

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Farmakologii

Natalia Wachowiak

**Badania aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej
wybranych acylowanych pochodnych hydroksyiminowych kwasu
oleanowego**

Praca doktorska

Promotor: Prof. UM dr hab. n. farm. Przemysław Mikołajczak

Poznań 2015

Słowa kluczowe: kwas oleanolowy, triterpeny, aktywność przeciwbólowa, aktywność przeciwzapalna, TLR, cytokiny

Praca została wykonana we współpracy z:

Katedrą i Zakładem Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie syntezy i dostarczenia substancji stanowiących temat niniejszej rozprawy,

Katedrą i Zakładem Farmacji Fizycznej i Farmakokinezyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie pomocy w obliczeniach parametru - AUC z uzyskanych wyników farmakodynamicznych,

Pracownią Farmakogenetyki Doświadczalnej Katedry i Zakładu Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie przygotowania i oznaczania prób w badaniach genetycznych.

Pragnę serdecznie podziękować promotorowi,

*Panu prof. UM dr hab. Przemysławowi
Mikołajczakowi za umożliwienie wykonania pracy
doktorskiej, nieocenioną pomoc przy jej realizacji, a
przede wszystkim za serdeczność i wyrozumiałość,
ogrom przekazanej wiedzy i motywację*

Składam serdeczne podziękowania

Pani dr n. biol. Ewie Kamińskiej za pomoc w doświadczeniach, gotowość do pracy, wyrozumiałość oraz cenne wskazówki podczas pracy badawczej

Panu Andrzejowi Kobdzie za opiekę nad zwierzętami podczas wykonywanych doświadczeń

Pani dr n. farm. Annie Bogacz, Pani dr n. biol. Joannie Bartkowiak-Wieczorek oraz Panu dr n. farm. Michałowi Szulcowi za pomoc w przygotowaniu i oznaczeniu prób do badań biochemicznych i genetycznych

Pracownikom Katedry i Zakładu Farmakologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za miłą atmosferę podczas wykonywania pracy, wszelką pomoc i życzliwość

*Niniejszą pracę dedykuję Najbliższym i
Przyjaciołom*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I NAZW CHEMICZNYCH	8
1. Wstęp	12
2. Część Teoretyczna	14
2.1. PODŁOŻE PROCESU ZAPALNEGO.....	14
2.2. BÓL W PRZEBIEGU PROCESU ZAPALNEGO.....	18
2.3. WYBRANE MEDIATORY BÓLU I PROCESU ZAPALNEGO.....	20
2.3.1. Cytokiny	22
2.3.2. PAF	23
2.3.3. Elastaza.....	24
2.3.4. Układ dopełniacza	24
2.3.5. Układ kalikreina – kininy	26
2.3.6. NF-κB	27
2.3.7. Receptory <i>Toll</i> -like	29
2.4. AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA I PRZECIWZAPALNA KWASU OLEANOLOWEGO I JEGO POCHODNYCH.....	33
3. Cel Pracy	41
4. Część Doświadczalna	42
4.1. MATERIAŁ ZWIERZĘCY I OGÓLNE WARUNKI DOŚWIADCZENIA	42
4.2. APARATURA I ODCZYNNIKI.....	43
4.2.1. Odczynniki i substancje stosowane w badaniach farmakodynamicznych.....	43
4.2.2. Przygotowanie roztworów do doświadczeń farmakodynamicznych	43
4.2.3. Odczynniki i substancje użyte w badaniach biochemicznych i genetycznych	44
4.2.4. Sprzęt i aparatura wykorzystana w przebiegu doświadczeń farmakodynamicznych	45
4.2.5. Sprzęt i aparatura wykorzystana w przebiegu badań biochemicznych i genetycznych	45
4.3. TESTY FARMAKODYNAMICZNE	46
4.3.1. Ocena toksyczności ostrej.....	46
4.3.2. Ocena spontanicznej aktywności ruchowej – „ <i>locomotor activity</i> ”	47
4.3.3. Ocena działania przeciwbólowego w teście „gorącej płyty”: test „ <i>hot – plate</i> ”	47
4.3.4. Ocena działania przeciwzapalnego w teście karageninowym za pomocą pletyzmometru	49

4.4.	SCHEMATY DOŚWIADCZEŃ	52
4.4.1.	Określenie toksyczności ostrej granicznej	52
4.4.2.	Wyznaczenie ruchliwości horyzontalnej i wertykalnej oraz badanie i ocena działania przeciwbólowego za pomocą testu <i>hot-plate</i>	52
4.4.3.	Ocena aktywności przeciwzapalnej badanych substancji w teście karageninowym za pomocą pletyzmometru	55
4.4.4.	Badanie zjawiska tolerancji dla najbardziej aktywnej substancji w najbardziej efektywnej dawce w podawaniu 4 – tygodniowym.....	57
4.4.5.	Postępowanie z materiałem pobranym do badań biochemicznych i genetycznych.....	58
4.5.	ANALIZA STATYSTYCZNA	62
4.6.	OBLICZENIA AUC	63
5.	Wyniki	64
5.1.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI OSTREJ METODĄ USTALONEJ DAWKI	64
5.2.	OCENA HORYZONTALNEJ ORAZ WERTYKALNEJ AKTYWNOŚCI LOKOMOTORYCZNEJ	65
5.3.	OCENA DZIAŁANIA ANTYNOCYCEPTYWNEGO W TEŚCIE „HOT-PLATE”	71
5.4.	OCENA DZIAŁANIA PRZECIWZAPALNEGO	103
5.5.	OKREŚLENIE WPŁYWU ZJAWISKA TOLERANCJI DLA NAJBARDZIEJ AKTYWNEJ SUBSTANCJI	121
5.6.	WPŁYW POCHODNEJ KWASU OLEANOLOWEGO NA STĘŻENIA WYBRANYCH INTERLEUKIN U SZCZURÓW	124
5.7.	WPŁYW POCHODNEJ KWASU OLEANOLOWEGO NA EKSPRESJĘ mRNA WYBRANYCH INTERLEUKIN U SZCZURÓW	125
5.8.	WPŁYW POCHODNEJ KWASU OLEANOLOWEGO NA EKSPRESJĘ mRNA TLR1 I TLR3 U SZCZURÓW.....	126
6.	Dyskusja i omówienie wyników	127
7.	Wnioski	137
7.	Streszczenie	138
8.	Abstract	140
9.	Piśmiennictwo	142
10.	Wykaz rycin i tabel	156

WYKAZ SKRÓTÓW I NAZW CHEMICZNYCH

5-HT	serotonina (5-hydroksytryptamina)
Ach	acetylocholina
ANOVA	analiza wariancji
ASA	kwask acetylosalicylowy
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
AUC	pole powierzchni pod krzywą (z ang. <i>Area Under the Curve</i>)
βAS	syntaza β-amarynowa
BB XII/59	ester metylowy kwasu 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owego
BB XII/72	morfolid kwasu 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owego
BB XII/73	kwask 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owy
BDNF	neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (z ang. <i>Brain-Derived Neurothrophic Factor</i>)
BK	bradykinina
BK1, BK2	receptor dla bradykininy 1 lub 2
CAS	syntaza cykloartenolu
CDDO	kwask 2-cyjano-3,12-dioksio-oleano-1,9(11)-dien-28-owy
CDDO-Me	ester metylowy kwasu 2-cyjano-3,12-dioksio-oleano-1,9(11)-dien-28-owego
cDNA	komplementarny kwask deoksyrybonukleinowy
c-Flip	białko FLIP komórkowe = (FADD-like IL-1β-converting enzyme – kaspaza 8)-inhibitory protein – białko hamujące Flip, gdzie FADD – z ang. <i>Fas-Associated Protein with Death Domain</i> - związane z Fas białko adaptorowe z domeną śmierci
CGRP	białko związane z genem kalcytoniny (z ang. <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>)
cm ³	centymetr sześcienny
COX	cyklooksygenaza
CpG DNA	„wyspy” cytozynowo-guaninowe kwasu deoksyrybonukleinowego
CRP	białko C-reaktywne (z ang. <i>C-Reactive Peptide</i>)

CSF	czynnik stymulujący kolonie (z ang. <i>Colony-Stimulating Factor</i>)
DEPC	pirowęglan dietylu (z ang. <i>Diethylpirocarbonate</i>)
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
dsRNA	dwuniciowy kwas rybonukleinowy (z ang. <i>double stranded RNA</i>)
ECAM-1	śródbłonkowy czynnik adhezji komórek 1 (z ang. <i>Endothelial Cell Adhesive Molecule 1</i>)
<i>E. coli</i>	pałeczki okrężnicy (<i>Escherichia coli</i> T.)
EDF	czynnik różnicujący eozynofile (z ang. <i>Eosinophil Differentiation Factor</i>)
ELISA	test immunoabsorpcyjny (z ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ERK	kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (z ang. <i>Extracellular signal-regulated Kinase</i>)
Fas	białko receptorowe błony komórkowej komórki należące do rodziny TNF także znane jako CD95, włączone w procesy apoptotyczne
g	gram
G-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (z ang. <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>)
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (z ang. <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GUS	Główny Urząd Statystyczny
h	godzina (z ang. <i>hour</i>)
HSP	białko szoku cieplnego (z ang. <i>Heat Shock Protein</i>)
HTLV1	ludzki wirus T-limfotropowy (z ang. <i>Human T-lymphotropic Virus 1</i>)
<i>i.p.</i>	podanie dootrzewnowe (z ang. <i>intraperitoneal injection</i>)
IASP	Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu (z ang. <i>International Association for the Study of Pain</i>)
ICAM-1	międzykomórkowa molekula adhezyjna – 1 (z ang. <i>Intracellular Adhesion Molecule 1</i>)
IF	interferon
I κ B	inhibitor κ B
IKK	kinaza inhibitora κ B
IL	interleukina
iNOS	indukowana syntaza tlenku azotu
kg	kilogram

LL	ligustr lśniący (z łac. <i>Ligustrum lucidum</i>)
LP	ligustr japoński (z łac. <i>Ligustrum japonicum</i> var. <i>pricei</i>)
LPS	lipopolisacharyd
LRR	powtórzenia bogate w leucynę (z ang. <i>Leucine Rich Repeats</i>)
LTA	kwask lipotejchojowy (z ang. <i>Lipoteichoic Acid</i>)
LTB	leukotrieny typu B
M	mol
mM	milimol
MAC	kompleks atakujący błonę (z ang. <i>Membrane Attacking Complex</i>)
MCP-1	białko chemotaktyczne dla monocytów-1 (z ang. <i>Monocyte Chemoactive Protein 1</i>)
MF	morfina
mg	milligram
min	minuta
ml	mililitr
MMTV	mysi wirus raka sutka (z ang. <i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>)
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy
MyD88	białko adaptorowe (z ang. <i>Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88</i>)
NaCl	chlorek sodu
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny κB (z ang. <i>Nuclear Factor - κB</i>)
NK	naturalni zabójcy (z ang. <i>Natural Killers</i>)
NL	nalokson
NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
OA	kwask oleanolowy (z ang. <i>Oleanolic Acid</i>)
OECD	Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (z ang. <i>The Organisation for Economic Co-operation and Development</i>)
OTC	leki wydawane bez przepisu lekarza (z ang. <i>Over-the-Counter</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
<i>p.o.</i>	podanie dożołądkowe (z łac. <i>per os</i>)
p50/p65	białko o masie cząsteczkowej 50 lub 65 kDa
PAF	czynnik aktywujący płytki (z ang. <i>Platelet-Activating Factor</i>)
PAF-AH	acetylohydrolaza czynnika aktywującego płytki (z ang. <i>Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase</i>)

PAMPs	wzorce molekularne związane z patogenami (z ang. <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PARFs	receptory dla PAF (z ang. <i>Platelet-Activating Factor Receptors</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (z ang. <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PGE ₂	prostaglandyna E ₂
PLA ₂	fosfolipaza A ₂ (z ang. <i>Phospholipase A₂</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy
RNaza	rybonukleaza
RSV	wirus ludzki RNA odpowiedzialny za infekcje dróg oddechowych u dzieci i niemowląt (z ang. <i>Respiratory Syncytial Virus</i>)
rt-PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (z ang. <i>Real Time Polimerase Chain Reaction</i>)
RZS	reumatoidalne zapalenie stawów
s	sekunda
s.c.	podanie podskórne (z łac. <i>sub cutis</i> ; z ang. - <i>subcutaneus injection</i>)
SE	epoksydaza skwalenu
SEM	standardowy błąd pomiaru (z ang. <i>Standard Error of Measurement</i>)
SNP	nitroprusydek sodu
sP	substancja P
SS	syntaza skwalenu
t _{0,5}	czas połowicznego trwania
TCR	receptory dla limfocytów T (z ang. <i>T Cell Receptor</i>)
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu β (z ang. <i>Transforming Growth Factor β</i>)
TIR	domena wspólna dla receptora Toll-like oraz dla receptora IL-1 (Toll/IL-1R)
TLR	receptor Toll-podobny (z ang. <i>Toll-like Receptor</i>)
TNF-α	czynnik martwicy nowotworu α (z ang. <i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
TRIF	domena TIR indukująca interferon β (IFNβ)
UV	promieniowanie ultrafioletowe (z ang. <i>Ultra Violet</i>)
VCAM-1	molekuła adhezyjna-1 komórki naczyniowej (z ang. <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>)

1. Wstęp

W ostatnich latach obserwujemy dynamiczny rozwój wiedzy na temat mechanizmów powstawania bólu, ale również jego istoty i metod leczenia. W dzisiejszych czasach zniesienie bólu nie jest problemem samym w sobie, problemem są liczne działania uboczne standardowo stosowanych w tym celu preparatów, jak również przechylająca się szala skuteczności leczenia przeciwbólowego i przeciwzapalnego na niekorzystną stronę interakcji i zaburzeń metabolicznych wywołanych leczeniem. Zasady farmakoterapii bólu każą likwidować go niezależnie od przyczyny, a leczenie powinno wyprzedzać moment pojawienia się bólu i być w najdogodniejszej dla pacjenta formie, z możliwie najmniejszym wpływem negatywnym na organizm. W przypadkach bardziej skomplikowanych leczenie farmakologiczne powinno być uzupełnione przez fizyko- lub psychoterapię.

Według danych Głównego Urzędu Statystycznego (GUS) z 2013 roku, w Polsce sprzedano ponad 2 miliardy tabletek preparatów leczniczych wydawanych bez recepty lekarskiej, z grupy tzw. OTC (z ang. *over-the-counter*). Zdecydowana większa część sprzedawanych preparatów zawierała w swoim składzie komponentę o działaniu przeciwbólowym lub/i przeciwzapalnym, w przeróżnych dawkach, kombinacjach i wskazaniach do stosowania. Od wielu lat rynek farmaceutyczny obraca się wokół leków o tej samej budowie chemicznej. Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) stanowią jedną z lepiej poznanych pod względem właściwości farmakologicznych grupą leków i najczęściej wybieraną pośród pacjentów.

Malejąca kontrola nad lekiem związana jest przede wszystkim ze względu na rosnącą ilość preparatów z komponentą przeciwbólową i przeciwzapalną na rynku farmaceutycznym, zmiana klasyfikacji dostępności preparatów leczniczych dostępnych dotychczas jedynie z przepisu lekarza na kategorię OTC, wszechobecna reklama w mediach, dostępność tych preparatów na półkach sklepowych czy stacjach benzynowych, które sprzedawne są bez jakiegokolwiek nadzoru. Powyżej opisana sytuacja powinna rodzić obawy ze strony lekarzy i farmaceutów, ale przede wszystkim urzędników państwowych odpowiedzialnych za politykę zdrowotną. Niekontrolowane spożywanie środków przeciwbólowych wiąże się z narastającymi problemami zdrowotnymi

pacjentów, występowaniem częstych działań niepożądanych, a w konsekwencji nowych dolegliwości i schorzeń, które niejednokrotnie wymagają hospitalizacji lub ją wydłużają.

Naukowcy na całym świecie poświęcają wiele wysiłku, aby znaleźć nowe substancje aktywne, które byłyby wysoko wyspecjalizowane w zwalczaniu przyczyn powstawania bólu, jego hamowania, i które pozwoliłyby na najszybsze i najskuteczniejsze zniesienie stanu zapalnego. Ponadto, kolejnym kryterium niezwykle istotnym w każdej terapii jest wyodrębnienie cząsteczki o możliwie najwyższym współczynniku bezpieczeństwa stosowania, a zatem charakteryzującą się bardzo niską toksycznością podczas przewlekłego podawania. Ze względu na dodatkowy czynnik, jakim jest występowanie współistniejących chorób przewlekłych, nowa cząsteczka nie powinna dawać interakcji z innymi lekami, w przypadku stosowania politerapii.

Poszukiwania nowych, efektywnie działających, a jednocześnie bezpiecznych preparatów, skierowało badaczy w kierunku fitoterapii i promowania związków szeroko rozpowszechnionych w naturze. Dużym zainteresowaniem cieszą się pochodne kwasu oleanolowego, który ze względu na swoją budowę chemiczną należy do bardzo zróżnicowanej grupy pod względem struktury chemicznej, tzw. triterpenoidów. W badaniach eksperymentalnych *in vitro* i *in vivo*, wykazano wielokierunkowość aktywności pochodnych triterpenowych, a do tej pory najmocniej zostało zaznaczone działanie przeciwdrobnoustrojowe oraz metaboliczne, związane z przemianami lipidowo-węglowodanowymi, z których warto wyszczególnić aktywność przeciwmiażdżycową. Kolejne doniesienia wskazują na silne działanie hepatoprotekcyjne pochodnych, stosowanych w przebiegu uszkodzenia wątroby przez kancerogeny i czynniki hepatotoksyczne, ich działanie antyoksydacyjne, a także coraz częściej udowodnione działanie przeciwnowotworowe oraz działanie przeciwzapalne. Dotychczasowe prace dotyczące działania przeciwzapalnego pochodnych kwasu oleanolowego, skupiają się przede wszystkim wokół chorób o podłożu neurodegeneracyjnym (parkinsonizm, choroba Alzheimer'a, płasawica Huntington'a), z współistniejącym bólem neuropatycznym, ale prowadzone są badania nad ich ewentualnym zastosowaniu w hamowaniu zapalenia.

Jednak pomimo wielu doniesień naukowych oraz szeroko stosowanych preparatów triterpenowych w medycynie ludowej, zwłaszcza na terenach Azji, jak do tej pory nie udało się jednoznacznie ustalić ich molekularnego mechanizmu działania przeciwzapalnego i/lub działania przeciwbólowego, co pozwoliło by na rozwój terapii celowanej i bardziej precyzyjne stosowanie tych środków u potrzebujących pacjentów.

2. Część Teoretyczna

2.1. PODŁOŻE PROCESU ZAPALNEGO

Każdy organizm żywy dąży do osiągnięcia hemostazy. Ma to miejsce dzięki wykorzystaniu oraz funkcjonowaniu wielu wysoko wyspecjalizowanych układów, jak również zróżnicowanych mechanizmów obrony, które pozwalają zaadoptować go do otaczającego środowiska. Pozwalają one na szybką reakcję w razie narażenia na czynniki i bodźce stresowe dla organizmu, doprowadzając do neutralizacji czynnika szkodliwego. Zapalenie lub odczyn zapalny (z łac. *inflammatio*) jest reakcją obronną organizmu, która ma na celu usunięcie lub zniszczenie przyczyny uszkodzenia komórek, z często występującym przerwaniem integralności tkanek. Stanowi swoistą, wzmożoną i ukierunkowaną odpowiedź biochemiczną, immunologiczną oraz hematologiczną na poziomie zarówno lokalnym, jak i ogólnoustrojowym [Schuster H.P. i wsp., 1997; Karpel E. 2001; Całkosiński I. i wsp., 2009].

Pierwszy opis zapalenia i pierwsza jego klasyfikacja miała miejsce już w II w. n.e.. Przeprowadzona została przez greckiego filozofa i uczonego, Celsusa, który wyodrębnił cztery etapy stanu zapalnego, charakterystyczne dla każdego przebiegu zapalenia. Pierwsze z nich to podwyższenie ciepłoty ciała (z łac. *calor*) oraz zaczerwienienie (z łac. *rubor*), pojawiające się w pierwszej fazie zapalenia w odpowiedzi na czynnik wywołujący, jako skutek zwiększonego przepływu krwi przez miejsce objęte zapaleniem. W kolejnym etapie obserwujemy obrzęk (z łac. *tumor*) powstały wskutek gromadzenia się wysięku (z łac. *exsudatum*) i zatrzymania płynów w obrębie łożyska naczyniowego oraz ból (z łac. *dolor*), związany z drażnieniem odkrytych zakończeń nerwowych przez mediatory zapalenia. W późniejszych latach, jako piąty element stanu zapalnego, rzymski uczoney Galen dopisał upośledzenie czynności tkanek (z łac. *functio laesa*) [Rather L.J., 1971], potwierdzone w późniejszym czasie przez niemieckiego badacza o polskich korzeniach, Rudolfa Virchow'a [Cotran R.S. i wsp., 1998].

Umiarkowany odczyn zapalny może przynieść korzystne skutki dla organizmu, ponieważ może wpływać na zachowanie pozytywnego bilansu pomiędzy wpływem destrukcyjnym samego procesu zapalnego a procesami przywracającymi równowagę

narządową. Dobrym przykładem opisanego powyżej zjawiska jest m.in. zdolność do hamowania krwawienia powstałego na skutek urazu, usuwanie i neutralizowanie produktów rozkładu szczątków bakterii z egzo- i endotoksyn wraz z wysiękiem, jak również tworzenie linii demarkacyjnej ograniczającej rozprzestrzenianie się ogniska zapalnego [Całkosiński I. i wsp., 2009; Cheng T. i wsp., 2011].

Przyczyny oraz czynniki wywołujące zapalenie są niezwykle zróżnicowane. Możemy postarać się je pogrupować, stosując jedno z trzech poniżej podanych kryteriów:

- Czynniki biologiczne, jako reakcja immunologiczna w odpowiedzi na antygeny własne lub obce, najczęściej wywołane zakażeniami bakteryjnymi, grzybiczymi, wirusowymi, pierwotniakowymi, zatruciem egzo- lub endotoksynami, uszkodzeniem ciągłości tkanek wraz z martwicą (odleżny, menstruacja, zawał).
- Czynniki fizyczne, do najczęstszych należą: uszkodzenia mechaniczne i termiczne, promieniowanie jonizujące oraz promieniowanie ultrafioletowe UV, pole elektromagnetyczne, a także fale ultradźwiękowe.
- Czynniki chemiczne, najczęściej związane z miejscowym drażnieniem tkanek, poprzez działanie: kwasów, zasad, aldehydów, w tym aldehydu mrówkowego i octowego, terpentyny, karageniny, kapsaicyny.

Ze względu na intensywność reakcji zapalnej, możemy wyszczególnić i wyróżnić: kolejne cztery kryteria: reakcję zapalną normergiczną, która jest adekwatna w stosunku do bodźca, hiper- lub hipoergiczną, odpowiednio nadmierną albo zbyt słabą, a także anergiczną, inaczej tzw. reakcję śladową, w której organizm nie może wyzwolić odpowiedzi na bodziec. Z punktu widzenia samej patofizjologii, mechanizm inicjujący przebieg zapalenia schodzi często na dalszy plan wobec występujących po nich zmianach, będących podstawą do rozwoju wielu chorób. Istotny natomiast jest charakter wieloetapowy procesu zapalnego oraz jego dynamika, rozłożona w czasie, w której możemy wyróżnić przebieg ostry lub przewlekły [Winsauer G. i de Martin R., 2007; Pham C.T., 2008].

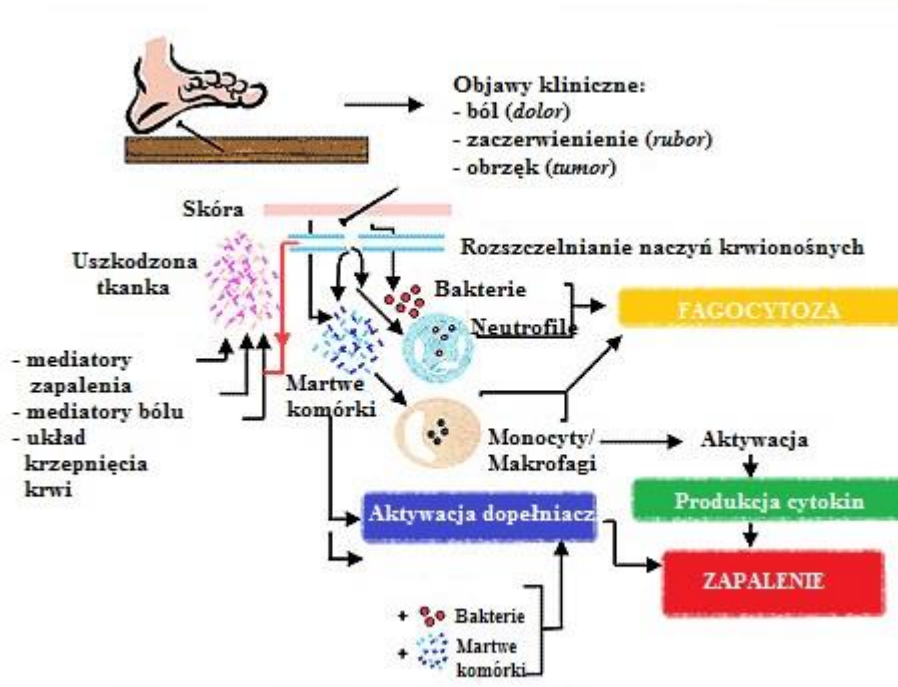
Pierwsza faza zapalenia, zwana również fazą ostrą odczynu zapalnego, trwa od kilku sekund do 12 godzin od zadziałania bodźca, z możliwością przekształcenia się w fazę przewlekłą. W pierwszym etapie procesu będącym najczęściej fazą utajoną, dochodzi w pierwszej kolejności do wielu zmian hematologicznych. Zmiany związane z silnym rozszerzeniem łożyska małych naczyń, występują po uwolnieniu do osocza mediatorów zapalenia (m.in. histaminy, serotoniny). To skutkuje powstawaniem obrzęku, na który składa się etap dyfundowania wody do przestrzeni międzykomórkowej, a w późniejszym

czasie również białek osocza [Winsauer G. i de Martin R., 2007]. Do kolejnych zaburzeń hemodynamicznych przy współistniejącym niedotlenieniu, dochodzi poprzez degradację śródbłonna naczyń włosowatych oraz migrację elementów morfotycznych krwi. Na tym etapie odczynu zapalnego główną rolę odgrywają trombocyty, które w następstwie pojawienia się w miejscu uszkodzenia, wydzielają aminy biogenne i czynnik aktywujący płytki (PAF), tym samym zapoczątkowując proces wykrzepiania śródnaczyniowego w miejscu powstania odczynu [Chrousos G.P., 1995; Całkosiński I. i wsp., 2007-2009; Cieślik K. i Kołaczowska E., 2012].

W fazie ostrej zapalenia dochodzi również do przemian samych komórek biorących czynny udział w procesie. Najbardziej istotny w patogenezie jest proces degranulacji mastocytów, którym towarzyszy uwolnienie mediatorów stanu zapalnego zmagazynowanych w ziarnistościach w cytoplazmie komórki. Po uwolnieniu rozprzestrzeniają się na sąsiadujące tkanki, a wraz z krwią docierają do innych organów. Na tym właśnie etapie możemy zaobserwować zmienne działanie ogólnoustrojowe odczynu zapalnego, objawiającego się m.in. obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi pod wpływem działania histaminy, wzrostem krzepliwości krwi związanej ze znacznie podwyższonym stężeniem fibrynogenu czy wzrostem stężenia w osoczu amin katecholowych, z wyszczególnieniem adrenaliny i noradrenaliny [Chrousos G.P., 1995; Zabłocka A., 2001; Bujniwicz E., 2002]. Wraz ze wzrostem przepływu krwi i napływu limfy w miejscu występowania odczynu zapalnego, wzrasta ilość kolejno napływających elementów układu białokrwinkowego (granulocyty, makrofagi) zdolnych do fagocytozy uszkodzonych komórek i toksyn, odpowiedzialnych za cytotoksyczny odczyn komórkowy oraz odpowiedź humoralną (limfocyty T i B). Monocyty i makrofagi w zajętych zapaleniem tkankach wpływają przede wszystkim na uwalnianie cytokin, które sygnalizują innym komórkom o obecności stanu zapalnego [McGeer E.G. i wsp., 2005; Glaros T. i wsp., 2009; Gieseg S.P. i wsp., 2009; Gołqb J. i wsp., 2013].

W fazie późnej odczynu zapalnego, zauważalny jest intensywny wzrost stężenia eikozanoidów, pochodzących z degradacji błon komórkowych (w tym tromboksanu i prostaglandyn), które wraz z bradykininą (BK), acetylocholiną (Ach) i histaminą ułatwiają migrację komórek z krwi do objętej zapaleniem tkanki (zwiększenie przepuszczalności naczyń, rozkurcz mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych), a także wyzwalając impulsy bólowe po wcześniejszej depolaryzacji nagich zakończeń nerwowych [Dobrogowski J. i Wrodlizek J., 2004; Watkins L.R. i Maier S.F., 2005; Całkosiński I. i wsp., 2009]. Decydująca w całym procesie jest niewątpliwie rola wątroby, która w odpowiedzi na rozprzestrzeniające się zapalenie, wykraczające poza obręb jednej tkanki, wpływa

hamująco na dalszy rozwój procesu patologicznego, poprzez wytwarzanie białek ostrej fazy, w głównej mierze białka CRP (z ang. *C* – *reactive protein*), a także kluczowych czynników biorących udział w kaskadzie krzepnięcia krwi. Stanowi także rezerwuuar działających antyoksydacyjnie metali ciężkich (Fe^{2+} , Cu^{2+}), które pełnią istotną rolę w początkowym przebiegu zapalenia [Boyer R.F. i wsp., 1983; Reilly C.A. i wsp., 1998; Prohaska J.R., 2008; White C. i wsp., 2009].



Ryc.1. Proces powstawania ogniska zapalnego [Opracowano na podstawie pracy: Całkosiński I. i wsp., 2007-2009]

Utrzymujący się stan zapalny może skutkować również przerostem tkanek, występującym najczęściej po uszkodzeniu i odkryciu włókien kolagenowych, co doprowadza do zmiany funkcji narażonej tkanki. Powyższe zjawisko ma najczęściej miejsce po zapoczątkowaniu migracji komórek o działaniu prozapalnym w miejsce uszkodzenia. Fibroblasty, reprezentujące jedną z najliczniej uczestniczących w tym etapie grup komórek, po wcześniejszej aktywacji przez uwolnione cytokiny i prostaglandyny, rozpoczynają syntetyzować, *de novo*, włókna kolagenowe oraz glikozaminoglikany, stanowiące zrąb nowo powstającej tkanki łącznej o charakterze zwyrodnieniowym [Mitchell R.N. i Cotran R.S., 1997; Maharaj C. i Laffey J.G., 2004; Barrientos S. i wsp., 2008].

Ogólny proces powstania ogniska zapalnego składają się kolejno odpowiedzi: typu humoralnego, w której pojawiają się kolejno mediatory zapalenia w płynach ustrojowych, typu hemostatycznego, opisana powyżej oraz typu immunologicznego związana z aktywacją układu dopełniacza, syntezą przeciwciał, interferonów oraz interleukin został przedstawiony na Ryc. 1. [Całkosiński I. i wsp., 2007 - 2009].

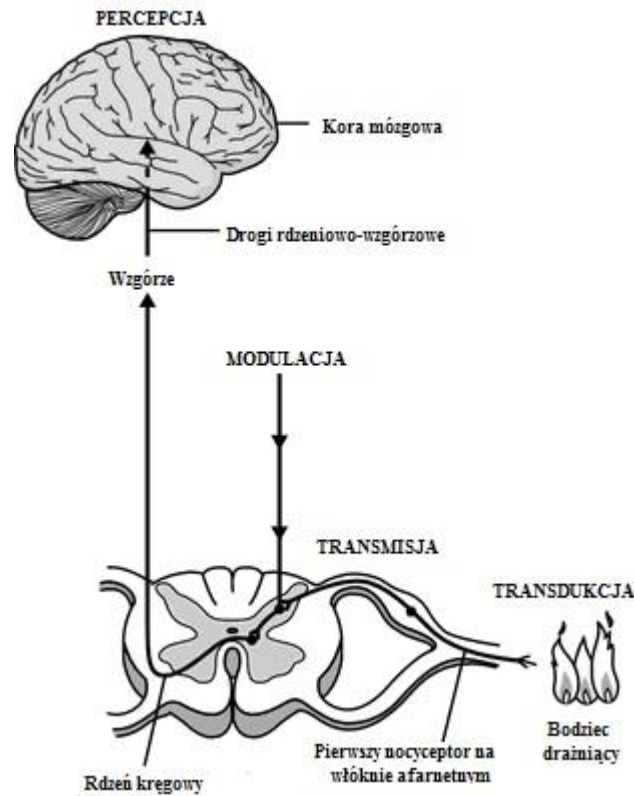
2.2. BÓL W PRZEBIEGU ZAPALENIA

Według definicji prof. Jerzego Wrodliczka bazującej na definicji Międzynarodowego Stowarzyszenia Leczenia Bólu (IASP, z ang. *International Association for the Study of Pain*) : „ból, nieodłączny w życiu każdego człowieka, spełnia szereg ważnych fizjologicznych funkcji poznawczych, ostrzegających i ochronnych. Jest doznaniem czuciowym związanym zarówno z działaniem bodźca, którego działanie może powodować uszkodzenie tkanki lub organu, ale także może się pojawić jako spostrzeżenie na podstawie psychicznej interpretacji zachodzących zjawisk, zmodyfikowanych przez wcześniejsze doświadczenia. Stąd stanowi funkcję indywidualną i subiektywną” [Wrodliczek J. i Dobrogowski J., 2007].

Rozbudowany system neuronów skupiających się w nerwach czuciowych i przewodzących stanowi dynamiczny i niezwykle złożony układ nocycceptywny (z łac. *nocere* – szkodzić). Jego zadaniem jest przewodzenie bodźców, będących informacją o zadziałaniu czynników szkodliwych i zaburzających hemostazę w tkankach obwodowych i przekazywanie jej do rdzenia kręgowego i dalszych struktur mózgu. W odpowiedzi na przetworzoną informację bólową, uaktywniają się mechanizmy kompensujące, które ograniczają siłę i czas trwania bólu [Wrodliczek J. i Dobrogowski J., 2007; Filypczyk-Bryniarska I. i wsp., 2010]. Za odbieranie wrażeń bólowych i przekształcanie bodźców drażniących na impuls elektryczny, odpowiadają nocycceptory, rozmieszczone na wolnych zakończeniach nerwowych, znajdujących się w skórze i w tkance podskórnej, tkance łącznej, nerwach układu współczulnego unerwiającego trzewia i narządy miednicy mniejszej [Żylicz Z. i Krajnik M., 2003; Dobrogowski J. i Wrodliczek J., 2004].

Nocycceptę, stanowiącą proces powstawania odczucia bólowego, jego przewodzenie i dalsze przetwarzanie przez wyższe struktury w mózgu, możemy podzielić na 4 kolejne etapy (Ryc.2):

- transdukcję (zmiana energii bodźca drażniącego na impuls elektryczny)
- transmisję (przewodzenie powstałego impulsu do struktur OUN)
- modulację (pobudzanie lub hamowanie, sumowanie bodźców)
- percepcję (ostateczna emocjonalna ocena bólu).



Ryc.2. Klasyczny szlak nocycepcji [wg Wrodliczek J. i Dobrogowski J., 2004]

Informacja o zadziałanym bodźcu w układzie nocyceptywnym odbywa się dzięki dwóm rodzajom włókien nerwowych: szybkich i zmienilizowanych włókien typu A δ oraz wolnych i nagich włókien typu C. Te ostatnie posiadają na swoich zakończeniach różne receptory, w tym receptory opioidowe, których nie ma na włóknach typu A δ [Schmelz M. i wsp., 1994]. Większość z wbudowanych w błonę komórkową receptorów opioidowych jest nieaktywna, a do ich aktywacji może się przyczynić rozwijający się proces zapalny. Co ciekawe, może również wpływać na zwiększoną syntezę nowych receptorów w tkance objętej zapalaniem, które po uwrażliwieniu mogą reagować na endo- i egzogenne opioidy [Krajnik M. i Żylicz Z., 2003; Sharp B.M., 2006; Filipczak-Bryniarska I. i wsp., 2010].

