripheral mononuclear cells. *J. Clin. Immunol.* 2013; 33(2):466-78.
- Vennera Mdel C., Picado C. Novel diagnostic approaches and biological therapeutics for intrinsic asthma. *Int. J. Gen. Med.* 2014; 7:365-71.
- Venturini C.L., Macho A., Arunachalam K., de Almeida D.A., Rosa S.I., Pavan E., Balogun S.O., Damazo A.S., Martins D.T. Vitexin inhibits inflammation in murine ovalbumin-induced allergic asthma. *Biomed. Pharmacother.* 2018; 97:143-151.
- Verheijden K.A., Henricks P.A., Redegeld F.A., Garssen J., Folkerts G. Measurement of airway function using invasive and non-invasive methods in mild and severe models for allergic airway inflammation in mice. *Front. Pharmacol.* 2014; 5:190.

- Vieira S.M., Lemos H.P., Grespan R., Napimoga M.H., Dal-Secco D., Freitas A., Cunha T.M., Verri W.A. Jr., Souza-Junior D.A., Jamur M.C., Fernandes K.S., Oliver C., Silva J.S., Teixeira M.M., Cunha F.Q. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 158(3):779-89.
- Vincent J.P., Mazella J., Kitabgi P. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 1999; 20(7):302-9.
- Vincent J.P. Neurotensin receptors: binding properties, transduction pathways, and structure. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1995; 15(5):501-12.
- Vita N., Laurent P., Lefort S., Chalon P., Dumont X., Kaghad M., Gully D., Le Fur G., Ferrara P., Caput D. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett.* 1993; 317(1-2):139-42.
- Walker C., Bode E., Boer L., Hansel T.T., Blaser K., Virchow J.C. Jr. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 146(1):109-15.
- Walter M.J., Kajiwarra N., Karanja P., Castro M., Holtzman M.J. Interleukin 12p40 production by barrier epithelial cells during airway inflammation. *J. Exp. Med.* 2001; 193(3):339-51.
- Wang S.B., Guo X.F., Weng B., Tang S.P., Zhang H.J. Tanshinone IIA attenuates ovalbumin-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2019; 22(2):160-165.
- Wang T.N., Lin M.C., Wu C.C., Leung S.Y., Huang M.S., Chuang H.Y., Lee C.H., Wu D.C., Ho P.S., Ko A.M., Chang P.Y., Ko Y.C. Risks of exposure to occupational asthmogens in atopic and nonatopic asthma: a case-control study in Taiwan. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 182(11):1369-76.
- Warbrick E.V., Dearman R.J., Basketter D.A., Kimber I. Analysis of interleukin 12 protein production and mRNA expression in mice exposed topically to chemical allergens. *Toxicology.* 1999; 132(1):57-66.
- Wermuth C.G., Ganellin C.R., Lindberg P., Mitscher L.A. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry.* 1998; 70(5): 1129–1143.

- Wills-Karp M., Luyimbazi J., Xu X., Schofield B., Neben T.Y., Karp C.L., Donaldson D.D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998; 282(5397):2258-61.
- Wilson R.H., Whitehead G.S., Nakano H., Free M.E., Kolls J.K, Cook D.N. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2009; 180(8):720-30.
- World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach, 2007.
- Wüthrich B., Schindler C., Leuenberger P., Ackermann-Liebrich U. Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 1995; 106(2):149-56.
- Yamamoto T., Juneja L.R., Hatta H., Kim M. Hen eggs: their basic and applied science. CRS Press, USA, 1997.
- Yano K., Kimura S., Imanishi Y. Simultaneous activation of two different receptor systems by enkephalin/neurotensin conjugates having spacer chains of various lengths. *Eur. J. Pharm. Sci*. 1998; 7(1):41-48.
- Ying S., Humbert M., Meng Q., Pfister R., Menz G., Gould H.J., Kay A.B., Durham S.R. Local expression of epsilon germline gene transcripts and RNA for the epsilon heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and nonatopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2001; 107(4):686-92.
- Zadina J.E., Hackler L., Ge L.J., Kastin A.J. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature*. 1997; 386(6624):499-502.
- Zhang Q., Wang L., Chen B., Zhuo Q., Bao C., Lin L. Propofol inhibits NF- κ B activation to ameliorate airway inflammation in ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma mice. *Int. Immunopharmacol*. 2017; 51:158-164.
- Zhao D., Pothoulakis C. Effects of NT on gastrointestinal motility and secretion, and role in intestinal inflammation. *Peptides*. 2006; 27(10):2434-44.
- Zhao J., Lloyd C.M., Noble A. Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling. *Mucosal Immunol*. 2013; 6(2):335-46.

- Zietkowski Z., Tomasiak M.M., Skiepmo R., Bodzenta-Lukaszyk A. RANTES in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients. *Respir. Med.* 2008; 102(8):1198-202.
- Zijlstra G.J., Ten Hacken N.H., Hoffmann R.F., van Oosterhout A.J., Heijink I.H. Interleukin-17A induces glucocorticoid insensitivity in human bronchial epithelial cells. *Eur. Respir. J.* 2012; 39(2):439-45.
- Zlotnik A., Yoshie O., Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 2006; 7(12):243.
- Zoltowska A.M., Lei Y., Fuchs B., Rask C., Adner M., Nilsson G.P. The interleukin-33 receptor ST2 is important for the development of peripheral airway hyperresponsiveness and inflammation in a house dust mite mouse model of asthma. *Clin. Exp. Allergy.* 2016; 46(3):479-90.