Ból przewlekły jest konsekwencją narażenia organizmu na urazy, uszkodzenie układu nerwowego albo w przebiegu chorób, u podłoża których leży proces zapalny. Ból zwykle pojawia się po pewnym czasie, utrudniając tym samym ustalenie lokalizacji uszkodzenia, jak również niejednokrotnie stwarza problem ze znalezieniem jego przyczyny [Filipczak-Bryniarska I. i wsp., 2010]. Jednakże etiopatogeneza powstawania wrażeń bólowych w większości przypadków przebiega podobnie. W pierwszym etapie zapalenia, z uszkodzonych tkanek zostają uwolnione mediatory bólu, do których należy m.in. histamina, serotonina (5-HT) i bradykinina (BK) [Rueff A. i wsp., 1994; Dray A., 1995], a ich uwolnienie wiąże się z aktywacją włókien afarentnych A δ i C. Poprzez zwiększony napływ do komórki jonów K⁺, dochodzi do hiperpolaryzacji błony komórkowej neuronów i transmisji informacji nocycytywnej do OUN [Dray A., 1995]. W dalszym etapie uwalniane zostają kolejne mediatory zapalenia i bólu (substancja P, prozapalne cytokiny, prostanoidy), które na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego wpływają na ponowne uwalnianie substancji P (sP). W połączeniu z rozszerzeniem łożyska naczyniowego i zwiększeniem przepuszczalności naczyń krwionośnych doprowadzają do zjawiska nazywanego „pierwotną hiperalgezą” wiążącą się z nadwrażliwością na ból w miejscu odczynu zapalnego, a w najcięższych przypadkach nawet z wystąpieniem zjawiska allodynii [Maśliński S., 1998; Watkins L.R. i Maier S.F., 2005; Wrodliczek J. i Dobrogowski J., 2007; Loeser J.L. i wsp., 2008].

2.3. WYBRANE MEDIATORY BÓLU I ZAPALENIA

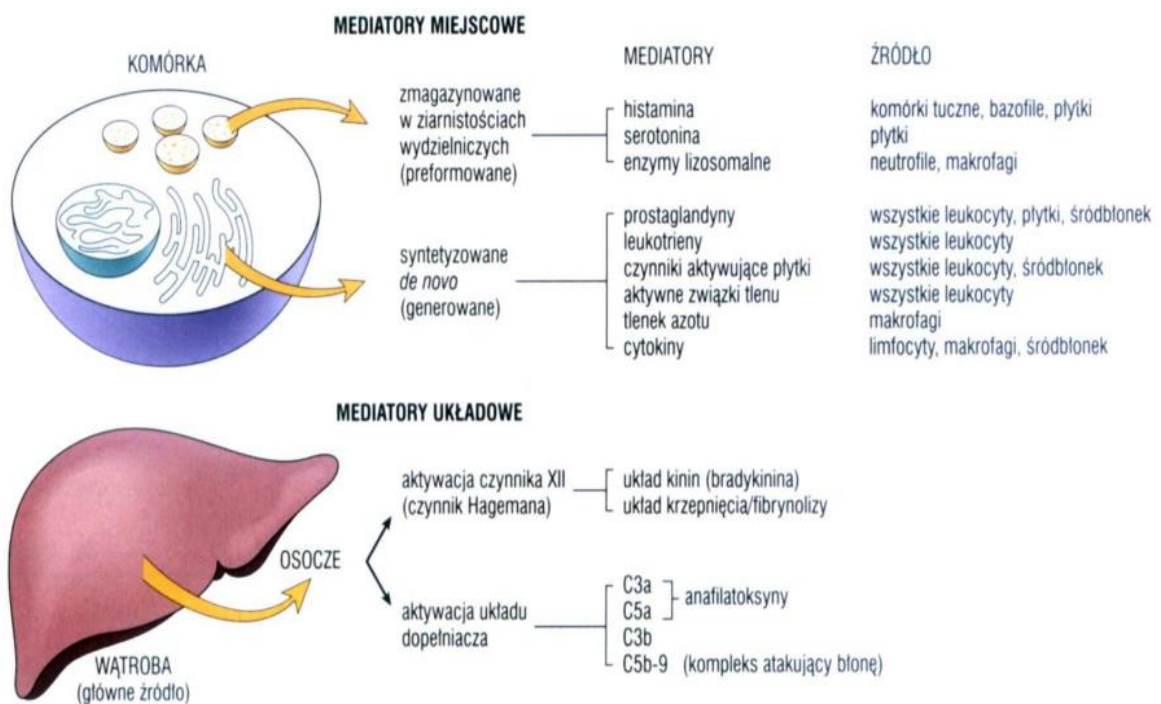
Kluczową rolę w funkcji obronnej organizmu oraz systemu wczesnego ostrzegania przed zagrożeniem pełnią liczne chemiczne czynniki humoralne, produkowane w wysokiej mierze przez komórki układu immunologicznego, stanowiące tzw. element komórkowy odpowiedzi zapalnej. Do tych komórek zaliczamy m.in. monocyty, makrofagi, granulocyty i limfocyty B, T i NK wytwarzane w narządach układu immunologicznego (grasica, śledziona) lub rozsianych po organizmie grudkach chłonnych, które następnie na drodze para- lub endokrynej, docierają wszędzie tam, gdzie niezbędna jest obrona przed szkodliwym czynnikiem [Karpel E., 2001; Sochacka M. i Błach-Olszewska Z., 2005; Gołęb J. i wsp., 2013].

Niezależnie od drogi aktywacji i czynnika wywołującego zapalenie, przebieg pierwotnego mechanizmu obrony dzielimy na fazę prozapalną, w której kluczową rolę odgrywa czynnik martwicy nowotworu - TNF- α , oraz fazę przeciwzapalną, w której najistotniejszą funkcję posiadają rozpuszczalne receptory dla TNF- α i IL-1 [Robak T., 1991-1995; Dinarello C.C.A., 1997].

Mediatory zapalenia możemy podzielić na dwie grupy, niezależnie od czynnika aktywującego, jak i fazy odczynu, na (Ryc.3):

- mediatory osoczowe, do których zaliczymy układ krzepnięcia krwi, układ dopełniacza i układ kininowy, posiadające istotne funkcje fizjologiczne (m.in. procesy gojenia się ran i tamowanie krwotoku),

- elementy komórkowe wpływające na wytwarzanie czynników chemicznych, tj. pochodne kwasu arachidonowego (neutrofile), histamina (mastocyty) czy serotonina (trombocyty) [Karpel E., 2001].



Ryc.3. Chemiczne mediatory bólu i zapalenia [wg Mitchell R.N. i Cotran R.S., 2005].

2.3.1. Cytokiny

Jak już wspomniano na wstępie, pierwotnym mediatorem reakcji zapalnej pojawiającym się już we wczesnej fazie zapalenia jest prozapalny TNF- α , któremu często towarzyszy IL-1. Pojawiają się one po zaktywowaniu komórek monocytów i makrofagów zaraz po ekspozycji organizmu na czynnik szkodliwy i zapoczątkowują lawinę działań mających na celu zatrzymanie odczynu zapalnego i przywrócenie homeostazy [Robak T., 1991-1995; Dinarello C.C.A., 1997; Haverman J.W. i wsp., 1999]. Cytokiny wpływają prawdopodobnie na wszystkie fazy odpowiedzi immunologicznej, zarówno humoralnej jak i komórkowej. Jako białka hormonopodobne regulują proliferację, różnicowanie i aktywację komórek biorących udział w procesie zapalenia, wliczając komórki NK (z ang. *Natural Killer*), granulocyty, monocyty i makrofagi. Z drugiej strony wpływają na ilość i rodzaj przeciwciał, po wcześniejszej aktywacji limfocytów typu B oraz typu T [Robak T., 1995; Sochacka M. i Błach-Olszewska Z., 2005]. Ze względu na sposób działania cytokin, podzielono je na grupy funkcjonalne o podobnym, ale nie identycznym działaniu i jego efekcie:

- pierwszą grupę stanowią mediatory reakcji odpornościowych, mające za zadanie przekazywanie sygnału do sąsiednich komórek, stymulując komórki do produkcji wtórnych przekaźników (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 oraz IF typu I),

- drugą grupę stanowią cytokiny prozapalne, mające za zadanie stymulację układu odpornościowego do produkcji przeciwciał przez limfocyty typu B, produkcję białek ostrej fazy w wątrobie i wywołanie ogólnego stanu zapalnego (IF typu II, IL-1 β , TNF- α , IL-15, IF- γ),

- cytokiny przeciwzapalne produkujące rozpuszczalne receptory cytokin prozapalnych, wykazując tym samym działanie supresyjne do wcześniejszych (TNF- α , IL-4, IL-10 i IL-13).

- osobną grupę stanowią cytokiny odpowiedzialne za proliferację i wzrost komórek układu immunologicznego, jak również komórek macierzystych szpiku kostnego (m.in. IL-6, CSF, EDF, TGF, IL-12) [Robak T., 1991-1995; Karpel E., 2001; Łukaszewicz M i wsp., 2007; Gołąb J. i wsp., 2013].

2.3.2. PAF

Czynnik aktywujący płytki krwi (z ang. *platelet – activating factor*, PAF) jest naczynioruchowym i chemotaktycznym mediatorem wytwarzanym przez komórki tuczne, monocyty, makrofagi oraz leukocyty (z wyłączeniem limfocytów) na skutek bodźca drażniącego komórkę [Yost C.C. i wsp., 2011]. Do jego istotniejszych zadań w przebiegu zapalenia należy pobudzenie monocytów i makrofagów do produkcji prozapalnej cytokiny TNF- α , uwalniania aktywnych form tlenu i aktywacja układów enzymów lizosomalnych w neutrofilach. Posiada aktywny udział w produkcji eikozanoidów i metabolizmu kwasu arachidonowego [Prescott S.M. i wsp., 2000; Ishii S. i wsp., 2002]. Kluczową rolę w aktywacji i rozpoczęciu kaskady przekazywania sygnału stanowią receptory sprzężone z białkiem G, dla których PAF i podobne do niego mediatory lipidowe stanowią substrat (PAFRs, z ang. *Platelet – Activating Factor Receptors*) [Schimizu T., 2009]. Głównym ich zadaniem jest pobudzenie ekspresji białek w kluczowych dla funkcji obronnej organizmu komórkach, biorących udział m.in. w zapaleniu, odpowiedzi immunologicznej humoralnej i komórkowej, a także w procesie hemostazy [Ishii S. i wsp., 2002; Schimizu T., 2009].

Zgodnie z powyższym, wraz ze wzrostem jego stężenia możemy zaobserwować zwiększoną przepuszczalność naczyń krwionośnych, zmniejszenie ciśnienia krwi oraz skurcz oskrzeli. Dodatkowo przesuwa neutrofile do komórek śród błonka, nasila ich migrację oraz stanowi dla nich silny czynnik chemotaktyczny, podobnie jak w przypadku eozynofilii. Zwiększoną aktywność PAF zauważono w odpowiedzi zapalnej na poziomie ogólnoustrojowym, która często ze względu na patologiczną i niekontrolowaną odpowiedź organizmu może doprowadzić do jego trwałego uszkodzenia lub nawet do śmierci [Mathiak G. i wsp., 1997; Alberti C. i wsp., 2005]. Mechanizmem obronnym przed nadmiernym wytwarzaniem lipidowych czynników aktywujących płytki, tym samym ograniczenie łączenia się z odpowiednim receptorem błonowym lub jądrowym, jest obecna, zarówno w środowisku komórkowym, jak również poza nim fosfolipaza A₂, znana jako acetylohydrolaza PAF (PAF AH), której działanie w tym przypadku ma też charakter przeciwzapalny [Karasawa K., 2006].

2.3.3. Elastaza

Głównym enzymem proteolitycznym wytwarzanym przez białe krwinki, w tym w głównej mierze neutrofile w odpowiedzi na bodziec zapalny, jest hydrolaza serynowa – elastaza [Dewald B. i wsp., 1975]. Po aktywacji leukocytów przez m.in. endotoksynę, PAF lub cytokiny, podczas procesu fagocytozy hydrolizuje ona połączenia peptydowe w obcych białkach, doprowadzając do ich degradacji i strawienia przez komórki żerne [Mohr W. i Wessinghage D., 1978; Cohen M.S., 1994; Johansson S. i wsp., 2002]. Dezaktywacja tego enzymu jest możliwa dzięki obecności naturalnie występujących inhibitorów, do których należy m.in. α_1 - antytrypsyna [Beatty K. i wsp., 1980; Travis J. i Salvesen G.S., 1983].

Nadmierne pobudzenie i stymulacja neutrofilii przez mediatory zapalenia, jak również brak wystarczającej ilości naturalnie występujących inhibitorów elastazy [Bieth J.G., 1984; Weitz J.I. i wsp., 1987; Dziedziczko A. i wsp., 2004], może skutkować uszkodzeniem kluczowych, biologicznie aktywnych protein błon komórkowych, degradacją tkanki łącznej i doprowadzeniem do rozprzestrzeniania się zapalenia na sąsiadujące tkanki [Beatty K. i wsp., 1980; Cohen M.S., 1994; Mitchell R.N. i Cotran R.S., 1997]. Brak skutecznej obrony przed nadmierną aktywacją enzymu może być przyczyną wielu groźnych chorób o podłożu zapalnym, tj. reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), mukowiscydoza, zespoły zaburzeń oddechowych, skutkujące w niektórych przypadkach nawet ostrym uszkodzeniem płuc [McGuire W. i wsp., 1982; Janoff A., 1985; McPhail L.C. i wsp., 1992; Lee W.L. i Downey G.P., 2001; Demkov U. i van Overveld F.J., 2010].

2.3.4. Układ dopełniacza

Dopełniacz (z ang. *complement*) to określenie na układ składający się z około 40 białek odpornościowych osocza krwi i pozostałych płynów ustrojowych, który jest aktywowany w toku szybkiej enzymatycznej reakcji kaskadowej [Zipfel P.F. i wsp., 2006; Carroll M.C., 2008; Gołqb J. i wsp., 2013]. Glikoproteiny tego układu wytwarzane są przede wszystkim przez monocyty i komórki wątroby, na skutek obecności toksyn bakteryjnych, kompleksów immunologicznych antygen – przeciwciało, ale także osoczowych mediatorów odczynu zapalnego (układu kininowego, czynników krzepnięcia krwi i fibrynolizy). Możliwe są trzy drogi pobudzenia dopełniacza: klasyczna, alternatywna lub lektynowa, jednakże w przypadku każdej z wyżej wymienionych dochodzi do utworzenia dwóch najistotniejszych enzymów: konwertazy C3 i C5, które wzmacniają efekt pobudzenia i doprowadzają do utworzenia kompleksu atakującego błonę MAC (z ang.

Membrane Attacking Complex) [McGeer E.G. i wsp., 2005; Wust S.K. i wsp., 2006; Male D. i wsp., 2012]. Kompleks ten odpowiedzialny jest za powstawanie kanałów transbłonowych w komórkach, powodując wypływ z wnętrza komórki jonów, ATP i substancji odżywczych. Równocześnie, ze względu na podwyższone ciśnienie osmotyczne, do komórki napływa woda, mogą dostawać się naturalne czynniki bakteriobójcze i bakteriostatyczne (np. lizozym), jak również antybiotyki [Gołąb J. i wsp., 2013; Male D. i wsp., 2012].

Do głównych zadań układu dopełniacza, poprzez stymulację odpowiedzi immunologicznej organizmu należą m.in.:

- bezpośrednia liza komórek patogenów (bakterii i wirusów) poprzez kompleks atakujący błonę

- bezpośrednia aktywacja komórek tucznych, pobudzając ich degranulację i uwolnienie mediatorów zapalenia (głównie histaminy), rozpoczynając fazę ostrego zapalenia. W miejscu toczącego się zakażenia zwiększa się przepływ krwi oraz przepuszczalność naczyń krwionośnych, ułatwiając przechodzenie przez śródbłonek naczyń mediatorów odczynu zapalnego i granulocytów

- chemotaksja komórek o właściwościach żernych do miejsca zapalenia (przede wszystkim neutrofilii) i aktywacja fagocytów, przez co możliwa jest opsonizacja drobnoustrojów, a następnie transport tak powstałych kompleksów immunologicznych do wątroby i śledziony oraz ich neutralizacja przez komórki żerne

- eliminacja zmodyfikowanych lub uszkodzonych komórek gospodarza

- hamowanie precypitacji kompleksów antygen – przeciwciała [Zipfel P.F. i wsp., 2006; Klaska I. i Nowak J.Z., 2007; Male D. i wsp., 2012; Gołąb J. i wsp., 2013].

Nadmierna aktywacja układu dopełniacza i różnego rodzaju zaburzenia w jego funkcjonowaniu mogą być niezwykle niebezpieczne, prowadząc do uszkodzenia komórek gospodarza, tym samym powodując zapadalność na wiele różnych chorób, w większości o podłożu zapalnym [Roitt I. i wsp., 2000; Nowak J.Z. i Waszczyk M., 2006]. Niewłaściwe funkcjonowanie układu dopełniacza powiązano m.in. z zakażeniami bakteryjnymi, niektórymi nowotworami, zapaleniem i ostrą niewydolnością nerek, zwyrodnieniem płamki żółtej i zaburzeniami procesów widzenia, niektórymi chorobami neurodegeneracyjnymi, w tym chorobą Alzheimera, RZS, zespołem hemolityczno-mocznicowym czy zespołem antyfosfolipidowym [Nowak J.Z., 2005 - 2006; Nowak J.Z. i Waszczyk M., 2006; Klaska I. i Nowak J.Z., 2007].

2.3.5. Układ kalikreina – kininy

Układ kalikreina-kininy stanowi jeden z pierwszych elementów wewnątrzpochoдного mechanizmu krzepnięcia krwi oraz układu odpornościowego organizmu, którego nieznaczna aktywacja może wywierać korzystny wpływ na działający miejscowo bodziec uszkodzający [Bhoola K.D. i wsp., 1992; Żelawski W. i wsp., 2005]. Towarzyszące zapaleniu przerwanie ciągłości ścian naczyń krwionośnych oraz krwawienie, powoduje aktywację kaskadową wielu różnych czynników i białek, celem której jest finalnie powstanie czynnego fibrynogenu, który pod wpływem trombiny przekształci się w fibrynę. Na tym etapie powstaje najważniejszy czynnik procesu krzepnięcia, uniemożliwiający dalsze wynaczynienia krwi z łożyska naczyniowego i wykrwawienie [Majno G. i Joris I., 2004].

Autokoidem o najważniejszej funkcji w tym układzie jest niewątpliwie bradykinina (BK) – peptyd składający się z 9 aminokwasów, powstały na skutek działania proteazy serynowej – kalikreiny osoczowej, na kininogen wielkocząsteczkowy, będący osoczym białkiem, α_1 -globuliną [Marceau F.A. i wsp., 1983; Bhoola K.D. i wsp., 1992]. W tkankach w większym stężeniu, aniżeli w osoczu krwi, obserwuje się kalikreinę tkankową, dla której substratem jest przede wszystkim tzw. kininogen drobnocząsteczkowy. Po jego degradacji zostaje uwolniony peptyd składający się z 10 aminokwasów, kalidyna, ulegająca przemianie do bradykininy [Bhoola K.D., 1992]. Zarówno kalidyna, bradykinina, jak i jej pochodna des-9-Arg-bradykinina wywierają działanie zapalne poprzez swoiste receptory dla bradykininy - BK1 oraz BK2 [Roberts R.A. i wsp., 1989; Hess J.F. i wsp., 1992]. Ekspresja pierwszego z nich zwiększa się na powierzchni komórek gromadzących się w ognisku nacieku zapalnego [Roberts R.A. i wsp., 1989]. Charakterystyczna jest przede wszystkim dla przewlekłego zapalenia, w którym obserwujemy zwiększoną syntezę kolagenu podczas proliferacji fibroblastów w procesie zapoczątkowującym proces włóknienia [Maharaj C. i Laffey J.G., 2004; Barrientos S. i wsp., 2008]. Głównym objawem działania kinin zarówno poprzez receptor BK1 jak i BK2 jest często ostry ból, spowodowany obniżeniem przez BK progu bólowego poprzez depolaryzację zakończeń nerwów czuciowych, jak również stymulację powstawania eikozanoidów, biorących również czynny udział w reakcji bólowej i zapalnej [Burh R.M. i wsp., 1989; Całkosiński I. i wsp., 2009]. Poza tym, BK jako mediator ostrej fazy zapalenia, może wywoływać ból poprzez aktywację receptora BK2, głównie związany z uwalnianiem za jej pośrednictwem, m.in. sP, CGRP (z ang. *calcitonine gene-related peptide* -

peptyd związany z genem kalcytoniny) i neurokininy A. Działanie BK na łożysko naczyniowe jest bardzo zbliżone do działania histaminy: następuje silne rozszerzenie naczyń i zwiększony dopływ krwi do miejsca objętego zapaleniem, co za tym idzie – zwiększona migracja leukocytów, jak również zwiększona przepuszczalność naczyń włosowatych, dzięki czemu dochodzi do wysięku białek zawartych w surowicy i powstawania obrzęku [Burh R.M. i wsp., 1989; Rojkaer R. i Schmaier A.H., 1999; Gryglewski R.J. i wsp., 2001; Schmaier A.H., 2008; Schulze-Topphoff U. i wsp., 2008].

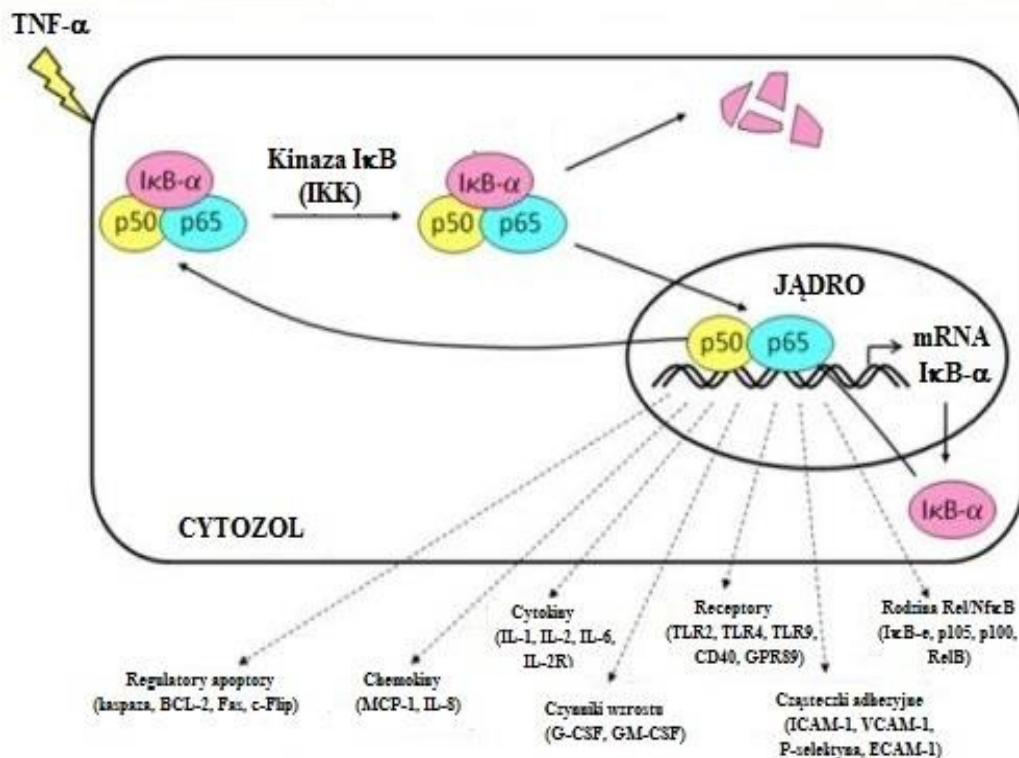
2.3.6. NF- κ B

Komórkowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B jest decydującym regulatorem szybkiej odpowiedzi na obecność patogenu. Odgrywa ważną rolę w promocji apoptozy, zapalenia, w procesach odporności, zarówno właściwej jak i nabytej [Karin M. i Ben-Neriah Y., 2000; Li Q., 2002; Casseli E. i wsp., 2007; Lawrence T. i Fong C., 2009; Atkinson G.P. i wsp., 2010; Niederberger E. i Geisslinger G., 2010]. NF- κ B po raz pierwszy został opisany w 1986 r. jako czynnik odgrywający istotną rolę w procesach odpornościowych oraz zapalnych [Sen R. i Baltimore D., 1986]. Jako czynnik jądrowy wiąże się z promotorem genu łańcucha lekkiego κ immunoglobulin w dojrzałych limfocytach B [Ahn K.S. i Agarrwal B.B., 2005]. NF- κ B występuje w postaci nieaktywnego kompleksu związanego z białkiem z rodziny I κ B. Indukcja kompleksu zachodzi w odpowiedzi na różne czynniki, tj. promieniowanie UV, infekcje bakteryjne i wirusowe, ale także narażenie i wystawienie na prozapalne cytokiny i mitogeny [Yamamoto Y. i Ganyor R.B., 2001, Santoro M.G. i wsp., 2003, Casseli E. i wsp., 2007].

Aktywacja kompleksu NF- κ B może zachodzić różnymi ścieżkami transdukcji sygnału, w zależności od indukującego bodźca, choć najczęściej dotyczy kompleksu IKK [Karin M. i Ben-Neriah Y., 2000; Casseli E. i wsp., 2007] (Ryc. 4). IKK to kompleks kilku podjednostek, z których dwie posiadają działanie katalityczne – IKK α oraz IKK β , a trzecia stanowi białko regulatorowe – IKK γ (NEMO). Białko IKK γ pełni funkcję „dokującą” dla licznych białek, występujące w wielu typach komórek i jest niezbędne w celu aktywacji NF- κ B po zadziałaniu m.in. czynnika martwiczego nowotworu (TNF- α), ludzkiego wirusa białaczki z komórek T typu 1 (HTLV1, z ang. *human T – lymphotropic virus 1*), lipopolisacharydu (LPS) [Suh S.J., 2007] czy poprzez bezpośredni wpływ na receptory dla limfocytów T (TCR) [Karin M. i Ben-Neriah Y., 2000; Karin M. i Lin A., 2002; Schifere A.S., 2010].

Kompleks NF- κ B ulega aktywacji poprzez fosforylację podjednostek inhibitora w miejscu wiązania ubikwityny, która prowadzi do degradacji połączenia podjednostek przez 26S proteazę [Ryan K.M. i wsp., 2000]. Uwolnione dimery NF- κ B następnie ulegają translokacji do jądra i wiążą się ze stałą sekwencją DNA promotora (elementem κ B), aktywując w ten sposób transkrypcję wielu genów związanych m.in. z odpowiedzią zapalną, tj. cząstek adhezyjnych komórek, prozapalnych i chemotaktycznych cytokin oraz receptorów dla tych cytokin, jak również enzymów produkujących mediatory zapalenia – COX-2 oraz iNOS [Li Q., 2002; Casseli E. i wsp., 2007; Jost P.J. i Rulad J., 2007]. Jednakże wiele z prozapalnych genów cytokin wymaga dużej liczby czynników transkrypcyjnych w celu aktywacji procesu transkrypcji oraz uzyskania maksymalnej ekspresji dla tych genów [Balkwill F., 2004].

Rodzina NF- κ B to: RelA (p65), c-Rel, RelB, p50 i p52, które łącząc się pomiędzy sobą tworzą różne kompilacje heterodimerów, ale tylko trzy pierwsze z nich posiadają domeny aktywujące proces transkrypcji, z przeważającą rolą kompleksu p65/p50 [Hoffmann A., 2003; Hagemann T. i wsp., 2009].



Ryc. 4 . Klasyczny szlak aktywacji czynnika NF- κ B [Opracowano na podstawie pracy: Marinho H.S. i wsp., 2014]

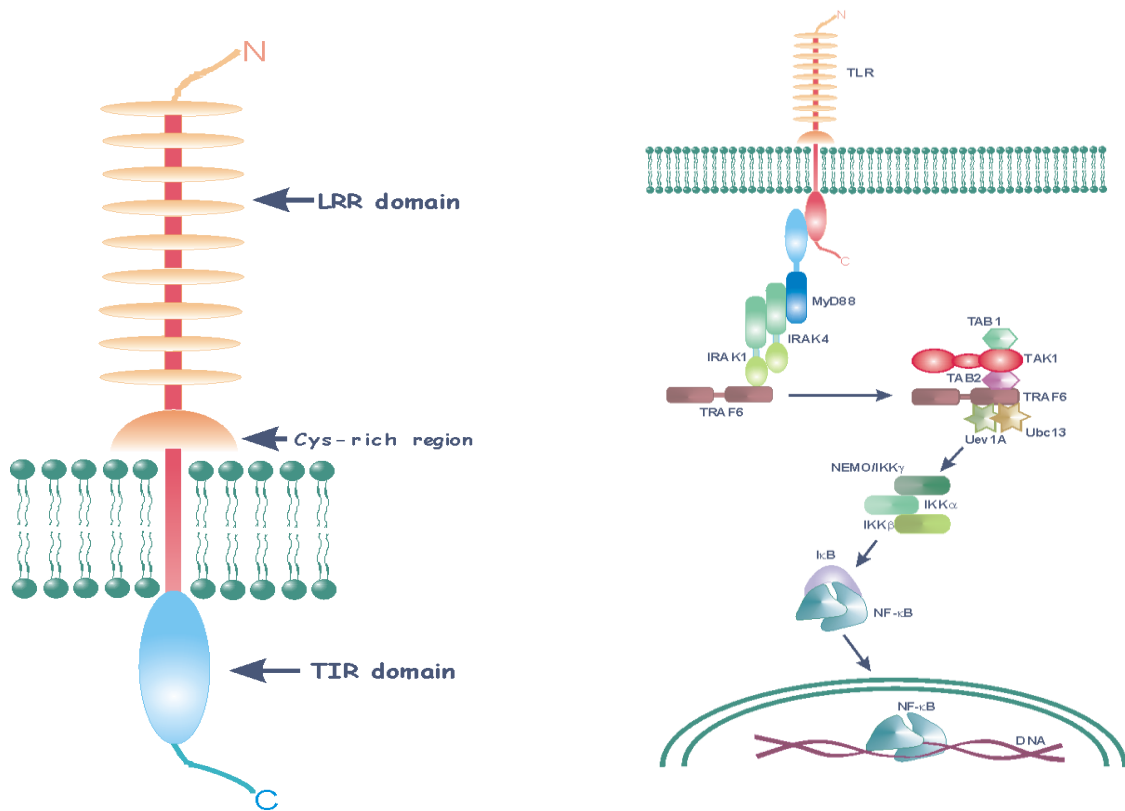
2.3.7. Receptory Toll-like

W latach 90-tych ubiegłego wieku po raz pierwszy w magazynie *Cell* ukazał się artykuł o istnieniu wyspecjalizowanych białek receptorowych *Toll* biorących udział w odpowiedzi przeciwgrzybiczej u człowieka [Lemaitre B. i wsp., 1996], a które po raz pierwszy odkryto u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster* Sp.) pod koniec lat 80-tych [Hashimoto C. i wsp., 1988]. W roku 1997 ukazał się ciekawy, a zarazem przełomowy artykuł, w którym po raz pierwszy zidentyfikowano i opisano ludzki gen będący homologiem genu kodującego białko *Toll* muszki owocowej, po czym receptor nazwano *Toll*-podobny (z ang. *Toll-like receptor*, TLR) [Medzhitov R. i wsp., 1997]. Receptory obecne są przede wszystkim na komórkach stanowiących broń w pierwszym etapie infekcji, jak komórki dendrytyczne, tuczne oraz makrofagi, gdy reakcja organizmu musi być natychmiastowa i nie ma możliwości angażowania limfocytów do produkcji przeciwciał.

Rodzina receptorów *Toll*-podobnych funkcjonujących w obrębie odporności wrodzonej u człowieka, stanowi pierwszą linię obrony organizmu w rozpoznawania molekularnych struktur zarówno powierzchniowych, jak i wewnętrznych drobnoustrojów (z ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) (Tabela 1). Ich aktywacja prowadzi do uruchomienia ważnych mechanizmów efektorowych odporności wrodzonej, a w kolejnych etapach uczestniczą również w kształtowaniu odporności nabytej, związanej przede wszystkim z pobudzeniem wytwarzania cytokin pro- jak i przeciwzapalnych [Takeda K. i Akira S., 2005; Pasare C. i Medzhitov R., 2005; O'Neill L.A., 2006; Kelian T., 2006]. Receptory *Toll*-podobne, których geny u człowieka zidentyfikowano w ilości 10 [Beutler B. i wsp., 2003], różnią się między sobą przede wszystkim pod względem komórek, na których ulegają ekspresji, szlakiem wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału, specyficzności ligandu (Ryc. 5.) który łączy się z receptorem, i tym samym typem odpowiedzi immunologicznej, które wywołują [Guo L.-H. i Schluesener H.J., 2011]. Wspólną cechą większości dotąd poznanych receptorów *Toll*-podobnych, z wyjątkiem TLR3, jest oddziaływanie poprzez białko adaptorowe MyD88 (z ang. *Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88*) i dalej szlakiem aktywacji NF- κ B (Ryc.6.) (Roz.1.3.6.).

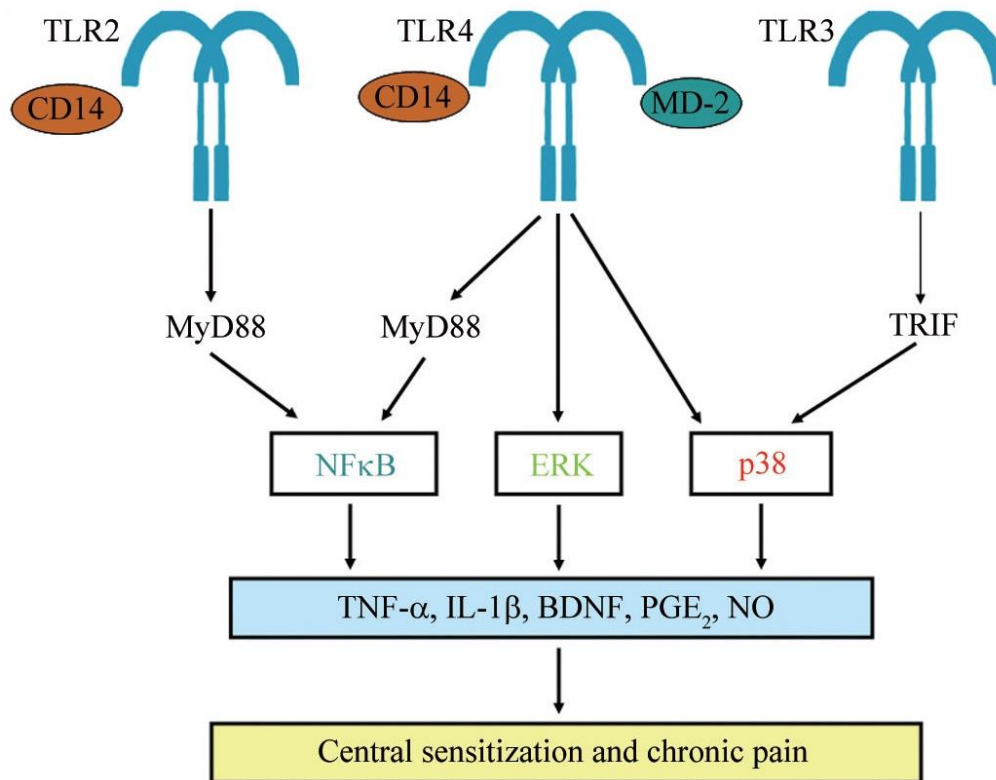
TLR to transbłonowe białka posiadające w swojej budowie dwie charakterystyczne domeny: zewnątrzkomórkowa domena występująca na N-końcu receptora zawiera powtórzenia bogate w leucynę (z ang. *leucine rich repeats*, LRR), jak również regiony bogate w cysteinę. Wewnątrzkomórkowa domena występująca na C-końcu białka wykazuje niezwykle wysokie podobieństwo do domeny występującej w receptorach dla IL-1 i podobnie jak ona nie posiada właściwości enzymatycznych.

Połączenie typu Toll/IL-1R (TIR) jest jedną z najstarszych ewolucyjnie domen i odpowiada za interakcję białko-białko (Ryc. 5.) [Akira S., 2003; Takeda K. i Akira S., 2004].



Ryc. 5. Budowa oraz ogólny schemat szlaku przekazywania sygnału przez receptory Toll-like [Akira S., 2003]

Liczne badania wskazują na kluczową rolę TLR w powstawaniu i na sam przebieg przewlekłego zapalenia i bólu poprzez aktywację mikrogleju. Następuje to poprzez wytwarzanie prozapalnych cytokin oraz białek adhezyjnych, prowadząc do sensytyzacji centralnego układu nerwowego i powstawania zjawiska hiperalgezji [Olson J.K. i Miller S.D., 2004; Jack C.S. i wsp., 2005; McMahon S.B i wsp., 2005; DeLeo J.A. i wsp., 2006]. Receptorami odpowiedzialnymi za modulację bólu w procesie zapalenia są najprawdopodobniej TLR1/2 (często występują wspólnie – są powiązane fizycznie i funkcjonalnie) [Ozinsky A. i wsp., 2000; Peng Y. i Zhang L., 2014], TLR3 oraz TLR4, któremu przypisuje się największe znaczenie w procesie powstawania bólu przewlekłego i neuropatycznego [Nicotra L. i wsp., 2012; Liu T. i wsp., 2012a; Sauer R.S. i wsp., 2014].



Ryc.6. Różne szlaki aktywacji receptorów *Toll*-podobnych: TLR2, TLR4 oraz TLR3 w komórkach mikrogleju rdzenia kręgowego w przebiegu powstawania bólu przewlekłego [Liu T. i wsp., 2012a].

Po podaniu LPS, będącego naturalnym ligandem dla TLR4 odnotowano znacznie zwiększoną ekspresję genu dla tego receptora, jak również uwolnienie prozapalnych cytokin, m.in. TNF- α , IL-1 β oraz IL-6 [Raghavendera V. i wsp., 2004; Lan L.S. i wsp., 2010], aktywację komórek dendrytycznych mikrogleju w centralnym układzie nerwowym [Rivest S., 2003]. Tramullas i wsp. [2014] powiązali w jednym z badań zwiększoną ekspresję TLR4 oraz zwiększone stężenia prozapalnych cytokin z silną aktywacją komórek mikrogleju w korze przedczołowej, a po podaniu zwierzętom specyficznego antagonisty receptora, TAK-242, odnotowano statystycznie istotne zmniejszenie odczuwania bólu przez zwierzęta. Zwiększona ekspresja TLR2 i TLR4 oraz poziom IL-1 β , w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej może stanowić potencjalny biomarker w oznaczaniu bólu przewlekłego [Kwok Y.H. i wsp., 2013] Również w badaniach z udziałem TLR3 oraz TLR7/8 oznaczono wyższe poziomy cytokin prozapalnych w rdzeniu kręgowym po podaniu odpowiednich dla tych receptorów ligandów (LPS, polyIC oraz R848) [Su Y. i wsp., 2005; Zhang Z. i wsp., 2005, Meng L. i wsp., 2010], a po podaniu agonistów

dla TLR2 oraz TLR6 (Tabela 1) odnotowano zwiększoną syntezę cytokin, które w połączeniu z niedotlenieniem tkanek prowadziły do uogólnionego odczynu zapalnego [Kuhlicke J. i wsp., 2007; Koch A. i wsp., 2012].

Tabela.1. Wykaz receptorów Toll-podobnych zlokalizowanych u człowieka wraz z ligandami zewnątrz- oraz wewnątrzpochođnymi [Tsan M.F. i Gao B., 2004; Takeda K. i Akira S., 2004].

TLR	Ligand
TLR1	Lipopeptydy
TLR2	Lipopeptydy, lipoproteiny Glikolipidy (m.in., β -glukan) Białka szoku cieplnego (m.in. HSP60, HSP70, HSPGp96) Nasycone kwasy tłuszczowe Zymosan Atypowy LPS LTA Lipoarabinomannan
TLR3	Podwójna nić wirusowego kwasu dsRNA polyIC
TLR4	LPS Taksol RSV ¹ , MMTV ² Białka szoku cieplnego (m.in. HSPGp96, HSP60, HSP70, HSP90) Nasycone kwasy tłuszczowe Fibronektyna Fibrynogen Siarczan heparyny Kwas hialuronowy Surfaktant A
TLR5	Flagelina
TLR6	Zymosan LTA Lipopeptydy
TLR7	Jednoniciowy wirusowy kwas RNA polyIC
TLR8	Jednoniciowy wirusowy kwas RNA polyIC
TLR9	Niemetylowane reszty CpG DNA
TLR11	<i>E. coli</i>

¹ z ang. *Respiratory Syncytial Virus*; ² z ang. *Mouse Mammary Tumor Virus*

2.4. AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA I PRZECIWZAPALNA KWASU OLEANOLOWEGO I JEGO POCHODNYCH

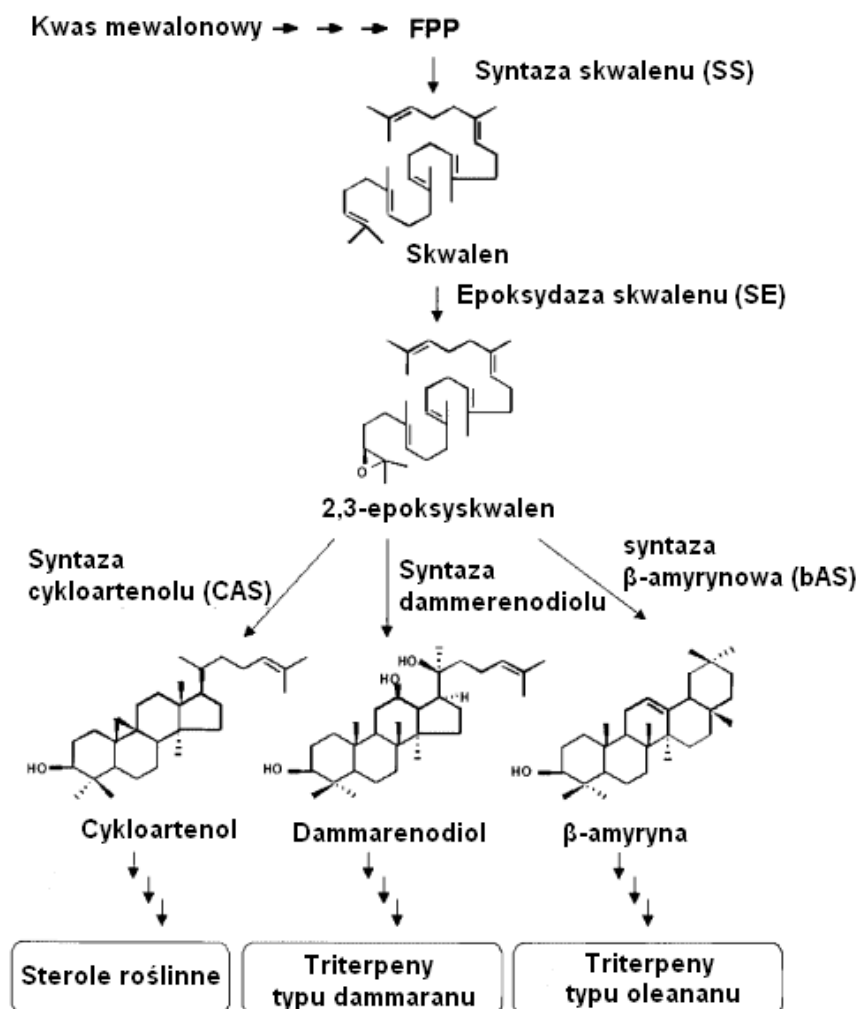
W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień i prac badawczych wskazujących na wielokierunkowe działanie farmakologiczne pochodnych kwasu oleanolowego. Związek ten należący do triterpenów pentacyklicznych, które obok steroli, saponin i glikozydów sercowych tworzą grupę tzw. triterpenoidów. Stanowią jedną z najliczniejszych oraz najszerzej występujących grup związków chemicznych w świecie organicznym, ciesząc się dużym zainteresowaniem wielu ośrodków badawczych w zakresie fitochemii i farmakologii. Ze względu na cenne właściwości lecznicze, kwas oleanolowy i jego pochodne pozyskuje się bezpośrednio z części roślin bogatych w pochodne triterpenowe (kora, żywica, skórka i wosk ochronny liści i kwiatów) [Mailard M. i wsp., 1992; Jager S. i wsp., 2009] szczególnie należących do rodziny *Oleaceae* [Allouche Y. i wsp., 2009]. Największym poznanym do tej pory źródłem kwasu oleanolowego jest oliwa z oliwek (*Olea europea* L.) [Juan M.E. i wsp., 2006; Allouche Y. i wsp., 2009; Sporn M.B. i wsp., 2011], skąd wzięta się również nazwa związku [Simonsen J. i wsp., 1957]. Warto wspomnieć również o jemiole pospolitej (*Viscum album* L.) oraz nagietku lekarskim (*Calendula officinalis* L.) [Ruszkowski D. i wsp., 2006], będących jednymi z bardziej popularnych gatunków występujących na terenie kraju, również bogatych w pochodne oleananu (Tabela 2).

Pochodne kwasu oleanolowego w środowisku roślinnym występują najczęściej w postaci wolnej w nadziemnych partiach roślin, w głównej mierze w liściach i woskach roślinnych [Li J., 2002] (Tabela 2), stanowiąc tym samym istotny element ochronny przed utratą wilgoci, jak również pierwszą linię obronną przed zagrożeniem ze strony patogenów [Heinzen R.A. i wsp., 1996]. W liściach oliwnych w badaniach mikroskopowych można dostrzec kryształki wolnego kwasu, który stanowi fizyczną barierę przeciwko patogennym grzybom [Kubo I. i Matsumoto A., 1984], natomiast występując w postaci samego aglikonu albo w połączeniu aglikonu z kilkoma łańcuchami cukrowymi z grupą hydroksylową lub karboksylową (tzw. glikonem) tworzy saponiny triterpenowe (Ryc. 7.) [Liu J., 1995; Szakiel A. i wsp., 2002-2005; Chołuj A. i Janiszowska W., 2005], które dodatkowo chronią roślinę przed organizmami roślinożernymi [Szakiel A. i wsp., 2002-2005].

Tabela 2. Naturalne źródła występowania kwasu oleanolowego (OA) [Li J., 2002; Chołuj A. i Janiszewska W., 2005]

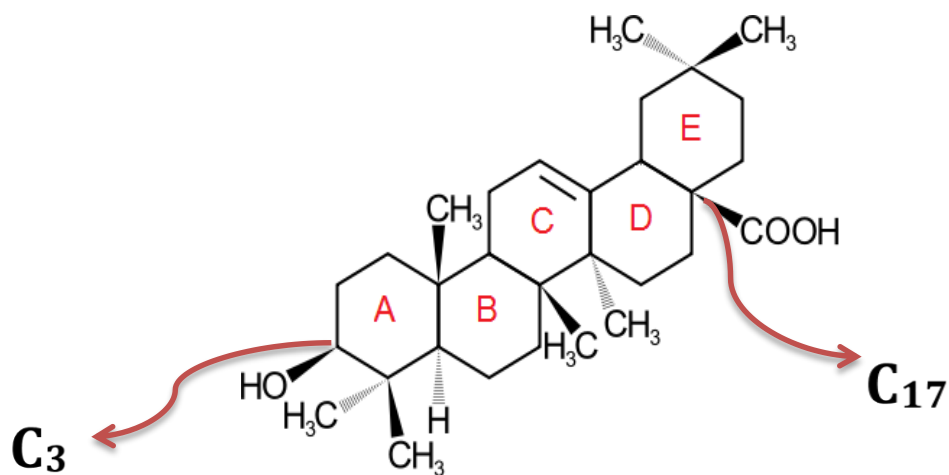
	ORGAN	GATUNEK
CZEŚĆ NADZIEMNA	Liście	<i>Acanthopanax nipponicus</i> , <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> , <i>Beta vulgaris</i> , <i>Calendula officinalis</i> , <i>Clematis montana</i> , <i>Coffea arabica</i> , <i>Crategus sp</i> , <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , <i>Gymnema sylvestre</i> , <i>Hedera helix</i> , <i>Ilex paraguariensis</i> , <i>Lavendula officinalis</i> , <i>Melissa officinalis</i> , <i>Nerium oleander</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Olea europea</i> , <i>Origanum majorana</i> , <i>Origanum vulgare</i> , <i>Plantago major</i> , <i>Platanus acerifolia</i> , <i>Polyscias fruticosa</i> , <i>Rosmarinum officinalis</i> , <i>Vaccinium myrtillus</i> , <i>Salvia officinalis</i> , <i>Sambucus nigra</i> , <i>Satureja montana</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Thymus willdenowii</i> , <i>Viscum album</i>
	Kwiaty	<i>Calendula officinalis</i> , <i>Helianthus annuus</i> , <i>Sambucus nigra</i>
	Owoce, skórka	<i>Caesalpinia paraguariensis</i> , <i>Catunaregam nilotica</i> , <i>Hedera helix</i> , <i>Kochia scoparia</i> , <i>Olea europea</i> , <i>Phytolacca dodecandra</i> , <i>Prunus spinosa</i> , <i>Randia dumetorum</i> , <i>Sapindus emarginatus</i>
	Nasiona	<i>Calendula officinalis</i> , <i>Chenopodium quinoa</i> , <i>Momordica cochinchinensis</i>
CZEŚĆ PODZIEMNA	Kora, ziele i inne	<i>Anemone rivularis</i> , <i>Bassia muricata</i> , <i>Betula alba</i> , <i>Calendula arvensis</i> , <i>Calendula officinalis</i> , <i>Centaurium erythraea</i> , <i>Chamaenerion angustifolium</i> , <i>Crategus sp.</i> , <i>Euphorbia geniculata</i> , <i>Fagonia arabica</i> , <i>Glechoma hederacea</i> , <i>Hysopus officinalis</i> , <i>Lavendula officinalis</i> , <i>Leonurus cardiaca</i> , <i>Melissa officinalis</i> , <i>Melilotus officinalis</i> , <i>Olea europea</i> , <i>Origanum maiorana</i> , <i>Prunella vulgaris</i> , <i>Sambucus nigra</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Verbena officinalis</i>
	Bulwa	<i>Ficaria ranunculoides</i> , <i>Leontice kiangnanensis</i> , <i>Talinum tenuissimum</i>
	Korzeń	<i>Aralia elata</i> , <i>Achyranthes faurei</i> , <i>Beta vulgaris</i> , <i>Calendula officinalis</i> , <i>Clematis chinensis</i> , <i>Clematis montana</i> , <i>Panax ginseng</i> , <i>Panax japonicus</i> , <i>Panax zigiberensis</i> , <i>Platycodon grandiflorum</i> , <i>Polyscias fruticosa</i> , <i>Pulsatilla patent</i> , <i>Viguiera decurrens</i>

Chemiczne pochodzenie i biosynteza kwasu oleanolowego oraz innych pochodnych triterpenoidowych wywodzi się z cząsteczki skwalenu, składającej się z sześciu reszt izoprenowych i będącego najbardziej znanym acyklicznym triterpenoidem, który po raz pierwszy został wyizolowany z tłuszczu wątroby rekina. Jego szerokie rozpowszechnienie zarówno w świecie zwierzęcym jak i roślinnym, potwierdza jego istotną rolę w biosyntezie alkoholi triterpenowych i steroli [Wrzeciono U. i Zaprutko L., 2001; Kołodziejczyk A., 2003]. W biosyntezie pentacyklicznych pochodnych proces cyklizacji cząsteczki skwalenu lub jego pochodnej 2,3-epoksydowej prowadzi do powstania, poprzez czterocykliczny układ bakchranu, do pięciocyklicznego szkieletu lupanu, a następnie układu oleananu (Ryc. 7.) [Wrzeciono U. i Zaprutko L., 2001].



Ryc. 7. Biosynteza kwasu oleanolowego [Opracowano na podstawie prac: Lee M.H. i wsp., 2004]

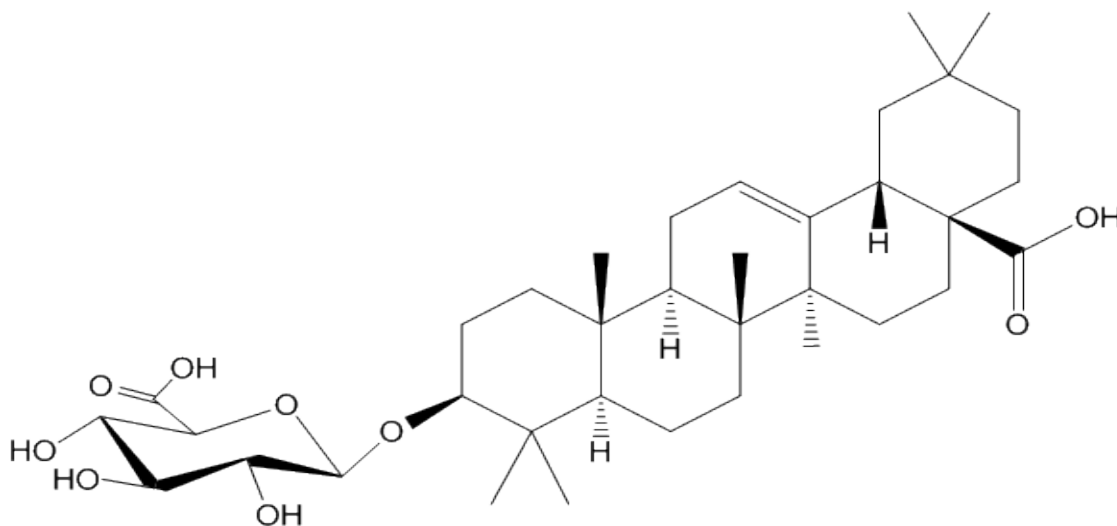
Podobieństwo triterpenów pentacyklicznych do steroidów opiera się przede wszystkim na występującym w obu grupach układzie cykloheptano-perhydrofenantrenowego, tworzonego przez pięć skondensowanych pierścieni, z których cztery są zawsze sześciocłonowe (A, B, C i D) a piąty (E) jest pięcio- lub sześciocłonowy (Ryc. 8.). Ze względu na różne położenie grup metylowych w pierścieniach wyróżniono wiele typów triterpenów pięciocyklicznych, z których największe znaczenie farmakologiczne posiadają związki klasyfikujące się do typu lupanu, oleananu i ursanu [Wrzeciono U i Zaprutko L., 2001; Chołuj A. i Janiszowska W., 2005; Kujawa-Warchala K. i Nazaruk J., 2012].



Ryc. 8. Budowa kwasu oleanolowego i strategiczne miejsca wpływające na aktywność przeciwbólową oraz przeciwzapalną: grupa hydroksylowa przy węglu C₃ oraz grupa karboksylowa przy C₁₇ [Opracowano na podstawie pracy Bednarczyk-Cwynar B. i wsp., 2012]

Występujące naturalnie saponiny triterpenowe, będące połączeniem cząsteczki kwasu oleanolowego z łańcuchem cukrowym przy C₃ i/lub C₁₇ podane drogą doustną są niewrażliwe na system enzymów trawiennych w przewodzie pokarmowym, rozkładane są dopiero w jelicie grubym w obecności flory bakteryjnej [Kida H. i wsp., 1998] (Ryc. 9). W ten sposób uwalniają się z nich triterpeny, które następnie ulegają resorpcji i integracji z błonami komórkowymi, dzięki temu mogą działać modulująco na mechanizmy przekazywania sygnału do komórki [Hasegawa H., 2004]. Wolny kwas oleanolowy zidentyfikowano w wielu ekstraktach roślinnych, natomiast zaznaczyć należy, że wyciągi

roślinne bardzo często zawierają inne, nieglikozydowe pochodne kwasu oleanolowego, których aktywność biologiczna jest różna i najczęściej zależna od struktury chemicznej [Sakai K. i Fukuda Y., 2004-2006].



Ryc.9. Struktura chemiczna 3-O- β -D-glukuronidu kwasu oleanolowego

Uważa się, że istotną rolę w aktywności przeciwbólowej oraz przeciwzapalnej pochodnych kwasu oleanolowego posiadają dwie grupy funkcyjne: grupa hydroksylowa – OH przy węglu C₃ oraz karboksylowa –COOH przy węglu C₁₇. Modyfikacja cząsteczki triterpenu w kierunku zacetylowania grupy hydroksylowej przy C₃ prowadziła do znaczącego wzrostu aktywności przeciwbólowej u testowanych zwierząt, w zależności od długości wprowadzanego do cząsteczki łańcucha [Recio M.C. i wsp., 1995; Soldi C. i wsp., 2008; Bednarczyk-Cwynar B. i wsp., 2012]. Ostatecznie wykazano jednak, iż najsilniej działające pochodne w kierunku działania analgetycznego w swojej strukturze posiadają grupę hydroksyiminową [Paszal A. i wsp., 2008]. Ponadto przyjmują się, iż modyfikacje w obrębie grupy karboksylowej przy C₁₇ mogą wpływać na siłę działania związku [Bednarczyk-Cwynar B. i wsp., 2012] (Ryc. 8).

Przez długi czas uważano, że kwas oleanolowy jest biologicznie nieaktywny. Pojawiające się pierwsze doniesienia o pożądanych właściwościach farmakologicznych połączonych z relatywnie niską toksycznością, wywodzących się najczęściej z medycyny i kultury azjatyckiej, zainteresowały wiele ośrodków badawczych na całym świecie

[Ovsemi Z. i wsp., 2006]. Działanie przeciwzapalne pochodnych oleanolowych i innych pochodnych triterpenowych po raz pierwszy zostało opisane w 1969 roku przez Gupta i współpracowników w pracy: „*Antiinflammatory activity of natural products – Triterpenoids*”, doprowadzając do silnego rozwoju badań nad aktywnością pochodnych naturalnych, jak i związków syntetyzowanych *de novo* [Liu J. i wsp., 1995, 2005; Sakai K. i wsp., 2004]. Pierwsze prace na temat mechanizmów włączonych w działanie przeciwzapalne kwasu oleanolowego i jego pochodnych pojawiły się w latach 80 – tych XX wieku i dotyczyły wpływu na hamowanie degranulacji mastocytów i zmniejszenia uwalniania wazoaktywnych amin, m.in. histaminy i serotoniny (5-HT) [Dai Y. i wsp., 1989-1989a-b; Wu C.R. i wsp., 2011], podczas gdy w kolejnej dekadzie wykazano hamujący wpływ samego kwasu na enzym C3-konwertazę, wchodzącym w skład układu dopełniacza [Kapil A. i Sharma S., 1994], Zbadano również możliwość bezpośredniego działania hamującego enzymu fosfolipazy A₂ (PLA₂, z ang. *phospholipase A₂*), uważanego za jeden z głównych czynników powstawania zapalenia i obrzęków [Cirinio G. i wsp., 1989; Ginger-Larza E.M. i wsp., 2001], jak również dowiedziono właściwość hamowania powstawania pochodnych kwasu arachidonowego, leukotrienów LTB₄, których stężenie w znacznych ilościach wzrasta w chronicznym zapaleniu [Stanley P.L. i wsp., 1991; Ginger-Larza E.M. i wsp., 2001; Santos-Rosa C. i wsp., 2007]. Inne pochodne wykazały także działanie przeciwne do działania elastazy i hialuronidazy, niezbędnych w procesach prawidłowego włóknienia tkanki łącznej [Ying Q.L. i wsp., 1991; Facinio R.M. i wsp., 1995].

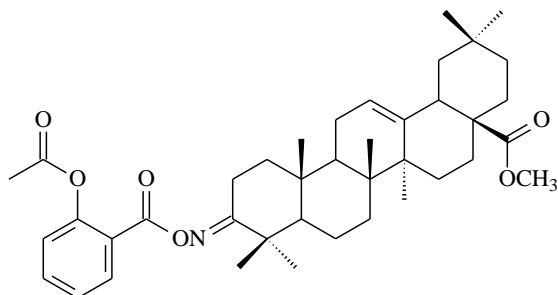
Od wielu lat w zainteresowaniu chińskich naukowców znajduje się *Ligustrum* spp., która w medycynie ludowej stosowana jest w przewlekłym nieżycie dolnych dróg oddechowych oraz w zapaleniu wątroby. Najlepszy potencjał przeciwzapalny posiadają dwa gatunki: *Ligustrum pricei* Hayata (LP) oraz *Ligustrum lucidum* Ait. (LL), których głównymi składnikami aktywnymi są amaryna, lupeol i kwas betulinowy (LP) oraz kwas oleanolowy i ursolowy (LL) [Feng J. i wsp., 2011; Wu C.R. i wsp., 2011]. W testach farmakodynamicznych z wykorzystaniem modelu formalinowego oraz testu „wicia” po podaniu kwasu octowego (*i.p.*), naukowcy wykazali efekt przeciwbólowy badanych ekstraktów w sposób zależny od dawki. W tym samym badaniu Wu i wsp. zbadali wpływ LP na zwiększoną przepuszczalność małych naczyń krwionośnych spowodowaną poprzez LPS, LTA, 5-HT, BK, SNP oraz histaminy i w każdym przypadku uzyskali działanie supresyjne w najwyższej zastosowanej dawce wynoszącej 1 g/kg m.c. (*p.o.*), natomiast w przypadku wspólnego podania LP z 5-HT działanie zmniejszające przepuszczalność naczyń i wysięk w całym przedziale dawkowania (0,1 – 1,0 g/kg m.c., *p.o.*) [Wu C.R. i wsp., 2011].

Po latach badań i poszukiwań ewentualnego mechanizmu działania przeciwzapalnego triterpenów pentacyklicznych, w tym samego kwasu oleanolowego i jego pochodnych, wskazuje na działanie związane z ekspresją NF- κ B i hamowaniem jego działania prozapalnego [Choi C.Y. i wsp., 2001; Nichols D.P. i wsp., 2009; Gao X. i wsp., 2008; Takeda K. i wsp., 2010; Nihem N.X. i wsp., 2011; Zha L.Y. i wsp., 2011; Papalouis A. i wsp., 2012; Jung K. i wsp., 2013; Kim H.S. i wsp., 2014]. Prawdopodobny mechanizm działania oleananów uzyskany w badaniach na syntetycznych pochodnych triterpenoidowych, CDDO (kwas 2-cyjano-3,12-diokso-oleano-1,9(11)-dien-28-owy) oraz CDDO-Me (ester metylowy kwasu 2-cyjano-3,12-diokso-oleano-1,9(11)-dien-28-owego) polega na hamowaniu aktywności przekazywania sygnału za pomocą NF- κ B, indukowanym przez TNF- α jak również hamowaniem aktywności enzymu IKK β *in vitro* [Ahmad R. i wsp., 2006] oraz I κ B β [Schishodia S. i wsp., 2006; Nichols D.P. i wsp., 2009] (Ryc. 4.). Wykazano także hamujący wpływ na proliferację limfocytów T, tym samym zmniejszenie ich działania cytotoksycznego [Gao X. i wsp., 2008].

Ze względu na wykazanie w ostatnich latach roli receptorów *Toll*-podobnych w procesie stymulacji i przetwarzania bólu przewlekłego oraz stanu zapalnego za pośrednictwem m.in. NF- κ B (Roz. 1.3.7.), próbuje się określić ewentualny wpływ pochodnych triterpenowych, w tym pochodnych oleananu, na aktywność antynocyceptywną oraz przeciwzapalną z wykorzystaniem szlaków molekularnych TLR. Badania nad samymi receptorami są stosunkowo świeże i sięgają końca lat 80-tych zeszłego wieku, choć już wtedy przypisano im szczególną rolę zwłaszcza w pierwszym etapie obrony przed zakażeniem i indukcją reakcji odpornościowej, tym samym decydując o wyborze drogi na jaką powinien wstąpić organizm w dalszych etapach reakcji obronnej. Wiadomo, że jednym z mechanizmów z wykorzystaniem tych białek jest zwiększone wytwarzanie prozapalnych cytokin (m.in. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) poprzez wpływ na uwalnianie czynnika NF- κ B do jądra komórkowego, który reguluje ekspresję genów odpowiednich cytokin, białek kompleksu zgodności tkankowej, cykliny D1, która m.in. pozwala limfocytom rozpocząć proces proliferacji i po stymulacji dodatkowych czynników, rozpocząć produkowanie przeciwciał [Ozinsky A. i wsp., 2000; Li X. i Stark G.R., 2002; Burstein E. i Duckett C.S., 2003; Cholewa J.B., 2004].

Jednymi z nowych pochodnych kwasu oleanolowego oraz kwasu acetylosalicylowego są związki o symbolach BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 (Ryc. 10-12.) zsyntetyzowane w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, które stanowiły przedmiot badań niniejszej dysertacji.

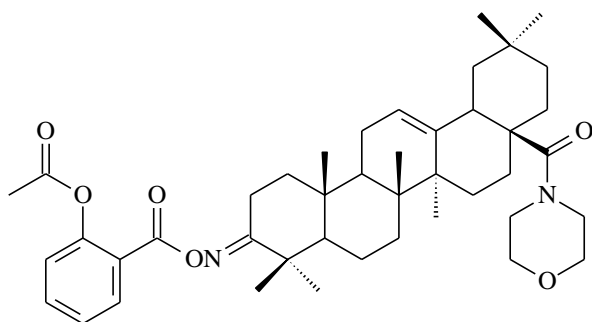
BB XII / 59



$C_{40}H_{55}NO_6$
 645.88
 645.402939
 C 74.39% H 8.58% N 2.17% O 14.86%

Ryc. 10. Ester metylowy kwasu 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owego

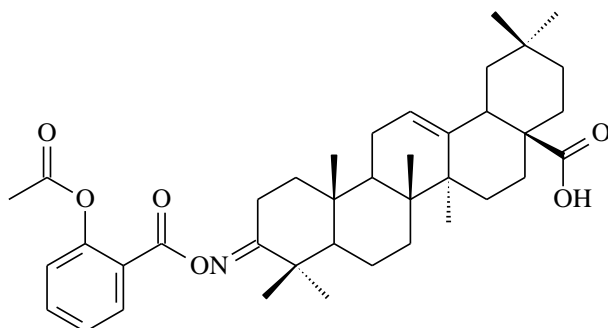
BB XII / 72



$C_{43}H_{60}N_2O_6$
 700.96
 700.445138
 C 73.68% H 8.63% N 4.00% O 13.70%

Ryc. 11. Morfolid kwasu 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owego

BB XII / 73



$C_{39}H_{53}NO_6$
 631.85
 631.387289
 C 74.14% H 8.45% N 2.22% O 15.19%

Ryc. 12. Kwas 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owy

3. Cel Pracy

W niniejszej pracy postanowiono określić profil działania przeciwbólowego i przeciwzapalnego nowych związków pochodnych kwasu oleanolowego oraz kwasu acetylosalicylowego o symbolach BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 zsyntetyzowanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, jak również zaproponować ewentualny profil działania poprzez wykonanie poniżej podanych zadań badawczych:

- 1 Badania toksyczności ostrej metodą ustalonej dawki wg OECD badanych substancji
- 2 Ocena dawko-zależnej
 - a. aktywności motorycznej horyzontalnej i wertykalnej
 - b. aktywności przeciwbólowej
 - c. działania przeciwzapalnego
- 3 Określenie względnego udziału kwasu acetylosalicylowego (ASA) w działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym analizowanych związków
- 4 Ocena interakcji badanych pochodnych kwasu oleanolowego z morfiną (MF), naloksonem (NL) i ASA w zakresie działania przeciwbólowego oraz z ASA w przebiegu aktywności przeciwzapalnej.
- 5 Dla pochodnej wykazującej najsilniejsze działanie przeciwbólowe i/lub przeciwzapalne postanowiono określić ocenę działania przeciwbólowego i przeciwzapalnego po podaniu wielokrotnym, jak również ocenić wpływ na stężenia wybranych prozapalnych cytokin (IL-6, TNF- α) oraz ekspresję mRNA dla wymienionych cytokin oraz jak ekspresję dla receptorów TLR1 i TLR3.

4. Część Doświadczalna

4.1. MATERIAŁ ZWIERZĘCY I OGÓLNE WARUNKI DOŚWIADCZENIA

Badania przeprowadzono na białych myszach szczepu Swiss o masie ciała 20 – 30 g oraz na szczurach szczepu Wistar o masie 250 – 350 g. W obu przypadkach do doświadczeń użyto jedynie samców, a termin eksperymentów obejmował okres od czerwca 2011 do grudnia 2013. Zwierzęta przez cały okres prowadzonych doświadczeń przebywały w warunkach kontrolowanych, tj. w pomieszczeniu o temperaturze $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ oraz wilgotności 65 – 75 %, zachowując naturalny 12 – godzinny cykl dobowy dzień – noc. Doświadczenia prowadzone jedynie w okresie cyklu oświetlonego, tj. 07:00 – 19:00. Zwierzęta przechowywane były w klatkach z białego tworzywa sztucznego, wyłożonych trocinami o wymiarach 35x20x13 cm (w przypadku myszy po 8 – 10 osobników) oraz 50x30x20 cm (dla 4 – 5 szczurów). Okres aklimatyzacji dla zwierząt obejmował 4 do 7 dni przed planowanym doświadczeniem, podczas którego były przyzwyczajane do obecności i ręki eksperymentatora. Zwierzęta przez cały okres badania miały wolny dostęp do wody i standardowej paszy laboratoryjnej (paletki Labofeed B, Wytwórnia Paszy i Koncentratów, Kcynia, Polska, PN – ISO 9001:1996).

Na wszystkie prowadzone badania otrzymano zgodę i pozytywną opinię Lokalnej Komisji Bioetycznej Do Spraw Doświadczeń Na Zwierzętach w Poznaniu wydanej w dniu 13 czerwca 2011 - nr uchwały: 52/2011.

4.2. APARATURA I ODCZYNNIKI

4.2.1. Odczynniki i substancje stosowane w badaniach farmakodynamicznych

- Substancje badane: BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 (uzyskane z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska)
- Naloksonu chlorowodorek (Naloxonum hydrochloricum WZF 0,4µg/ml , WZF Polfa S.A., Warszawa, Polska)
- Morfiny siarczan (Morphini sulfas inj. 20 mg/ml, Polpharma, Warszawa, Polska)
- Kwas acetylosalicylowy (Acidum acetylosalicylicum pro recepturae, Galfarma, Kraków, Polska)
- Karagenina (Carrageenan, SigmaAldrich, USA)
- Tween 80 (Sigma Aldrich, USA)
- Chlorek sodu (Natrium chloridum, Galfarma, Kraków, Polska)
- Woda do iniekcji (Aqua pro iniectionae a 5ml, Polpharma, Warszawa, Polska)
- Izotoniczny roztwór chlorku sodu (0,9% Natrium chloridum a 5 ml, Polpharma, Warszawa, Polska)

4.2.2. Przygotowanie roztworów do doświadczeń farmakodynamicznych

- 5% roztwór Tween 80 otrzymano poprzez rozpuszczenie na gorąco Tween 80 z wodą destylowaną w stosunku 1:20
- 1% roztwór karageniny (2mg/0,2ml) za każdym razem przygotowywano *ex tempore*, zawieszając karageninę w 0,9% NaCl i następnie ogrzewając do temperatury ok. 37°C w celu przeprowadzenia zawiesiny w roztwór
- płyn elektrolitowy do pomiaru zmian objętości łąp w teście z użyciem pletyzmometru wykonano po rozpuszczeniu 0,351 g NaCl oraz 3 ml środka zmniejszającego napięcie powierzchniowe w 1000 ml wody destylowanej
- roztwór morfiny (MF) w dawce 5,0 mg/kg m.c. przygotowano poprzez rozcieńczenie roztworu siarczanu morfiny z wodą do iniekcji
- roztwór naloksonu (NL) w dawce 3,0 mg/kg m.c. przygotowano poprzez rozcieńczenie roztworu chlorowodoru naloksonu z wodą do iniekcji

- zawiesina kwasu acetylosalicylowego (ASA) w dawce 200,0 i 300,0 mg/kg m.c. oraz w po przeliczeniu z masy molowej ASA podawana w dawkach komplementarnych do dawki 30,0 oraz 300,0 mg/kg substancji badanych:

BB XII/59 – 8,4 oraz 84,0 mg/kg (ASA)

BB XII/72 – 7,7 oraz 77,0 mg/kg (ASA)

BB XII/73 – 8,6 oraz 86,0 mg/kg (ASA)

przygotowywano zawieszając odpowiednią ilość substancji, wcześniej zmikronizowanej dodatkowo w moździerzku oraz za pomocą homogenizatora, *ex tempore* w 5% roztworze Tween 80

- przygotowanie zawiesin substancji badanych: BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73:

w dawce 0,3 mg/kg m.c.

w dawce 3,0 mg/kg m.c.

w dawce 30,0 mg/kg m.c.

w dawce 300,0 mg/kg m.c.

w dawce 2,0 g/kg m.c.

przygotowywano zawieszając odpowiednią ilość w/w substancji *ex tempore* w 5% roztworze Tween 80.

4.2.3. Odczynniki i substancje użyte w badaniach genetycznych

- Kwas borowy (Sigma, USA)
- Agaroza (ABO, Fermentas, Litwa)
- Etanol 75% (POCh, Polska)
- Izopropanol (Sigma, USA)
- Chloroform (Sigma, USA)
- Woda autoklawowana , dejonizowana
- DEPC (Sigma, USA)
- EDTA (Sigma, USA)

- TRIS Base (Sigma, USA)
- IL- 6 [KIT] (RayBiotech, USA)
- Molecular Weight Marker KBL (1kb DNA Ladder, Fermentas, Litwa)
- TriPure Isolation Reagent (Roche, USA)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, USA)
- SuperScript III RT (200U/μl) (ThermoFisher Scientific, USA)
- RNase OUT (40U/μl) (ThermoFisher Scientific, USA)
- Fast Start DNA Master Sybr Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy)

4.2.4. Sprzęt i aparatura wykorzystana w przebiegu doświadczeń farmakodynamicznych

- Aktywnometr (Activity Cage cat. 7436 – UGO BASILE, Włochy)
- Pletyzmometr (Plethysmometer cat. 7140 – HUGO SACHS ELECTRONIC, Niemcy)
- Urządzenie do testu *hot-plate* wykonane w Katedrze i Zakładzie Farmakologii UM w Poznaniu (cylinder z przezroczystego tworzywa sztucznego o średnicy 20 cm i wysokości 18 cm; płytką grzewczą o wymiarach 20x20 cm, Poznań, Polska)
- Waga elektroniczna (Typ A200, AXIS, Gdańsk, Polska)
- Waga techniczna (POFAWAG, Lublin, Polska)
- Sonda dożołądkowa ze stali nierdzewnej (modele: FTSS-24S-24ga-25mm oraz FTSS-18S-18ga-76mm, ANIMALAB, Poznań, Polska)
- Strzykawki z igłami do podania podskórnego (MLS 1.1., BOGMARK, MEDICAL, Łomża, Polska)

4.2.5. Sprzęt i aparatura wykorzystana w przebiegu badań genetycznych

- Pipety o regulowanej objętości (Eppendorf, USA; LabMate, Wielka Brytania)
- Wirówka (Centrifuge 5415D/R, Eppendorf, USA)
- Wirówka (MiniSpin, Eppendorf, USA)
- Termomikser (Thermomixer Compact, Eppendorf, USA)
- Zamrażarka (Joun VXE 380, Kendromed, Polska)
- Mikrofalówka (Electrolux EMS 2840, Electrolux, Szwecja)

- Wirówka (WL-1, BIOMIX, Polska)
- Spektrofotometr (Biophotometer, Eppendorf, USA)
- Komora do elektroforezy (BioRad, USA)
- Termocykler PTC 200 DNA Engine Gradient Cyler (MJ Research, Inc., USA)
- Aparat do amplifikacji LightCycler 480 II system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy)
- System komputerowy do analizy obrazu (UV:UVI-KS4000/Image PC, System Biotech Molecular Biology Instruments, USA)
- Lodówka (ERE 3000, Electrolux, Szwecja)
- Zamrażarka (EUC – 2100, Electrolux, Szwecja)
- Waga elektroniczna (WPE 600, RadWag, Polska)
- Komora z laminarnym przepływem powietrza (Heraeus Herasafe KS, Kendro, Niemcy)
- Komora PCR UV – CLEANER UVC/T-M-AR (Biosan, USA)
- Generator płatków lodu (iShin IF 300-150, Biocom, USA)
- Homogenizator do tkanek (Power Gen 125, Fisherbrand, FisherScientific, USA)

4.3. TESTY FARMAKODYNAMICZNE

4.3.1. Ocena toksyczności ostrej

Badanie przeprowadzono wg wytycznych OECD TG 420 „*Toksyczność ostra doustna – Metoda ustalonej dawki*” do badań substancji chemicznych z dnia 20 stycznia 2001. Badanie przeprowadzono na czterech grupach myszy Swiss (samce o masie 25 – 35 g), tj. pierwszej stanowiącej kontrolę (5% roztwór Tween 80 – *vehiculum*) i pozostałych trzech, którym podano odpowiednio substancję: BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 w dawce 2,0 g/kg m.c. Badane związki po wcześniejszym zawieszeniu w *vehiculum* podano dożołądkowo (*p.o.*) za pomocą strzykawki z metalową sondą w pozycji pionowej. Zwierzęta stanowiące kontrolę otrzymały *vehiculum* wg tej samej procedury. W trakcie 3 tygodniowej obserwacji odnotowywano ewentualne zmiany u

myszy w zakresie: zmiany wyglądu skóry, sierści i błon śluzowych, zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego i oddechowego, wystąpienie ewentualnych zaburzeń neurologicznych czy też śmiertelności.

4.3.2. Ocena spontanicznej aktywności ruchowej – „locomotor activity”

Test polegał na umieszczeniu myszy w aktywnym oceniaczu spontanicznych ruchów poziomych oraz pionowych, a ruchliwość zwierzęcia była oceniana wg licznika sumującego osobno ruchy horyzontalne (poziome) i wertykalne (pionowe) w przeciągu pięciu minut. Na 60 minut przed rozpoczęciem testu samcom myszy Swiss podzielonych na 13 grup po 10 osobników każda, podano każdą z badanych substancji w dawkach 0,3 ; 3,0, 30,0 oraz 300,0 mg/kg m.c. dożołądkowo (*p.o.*) za pomocą sondy, a zwierzętom stanowiącym kontrolę podano *vehiculum*, którym był 5% roztwór Tween 80.

Ruchliwość każdej ze 130 badanych myszy rejestrowano osobno przez 5 min. W trakcie pomiaru ograniczono do minimum czynniki mogące wpływać na uzyskane wyniki (m.in. hałas, obecność osób postronnych jak i innych zwierząt, nie biorących udziału w/w doświadczeniu).

4.3.3. Ocena działania przeciwbólowego w teście „gorącej płyty”: test „hot - plate”

Test „hot-plate” („test gorącej płyty”) polega na umieszczeniu myszy na powierzchni rozgrzanej płyty aluminiowej do temperatury $51 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ o wymiarach 20 x 20 cm, ograniczonej cylindrem wykonanym z przezroczystego tworzywa o średnicy 20 cm i wysokości 18 cm. Reakcję nocyceptywną (lizanie łap zarówno przednich jak i tylnych, a także skoki) wyrażono jako czas w którym zauważono w/w reakcję [s], natomiast badanie przerywano po 60 sekundach od rozpoczęcia testu, ze względu na możliwość termicznego uszkodzenia tkanek.

Ocena wpływu jedokrotnego podania badanych substancji na reakcję bólową w teście „hot-plate”

Myszom podawano substancje BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 w dawce: 0,3; 3,0; 30,0 oraz 300,0 mg/kg (*p.o.*) jednorazowo bezpośrednio przed rozpoczęciem badania, który uznawano za czas zerowy. Grupie kontrolnej podawano 5% roztwór Tween 80 (*p.o.*). Następnie dokonywano pomiaru efektu przeciwbólowego w pięciu przedziałach czasowych, liczonych od momentu podania badanej substancji, czyli po: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 oraz 24,0 godzinach.

Ocena działania ASA w dawkach komplementarnych na reakcję bólową w teście „hot-plate”

W celu zbadania ewentualnego wpływu cząsteczki ASA pochodzącej ze struktury badanych związków na reakcję bólową zwierząt, myszom podawano ASA w dawce komplementarnej (wyliczonej na podstawie znanej masy molowej badanych związków i proporcjonalnego udziału ASA w strukturze) dla zastosowanych wybranych dawek substancji BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 w dawkach 30,0 oraz 300,0 mg/kg (*p.o.*), które przedstawiały się następująco: ASA podano jednorazowo bezpośrednio przed rozpoczęciem badania, który uznawano za czas zerowy. Grupie kontrolnej podawano odpowiednią objętość 5% roztworu Tween 80 (*p.o.*). Następnie dokonywano pomiaru efektu przeciwbólowego w pięciu wybranych przedziałach czasowych, liczonych od momentu podania badanej substancji, czyli po: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 oraz 24,0 godzinach.

Ocena łącznego, jednorazowego podania badanych substancji z ASA na reakcję bólową w teście „hot-plate”

W celu określenia ewentualnego mechanizmu działania związanego z hamowaniem aktywności cyklooksygenazy (a więc mechanizmu odpowiedzialnego za część profilu farmakologicznego ASA) badanych związków postanowiono zbadać interakcję tychże z ASA. W tym celu myszom podawano ASA w dawce 300,0 mg/kg (*p.o.*). Po 60 minutach od podania ASA, aplikowano substancje BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 w dawce: 0,3; 3,0; 30,0 oraz 300,0 mg/kg (*p.o.*), jednorazowo bezpośrednio przed rozpoczęciem badania, który uznawano za czas zerowy. Grupie kontrolnej podawano 5% roztwór Tween 80 (*p.o.*) odpowiedniej objętości. Następnie dokonywano pomiaru efektu przeciwbólowego w pięciu wybranych przedziałach czasowych, liczonych od momentu podania badanej substancji, czyli po: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 oraz 24,0 godzinach.

Ocena łącznego, jednorazowego podania badanych substancji z MF na reakcję bólową w teście „hot-plate”

W kolejnym etapie doświadczeń spróbowano określić ewentualny wpływ badanych pochodnych kwasu oleanolowego na działanie substancji o centralnym opioidowym mechanizmie działania. W tym celu myszom w pierwszej kolejności podawano MF w dawce 5,0 mg/kg (s.c.), i po 15 minutach od podania podskórnego podano badane substancje BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 w dawce: 0,3; 3,0; 30,0 oraz 300,0 mg/kg (p.o.), jednorazowo bezpośrednio przed rozpoczęciem badania, który uznawano za czas zerowy. Grupie kontrolnej podawano 0,9% roztwór NaCl (s.c.) i po 15 minutach 5% roztwór Tween 80 (p.o.). Następnie dokonywano pomiaru efektu przeciwbólowego w pięciu wybranych przedziałach czasowych, liczonych od momentu podania badanej substancji, czyli po: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 oraz 24,0 godzinach.

Ocena łącznego, jednorazowego podania badanych substancji z NL na reakcję bólową w teście „hot-plate”

W celu określenia wpływu badanych pochodnych na działanie przeciwbólne poprzez receptory opioidowe, myszom podawano nalokson (NL) w dawce 3,0 mg/kg (s.c.), a następnie po 15 minutach od podania podskórnego podano badane substancje BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 w dawce 30,0 mg/kg (p.o.), jednorazowo bezpośrednio przed rozpoczęciem badania, który uznawano za czas zerowy. Grupie kontrolnej podawano 0,9% roztwór NaCl (s.c.) i po 15 min odpowiadającą dawce badanego związku objętość 5% roztworu Tween 80 (p.o.). Następnie dokonywano pomiaru efektu przeciwbólowego w pięciu wybranych przedziałach czasowych, liczonych od momentu podania badanej substancji, czyli po: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 oraz 24,0 godzinach.

4.3.4. Ocena działania przeciwzapalnego w teście karageninowym za pomocą pletyzmometru

Test wykonywano poprzez zastosowanie karageniny jako środka wywołującego obwodowy miejscowy stan zapalny. W poduszkę tylnej prawej łapy szczura podawano 0,2 ml roztworu karageniny w celu wywołania obrzęku, którego przyrost następnie mierzono za pomocą pletyzmometru w 1, 3, 6 oraz 10 godzinie od momentu podania substancji badanej. Kontrolę stanowiła lewa łapa po wstrzyknięciu 0,2 ml 0,9% roztworu NaCl mierzona równocześnie z próbą badaną, natomiast pomiar zerowy łap szczura przed

podaniem substancji wywołującej zapalenie przeprowadzono na kilka godzin przed planowanym badaniem.

Stopień obrzęku łapy szczura mierzono zanurzając łapę zawsze na taką samą, wcześniej ustaloną głębokość w komorze pomiarowej wypełnionej płynem elektrolitowym, po czym odnotowywano wynik. Każdy pomiar powtarzano 3 – krotnie. Ilość płynu w komorze uzupełniano po każdym pomiarze do poziomu zerowego. Aby zapobiec zanieczyszczeniu płynu w komorze, łapy szczura były oczyszczane przed każdym pomiarem, a płyn wymieniany po każdej grupie zwierząt.

W opracowaniu wyników użyto wzoru wyrażającego różnicę w zmianach objętości prawej i lewej łapy po wywołaniu stanu zapalnego:

$\Delta G = (PPO\ XH - PO) - (LPO\ XH - LO)$ [ml], gdzie:

ΔG – zmiana objętości prawej i lewej tylnej łapy po 1, 3, 6 i 10 h w stosunku do wartości wyjściowej, przed wywołaniem obrzęku

P – objętość prawej łapy przed wstrzyknięciem karageniny

L - objętość lewej łapy przed wstrzyknięciem 0,9% NaCl

PPO XH - objętość prawej łapy po wstrzyknięciu karageniny w danym czasie XH

LPO XH - objętość lewej łapy po wstrzyknięciu 0,9% NaCl w danym czasie XH

Ocena wpływu jednorazowego podania badanych substancji na reakcję zapalną po podaniu szczirom karageniny badaną za pomocą pletyzmometru

Po 30 minutach od podania karageniny za pomocą sondy podawano dożołądkowo (*p.o.*) badaną substancję BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 w dawce: 0,3; 3,0; 30,0 oraz 300,0 mg/kg. Grupie kontrolnej podano odpowiednią objętość 5% roztworu Tween 80 (*p.o.*). Wpływ podawanych substancji oceniono wg metodyki jak podano w poprzednim podrozdziale.

Ocena wpływu jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych na reakcję zapalną

Podobnie jak w przypadku badania reakcji bólowej i zbadania ewentualnego wpływu ASA pochodzącego ze struktury badanych związków (wyliczonej na podstawie znanej masy molowej badanych związków i proporcjonalnego udziału ASA w strukturze), w tym doświadczeniu zbadano wpływ ASA w dawkach przeliczonych odpowiednio do dawki 30,0 oraz 300,0 mg/kg (*p.o.*) związku BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73. Jako związku referencyjnego w tym doświadczeniu użyto ASA w dawce 200,0 mg/kg (*p.o.*). Grupa kontrolna otrzymywała 5% roztwór Tween 80 (*p.o.*) w odpowiedniej objętości. Badane substancję podawano 30 minut od podania karageniny za pomocą sondy dożołądkowo. Wpływ podawanych substancji oceniono wg metodyki jak podano w poprzednim podrozdziale.

Ocena łącznego, jednorazowego podania badanych pochodnych z ASA na reakcję zapalną

W celu określenia ewentualnego mechanizmu działania przeciwzapalnego związanego z hamowaniem aktywności cyklooksygenazy, COX (a więc mechanizmu odpowiedzialnego za część profilu farmakologicznego ASA) badanych związków postanowiono zbadać interakcję tychże z ASA. W tym celu związki BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73, podano łącznie z ASA w dawce 200,0 mg/kg, którą podano również szczurom jako dawkę referencyjną. Badane pochodne podawano zwierzętom w dawce: 0,3; 3,0 oraz 30,0 mg/kg (*p.o.*). W doświadczeniu po 30 minutach od podania karageniny, podano ASA drogą dożołądkową, a po 60 minutach tą samą drogą odpowiednią dawkę substancji badanej. Grupa kontrolna otrzymała odpowiednie objętości (podwójnie) 5% roztworu Tween 80 w stosowanych przedziałach czasowych (*p.o.*). Interakcje badanych substancji z ASA oceniono wg metodyki jak podano w poprzednim podrozdziale.

4.4. SCHEMATY DOŚWIADCZEŃ

4.4.1. Określenie toksyczności ostrej granicznej

Badania toksyczności ostrej przeprowadzono w 4 grupach zwierząt po 10 sztuk w każdej:

- Grupa I – myszy kontrolne, które otrzymały 5% Tween 80 (*p.o.*)
- Grupa II – myszy, które otrzymały BB XII/59 w dawce 2 g/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa III – myszy, które otrzymały BB XII/72 w dawce 2 g/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa IV - myszy, które otrzymały BB XII/73 w dawce 2 g/kg m.c. (*p.o.*)

4.4.2. Wyznaczenie ruchliwości pionowej i poziomej oraz badanie i ocena działania przeciwbólowego za pomocą testu *hot-plate*

W celu oceny ruchliwości zwierząt oraz określenia działania przeciwbólowego za pomocą testu *hot-plate* wyłoniono następujące grupy zwierząt:

a. Badanie aktywności lokomotorycznej horyzontalnej oraz wertykalnej oraz aktywności przeciwbólowej badanych substancji:

- Grupa Ia – myszy kontrolne, które otrzymały 5% Tween 80 (*p.o.*)
- Grupa IIa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/59 0,3 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa IIIa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/72 0,3 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa IVa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/73 0,3 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa Va – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/59 3,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/72 3,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIIa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/73 3,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIIIa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/59 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa IXa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/72 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa Xa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/73 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa XIa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/59 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa XIIa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/72 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa XIIIa – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/73 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)

b. Badanie aktywności przeciwbólowej dawek komplementarnych ASA:

- Grupa Ib – myszy, które otrzymały 5% Tween 80 (*p.o.*)
- Grupa IIb – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA w dawce 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa IIIb – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/59 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa IVb – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/72 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa Vb – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/73 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIb – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/59 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIIb – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/72 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIIIb – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/73 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)

c. Badanie aktywności przeciwbólowej badanych substancji w interakcji z ASA:

- Grupa Ic – myszy, które otrzymały 5% Tween 80 (*p.o.*) (kontrola dla ASA) oraz po 60 min drugą odpowiednią objętość 5% Tween 80 (*p.o.*) (kontrola dla badanych substancji)
- Grupa IIc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*) oraz po 60 min 5% Tween 80 (*p.o.*)
- Grupa IIIc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*) oraz po 60 min BB XII/59 0,3 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa IVc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*) oraz po 60 min BB XII/72 0,3 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa Vc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*) oraz po 60 min BB XII/73 0,3 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*) oraz po 60 min BB XII/59 3,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIIc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*) oraz po 60 min BB XII/72 3,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIIIc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (*p.o.*) oraz po 60 min BB XII/73 3,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)

- Grupa IXc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz po 60 min BB XII/59 30,0 mg/kg m.c. (p.o.)
 - Grupa Xc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz po 60 min BB XII/72 30,0 mg/kg m.c. (p.o.)
 - Grupa XIc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz po 60 min BB XII/73 30,0 mg/kg m.c. (p.o.)
 - Grupa XIIc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz po 60 min BB XII/59 300,0 mg/kg m.c. (p.o.)
 - Grupa XIIIc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz po 60 min BB XII/72 300,0 mg/kg m.c. (p.o.)
 - Grupa XIVc – myszy, które otrzymały zawiesinę ASA 300,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz po 60 min BB XII/73 300,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- d. Badanie aktywności przeciwbólowej badanych substancji w interakcji z MF:
- Grupa Id – myszy, które otrzymały 5% Tween 80 (p.o.) (kontrola dla badanych substancji) i 0,9% roztwór NaCl (s.c.) (kontrola dla MF)
 - Grupa IId – myszy, które otrzymały 5% Tween 80 (p.o.) i MF w dawce 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
 - Grupa IIIId – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/59 0,3 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
 - Grupa IVd – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/72 0,3 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
 - Grupa Vd – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/73 0,3 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
 - Grupa VIId – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/59 3,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
 - Grupa VIIId – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/72 3,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
 - Grupa VIIIId – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/73 3,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
 - Grupa IXd – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/59 30,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
 - Grupa Xd – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/72 30,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)

- Grupa XIId – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/73 30,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
- Grupa XIIId – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/59 300,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
- Grupa XIIIId – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/72 300,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)
- Grupa XIVId – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/73 300,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz MF 5,0 mg/kg m.c. (s.c.)

e. Badanie aktywności przeciwbólowej badanych substancji w interakcji z NL:

- Grupa Ie – myszy, które otrzymały 5% Tween 80 (p.o.) (kontrola dla badanych substancji) i po 15 minutach 0,9% roztwór NaCl (s.c.) (kontrola dla NL) – badanie po 30 minutach od podania *vehiculum*
- Grupa IIe – myszy, które otrzymały 5% Tween 80 (p.o.) i po 15 minutach NL w dawce 3,0 mg/kg m.c. (s.c.)
- Grupa IIIe – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/59 30,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz i po 15 minutach NL 3,0 mg/kg m.c. (s.c.)
- Grupa IVe – myszy, które otrzymały zawiesinę BBXII/72 30,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz i po 15 minutach NL 3 mg/kg m.c. (s.c.)
- Grupa Ve – myszy, które otrzymały zawiesinę BB XII/73 30,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz i po 15 minutach NL 3mg/kg m.c. (s.c.)

4.4.3. Ocena aktywności przeciwzapalnej badanych substancji w teście karageninowym za pomocą pletyzmometru

W celu określenia działania przeciwzapalnego wydzielono następujące grupy szczurów po 8 sztuk w każdej:

a. Badanie aktywności przeciwzapalnej badanych substancji:

- Grupa Ia – szczury kontrolne, którym podano 5% Tween 80 (p.o.)
- Grupa IIa – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa IIIa – szczury, którym podano zawiesinę BB XII/59 0,3 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa IVa – szczury, którym podano zawiesinę BB XII/72 0,3 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa Va – szczury, którym podano zawiesinę BB XII/73 0,3 mg/kg m.c. (p.o.)

- Grupa VIa – szczury, którym podano zawiesinę BBXII/59 3,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa VIIa – szczury, którym podano zawiesinę BBXII/72 3,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa VIIIa – szczury, którym podano zawiesinę BBXII/73 3,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa IXa – szczury, którym podano zawiesinę BBXII/59 30,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa Xa – szczury, którym podano zawiesinę BBXII/72 30,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa XIa – szczury, którym podano zawiesinę BBXII/73 30,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa XIIa – szczury, którym podano zawiesinę BBXII/59 300,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa XIIIa – szczury, którym podano zawiesinę BBXII/72 300,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa XIVa – szczury, którym podano zawiesinę BBXII/73 300,0 mg/kg m.c. (p.o.)

b. Badanie aktywności przeciwzapalnej dawek komplementarnych ASA:

- Grupa Ib – szczury, które otrzymały 5% Tween 80 (p.o.)
- Grupa IIb – szczury, które otrzymały zawiesinę ASA w dawce 200,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa IIIb – szczury, którym podano zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/59 30,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa IVb – szczury, którym podano zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/72 30,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa Vb – szczury, którym podano zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/73 30,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa VIb – szczury, którym podano zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/59 300,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa VIIb – szczury, którym podano zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/72 300,0 mg/kg m.c. (p.o.)
- Grupa VIIIb – szczury, którym podano zawiesinę ASA w dawce komplementarnej dla BB XII/73 300,0 mg/kg m.c. (p.o.)

c. Badanie aktywności przeciwzapalnej badanych substancji w interakcji z ASA:

- Grupa Ic – szczury kontrolne, którym podano 5% Tween 80 (p.o.) (kontrola dla ASA) oraz po 60 min odpowiednią objętość 5% Tween 80 (p.o.) (kontrola dla odpowiedniej substancji)
- Grupa IIc – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. (p.o.) oraz po 60 min 5% Tween 80
- Grupa IIIc – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. oraz po 60 min zawiesinę BBXII/59 0,3 mg/kg m.c. (p.o.)

- Grupa IVc – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. oraz po 60 min zawiesinę BBXII/72 0,3 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa Vc – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. oraz po 60 min zawiesinę BBXII/73 0,3 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIc – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. oraz po 60 min zawiesinę BBXII/59 3,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIIc – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. oraz po 60 min zawiesinę BBXII/72 3,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa VIIIc – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. oraz po 60 min zawiesinę BBXII/73 3,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa IXc – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. oraz po 60 min zawiesinę BBXII/59 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa Xc – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. oraz po 60 min zawiesinę BBXII/72 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)
- Grupa XIc – szczury, którym podano zawiesinę ASA 200,0 mg/kg m.c. oraz po 60 min zawiesinę BBXII/73 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*)

4.4.4. Badanie zjawiska tolerancji dla najbardziej aktywnej substancji w najbardziej efektywnej dawce w podawaniu 4 – tygodniowym

W celu zbadania występowania zjawiska tolerancji na działanie przeciwbólowe oraz przeciwzapalne po pierwszym podaniu przeprowadzono test *hot-plate* (myszy) oraz test karageninowy (szczury), a następnie przez kolejne cztery tygodnie podawano jednokrotnie, codziennie o tej samej porze substancję badaną w jednej ustalonej dawce i po upływie tego czasu ponownie przeprowadzono w/w badania. Doświadczenie to wykonano z udziałem następujących grup zwierząt w niżej podanych grupach po 10 sztuk w każdej:

- Grupa I – myszy kontrolne, którym podawano 5% Tween 80 (*p.o.*)
- Grupa II – myszy, którym podawano najbardziej efektywną dawkę substancji o najlepszych właściwościach farmakodynamicznych (*p.o.*)
- Grupa III – szczury kontrolne, którym podawano 5% Tween 80 (*p.o.*)
- Grupa IV – szczury, którym podawano najbardziej efektywną dawkę substancji o najlepszych właściwościach farmakodynamicznych (*p.o.*)

4.4.5. Postępowanie z materiałem pobranym do badań biochemicznych i genetycznych

Przygotowanie materiału do badań stężenia wybranych interleukin

Po zakończeniu doświadczenia nad wpływem wielokrotnego podania najbardziej aktywnej substancji w najbardziej efektywnej w podawaniu 4 – tygodniowym na działanie przeciwbólowe oraz przeciwzapalne, dodatkowo podano jeszcze raz badaną substancję i po 120 min szczury zdekapitowano, a następnie pobrano krew obwodową na skrzep. Po odstaniu przez 2 godziny do wytworzenia skrzepu, krew została odwirowana w wirówce przez 15 minut z częstotliwością 4000 obrotów/min. Uzyskaną surowicę następnie oddzielono i zamrożono w temperaturze -80°C.

Oznaczanie wybranych interleukin

Uzyskaną surowicę przebadano biochemicznie z wykorzystaniem metody immunoenzymo-sorbcyjnej ELISA (z ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Badanie przeprowadzono przy użyciu testu immunologicznego (kit) typu TNF- α oraz interleukiny 6 (IL-6). W teście zawarte były przeciwciała przeciwko szczurzymu TNF- α i IL-6, a oznaczenie ilościowe tych cytokin umożliwił pomiar absorbancji kompleksów przeciwciał zawartych w teście z TNF- α lub IL-6 w szczurzej surowicy. Stężenie obu cytokin odczytano przy pomocy krzywych wzorcowych, sporządzonych przez rozcieńczenie zrekombinowanego czynnika znajdującego się w teście. Czułość wykorzystanego testu była dla TNF- α mniejsza niż 25 pg/ml oraz 30 pg/ml dla IL-6.

Przygotowanie materiału do badań ekspresji mRNA wybranych interleukin i TLR

Po zakończeniu doświadczenia nad wpływem wielokrotnego podania najbardziej aktywnej substancji w najbardziej efektywnej w podawaniu 4 – tygodniowym na działanie przeciwbólowe oraz przeciwzapalne, dodatkowo podano jeszcze raz badaną substancję i po 120 min zwierzęta zdekapitowano, a następnie pobrano krew, z której przez zastosowanie Ficol'u wyodrębniono frakcję zawierającą limfocyty, które przechowywano w -80°C.

Analiza ekspresji mRNA wybranych cytokin i TLR

Izolacja RNA

W ramach projektu z limfocytów wyizolowano całkowity RNA według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi [Chomczyński P., Sacchi N., 1987]. Pobrany materiał zalano 1 ml odczynnika TriPure Isolation Reagent. Następnie do probówek dodano 200 µl chloroformu i intensywnie wytrząsano, po czym wirowano w warunkach 12 000 x g, 4°C przez okres 15 min. Następnie zebrano górną fazę, w której znajdował się RNA, przeniesiono do świeżej probówki i podano do niej izopropanol w stosunku objętościowym 1:1. Zawartość probówek zmieszano i umieszczono na czas 30 min. w temperaturze -80°C. Po rozmrożeniu probówki z zawartością, poddano wirowaniu w warunkach 4°C, 12 000 x g przez 10 min. Następnie usunięto nadsącz, a osad RNA jednokrotnie płukano w 1 ml. 75% etanolu przygotowanego z użyciem wody dejonizowanej i autoklawowanej w obecności DEPC (pirowęglan dietylu; z ang. *Diethylpyrocarbonate*), mieszano i pozostawiano na lodzie w celu kilku minut inkubacji. Tak przygotowane próby wirowano przez okres 5 min., w warunkach 7500 x g, 4°C, po czym usunięto etanol pod komorą laminarną, gdzie pozostawiono próby RNA w celu ich wysuszenia na okres 15 min. Po tym czasie do probówek podano 100 µl wody wolnej od rybonukleaz (RNaz) i w celu pełnego rozpuszczenia RNA probówki umieszczono w termobloku w temperaturze 65°C na czas 5 min. Po upływie inkubacji probówki z zawartością zworteksowano i zwirowano. Próby przechowywano w -80°C.

Synteza cDNA - odwrotna transkrypcja

Odwrotną transkrypcję przeprowadzano przy użyciu zestawu komercyjnego Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit i z wykorzystaniem termocyklera PTC 200 DNA Engine Gradient Cycler firmy MJ Research, Inc. Całą procedurę wykonywano pod komorą laminarną, na lodzie. Do 2 µg RNA rozpuszczonego w wodzie wolnej od RNaz dodawano 1 µl oligo(dT)₁₈ (stężenie wyjściowe 50 µM) i uzupełniano wodą wolną od RNaz do objętości 12 µl. Zawartość probówki mieszano i wirowano przez 30 s po czym umieszczano w termobloku na 5 min w temperaturze 65°C w celu denaturacji RNA. Następnie probówkę przenoszono do lodu na 1 min i dodawano następujące składniki: 4 µl 10x stężonego buforu, 2 µl mieszaniny deoksyrybonukleotydów (dNTP) (stężenie

wyjściowe 10mM), 1 µl DTT (stężenie wyjściowe 0,1M), 0,5 µl inhibitora rybonukleaz RNase OUT (40U/µl) oraz 0,5 µl odwrotnej transkryptazy SuperScript III RT (200U/µl). Probówkę wstrząsano, krótko wirowano i umieszczano w termobloku. Syntezę cDNA prowadzono w czasie 35 min. w temperaturze 50°C. Po zakończeniu syntezy probówki z cDNA przechowywano w temperaturze 4°C. W ten sposób uzyskany cDNA przechowywano w -20°C lub bezpośrednio wykorzystywano jako matrycę do reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (z ang. *Real-Time PCR*).

Real-Time PCR

Dla oszacowania zmian w poziomie ekspresji badanych genów (TNF- α , IL-1 β i TLR3) niezbędne było zaprojektowanie starterów specyficznych dla oznaczanego genu i komplementarnych do fragmentu kodującego oraz zoptymalizowanie warunków specyficznej syntezy produktów. Sekwencje użytych do reakcji starterów, wielkość amplikonu dla każdej z użytych par oraz warunki reakcji badanych genów zamieszczono poniżej (Tabela 3 i 4).

Reakcję rt-PCR przeprowadzano na płytkach, w końcowej objętości 10 µl, z wykorzystaniem cDNA pozyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji, specyficznych par starterów oraz zestawu Fast Start DNA Master Sybr Green I. Do amplifikacji posłużył aparat LightCycler 480 II system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), natomiast oprogramowanie pozwoliło na analizowanie uzyskanych wyników oraz porównanie względnych różnic ilości początkowej matrycy. Poziom analizowanych transkryptów standaryzowano względem genu referencyjnego – GAPDH.

Dla wszystkich genów reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym obejmowała kilka następujących po sobie etapów i przebiegała w określonych powyżej warunkach. Ilość transkryptu wyznaczano z krzywej wzorcowej, którą sporządzono poprzez wykorzystanie rozcieńczeń cDNA uzyskanego po odwrotnej transkrypcji mRNA. Uzyskane wyniki standaryzowano wobec genu referencyjnego *GAPDH* po czym przedstawiono w postaci wykresów jako wartość względną w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Tabela 3. Sekwencje starterów użytych do rt-PCR

Nazwa genu	Sekwencja starterów (5' - 3')
GAPDH	F: GAT GGT GAA GGT CGG TGT G R: ATG AAG GGG TCG TTG ATG G
TLR1*	F: CAG CAG CCT CAA GCA TGT CTA R: CAGCCCTAAGACAACAATACAATAGAAGA
TLR3*	F: GATTGGCAAGTTATTTCGTC R: GCGGAGGCTGTTGTAGG
IL-6**	F: CGA GCC CACCAGGAACGAAAGTC R: CTGGCTGGAAGTCTCTTGCGGAG
TNF- α	F: GTCGTAGCAAACCACCAAGC R: TTGAAGAGAACCTGGGAGTAG

*Startery dla TLR1 i 3 wykorzystano z publikacji *Meng L. i wsp., 2010*

**Startery dla IL-6 wykorzystano z publikacji *You Z. i wsp., 2011*

Dla każdego z genów prowadzono z osobna reakcje łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym obejmującą następujące po sobie etapy o odmiennym profilu termicznym i czasie jego trwania, których warunki przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Warunki rt-PCR dla poszczególnych genów

Gen	Liczba cykli	Denaturacja wstępna	Denaturacja	Annealing	Elongacja
GAPDH	35	95°C, 10 min	95°C, 15s	59°C, 20s	72°C, 15s
TLR1	40	95°C, 10 min	95°C, 15s	59°C, 15s	72°C, 15s
TLR3	40	95°C, 10 min	95°C, 15s	61°C, 20s	72°C, 15s
TNF-a	40	95°C, 10 min	95°C, 15s	59°C, 20s	72°C, 20s
IL6	40	95°C, 10 min	95°C, 15s	62°C, 20s	72°C, 15s

4.5. ANALIZA STATYSTYCZNA

Otrzymane w przeprowadzonych doświadczeniach dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm standardowy błąd pomiaru SEM (z ang. *Standard Error of Measurement*). Analizę statystyczną wykonano stosując jednoczynnikowa lub dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA II (z ang. *two-way ANOVA*) – badanie obserwacji, które zależą od kilku równocześnie działających czynników. Porównanie *post hoc* pomiędzy średnimi dla analizowanych grup dokonano posługując się za pomocą testu Duncan’a (test oparty na studentyzowanym rozstępie umożliwiającym grupowanie średnich, do oceny istotności różnic między grupami doświadczalnymi, według odpowiednich założeń dla danych czasowych) [Milliken G.A., Johnson D.E., 1984], z wykorzystaniem zintegrowanego pakietu oprogramowania analitycznego i statystycznego –STATISTICA, wersja 8.0 oraz 9.0 (StatSoft, Inc. USA).

4.6. OBLICZENIA AUC

W celu uproszczenia danych uzyskanych w przebiegu doświadczeń farmakodynamicznych, postanowiono przeliczyć uzyskane wyniki zależności „dawka – efekt - czas”. Przedstawiono je jako wartość pola powierzchni pod krzywą AUC (z ang. *Area Under the Curve*), wyrażane dla aktywności przeciwbólowej, jako czas reakcji na bodziec termiczny w zależności od czasu przeprowadzanego badania ($s * h$), natomiast dla aktywności przeciwzapalnej, jako iloczyn zmiany obrzęku łąpy (ΔG) po podaniu środka wywołującego zapalenie i czasu ($cm^3 * h$). Następnie wyniki podawano jako zależność AUC do zastosowanej dawki substancji badanej. Wyniki uzyskano we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki, korzystając z programu Phoenix WinNolin 6.2. Phorsight dla modułu farmakokinetyki bezmodelowej, przy zastosowaniu metody ważenia $1/y^2$.

5. Wyniki

5.1. BADANIE TOKSYCZNOŚCI OSTREJ METODĄ USTALONEJ DAWKI

Po ustaleniu dawki granicznej badanych substancji, wynoszącej 2,0 g/kg m.c. prowadzono obserwacje zwierząt przez 21 dni. Szczegółową obserwację prowadzono zaraz po podaniu substancji, jak i w trakcie pierwszych kilku godzin od podania. Podczas kolejnych dni przynajmniej raz w ciągu dnia sprawdzano i oceniano stan zwierząt. W przebiegu całego okresu obserwacji nie doszło do zgonu żadnego zwierzęcia, jak również nie zauważono zmian w zachowaniu zwierząt w stosunku do grupy kontrolnej. Nie wykryto zmian patologicznych na futrze, skórze, ani na błonach śluzowych, uszach i ogonie. Nie odnotowano zmian w działaniu układu nerwowego centralnego – brak pojawienia się ewentualnych drgawek, konwulsji, letargu, senności oraz śpiączki. Żadne z obserwowanych zwierząt nie wykazywało również odchyień w działaniu wegetatywnego układu nerwowego w stosunku do kontroli (ewentualny ślinotok, biegunka). Badania *post mortem* natomiast nie wykazały istotnych zmian w budowie tkanek i narządów układu oddechowego, krążenia, pokarmowego oraz układu wydzielniczego.

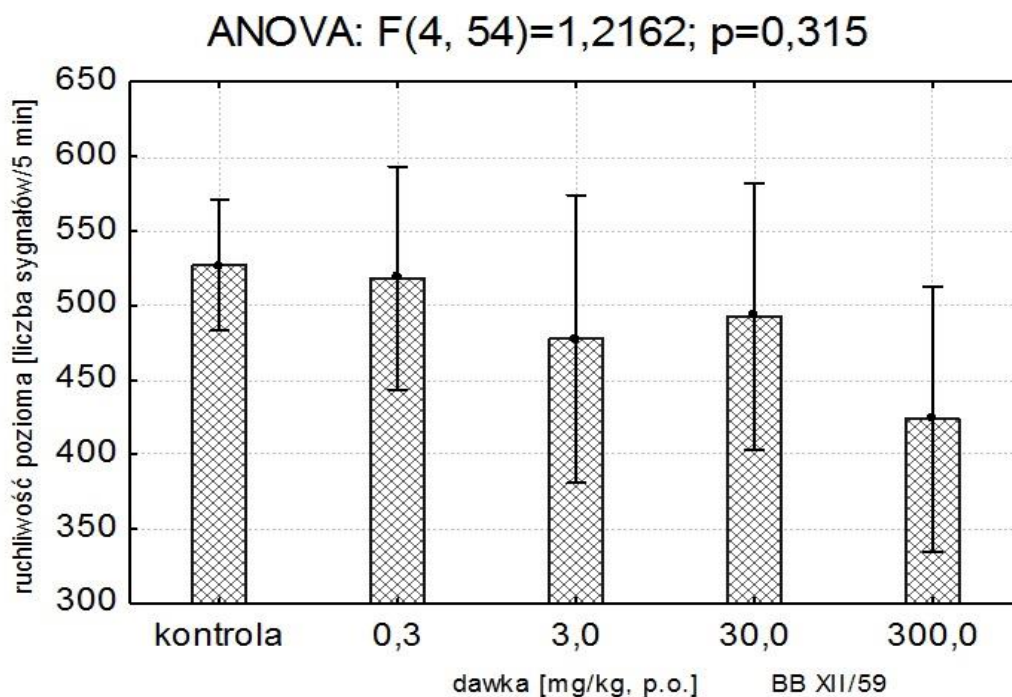
5.2. OCENA HORYZONTALNEJ ORAZ WERTYKALNEJ AKTYWNOŚCI LOKOMOTORYCZNEJ

SUBSTANCJA BB XII/59

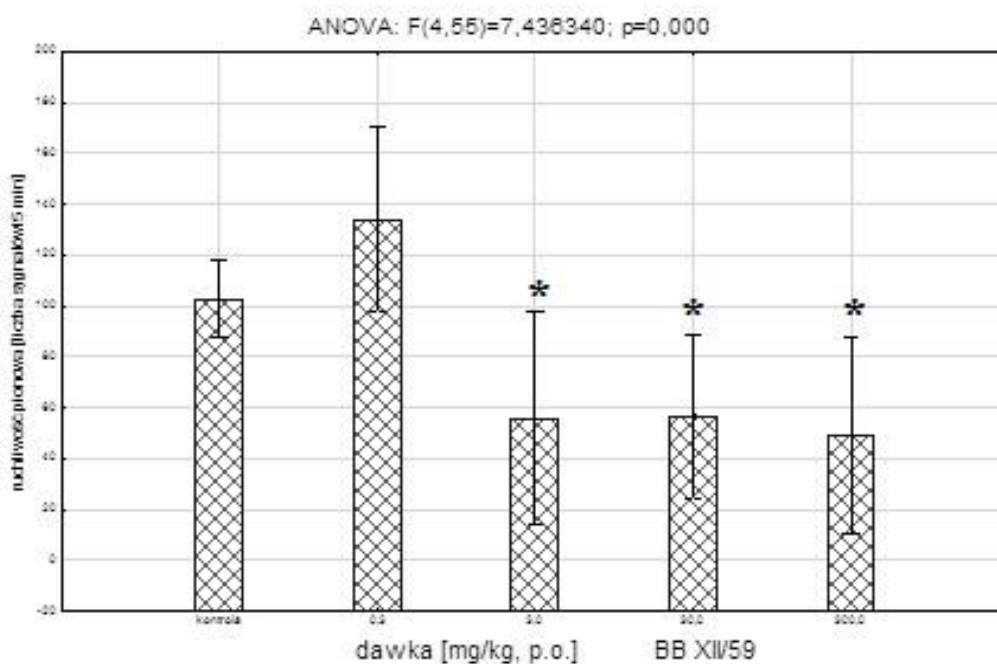
Analiza statystyczna otrzymanych danych wpływu substancji BB XII/59 na aktywność horyzontalną (poziomą) myszy wskazuje, że nie istniały znamienne różnice między otrzymanymi wartościami średnimi (analiza wariancji jednoczynnikowa ANOVA: $F(4,54)=1,216$; $p=0,315$) (Ryc. 13A.). Na podstawie szczegółowej analizy (*post-hoc* test Duncana) również nie stwierdzono znamienych różnic między ruchliwością zwierząt dla poszczególnych dawek badanego związku a wartościami kontrolnymi.

Wyniki badania wpływu substancji BB XII/59 na ruchliwość pionową zwierząt wskazują, iż substancja BB XII/59 wpływała na ogólna zmienność tego parametru (ANOVA: $F(4,55)=7,438$; $p=0,000$) (Ryc. 13B.). Dalsza szczegółowa analiza statystyczna wykazała występowanie znamienych różnic między otrzymanymi średnimi dla dawki 3,0; 30,0 mg/kg oraz 300,0 mg/kg wpływając wyraźnie hamująco na mierzony parametr w porównaniu do wartości kontrolnych ($p<0,05$).

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc.13. Wpływ substancji BB XII/59 na aktywność lokomotoryczną horyzontalną (A) oraz wertykalną (B) u myszy badaną w ciągu 5 minut po 30 minutach od jednorazowego podaniu *p.o.*

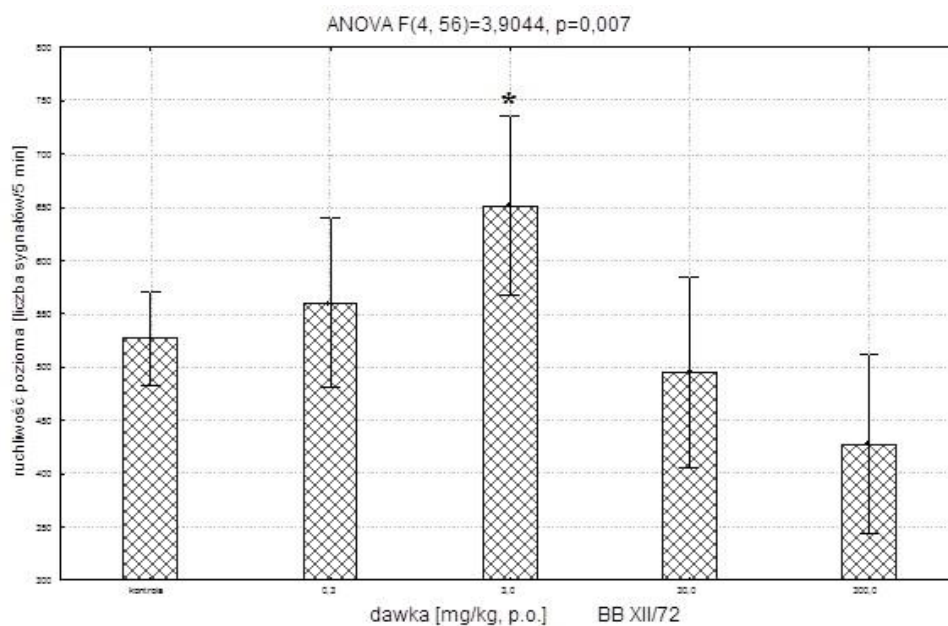
SUBSTANCJA BB XII/72

Analiza wariancji jednoczynnikowa ANOVA wykazała, że jednokrotne podanie substancji BB XII/72 w zakresie dawek 0,3 – 300,0 mg/kg (*p.o.*), wpływa istotnie statystycznie na aktywność lokomotoryczną horyzontalną myszy [$F(4,56)=3,904$; $p=0,007$] (Ryc. 14A.).

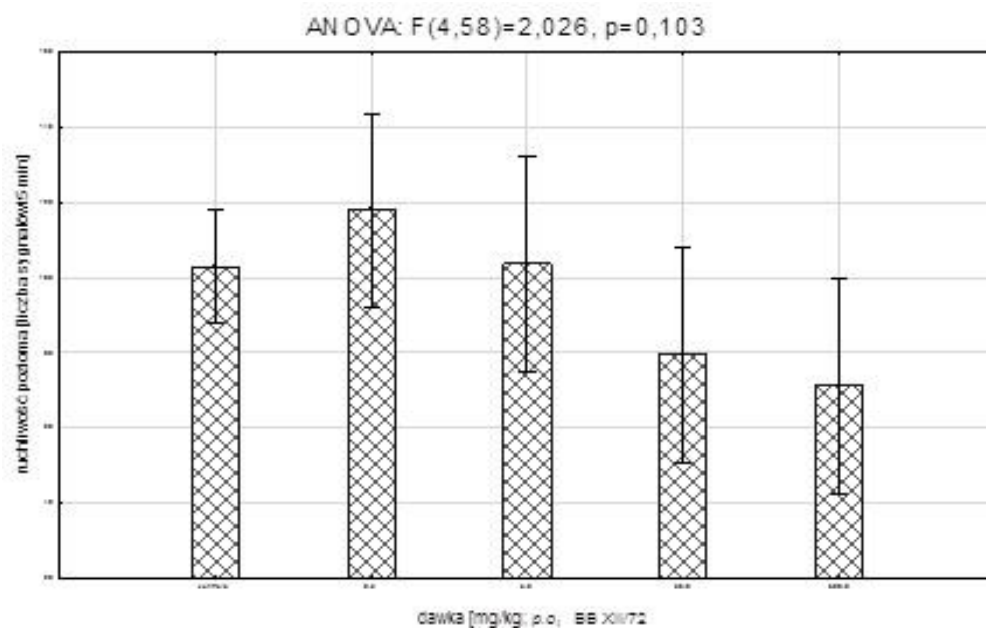
Szczegółowa analiza wpływu poszczególnych dawek BB XII/72 na aktywność lokomotoryczną poziomą pozwoliła stwierdzić, że jedynie dawka 3,0 mg/kg (*p.o.*) w sposób znamienny do grupy kontrolnej, zwiększa ruchliwość poziomą zwierząt w badanym teście ($p=0,03$). Ponadto zaobserwowano spadek aktywności po podaniu tego związku w dawce 300,0 mg/kg (*p.o.*), jednak otrzymana wartość średnia nie różniła się istotnie w stosunku do wartości kontrolnych ($p>0,05$).

Natomiast analizując wpływ związku BB XII/72 w badanych dawkach na aktywność wertykalną u myszy, nie wykazano istotnych zmian wartości poszczególnych średnich w tej ruchliwości zwierząt [$F(4,56)=2,025$; $p=0,102$] (Ryc. 14B.). Szczegółowa analiza *post-hoc* również nie wykazała wpływu stosowanych dawek tego związku na aktywność pionową w stosunku do wartości kontrolnych ($p>0,05$), chociaż parametr ten wskazywał na nieznamienne działanie sedatywne w dawce 30,0 i 300,0 mg/kg. .

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

Ryc. 14. Wpływ substancji BB XII/72 na aktywność lokomotoryczną horyzontalną (A) oraz wertykalną (B) u myszy badaną w ciągu 5 minut po 30 minutach od jednorazowego podaniu *p.o.*

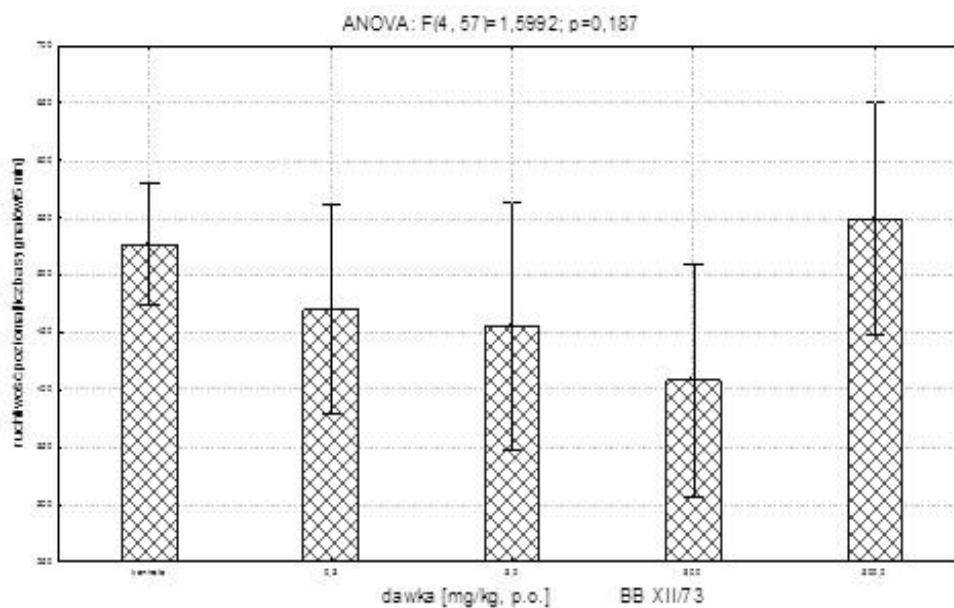
SUBSTANCJA BB XII/73

Poddając analizie wyniki uzyskane z badania aktywności poziomej u zwierząt, którym podawano substancję BB XII/73 w zakresie dawek 0,3 – 300,0 mg/kg wykazano, iż badana substancja w testowanych dawkach nie wykazuje istotnej ogólnej [ANOVA: $F(4,57)=1,599$; $p=0,187$] (Ryc. 15A.).

Na podstawie dalszej szczegółowej analizy również nie stwierdzono znamiennych różnic między ruchliwością zwierząt dla badanego związku w poszczególnych dawkach a wartościami kontrolnymi, chociaż pewien nieznamienny spadek tej aktywności znaleziono dla dawki 30,0 mg/kg .

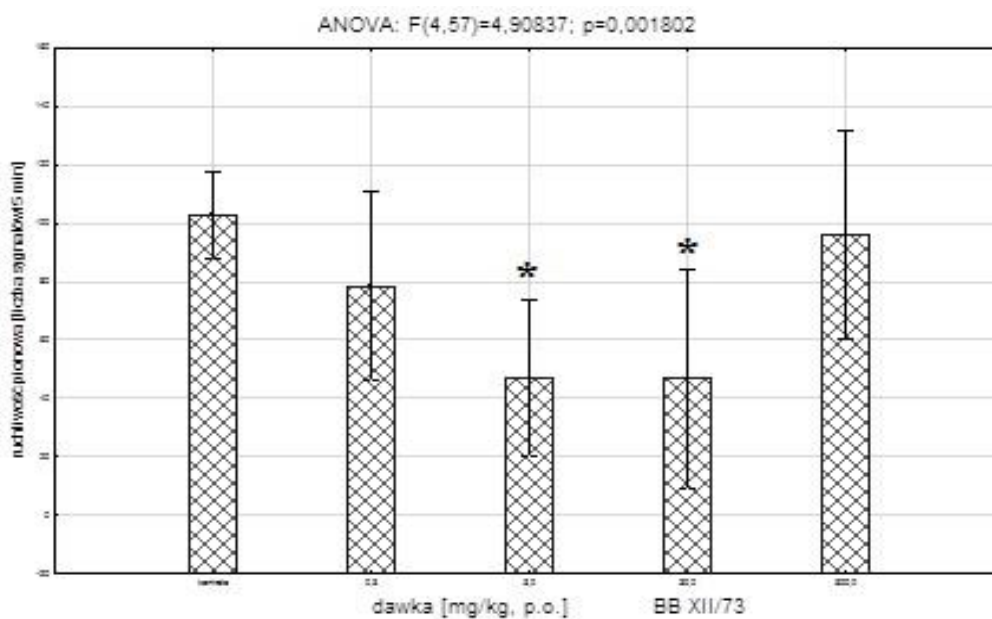
Natomiast stosując jednoczynnikową analizę wariancji wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy badanymi grupami zwierząt podczas pomiaru ich aktywności wertykalnej [ANOVA: $F(4,57)=4,908$; $p=0,002$] (Ryc. 15B.). Przy pomocy testu *post-hoc* wskazano znaczący spadek aktywności dla dwóch badanych dawek BB XII/73: 3,0 mg/kg sięgający nawet 55% ($p=0,007$) oraz 30,0 mg/kg, dla której spadek wyniósł średnio 54% ($p=0,008$) w stosunku do kontroli, której podawano 5% Tween 80. Związek ten w pozostałych dawkach: 0,3 oraz 300,0 mg/kg nie wpłynął w sposób istotny na ruchliwość badanych zwierząt.

A.



*

B.

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p<0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne ± SEM

Ryc.15. Wpływ substancji BB XII/73 na aktywność lokomotoryczną horyzontalną (A) oraz wertykalną (B) u myszy, badaną w ciągu 5 minut po 30 minutach od jednorazowego podaniu *p.o.*

5.3. OCENA DZIAŁANIA ANTYNOCYCEPTYWNEGO W TEŚCIE „HOT-PLATE”

Wpływ pochodnych na reakcję bólową myszy po jednorazowym podaniu w teście „hot-plate”

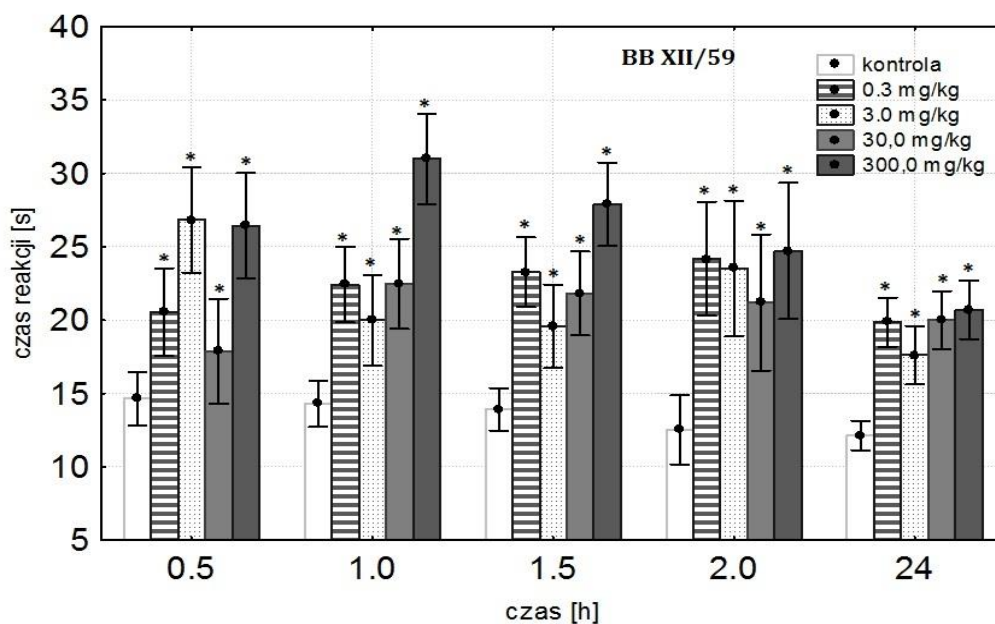
SUBSTANCJA BB XII/59

Zauważono występowanie ogólnej zmienności w zakresie badanych dawek dla związku BB XII/59 [ANOVA efekt główny $F(4,63)=57,605$; $p=0,000$]. Ponadto analizując wpływ czasu na działanie przeciwbólowe, również stwierdzono występowanie istotnej znamienności statystycznej [ANOVA wpływ czasu $F(4,252)=7,810$; $p=0,000$]. Analizując oddziaływania obu efektów (tj. grupy oraz czasu), stwierdzono występowanie silnej zmienności między otrzymanymi wartościami [ANOVA II, interakcja $F(16,212)=3,120$; $p=0,000$] (Ryc. 16A.).

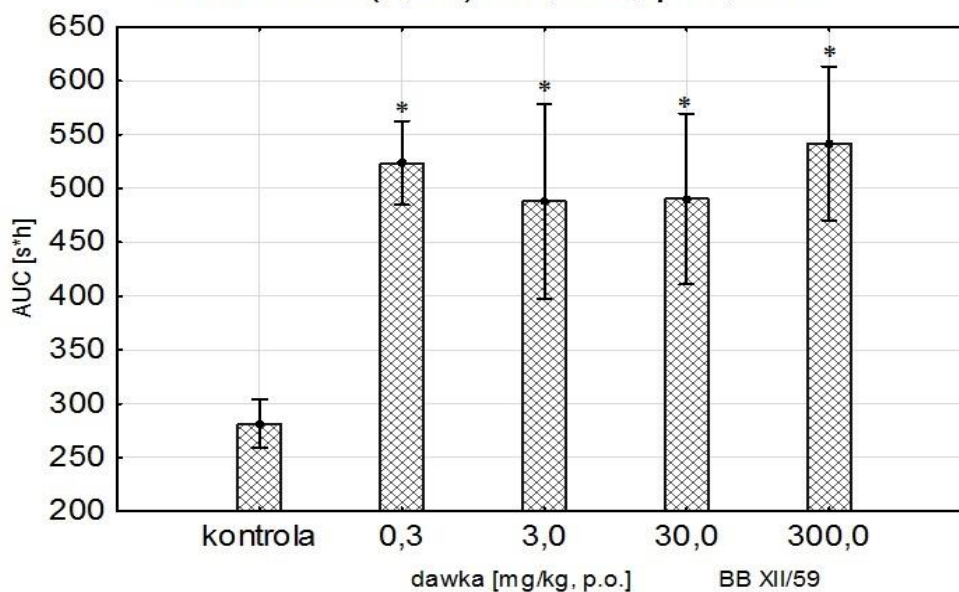
Dalsza szczegółowa analiza statystyczna (test *post-hoc* Duncan'a) pozwoliła wykazać, że dla całego przedziału dawkowania badanej substancji (0,3 – 300,0 mg/kg, *p.o.*) oraz w każdym badanym punkcie czasowym (0,5 – 24,0 h) uzyskano wysoką znamienność względem grupy kontrolnej, której podawano 5% Tween 80 (Ryc.16A.). Zauważono, że najsilniejszy efekt przeciwbólowy wystąpił dla dawki 300,0 mg/kg po 60 min. Wpływ czasu miał różny wymiar dla poszczególnych stosowanych dawek, bowiem dla dawki 3,0 mg/kg maksimum działania wystąpiło po 60 min, dla 30 mg/kg po 120 min, natomiast paradoksalnie najsilniejsze działanie dla dawki 0,3 mg/kg zauważono po 30 min.

Analiza wartości AUC zależności dawka – efekt uzyskanych po wyeliminowaniu efektu czasu na działanie przeciwbólowe substancji BB XII/59, wykazała również istotny statystycznie wpływ badanej substancji na aktywność antynocyceptywną [ANOVA: $F(4,67)=37,880$; $p=0,000$] dla wszystkich stosowanych dawek, wykazując jednak niewielkie obniżenie działania przeciwbólowego w dawkach 3,0 i 30,0 mg/kg (Ryc.16B.).

A.

ANOVA II interakcja: $F(16, 212)=3,120$; $p=0,000$ 

B.

ANOVA: $F(4,67)=37,879$; $p=0,000$ *różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

Ryc. 16. Wpływ jednorazowego podania BB XII/59 na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

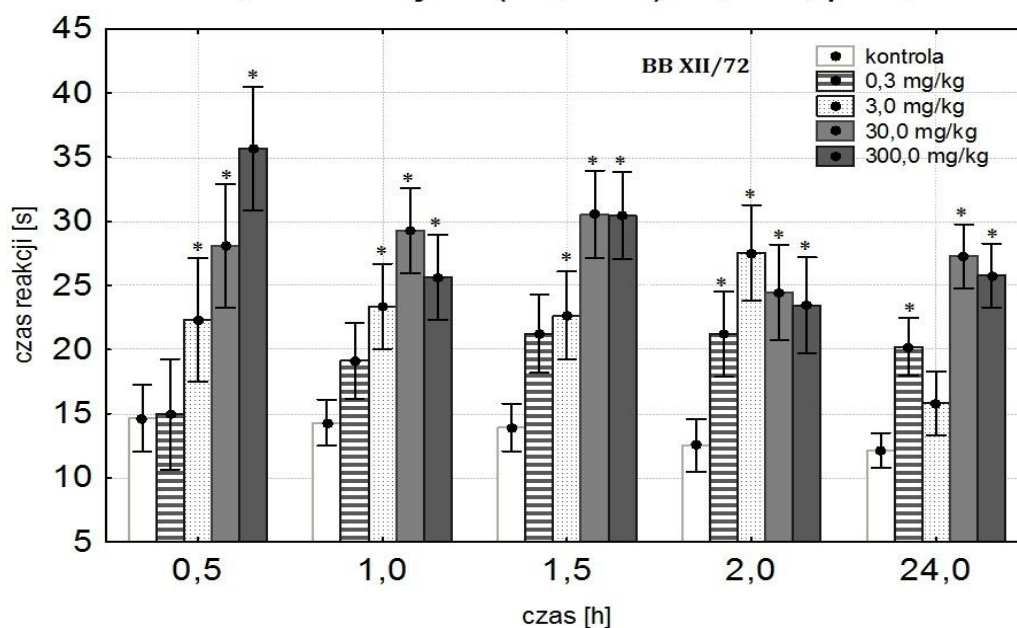
SUBSTANCJA BB XII/72

Zauważono, że podawanie substancji BB XII/72 wykazało istotne statystycznie działanie przeciwbólowe w teście hot-plate w zastosowanym układzie eksperymentalnym [ANOVA efekt główny $F(4,56)=53,323$; $p=0,000$], jak również wskazało na istotny wpływ czasu na tego rodzaju aktywność [ANOVA $F(4,224)=4,456$; $p=0,002$]. Interakcja pomiędzy efektem grupy oraz czasu wykazała także wysoką znamienność [ANOVA II: $F(16,224)=4,960$; $p=0,000$] (Ryc. 17A.).

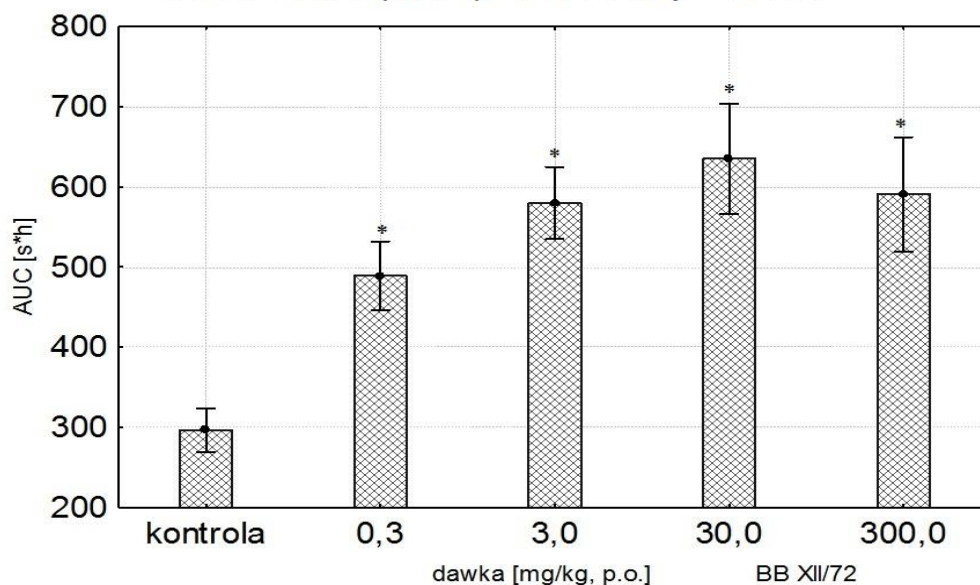
Na podstawie dalszej szczegółowej analiza za pomocą testu post-hoc stwierdzono, iż istnieją istotne statystycznie różnice w hamowaniu reakcji bólowej wywołanej bodźcem termicznym przez BB XII/72. Najsilniejsze działanie przeciwbólowe zauważono po podaniu analizowanego związku w dawce 300,0 mg/kg po 30 min. Stwierdzono również, że profil czasu działania był różny w stosowanych dawkach, bowiem znamienny efekt przeciwbólowy pojawił się przy zastosowaniu najniższej badanej dawki 0,3 mg/kg w 2,0 godzinie badania ($p<0,05$) i dla tej dawki efekt utrzymywał się nawet do 24,0 h testu. Natomiast związek ten podany w dawce 3,0 mg/kg działał już po 0,5 h od rozpoczęcia testu, a najsilniejszą aktywność zaobserwowano po 2,0 h, natomiast efekt antynocyceptywny był nieznamienny statystycznie w 24,0 h doświadczenia. Dla analizowanego związku w dawkach 30,0 oraz 300,0 mg/kg efekt przeciwbólowy był widoczny w całym przebiegu badania i trwał nawet do 24,0 h eksperymentu w porównaniu do wartości kontrolnych ($p<0,01$).

Analiza wartości AUC zależności dawka-efekt uzyskanych po wyeliminowaniu wpływu czasu na działanie przeciwbólowe substancji BB XII/72, wykazała również istotny statystycznie wpływ badanej substancji na aktywność antynocyceptywną [ANOVA: $F(4,62)=57,909$; $p=0,000$] dla wszystkich stosowanych dawek, osiągając maksymalny efekt dla dawki 30,0 mg/kg (Ryc. 17B.).

A.

ANOVA II, interakcja $F(16, 224)=4,960$; $p=0,000$ 

B.

ANOVA: $F(4,62)=57,909$; $p=0,000$ 

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

Ryc. 17. Wpływ jednorazowego podania BB XII/72 na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

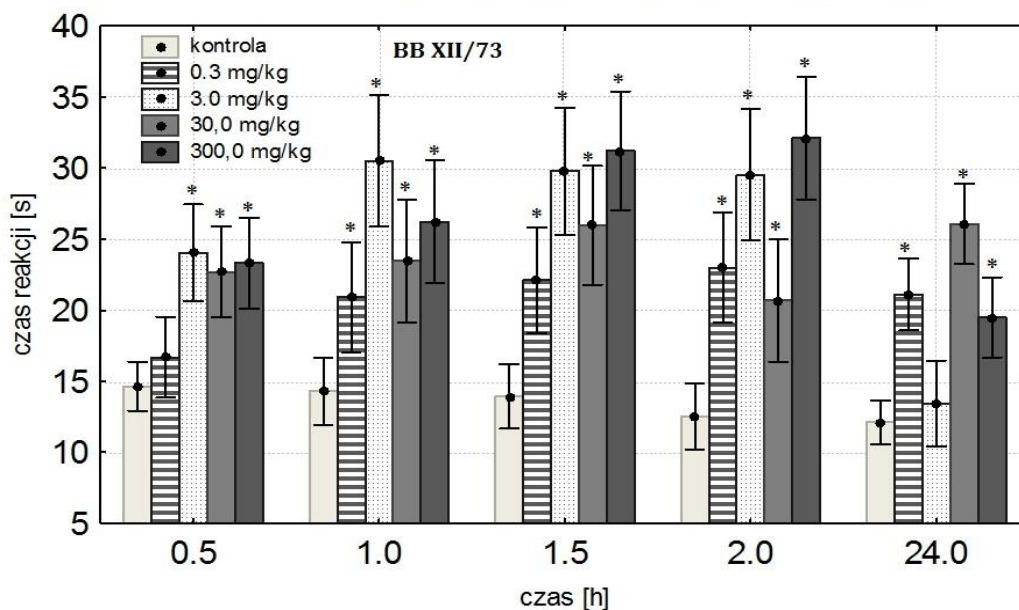
SUBSTANCJA BB XII/73

Zauważono występowanie ogólnej zmienności w zakresie badanych dawek dla związku BB XII/73 [ANOVA efekt główny $F(4,55)=28,572$; $p=0,000$], jak również wykryto istotny statystycznie wpływ czasu na działanie przeciwbólne [ANOVA wpływ czasu $F(4,220)=17,967$; $p=0,000$]. Analizując oddziaływania efektu grupy oraz czasu, również stwierdzono występowanie silnej zmienności między otrzymanymi wartościami efektu przeciwbólowego w teście hot-plate [ANOVA II, interakcja $F(16,140)=7,076$; $p=0,000$] (Ryc.18A.)

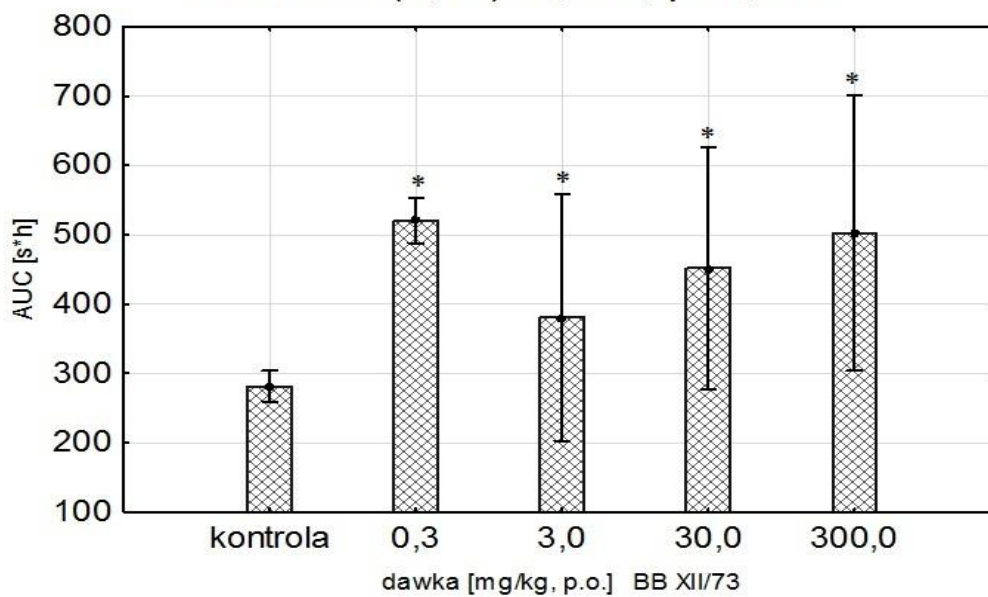
Dalsza analiza statystyczna z wykorzystaniem testu *post-hoc* pozwoliła wskazać, że w czasie 0,5 h od rozpoczęcia badania jedynie BB XII/73 w dawce 0,3 mg/kg nie wykazywał aktywności przeciwbólnej we wskazanym teście, podczas gdy związek ten w dawkach 3,0 – 300,0 mg/kg charakteryzował się istotną statystycznie aktywnością przeciwbólową, która dla powyższych dawek utrzymywała się niezmiennie na poziomie istotności $p<0,01$ do 2,0 h badania. Po 1,0 h efekt przeciwbólowy zauważono także dla najniższej dawki 0,3 mg/kg ($p<0,05$), a po 1,5 oraz 2,0 h stwierdzono znamienność działania analgetycznego względem zwierząt kontrolnych dla całego zakresu dawek BBXII/73 ($p<0,01$). Do 24,0 h wciąż widoczny jest efekt przeciwbólowy dla badanego związku ($p<0,01$), z wyjątkiem dawki 3,0 mg/kg.

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu podanych wartości na AUC również uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwbólnej [ANOVA I: $F(4,72)=6,913$; $p=0,000$] (Ryc.18B.). Na podstawie analizy *post-hoc* stwierdzono, że najsilniejsze działanie występowało po podaniu związku w dawce 0.3 mg/kg, a najslabsze w dawce 3.0 mg/kg.

A.

ANOVA II interakcja $F(16, 220)=7,896$; $p=0,000$ 

B.

ANOVA: $F(4,72)=6,913$; $p=0,000$ *różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

Ryc. 18. Wpływ jednorazowego podania BB XII/73 na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

Wpływ komplementarnych dawek ASA na reakcję bólową myszy po jednorazowym podaniu w teście „hot-plate”

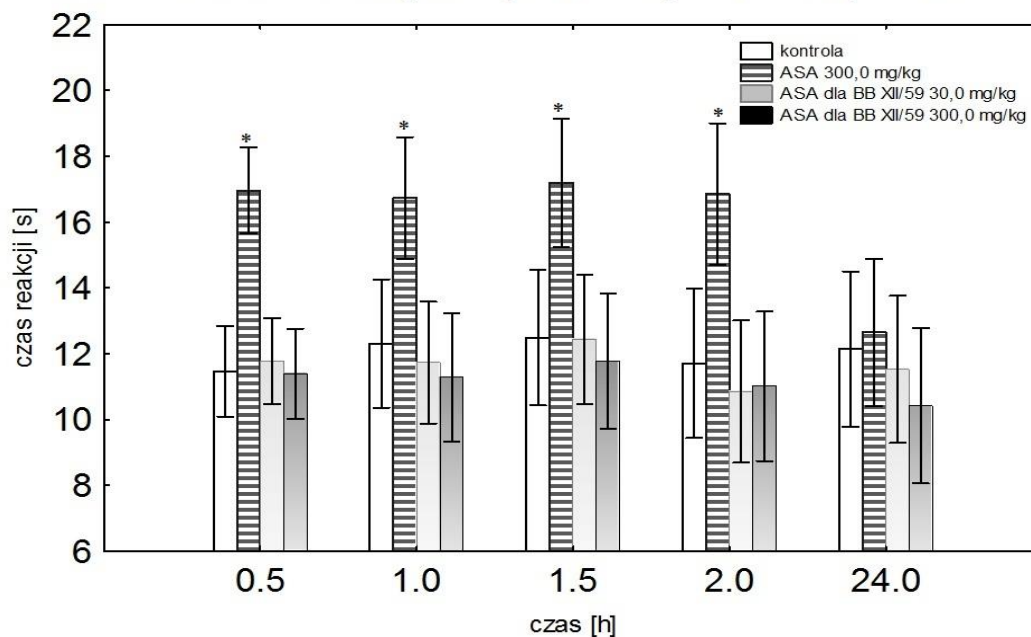
SUBSTANCJA BB XII/59

W badanym układzie doświadczalnym stwierdzono występowanie istotnej zmienności uzyskanych wyników [ANOVA efekt główny $F(3,34)=11,262$; $p=0,000$], jak również zauważono istotny statystycznie wpływ czasu na działanie przeciwbólowe [ANOVA wpływ czasu $F(4,136)=2,943$; $p=0,023$]. Szczegółowa analiza interakcji obu badanych czynników w zastosowanym układzie eksperymentalnym nie wykazała jednak istotności w działaniu obu badanych [ANOVA II, interakcja $F(12,136)=1,529$; $p=0,121$] (Ryc.19A.).

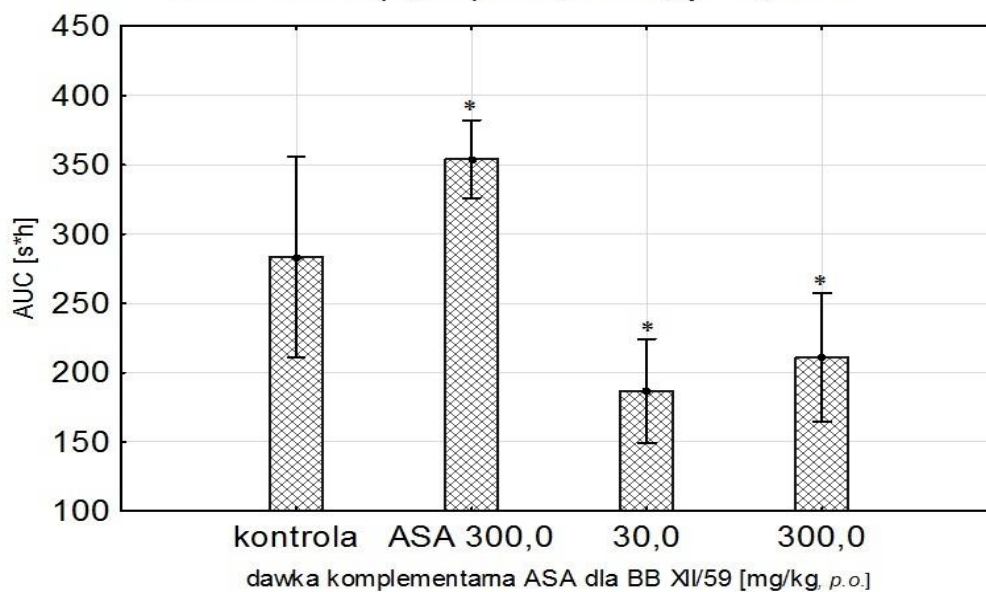
Na podstawie dalszej analizy *post-hoc* zależności wystąpienia reakcji bólowej od czasu wśród badanych zwierząt po zastosowaniu poszczególnych dawek ASA, komplementarnych dla odpowiednich dawek substancji BB XII/59 oraz ASA w dawce 300,0 mg/kg *p.o.* względem kontroli, pozwoliła stwierdzić, iż ASA w dawce 300,0 mg/kg charakteryzuje istotne statystycznie działanie przeciwbólowe ($p<0,01$) w czasie 0,5 h do 2,0 h. Dla dawek ASA komplementarnych względem zastosowanych dawek BB XII/59 nie otrzymano istotnych różnic w działaniu przeciwbólowym w całym przedziale czasowym. (Ryc.19A.). W 24,0 h badania żadna badana grupa nie wykazywała istotnego działania analgetycznego.

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu podanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwbólowej [ANOVA I: $F(3,34)=13,762$; $p=0,000$] (Ryc.19B.). Dalsza analiza pozwoliła stwierdzić, że jedynie podanie ASA w dawce 300,0 mg/kg wykazało wyraźne działanie względem grupy kontrolnej ($p<0,01$), natomiast dla ASA podanych w komplementarnych dawkach odpowiadających zawartości w BB XII/59 otrzymane odpowiednie średnie były znamienne niższe od wartości dla wartości AUC grupy kontrolnej ($p<0,01$).

A.

ANOVA II interakcja: $F(12, 136)=1,529$; $p=0,121$ 

B

ANOVA: $F(3,34)=13,7615$; $p=0,000$ 

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p<0,05$)
Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc. 19. Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/59 na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

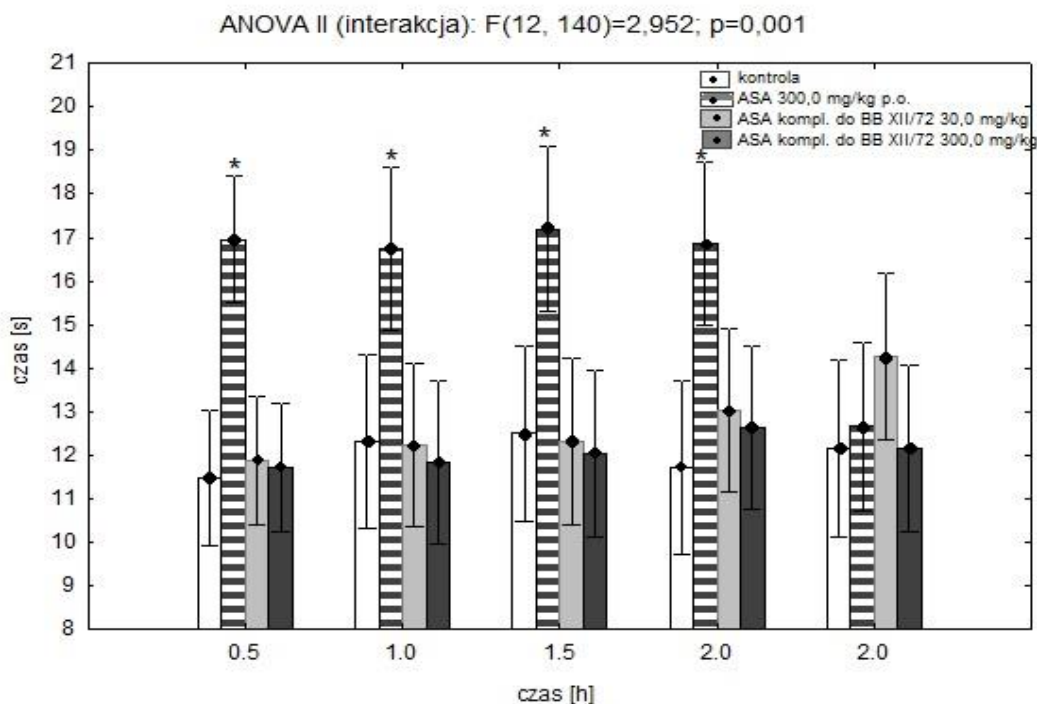
SUBSTANCJA BB XII/72

Zauważono występowanie ogólnej zmienności w zakresie badanych dawek dla efektu grupy [ANOVA: $F(3,35)=9,043$; $p=0,000$], natomiast nie wykryto znamienne statystycznego wpływu czasu na efekt antynocyceptywny w analizowanym układzie doświadczalnym [ANOVA: $F(4,140)=0,812$; $p=0,519$]. Analizując oddziaływania efektu grupowego oraz czasu, stwierdzono występowanie zmienności między otrzymanymi wartościami [ANOVA II: interakcja $F(12,140)=2,953$; $p=0,001$] (Ryc.20A.).

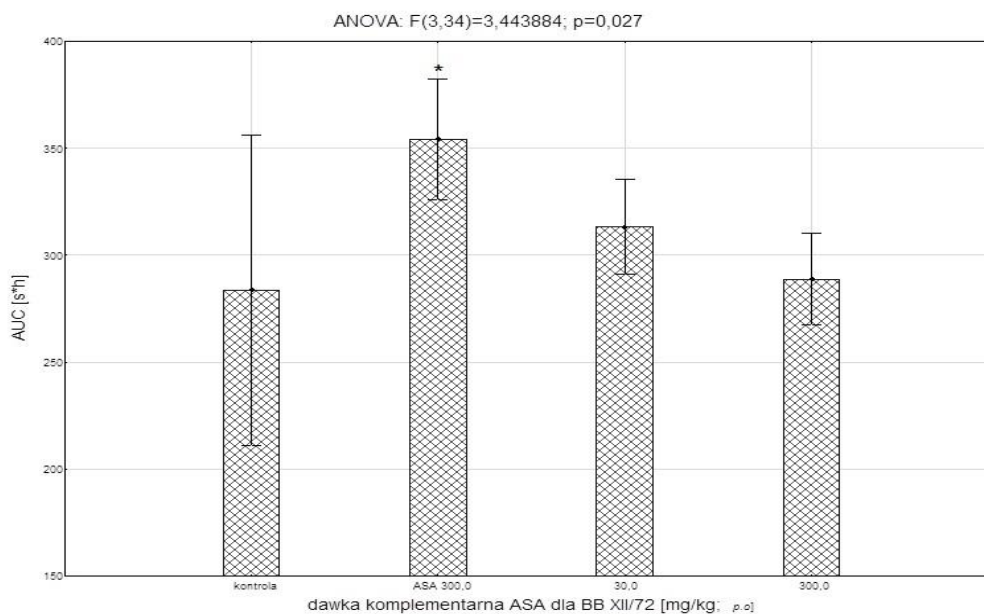
Dalsza analiza wpływu komplementarnych dawek ASA dla związku BB XII/72 na efekt przeciwbólowy u myszy w teście hot-plate wskazała, iż jedynie podanie ASA w dawce referencyjnej 300,0 mg/kg (*p.o.*) wykazało istotne działanie przeciwbólowe w stosunku do grupy kontrolnej, której podawano 5% roztwór Tween 80. Efekt dla ASA w tej dawce był widoczny od 0,5 do 2,0 h badania, nie zauważono natomiast działania przeciwbólowego po 24,0 godzinach. Nie zauważono natomiast istotnych różnic dla ASA podanego we wszystkich komplementarnych dawkach dla zawartości ASA w analizowanym związku względem wartości kontrolnych we wszystkich przedziałach czasowych.

Analiza wartości AUC zależności dawka-efekt uzyskanych po wyeliminowaniu wpływu czasu na działanie przeciwbólowe ASA w komplementarnych dawkach odpowiadających zawartości w substancji BB XII/72, wykazała istnienie zmienności między otrzymanymi wartościami [ANOVA I: $F(3,34)=3,444$; $p=0,027$] (Ryc.20B.). Dalsza analiza pozwoliła stwierdzić, że jedynie podanie ASA w dawce 300,0 mg/kg wykazało wyraźne działanie względem grupy kontrolnej ($p<0.01$), natomiast dla ASA podanych w komplementarnych dawkach odpowiadających zawartości w BB XII/72 otrzymane odpowiednie średnie nie różniły się znamienne od wartości dla wartości AUC grupy kontrolnej ($p>0.05$).

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

Ryc. 20. Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/72 na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B.)

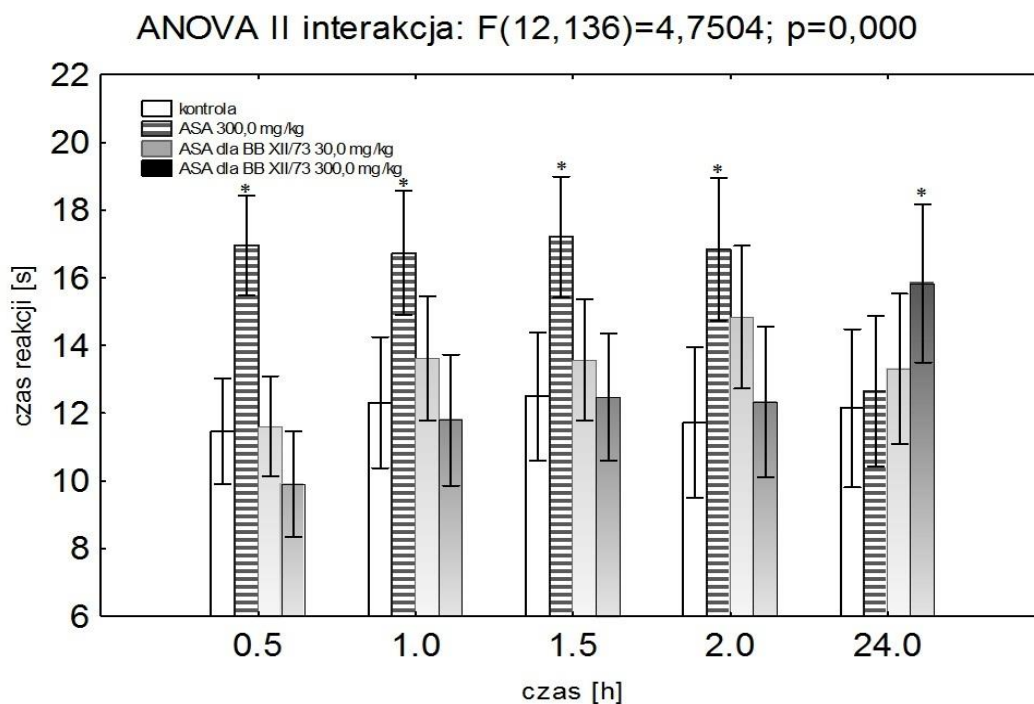
SUBSTANCJA BB XII/73

W badanym układzie doświadczalnym stwierdzono występowanie istotnej zmienności uzyskanych wyników w aktywności przeciwbólowej pomiędzy badanymi grupami [ANOVA II, efekt główny $F(3,34)=7,451$; $p=0,001$], ponadto wykryto słabo istotny wpływ czasu na to działanie [ANOVA II, wpływ czasu $F(4,136)=2,399$; $p=0,053$]. Analizując tzw. interakcję oddziaływania efektu grupowego oraz czasu i wykryto istnienie znamiennych różnic między otrzymanymi wartościami [ANOVA II, interakcja $F(12,136)=4,750$; $p=0,000$] (Ryc. 21A.).

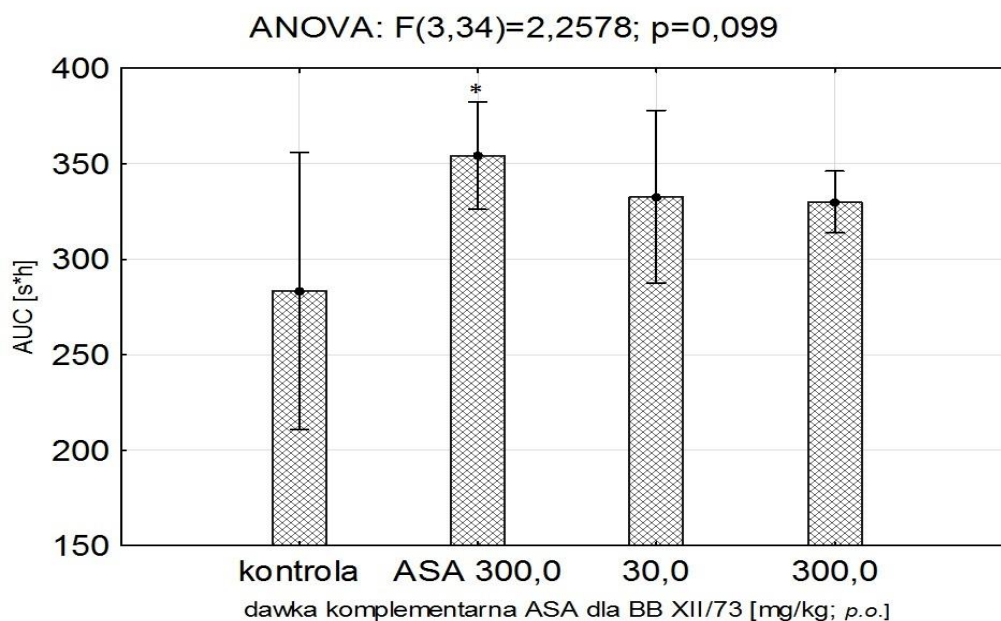
Dalsza szczegółowa analiza statystyczna pozwoliła wykazać, iż różnice znamienne uzyskano dla ASA w dawce referencyjnej 300,0 mg/kg (*p.o.*) we wszystkich przedziałach czasowych w stosunku do grupy kontrolnej ($p\leq 0,01$). Dla ASA po podaniu w dawkach komplementarnych w stosunku do obliczonej zawartości ASA występującej w związku BB XII/73 zauważono, że dla zakresu dawki 30,0 mg/kg we wszystkich przedziałach czasowych różnice w stosunku do wartości kontrolnych nie osiągnęły znamienności statystycznej ($p>0,05$), natomiast po 24,0 h działanie przeciwbólowe uzyskano jedynie dla dawki ASA odpowiadającej 300,0 mg/kg BB XII/73 ($p\leq 0,05$). W pozostałych dawkach i przedziałach czasowych nie stwierdzono natomiast znamiennego działania analgetycznego.

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC nie uzyskano istotnych różnic między średnimi w zakresie aktywności przeciwbólowej [ANOVA I: $F(3,34)=2,258$; $p=0,099$] (Ryc. 21B.). Dalsza analiza *post-hoc* wykazała, że otrzymane wartości różniły się znamienne względem wartości kontrolnych ($p\leq 0,05$) dla ASA podanego tak w dawce referencyjnej, natomiast dla komplementarnych dawek 30,0 i 300,0 mg/kg związku BB XII/73 nie wykazano różnic znamiennych w stosunku do wartości kontrolnych ($p>0,05$).

A.



B.

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

Ryc. 21. Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/73 na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

Wpływ łącznego, jednorazowego podania badanych pochodnych kwasu oleanolowego oraz acetylosalicylowego z ASA na reakcję bólową myszy w teście *hot-plate*

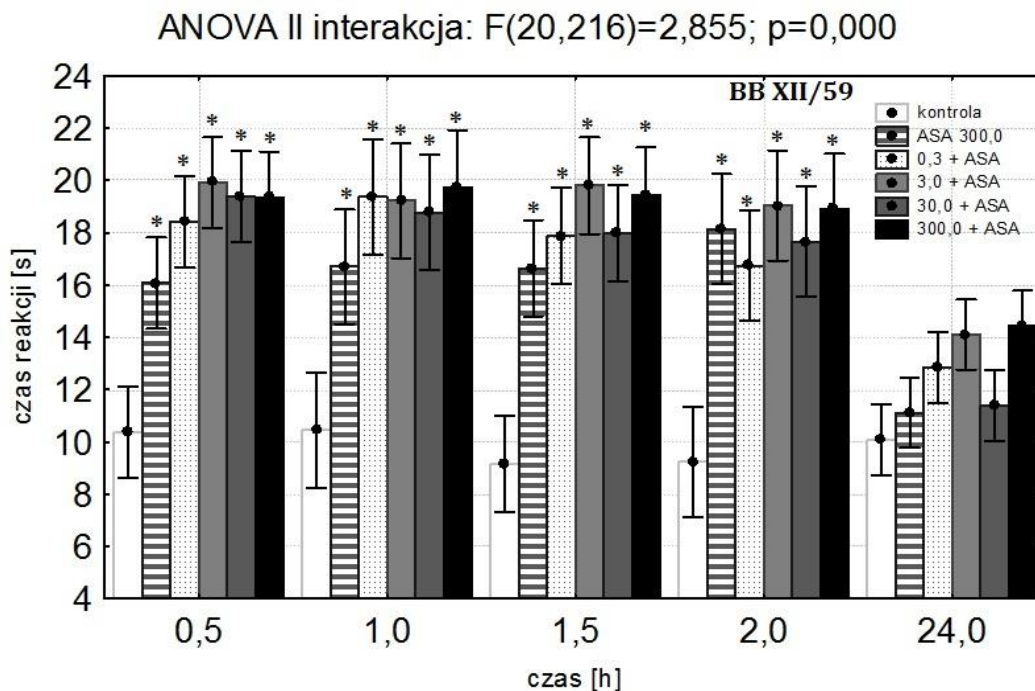
SUBSTANCJA BB XII/59

Oceniając wyniki wpływu łącznego podawania związku BB XII/59 oraz ASA w dawce 300,0 mg/kg (*p.o.*) zauważono występowanie wysokiej zmienności między analizowanymi grupami [ANOVA efekt główny $F(4,63)=57,605$; $p=0,000$], jak również wykazano znamienne wpływy czasu na występowanie działania przeciwbólowego w badanym układzie doświadczalnym [ANOVA wpływ czasu $F(4,252)=7,810$; $p=0,000$]. Oceniając interakcję obu czynników (tj. efektu grupy jak i czasu) na działanie przeciwbólne, również uzyskano wartości istotne statystycznie [ANOVA II, interakcja $F(16,212)=3,120$; $p=0,000$] (Ryc. 22A.).

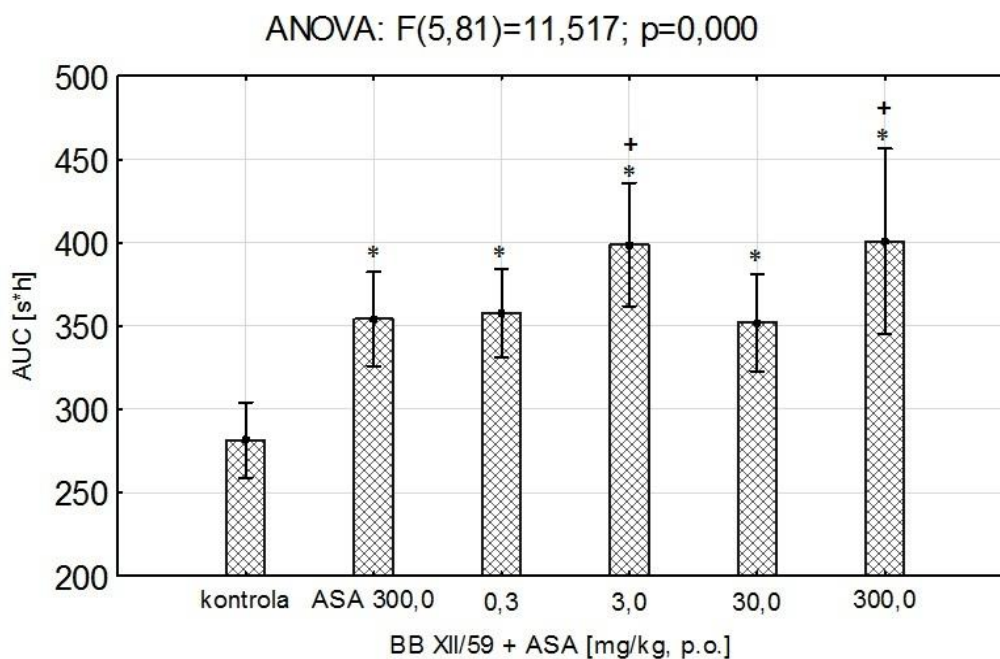
Dalsza szczegółowa analiza pozwoliła stwierdzić, że jedynie dla czasu 24,0 h nie znaleziono znamienych różnic otrzymanych wartości wskazujących na aktywność przeciwbólową badanych substancji podanych łącznie, podczas gdy dla pozostałych czasów badania tej aktywności (0,5 – 2,0 h) wykazano wysoką znamienność dla wszystkich badanych grup względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,01$). Ponadto ustalono, iż związek BB XII/59 w żadnej ze stosowanych dawek po łącznym podaniu z ASA w dawce referencyjnej 300,0 mg/kg nie wpływał w sposób istotny na aktywność przeciwbólową ASA.

Analiza wartości AUC zależności dawka-efekt uzyskanych po wyeliminowaniu wpływu czasu na działanie przeciwbólową badanego związku po łącznym podaniu z ASA pozwoliła stwierdzić występowanie istotnej zmienności między otrzymanymi wartościami [ANOVA I: $F(4,67)=37,880$; $p=0,000$] (Ryc. 22B.). Na podstawie dalszej analizy *post-hoc* zauważono jednak, że otrzymane wartości po podaniu łącznym związku BB XII/59 w dawce 3,0 oraz 300,0 mg/kg oraz ASA wyraźnie są istotnie wyższe w porównaniu do otrzymanych dla ASA i wskazują z występowanie synergistycznego działania przeciwbólowego.

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
 +różnice znamienne statystycznie względem ASA 300,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc. 22. Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/59 z ASA na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

SUBSTANCJA BB XII/72

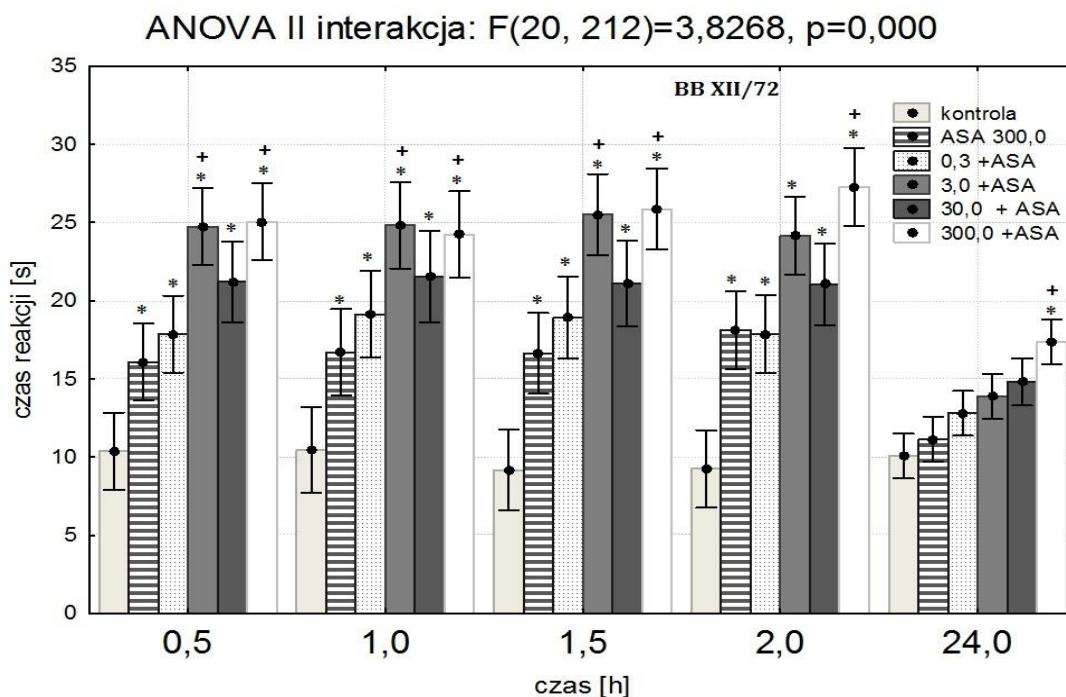
Analizując wpływ łącznego podawania związku BB XII/72 oraz ASA w dawce 300,0 mg/kg (*p.o.*) na aktywność przeciwbólową w teście hot-plate, uzyskano wartości statystyczne potwierdzające występowanie ogólnej zmienności w badanym układzie eksperymentalnym [ANOVA efekt grupy $F(5,53)=35,750$; $p=0,000$], jak również potwierdzono istotny wpływ czasu na aktywność antynocyceptywną w tym układzie [ANOVA: $F(4,212)=51,538$; $p=0,000$]. Interakcja obydwu efektów (tj. efektu grupowego oraz czasu) wykazała istnienie znamiennych różnic między analizowanymi średnimi [ANOVA II: interakcja $F(20,212)=3,827$; $p=0,000$] (Ryc. 23A.).

Analiza *post-hoc* (test Duncan'a) wykazała występowanie efektu antynocyceptywnego dla ASA podanego w dawce 300,0 mg/kg w zakresie 30 – 120 min od rozpoczęcia badania ($p \leq 0,05$), natomiast po 24,0 h nie zaobserwowano istotnej znamienności różnicy otrzymanej wartości względem kontroli. Dla łącznego podania ASA oraz badanej substancji w całym zakresie stosowanych dawek zauważono występowanie silnej znamienności względem kontroli w czasie: 0,5; 1,0; 1,5 oraz 2,0 h. Po 24,0 godzinach dla łącznego podawania związku BB XII/72 oraz ASA w dawkach 0,3 – 30,0 mg/kg efekt ten nie różnił się istotnie od wartości dla grupy której podawano samo *vehiculum*, natomiast dla najwyższej dawki badanego związku oraz ASA otrzymana wartość średnia różniła się znamienne względem wartości kontrolnych ($p \leq 0,05$).

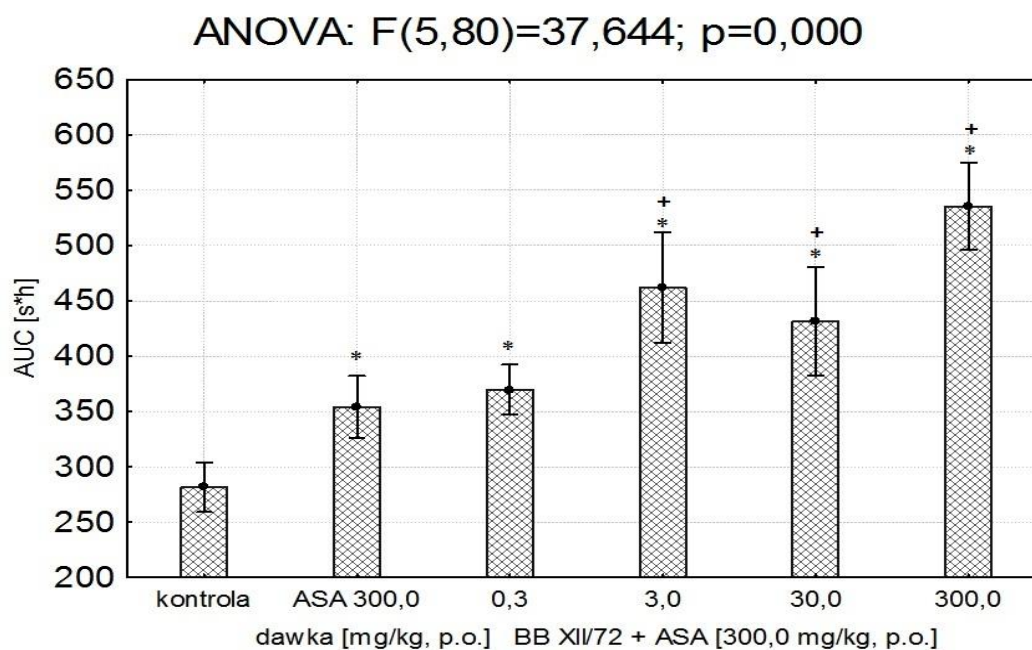
Zauważono, że BB XII/72 w dawce 300,0 mg/kg w sposób istotny statystycznie zwiększał siłę oraz przedłużał czas działania ASA w każdym z badanych punktów czasowych (Ryc. 23A.). natomiast w dawce 3,0 mg/kg wzrost siły działania ASA po łącznym podaniu widoczny był w 0,5; 1,0 oraz 1,5 h eksperymentu.

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwbólowej [ANOVA I: $F(5,80)=37,644$; $p=0,000$] (Ryc. 23B.). Dalsza analiza *post-hoc* wykazała, że otrzymane wartości dla łącznego podania badanego związku w zakresie dawek 3,0 – 300,0 mg/kg oraz ASA różniły się znamienne względem wartości dla ASA ($p \leq 0,01$); jedynie związek BB XII/72 podany w najniższej dawce nie wykazywał synergistycznego efektu.

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
 +różnice znamienne statystycznie względem ASA 300,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc. 23. Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/72 z ASA na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

SUBSTANCJA BB XII/73

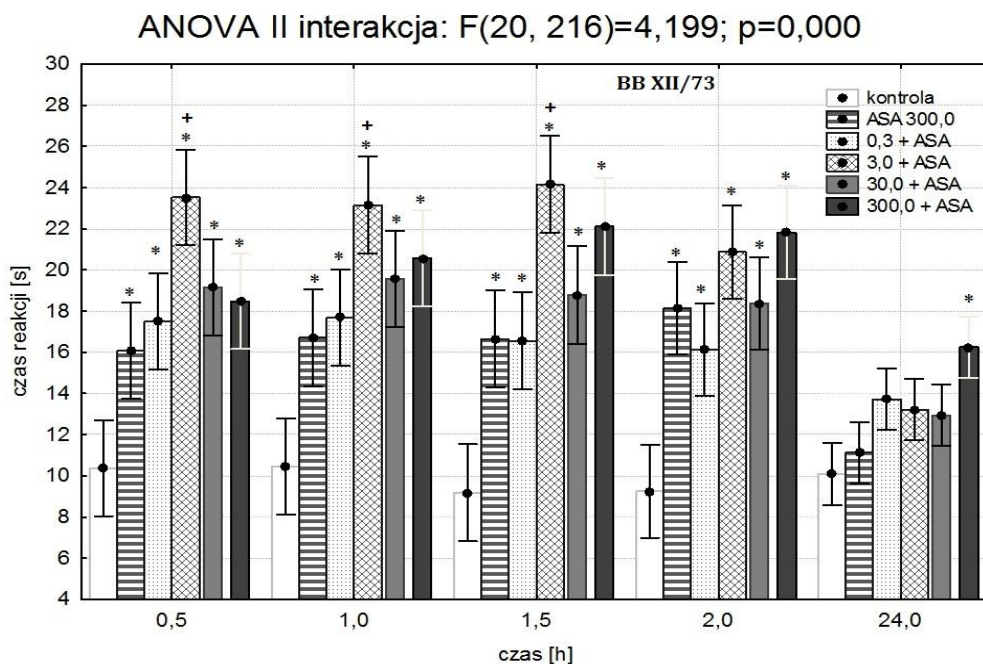
Oceniając wyniki wpływu łącznego podawania związku BB XII/73 oraz ASA w dawce 300,0 mg/kg (*p.o.*) zauważono występowanie wysokiej zmienności między analizowanymi grupami w stosowanym układzie doświadczalnym [ANOVA efekt główny $F(5,54)=26,405$; $p=0,000$]. Potwierdzono także istotny statystycznie wpływ czasu na działanie przeciwbólowe w tym układzie [ANOVA wpływ czasu $F(4,216)=37,892$; $p=0,000$]. Jednocześnie analiza interakcji obu badanych czynników (tj. efektu grupy oraz czasu) w tym teście wskazała na istotność działania obu [ANOVA II, interakcja $F(20,216)=4,199$; $p=0,000$] (Ryc. 24A.).

Szczegółowa analiza czasów wystąpienia reakcji bólowej wśród zwierząt pozwoliła stwierdzić, że zarówno ASA w dawce 300,0 mg/kg (*p.o.*), jak i ASA podane łącznie z BB XII/73 w całym zakresie badanych dawek charakteryzuje znamienne statystycznie działanie przeciwbólowe występujące od 0,5 – 2,0 h badania (Ryc. 24A.). Dla 24,0 h testu jedynie kombinacja ASA z BB XII/73 w dawce 300,0 mg/kg wykazywała działanie przeciwbólowe w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej ($p=0,03$). W czasie 0,5 – 1,5 h stwierdzono jednocześnie znamienny wzrost siły działania ASA po wspólnym podaniu z BB XII/73 w dawce 3,0 mg/kg w porównaniu do działania samego ASA ($p<0,05$), czego nie zaobserwowano dla pozostałych punktów czasowych jak i dla pozostałych dawek we wszystkich przedziałach czasowych badanej substancji.

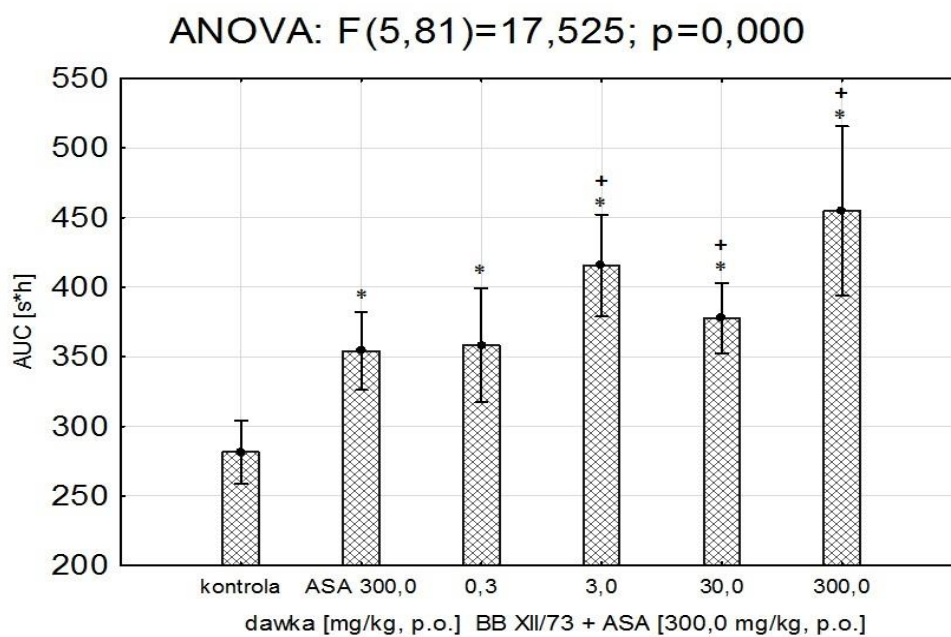
Analiza wartości AUC zależności dawka-efekt uzyskanych po wyeliminowaniu wpływu czasu na działanie przeciwbólową badanego związku po łącznym podaniu z ASA pozwoliła stwierdzić występowanie istotnej zmienności między otrzymanymi wartościami [ANOVA I: $F(5,81)=17,525$; $p=0,000$] (Ryc. 24B.).

Na podstawie dalszej analizy *post-hoc* zauważono jednak, że otrzymane wartości po podaniu łącznym związku BB XII/73 w dawce 3,0 oraz 300,0 mg/kg oraz ASA wyraźnie są istotnie wyższe w porównaniu do otrzymanych dla ASA i wskazują występowanie synergistycznego działania przeciwbólowego, natomiast takiego efektu nie stwierdzono dla dawki 0,3 i 30,0 mg/kg (Ryc. 24B.).

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
+różnice znamienne statystycznie względem ASA 300,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc. 24. Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/73 z ASA na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

Wpływ łącznego, jednorazowego podania badanych pochodnych kwasu oleanolowego z MF na reakcję bólową myszy w teście *hot-plate*

SUBSTANCJA BB XII/59

Analizując wpływ łącznego podawania związku BB XII/59 oraz MF w dawce 5,0 mg/kg (*s.c.*) na aktywność przeciwbólową w teście *hot-plate* wykazano występowanie ogólnej zmienności między otrzymanymi wartościami [ANOVA efekt główny $F(5,54)=10,106$; $p=0,000$], a także istotny statystycznie wpływ czasu na aktywność przeciwbólową badanych substancji w omawianym układzie doświadczalnym [ANOVA wpływ czasu $F(4,216)=66,504$; $p=0,000$]. Konfrontując ze sobą oba analizowane efekty (tj. efekt grupy oraz czasu) uzyskano ponownie wysoką zmienność między wartościami [ANOVA II, interakcja $F(20,216)=7,170$; $p=0,000$] (Ryc. 25A.).

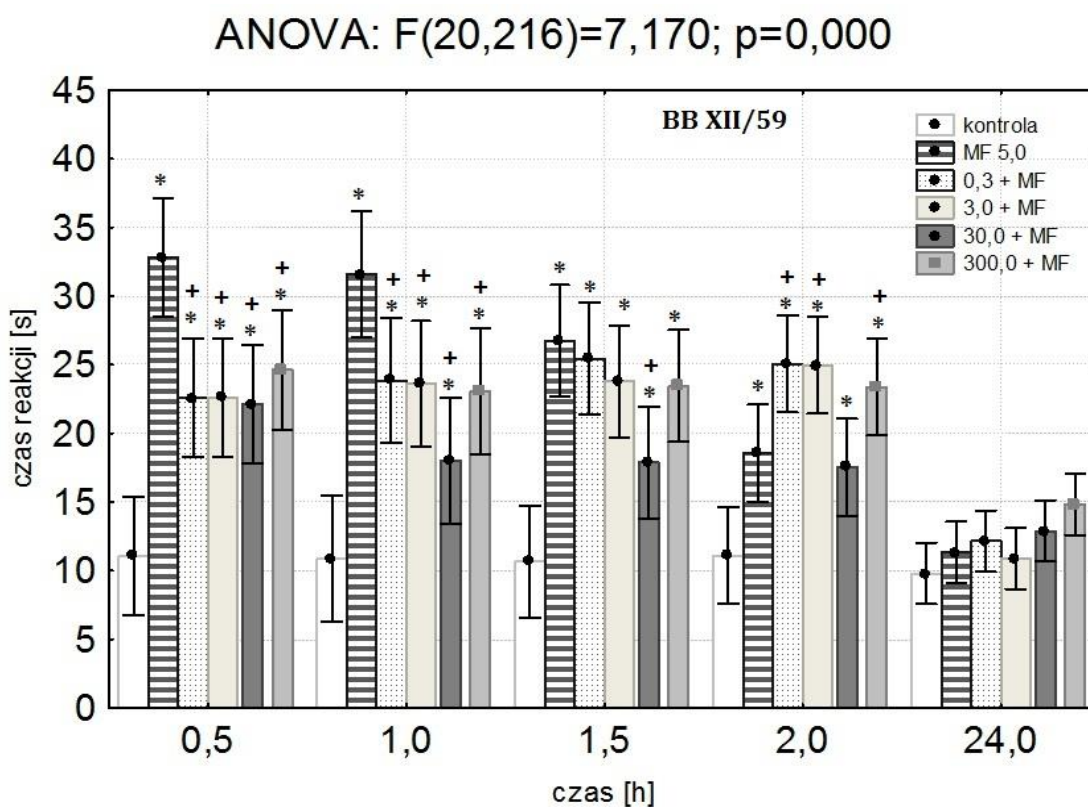
Szczegółowa analiza czasów występowania reakcji bólowej, pozwoliła uzyskać informację, iż MF w dawce 5,0 mg/kg (*s.c.*) podana sama jak w połączeniu z BB XII/59 w całym zakresie badanych dawek, charakteryzuje się wysoką aktywnością przeciwbólową na poziomie istotności $p \leq 0,01$ w 0,5; 1,0 oraz 1,5 h od rozpoczęcia testu w stosunku do odpowiednich wartości kontrolnych. Na tym samym poziomie istotności działa MF w połączeniu z BB XII/59 w każdej dawce w 2,0 h badania, natomiast dla samej MF w tym czasie wykazano działanie przeciwbólowe na poziomie $p=0,017$. Nie wykazano natomiast istotnego działania przeciwbólowego po 24,0 h badania zarówno dla samej MF, jak i MF podanej łącznie z BB XII/59 we wszystkich stosowanych dawkach.

Dzięki kolejnej analizie uzyskano informację, iż badana substancja w całym przedziale dawkowania w sposób istotny ($p \leq 0,01$) wpływa hamująco na aktywność analgetyczną MF w 0,5 oraz 1,0 h badania. Po 90 minutach antagonistyczny wpływ na aktywność MF posiada jedynie BB XII/59 podana w dawce 30,0 mg/kg ($p \leq 0,01$), podczas gdy dla dawki: 0,3; 3,0 oraz 300,0 mg/kg dla tego przedziału czasowego nie wykazano żadnej istotnej różnicy działania względem podawanej MF. W 2,0 h badania zarówno związek po podaniu łącznym z MF w dawce 0,3; 3,0 mg/kg jak i w dawce 300,0 mg/kg BB XII/59 zwiększał potencjał działania przeciwbólowego MF ($p \leq 0,01$), natomiast nie zaobserwowano interakcji po podaniu w dawce 30,0 mg/kg. W 24,0 h nie zauważono znamiennych różnic pomiędzy MF i MF po podaniu łącznym z omawianym związkiem we wszystkich stosowanych dawkach.

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwbólowej BBXII/59 podanego łącznie z MF oraz samej MF [ANOVA I: $F(5,52)=9,518$; $p=0,000$] (Ryc. 25B.).

Zauważono, że wszystkie otrzymane średnie były znamienne wyższe w stosunku do wartości kontrolnych ($p \leq 0,01$). Stwierdzono, że łączne podanie związku BB XII/59 w dawce 0,3 i 300,0 mg/kg działało synergistycznie z MF w porównaniu do samego działania zastosowanego opioidu, podczas dla analizowanego związku w dawce 3,0 mg/kg różnica była słabo znamienna ($p \leq 0,1$), a dla dawki 30,0 mg/kg nie otrzymano istotnej różnicy działania analgetycznego w stosunku do MF.

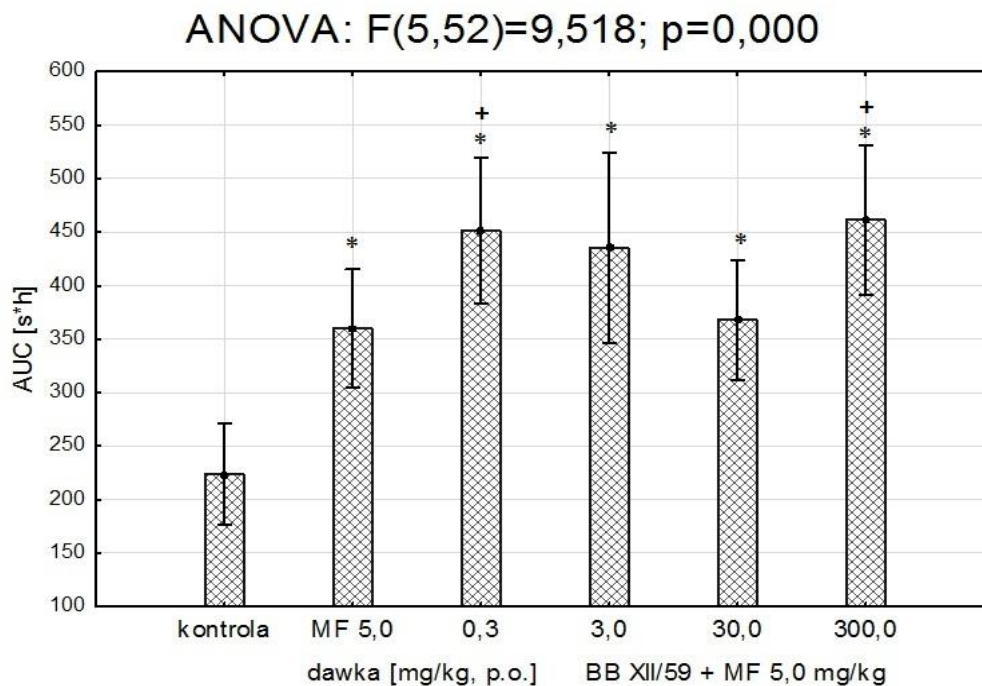
A.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
+różnice znamienne statystycznie względem MF 5,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
 +różnice znamienne statystycznie względem MF 5,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc. 25. Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/59 z MF na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

SUBSTANCJA BB XII/72

W badanym układzie doświadczalnym wykazano ogólną zmienność pomiędzy średnimi [ANOVA efekt główny $F(5,54)=10,218$; $p=0,000$] oraz wykazano istotność wpływu czasu na przebieg działania przeciwbólowego [ANOVA wpływ czasu $F(4,216)=64,609$; $p=0,000$]. Jednocześnie analiza interakcji obu badanych czynników w tym teście wskazała na istotność działania obu [ANOVA II, interakcja $F(20,216)=6,021$; $p=0,000$] (Ryc. 26A.).

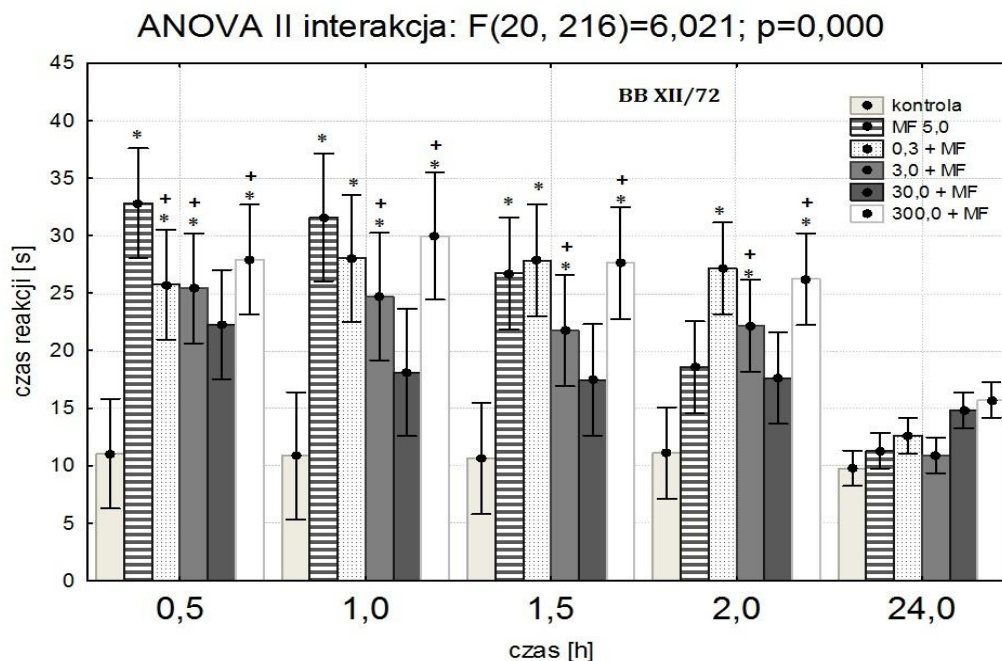
Analiza post-hoc wykazała występowanie efektu przeciwbólowego MF w dawce 5,0 mg/kg (*s.c.*) w 0,5; 1,0 ($p \leq 0,01$) oraz 1,5 h ($p \leq 0,05$) badania w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast po 2,0 oraz 24,0 godzinach nie wykazywała istotnego działania. Łączne podanie MF z substancją BB XII/72 w dawce 0,3 mg/kg (*p.o.*) wykazuje istotnie

statystycznie działanie przeciwbólowe które trwa do 2,0 h od rozpoczęcia badania, a w 0,5 h zwiększa istotnie siłę działania samej MF. Podobnie w dawce 3,0 oraz 300,0 mg/kg stwierdzono znamienne aktywność analgetyczną łącznego podania badanego związku z MF we wszystkich badanych przedziałach czasowych z wyjątkiem 24,0 h. Najmniej efektywne było podanie związku w dawce 30,0 mg/kg, ponieważ po łącznym podaniu z MF w żadnym z badanych punktów czasowych nie wykazano znamiennej statystycznie aktywności antynocyceptywnej.

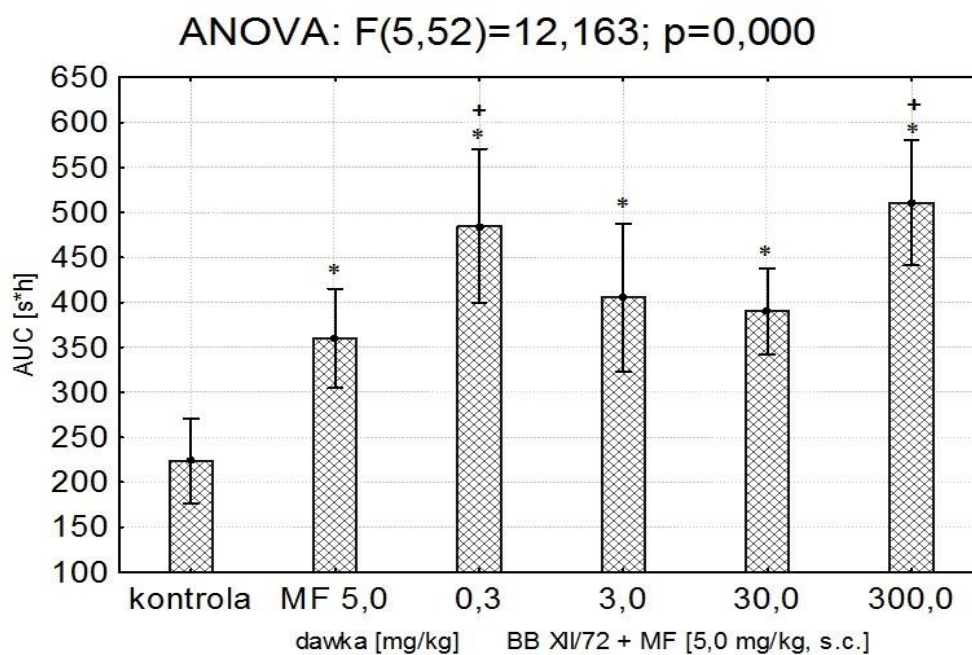
Stwierdzono, że zastosowanie połączenia BB XII/72 w dawce 3,0 mg/kg wraz z MF istotnie hamuje reakcję bólową w 0,5 oraz 1,0 h w stosunku do działania MF, a w pozostałych przedziałach czasowych nie odnotowano znamiennych różnic łącznego podania w porównaniu do wartości średnich MF. Badany związek zastosowany w dawce 300,0 mg/kg podany wraz z MF, podobnie jak najniższej stosowanej w badanym układzie dawce 0,3 mg/kg, w sposób istotny hamował reakcję nocyceptywną w czasie 0,5 ($p \leq 0,05$); 1,0 ($p \leq 0,01$); 1,5 oraz 2,0 h ($p \leq 0,05$).

Analiza wartości AUC zależności dawka-efekt uzyskanych po wyeliminowaniu wpływu czasu na działanie przeciwbólową badanego związku po łącznym podaniu z MF pozwoliła stwierdzić występowanie istotnej zmienności między otrzymanymi wartościami [ANOVA I: $F(5,52)=12,166$; $p=0,000$] (Ryc. 26B.). Na podstawie dalszej analizy post-hoc, że otrzymane wartości średnie po podaniu łącznym związku BB XII/72 we wszystkich dawkach z MF oraz samego MF są istotnie wyższe od wartości kontrolnych ($p \leq 0,01$). Natomiast stosowane połączenie w najniższej i najwyższej stosowanej dawce w sposób znamienne podwyższyło wartości AUC w stosunku do otrzymanych dla MF ($p \leq 0,01$), podczas gdy dla podania łącznego w dawce 3,0 i 30,0 mg/kg otrzymane dane nie różniły się znamienne w stosunku do wartości MF.

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
+różnice znamienne statystycznie względem MF 5,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc. 26. Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/72 z MF na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

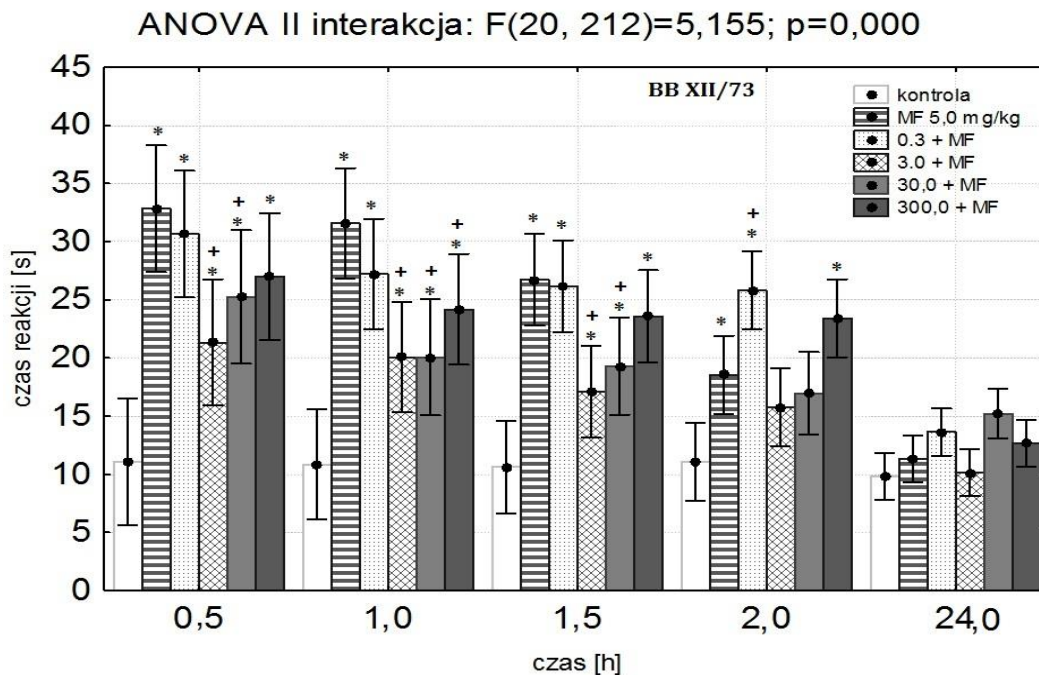
SUBSTANCJA BB XII/73

Analizując wpływ łącznego podawania związku BB XII/73 oraz MF w dawce 5,0 mg/kg (s.c.) na aktywność przeciwbólową w teście hot-plate w badanym układzie wykazano występowanie różnic znamiennej statystycznie między średnimi [ANOVA efekt główny $F(5,53)=11,218$; $p=0,000$] oraz uzyskano informację o istotności wpływu czasu na efekt przeciwbólowy [ANOVA wpływ czasu $F(4,212)=66,157$; $p=0,000$]. Następnie, podczas analizy interakcji obu badanych czynników w zastosowanym teście, wykazano także istnienie znamiennej różnic w wartościach średnich [ANOVA II, interakcja $F(20,216)=4,199$; $p=0,000$] (Ryc. 27A.).

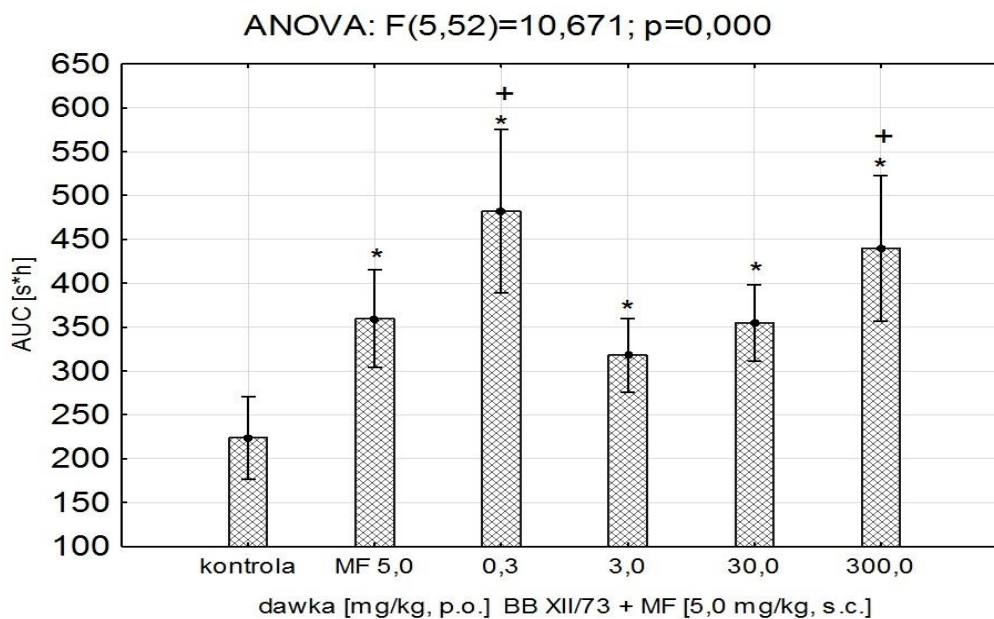
Dalsza szczegółowa analiza statystyczna pozwoliła zaobserwować, iż w przedziale czasu 0,5 – 1,5 h każda badana grupa dla łącznego podania analizowanego związku we wszystkich dawkach wraz z MF wykazywała znamienne działanie przeciwbólowe względem kontroli ($p \leq 0,05$) (Ryc. 27A.). Po 2,0 h od rozpoczęcia testu działanie to pojawiło się dla MF oraz połączenia MF z BB XII/73 jedynie w dawce 0,3 oraz 300,0 mg/kg. Dla 24,0 h badania dla żadnej badanej grupy nie odnaleziono różnic znamiennej statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej. Zaobserwowano przeważnie hamujący wpływ BB XII/73 na aktywność przeciwbólową MF. Zauważono bowiem, że istotny statystycznie spadek aktywności MF wystąpił już w czasie 0,5 h dla dawki 3,0 oraz 30,0 mg/kg BB XII/73 ($p \leq 0,01$), czego nie zauważono po podaniu łącznym dla dawki 0,3 oraz 300,0 mg/kg. Dla 1,0 h badania jedynie analizowany związek w dawce 0,3 mg/kg nie hamował działania MF w sposób znamiennej, natomiast po 1,5 h ponownie zanotowano efekt hamujący dla BB XII/73 w dawce 3,0 oraz 30,0 mg/kg. Po 2,0 h jedynie po podaniu omawianego związku w najniższej dawce 0,3 mg/kg razem z MF wpłynęło hamująco na aktywność agonisty w sposób znamiennej statystycznie ($p=0,033$).

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwbólowej (ANOVA I: $F(5,52)=10,671$; $p=0,000$) (Ryc. 27B.). Wykazano, że otrzymane wartości średnie AUC dla wszystkich analizowanych grup różnią się znamiennej w stosunku do wartości kontrolnych ($p \leq 0,05$). Zauważono także, że po podaniu BB XII/73 łącznym z MF w dawce 0,3 mg/kg i 300,0 mg/kg wstępowało podwyższenie wartości AUC w stosunku do otrzymanych dla samego MF, ale tylko dla niższej dawki była to różnica wyraźnie znamiennej ($p \leq 0,05$). W pozostałych kombinacjach (tj. dla łącznego podania MF i związku w dawkach 3,0 i 30,0 mg/kg) nie stwierdzono występowania różnic znamiennej statystycznie w porównaniu do MF.

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
 +różnice znamienne statystycznie względem MF 5,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

Ryc. 27. Wpływ jednorazowego, łącznego podania BBXII/73 z MF na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

Wpływ łącznego, jednorazowego podania badanych pochodnych kwasu oleanolowego z NL na reakcję bólową myszy w teście *hot-plate*

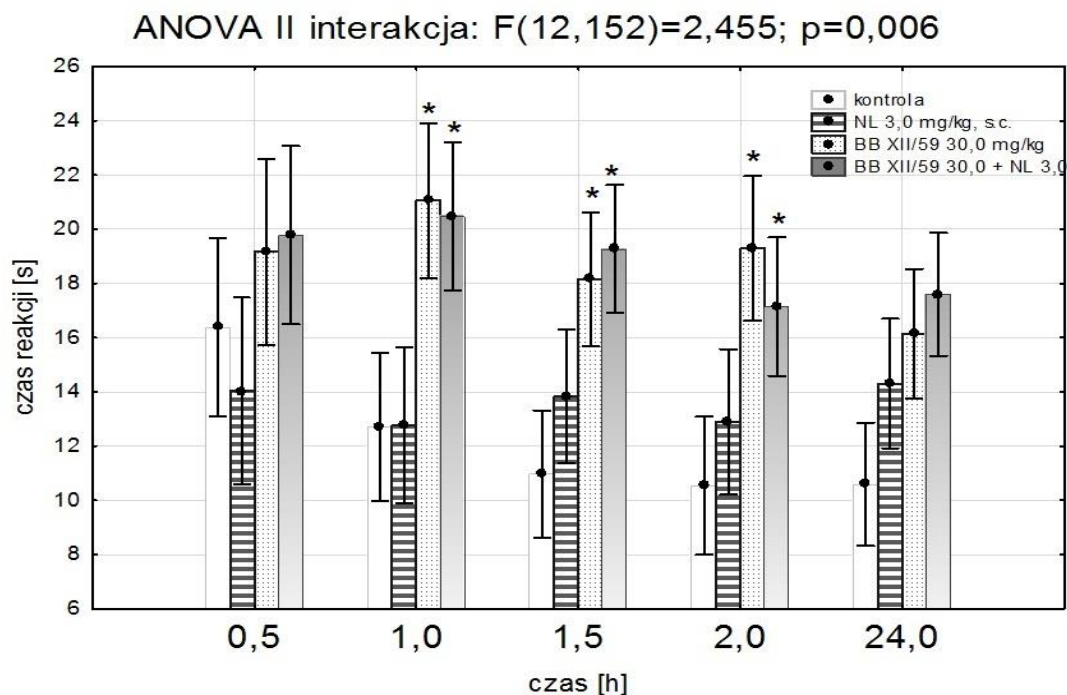
SUBSTANCJA BB XII/59

Analizując wpływ łącznego podawania związku BB XII/59 w dawce 30,0 mg/kg (*p.o.*) oraz NL w dawce 3,0 mg/kg *m.c. (s.c.)* na aktywność przeciwbólową w teście *hot-plate* wykazano występowanie ogólnej zmienności między średnimi [ANOVA efekt główny $F(3,38)=10,936$; $p=0,000$], a także stwierdzono, że czas jest istotnym czynnikiem wpływającym na aktywność przeciwbólową w badanym układzie [ANOVA wpływ czasu $F(4,152)=5,936$; $p=0,000$]. Jednocześnie analiza interakcji obu badanych czynników w tym teście wskazała na istnienie znamienych różnic podczas działania obu efektów [ANOVA II, interakcja $F(12,152)=2,455$; $p=0,006$] (Ryc. 28A.).

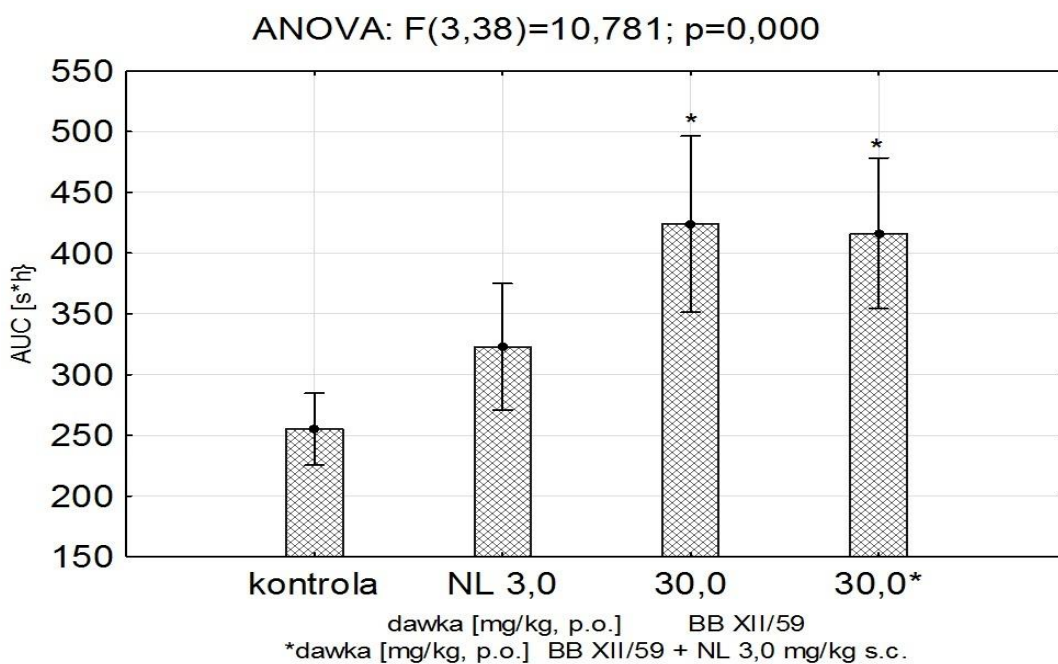
Dalsza szczegółowa analiza pozwoliła określić, że podanie NL we wszystkich przedziałach czasowych nie wykazało znamienego działania przeciwbólowego w stosunku do odpowiednich wartości kontrolnych. Zauważono, iż jedynie po 0,5 jak i po 24,0 h od rozpoczęcia badania nie odnotowano różnic znamienych statystycznie względem kontroli zarówno dla BB XII/59 podanego łącznie z NL jak i samej analizowanej pochodnej kwasu oleanolowego. Natomiast w pozostałych przedziałach czasowych wykazano występowanie znamiennej aktywności przeciwbólowej dla samej badanej substancji w dawce 30,0 mg/kg oraz w połączeniu z NL w stosunku do odpowiednich wartości kontrolnych ($p \leq 0,01$). Nie stwierdzono znamienych różnic w działaniu przeciwbólowym pomiędzy grupą otrzymującą BB XII/59 w dawce 30,0 mg/kg a grupą otrzymującą kombinację badanego związku wraz z NL dla każdego analizowanego czasu.

Analiza wartości AUC uzyskanych po wyeliminowaniu wpływu czasu na działanie przeciwbólne badanego związku po łącznym podaniu z NL pozwoliła stwierdzić występowanie istotnej zmienności między otrzymanymi wartościami [ANOVA I: $F(3,38)=10,781$; $p=0,000$] (Ryc. 28B.). Wykazano, że otrzymane wartości średnie AUC dla samego związku BB XII/59 oraz tego związku po podaniu łącznie z NL różnią się znamienne w stosunku do wartości kontrolnych ($p \leq 0,05$). Natomiast AUC dla działania NL nie różniło się istotnie w porównaniu do wartości kontrolnych ($p > 0,05$). Ponadto stwierdzono, że wartości dla grupy BB XII/59 podanej z NL nie różnią się znamienne w stosunku do wartości otrzymanych dla samej analizowanej pochodnej kwasu oleanolowego ($p > 0,05$).

A.



B.

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)+różnice znamienne statystycznie względem NL 3,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc.28. Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/59 z NL na reakcję bólową u myszy w testie „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

SUBSTANCJA BB XII/72

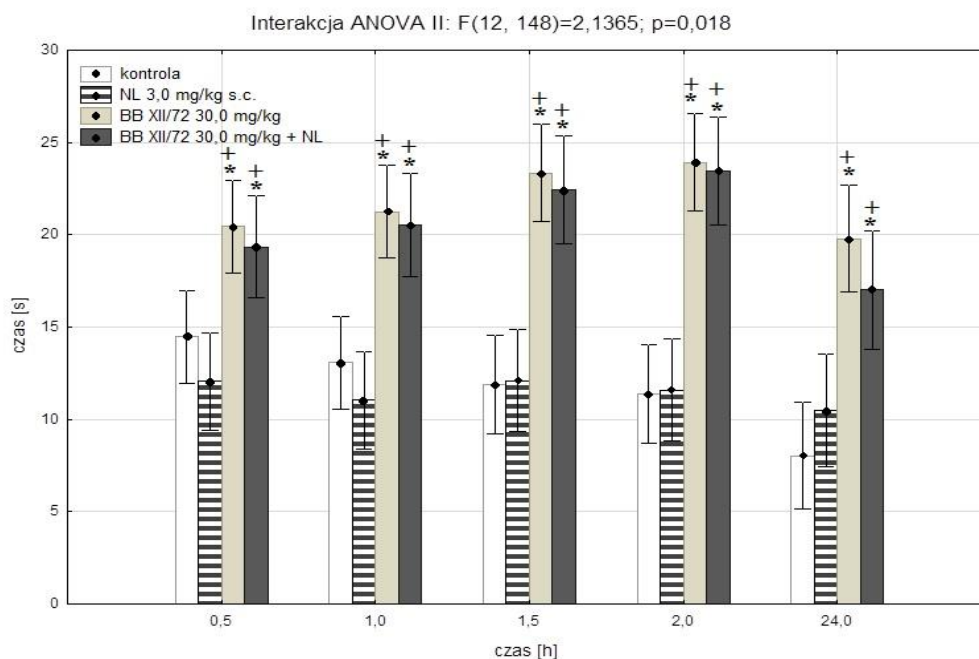
W wybranym układzie doświadczalnym wpływu łącznego podawania związku BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg (*p.o.*) oraz antagonisty receptorów opioidowych w dawce 3,0 mg/kg m.c. (*s.c.*) na aktywność przeciwbólową w teście *hot-plate* wykazano istnienie zmienności między średnimi [ANOVA efekt główny $F(3,37)=31,995$; $p=0,000$], a także wskazano na istotność wpływu czasu w badanym układzie [ANOVA wpływ czasu $F(4,148)=8,383$; $p=0,000$]. Jednocześnie analiza interakcji obu badanych czynników w tym teście wskazała na istotność działania obu efektów [ANOVA II, interakcja $F(12,148)=2,137$; $p=0,0178$] (Ryc. 29A.).

Dalsza szczegółowa analiza pozwoliła określić, że podanie NL we wszystkich przedziałach czasowych nie wykazało znamiennego działania przeciwbólowego w stosunku do odpowiednich wartości kontrolnych. Stwierdzono, iż dla całego badanego przedziału czasowego dla BB XII/72 podanego razem z NL jak i bez antagonisty uzyskano wyniki znamienne statystycznie w porównaniu do odpowiednich wartości kontrolnych ($p\leq 0,01$).

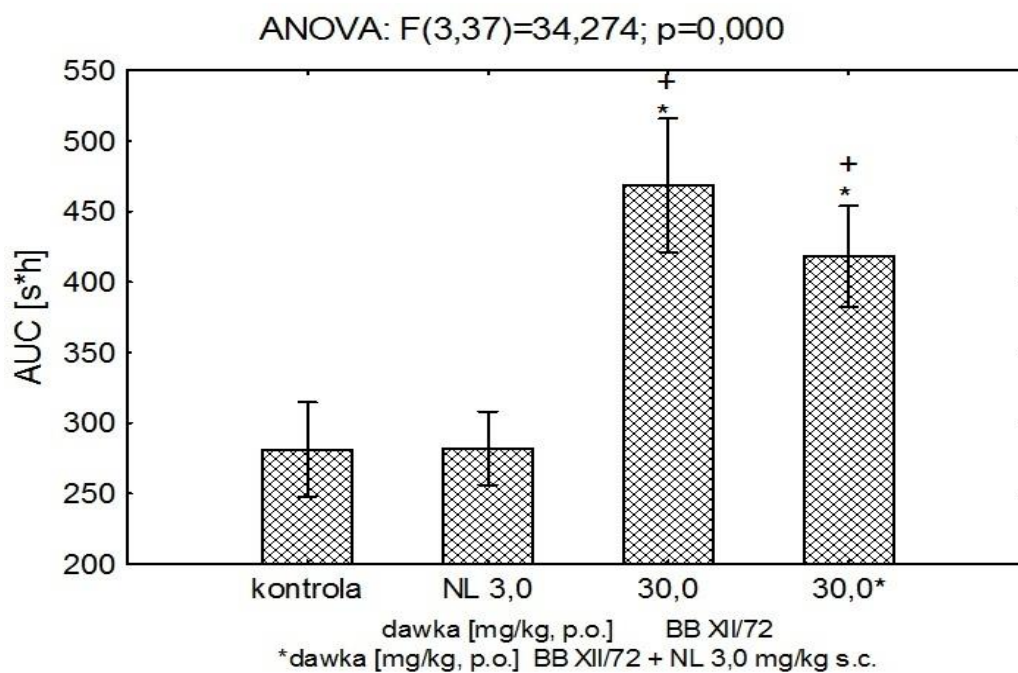
Porównując natomiast otrzymane wartości aktywności przeciwbólowej BB XII/72 z i bez NL w wybranym teście do wartości uzyskanych po podaniu samego NL stwierdzono, że w całym przedziale 0,5 – 24,0 h istniała znamienna różnica w otrzymanych wartościach dla obu badanych grup ($p\leq 0,01$) (Ryc. 29A.). Nie wykryto ponadto znamiennych różnic dla działania przeciwbólowego pomiędzy grupą otrzymującą BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg a grupą otrzymującą kombinację związku badanego wraz z NL ($p>0,05$).

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwbólowej [ANOVA I: $F(3,37)=34,274$; $p=0,000$] (Ryc. 29B.). Stwierdzono, iż otrzymane wartości średnie AUC dla samego związku BB XII/72 oraz tego związku po podaniu łącznie z NL różnią się znamienne w stosunku do wartości kontrolnych ($p\leq 0,01$). Natomiast AUC dla działania NL nie różniło się istotnie w porównaniu do wartości kontrolnych ($p>0,05$). Ponadto zauważono, że wartości dla grupy BB XII/72 podanej z NL nie różnią się znamienne w stosunku do wartości otrzymanych dla samej analizowanej pochodnej kwasu oleanolowego ($p>0,05$).

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
+różnice znamienne statystycznie względem NL 3,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc. 29. Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/72 z NL na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

SUBSTANCJA BB XII/73

W wybranym układzie doświadczalnym wpływu łącznego podawania związku BB XII/73 w dawce 30,0 mg/kg (*p.o.*) oraz NL w dawce 3,0 mg/kg m.c. (*s.c.*) na aktywność przeciwbólową w teście *hot-plate* wykazano istnienie zmienności między średnimi [ANOVA efekt główny $F(3,38)=30,759$; $p=0,000$], a także wskazano na istotność wpływu czasu w badanym układzie [ANOVA wpływ czasu $F(4,152)=4,540$; $p=0,002$]. Jednocześnie analiza interakcji obu badanych czynników w tym teście wskazała na istotność działania obu efektów [ANOVA II, interakcja $F(12,152)=2,622$; $p=0,003$] (Ryc. 30A.).

Dalsza szczegółowa analiza pozwoliła określić, że podanie NL we wszystkich przedziałach czasowych nie wykazało znamiennego działania przeciwbólowego w stosunku do odpowiednich wartości kontrolnych. Stwierdzono, iż po 0,5 h od rozpoczęcia badania nie odnotowano różnic znamiennych statystycznie względem kontroli dla BB XII/73 podanego razem z NL, podczas gdy sam związek BB XII/73 wykazał znamienne aktywność przeciwbólową w tym punkcie czasowym ($p<0,01$). W dalszym etapie analizy podobnie jak w przypadku pozostałych badanych związków, dla każdego z badanych czasów (1,0 – 24,0 h) uzyskano wyniki znamienne statystycznie dla samej badanej substancji w dawce 30,0 mg/kg oraz w połączeniu z NL w porównaniu do odpowiednich wartości kontrolnych ($p\leq 0,01$).

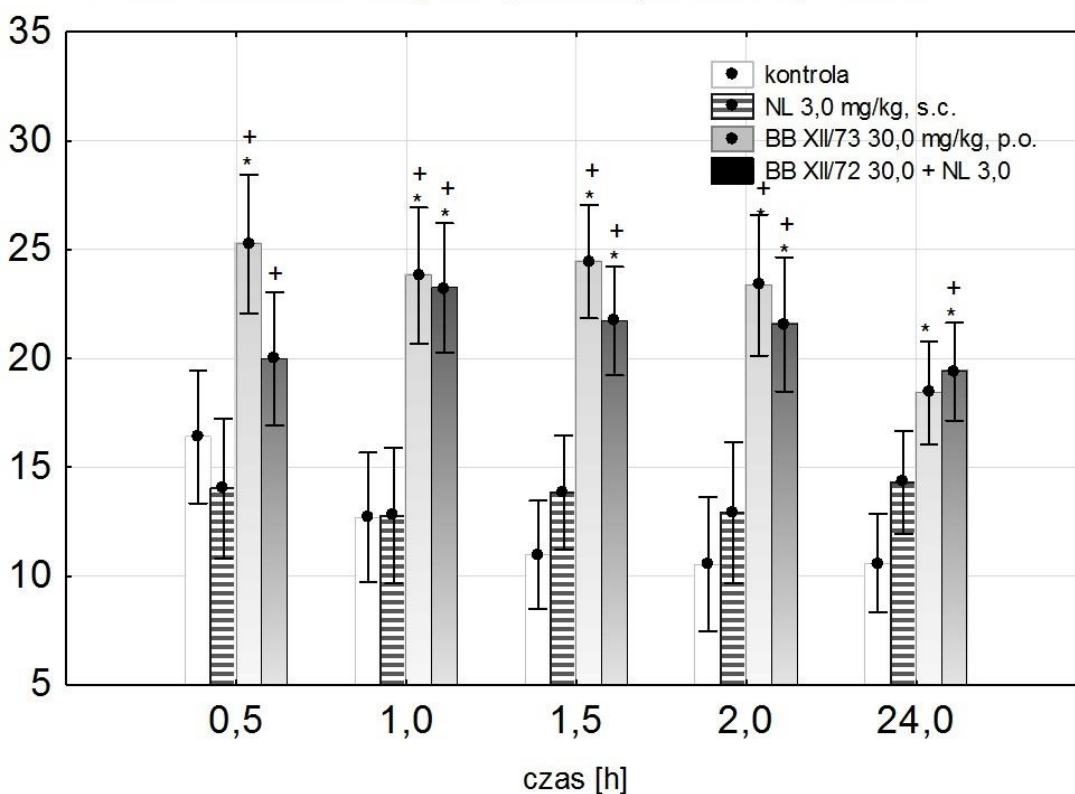
Porównując natomiast otrzymane wartości aktywności przeciwbólowej BB XII/73 z i bez NL w wybranym teście do wartości uzyskanych po podaniu samego NL stwierdzono, że w przedziale 0,5 – 2,0 h istniała znamienna różnica w otrzymanych wartościach dla obu badanych grup ($p\leq 0,05$). Dla 24,0 h dla grupy otrzymującej badany związek z NL otrzymana różnica osiągnęła znamienność statystyczną ($p\leq 0,05$), natomiast dla grupy której podano tylko BB XII/73 otrzymane wartości w stosunku do grupy otrzymującej NL różniły się słabo znamienne ($p=0,054$) (Ryc. 30A.). Nie wykryto znamiennych różnic w przedziale 1,0 – 24,0 h dla działania przeciwbólowego pomiędzy grupą otrzymującą BB XII/73 w dawce 30,0 mg/kg a grupą otrzymującą kombinację związku badanego wraz z NL. Jedynie dla pierwszego przedziału czasowego (30 min) sama pochodna OA działała znamienne silniej niż podana w kombinacji z NL ($p\leq 0,05$).

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwbólowej [ANOVA I: $F(3,38)=20,215$; $p=0,000$] (Ryc. 30B.). Stwierdzono, iż otrzymane wartości średnie AUC

dla samego związku BB XII/73 oraz tego związku po podaniu łącznie z NL różnią się znacząco w stosunku do wartości kontrolnych ($p \leq 0,05$). Natomiast AUC dla działania NL nie różniło się istotnie w porównaniu do wartości kontrolnych ($p > 0,05$). Ponadto zauważono, że wartości dla grupy BB XII/73 podanej z NL nie różnią się znacząco w stosunku do wartości otrzymanych dla samej analizowanej pochodnej OA ($p > 0,05$), ale badana pochodna w obu kombinacjach w sposób istotny różniła się od wartości po podaniu samego antagonisty opioidowego w dawce 3,0 mg/kg m.c. ($p \leq 0,05$).

A.

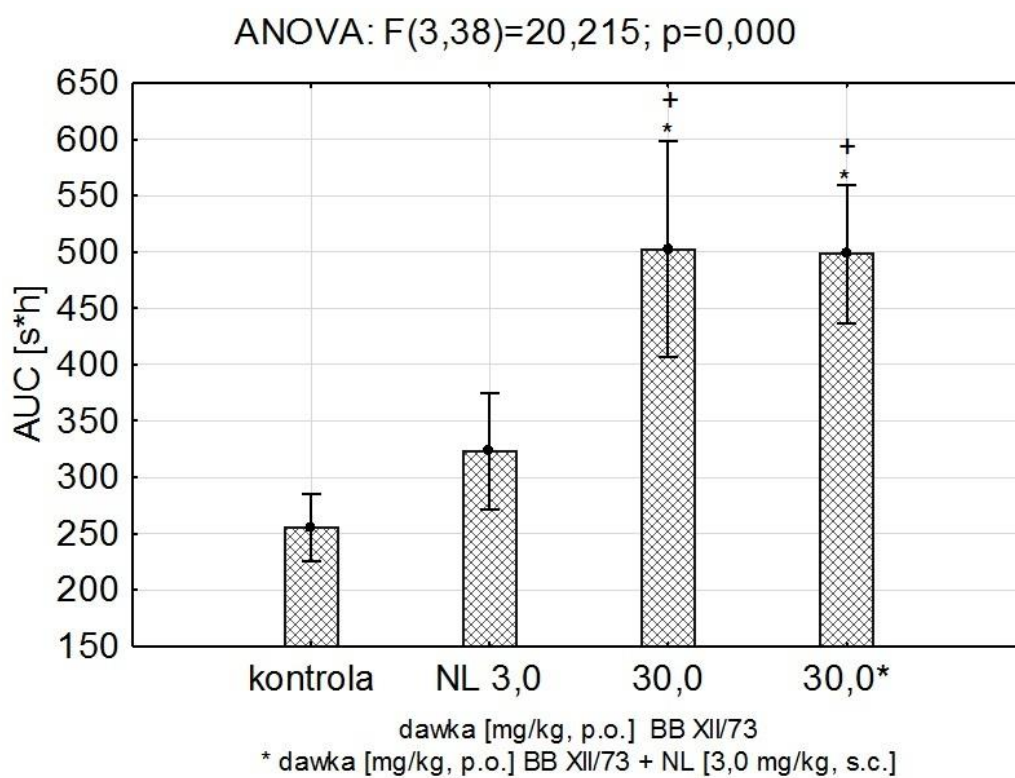
ANOVA II interakcja: $F(12,152)=2,622$; $p=0,003$



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

+różnice znamienne statystycznie względem NL 3,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

+różnice znamienne statystycznie względem NL 3,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne ± SEM

Ryc.30. Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/73 z NL na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

5.4. OCENA DZIAŁANIA PRZECIWZAPALNEGO

Wpływ pochodnych kwasu oleanolowego na reakcję przeciwzapalną u szczurów po jednorazowym podaniu w teście karageninowym

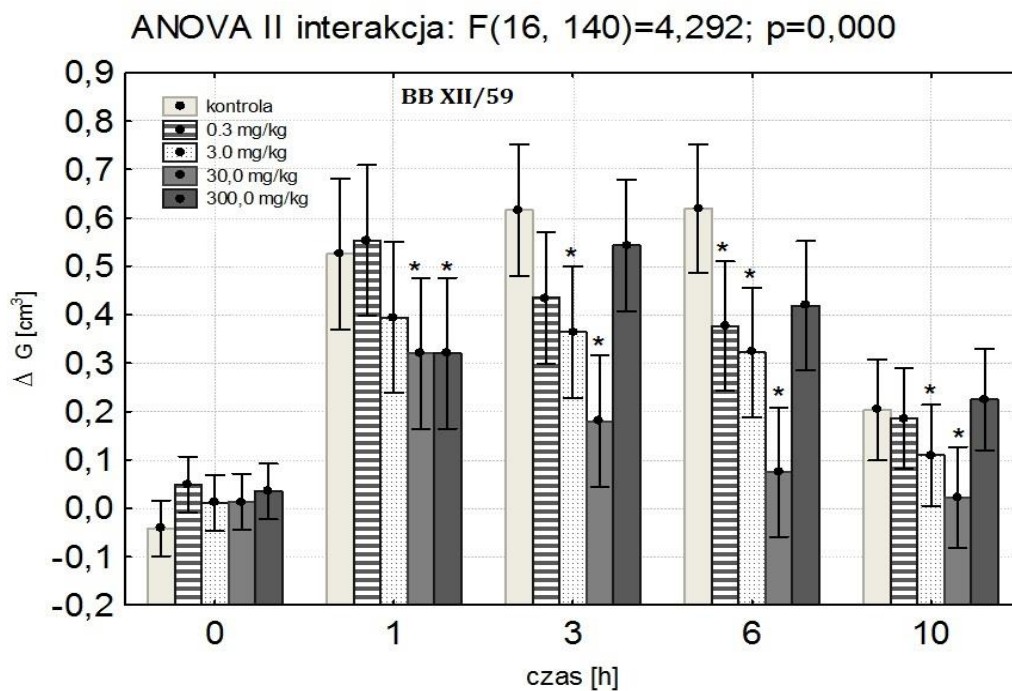
SUBSTANCJA BB XII/59

Analizując wpływ podawania substancji BB XII/59 w poszczególnych dawkach (0,3 – 300,0 mg/kg) na aktywność przeciwzapalną u szczurów po podaniu karageniny, zauważono występowanie ogólnej zmienności między średnimi [ANOVA efekt główny $F(4,53)=7,069$; $p=0,000$], jak również istotny wpływ czasu na działanie przeciwzapalne [ANOVA wpływ czasu $F(4,212)=79,215$; $p=0,000$]. Wykazano także istotny wpływ interakcji działania przeciwzapalnego oraz czasu [ANOVA II, interakcja $F(16,140)=4,292$; $p=0,000$] (Ryc. 31A.).

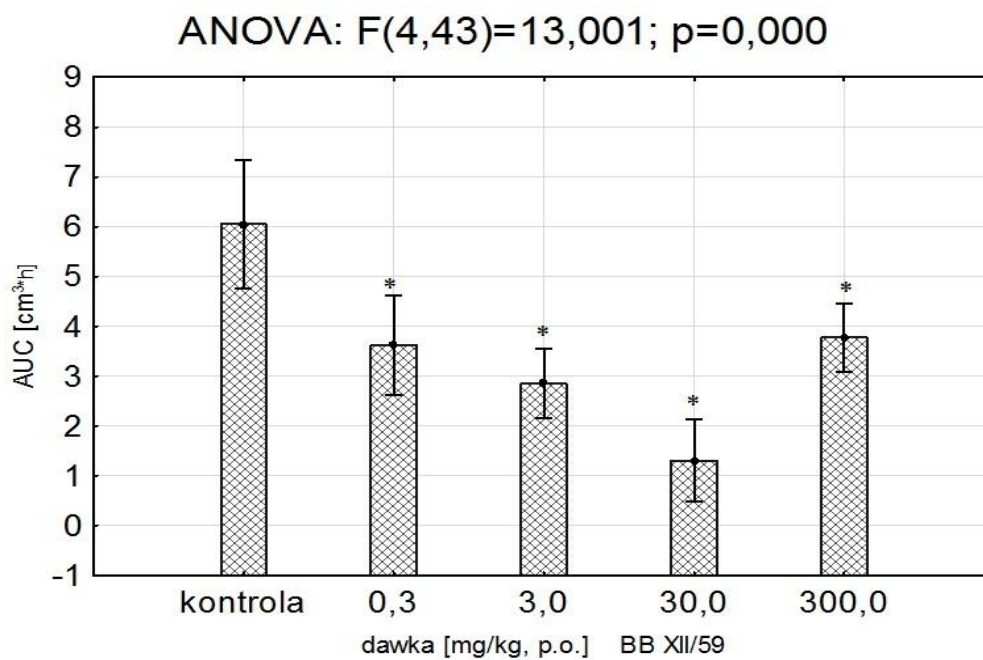
Dalsza szczegółowa analiza pozwoliła stwierdzić, iż działanie przeciwzapalne polegające na zmniejszeniu obrzęku wywołanego podaniem karageniny pojawiło się już w 1 h od rozpoczęcia badania związku w dawce 30,0 oraz 300,0 mg/kg ($p\leq 0,05$), podczas gdy dla dawki 0,3 oraz 3,0 mg/kg nie stwierdzono znamienych różnic pomiędzy poszczególnymi otrzymanymi wartościami a danymi dla grupy kontrolnej. W kolejnych badanych przedziałach czasowych (3 – 10 h) wartości znamienne względem kontroli wykazywała substancja BB XII/59 w dawce 3,0 oraz 30,0 mg/kg ($p\leq 0,05$), podczas gdy w pozostałych dawkach aktywność przeciwzapalna nie różniła się w sposób istotny od próby kontrolnej. Ponadto w 6 h badania uzyskano również istotne działanie, po podaniu omawianego związku w dawce 0,3 mg/kg (Ryc. 31A.).

Analiza wartości AUC uzyskanych po wyeliminowaniu wpływu czasu na działanie przeciwzapalne badanego związku pozwoliła stwierdzić, iż występowała istotna zmienność między otrzymanymi wartościami [ANOVA I: $F(4,43)=13,001$; $p=0,000$] (Ryc. 31B.). Wykazano, że wartości odpowiadające działaniu przeciwzapalnemu dla związku BB XII/59 w całym zakresie stosowanych dawek różniły się znamienne w stosunku do wartości kontrolnych ($p<0,01$). Zauważono, iż najsilniejsze działanie występowało po podaniu analizowanej substancji w dawce 30,0 mg/kg i różniło się ono w sposób znamieny w stosunku do dawki poprzedzającej (tj. 3,0 mg/kg; $p\leq 0,05$) jak i największej ($p\leq 0,01$).

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

Ryc.31. Wpływ jednorazowego podania BB XII/59 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (*s.c.*) badana przy pomocy pletyzmometru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

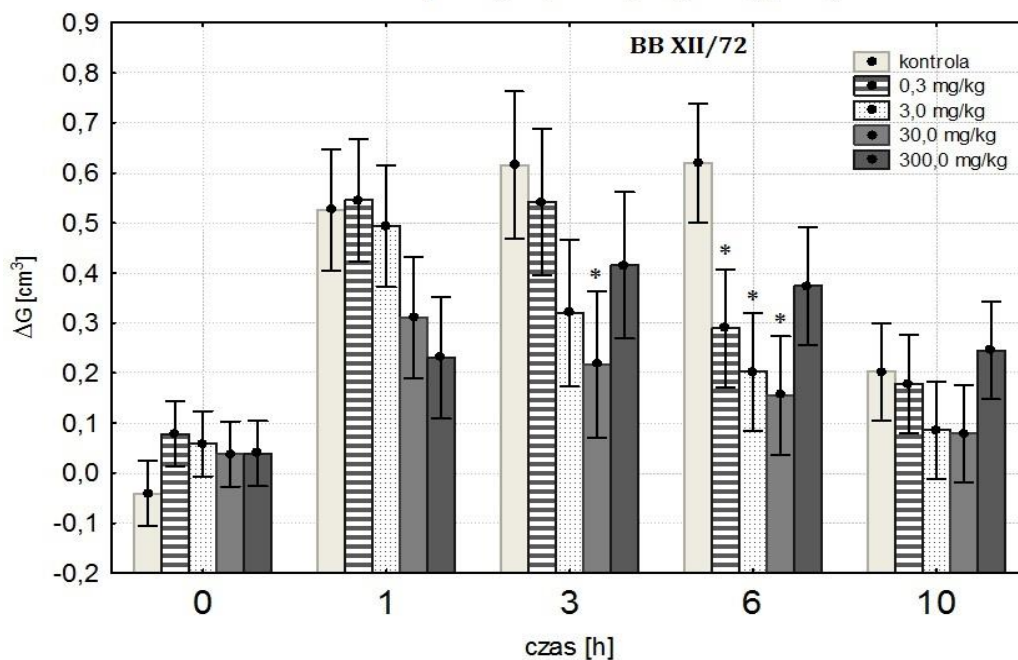
SUBSTANCJA BB XII/72

Zauważono, że podawanie substancji BB XII/72 wykazało istotne statystycznie działanie przeciwzapalne w zastosowanym układzie eksperymentalnym spowodowanych wpływem grupy zwierząt [ANOVA efekt główny $F(4,35)=4,482$; $p=0,000$] oraz wpływem czasu na mierzoną aktywność przeciwzapalną [ANOVA wpływ czasu $F(4,140)=81,469$; $p=0,000$]. Interakcja obu badanych czynników w powyższym układzie wskazała na istotność działania ich obu [ANOVA II, interakcja $F(16,140)=6,909$; $p=0,000$] (Ryc. 32A.).

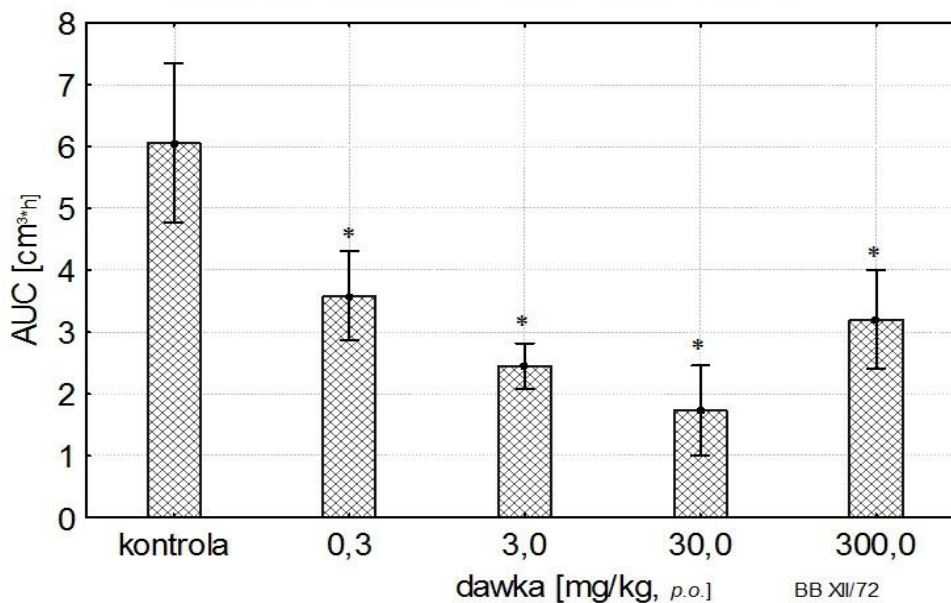
Dalsza analiza *post-hoc* pozwoliła ustalić, iż efektem przeciwzapalnym w odniesieniu do grupy kontrolnej, charakteryzowało się podanie analizowanego związku w dawce: 0,3 mg/kg w czasie 6 h ($p\leq 0,05$), dla dawki 3,0 mg/kg stwierdzono słabą znamienność ($p=0,051$) już w 3 h od rozpoczęcia badania, natomiast istotny statystycznie efekt zauważono w 6 h badania ($p\leq 0,05$), dla dawki 30,0 mg/kg efekt ten pojawił się już w 3 h ($p\leq 0,05$) i był widoczny jeszcze po 6 h ($p\leq 0,01$) względem odpowiednich wartości kontrolnych. Po podaniu związku w BB XII/72 w dawce 300,0 mg/kg nie otrzymano znamienności w omawianym eksperymencie, jedynie w 1 h badania wykazano słabą istotność statystyczną dla otrzymanej wartości działania przeciwzapalnego ($p=0,054$) względem grupy kontrolnej.

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwzapalnej [ANOVA I: $F(4,43)=13,608$; $p=0,000$] (Ryc. 32B.). Stwierdzono, iż otrzymane wartości średnie AUC dla związku BB XII/72 w całym zakresie stosowanych dawek różniły się znamienne w stosunku do wartości kontrolnych ($p\leq 0,01$). Zauważono, iż najsilniejsze działanie występowało po podaniu analizowanej substancji w dawce 30,0 mg/kg i różniło się ono w sposób znamienny w stosunku do dawki najmniejszej (tj. 0,3 mg/kg; $p\leq 0,05$) jak i największej ($p\leq 0,05$).

A.

ANOVA II interakcja: $F(16, 140)=6,908$; $p=0,000$ 

B.

ANOVA: $F(4,43)=13,608$; $p=0,000$ *różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

Ryc.32. Wpływ jednorazowego podania BB XII/72 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmometru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

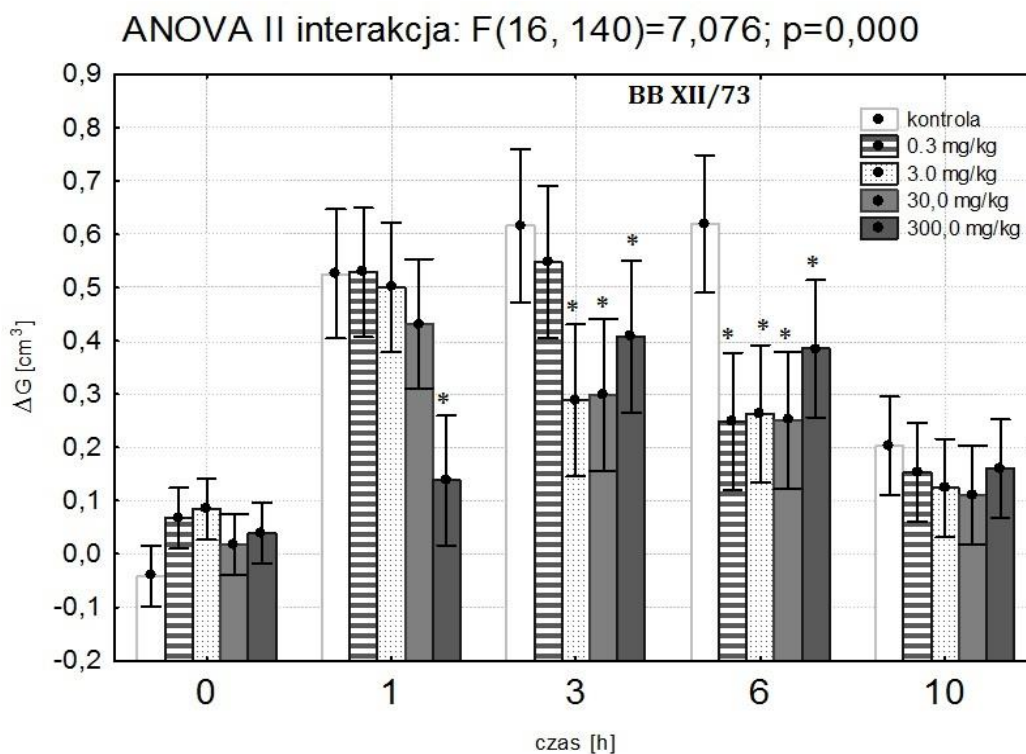
SUBSTANCJA BB XII/73

Analizując wpływ podawania substancji BB XII/73 w poszczególnych dawkach (0,3 – 300,0 mg/kg) na aktywność przeciwzapalną w zastosowanym układzie doświadczalnym zauważono występowanie ogólnej zmienności [ANOVA efekt główny $F(4,53)=5,332$; $p=0,001$] jak również otrzymano znamiennego wpływu czasu na działanie przeciwzapalne [ANOVA wpływ czasu $F(4,212)=79,720$; $p=0,000$]. Równocześnie porównując oba efekty uzyskano interakcję charakteryzującą się istotną statystycznie zmiennością między średnimi [ANOVA II, interakcja $F(16,140)=7,076$; $p=0,000$] (Ryc. 33A.).

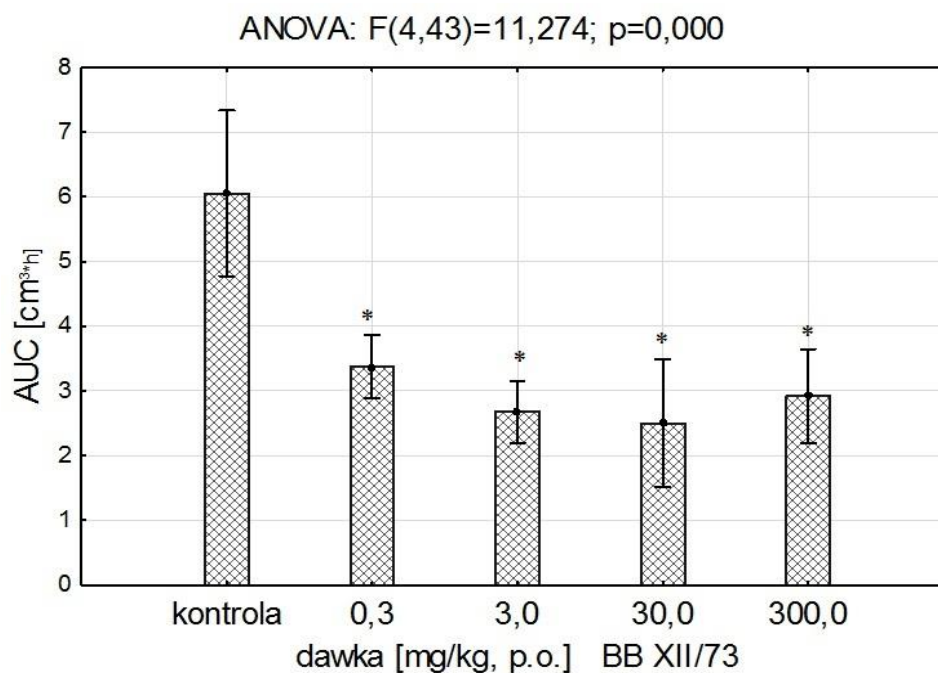
Po dalszej szczegółowej analizie stwierdzono, iż po 1 h badania jedynie BB XII/73 w dawce 300,0 mg/kg wykazywał istotną różnicę wobec odpowiedniej wartości kontrolnej ($p \leq 0,01$), podczas gdy w pozostałych dawkach i nie wykazano znamiennej aktywności przeciwzapalnej. W 3 h w zakresie dawek 3,0 – 300,0 mg/kg analizowana substancja charakteryzowała się istotnym działaniem zmniejszającym obrzęk po podaniu karageniny ($p \leq 0,05$), czego nie zaobserwowano po podaniu związku w najmniejszej dawce 0,3 mg/kg. W kolejnych przedziałach czasowych tj. po 6 i 10 h każda z zastosowanych dawek związku BB XII/73 charakteryzowała aktywność przeciwzapalną, przynajmniej na poziomie istotności $p \leq 0,05$ (Ryc. 33A.).

Analiza wartości AUC uzyskanych po wyeliminowaniu wpływu czasu na działanie przeciwzapalne badanego związku pozwoliła stwierdzić, iż występowała istotna zmienność między otrzymanymi wartościami [ANOVA I: $F(4,43)=11,274$; $p=0,000$]. (Ryc. 33B.). Wykazano, że wartości odpowiadające działaniu przeciwzapalnemu dla związku BB XII/73 w całym zakresie stosowanych dawek różniły się znamienne w stosunku do wartości kontrolnych ($p \leq 0,01$). Zauważono, iż najsilniejsze działanie występowało po podaniu analizowanej substancji w dawce 30,0 mg/kg, jednak otrzymane różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami AUC dla stosowanych dawek nie różniły się w sposób znamienne.

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc.33. Wpływ jednorazowego podania BB XII/73 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmometru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

Wpływ komplementarnych dawek ASA na reakcję zapalną u szczurów po jednorazowym podaniu w teście karageninowym

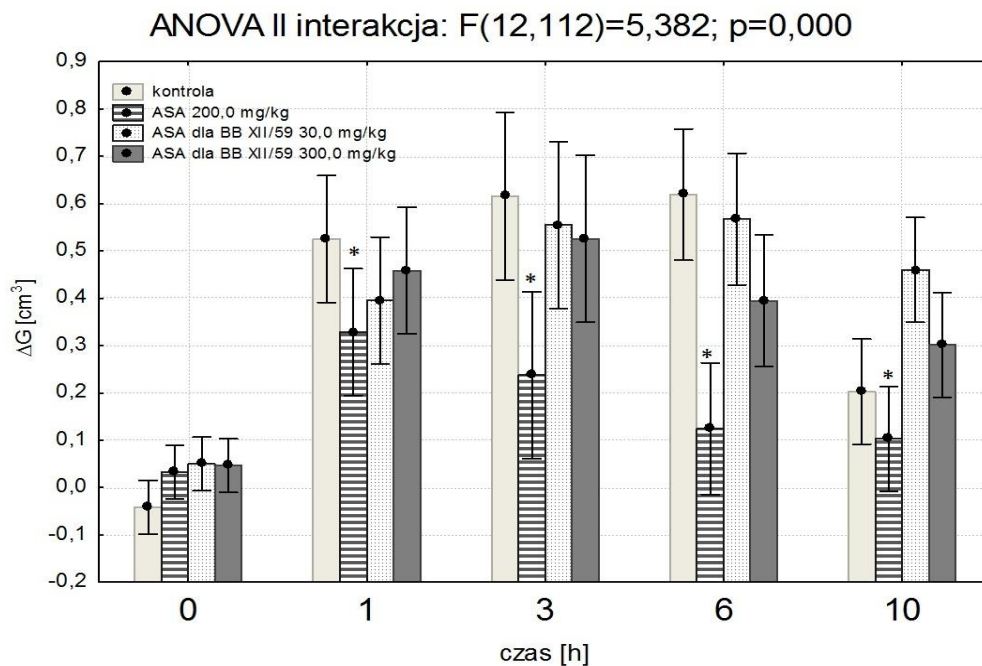
SUBSTANCJA BB XII/59

Nie zauważono występowania ogólnej zmienności w zakresie użytych dawek ASA [ANOVA efekt główny $F(2,21)=0,358$; $p=0,703$], choć wykazano istotność wpływu czasu na aktywność przeciwzapalną w zastosowanym układzie doświadczalnym [ANOVA wpływ czasu $F(4,84)=59,060$; $p=0,000$]. Analizując oddziaływania obu efektów (tj. działania przeciwzapalnego oraz czasu), stwierdzono występowanie istotnej statystycznie zmienności między otrzymanymi wartościami [ANOVA II, interakcja $F(8, 84)=3,505$; $p=0,001$] (Ryc. 34A.).

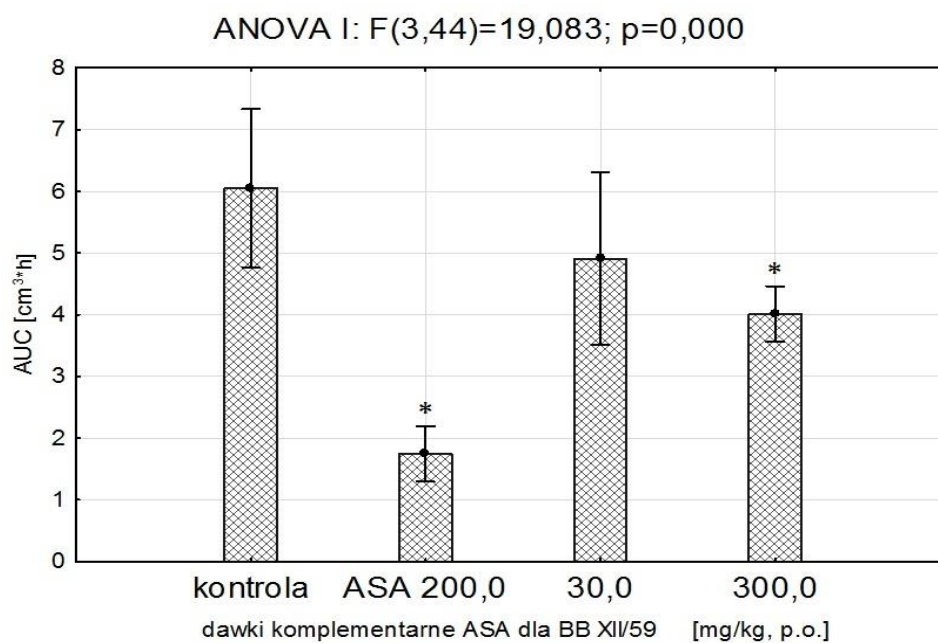
Poddając uzyskane wyniki dalszej analizie stwierdzono, iż już od 1 h dla ASA w dawce referencyjnej 200,0 mg/kg (*p.o.*) wykazano znamienne statystycznie działanie przeciwzapalne we wszystkich przedziałach czasowych ($p\leq 0,01$). Nie wykazano natomiast aktywności ASA wyliczonej dla dawki 30,0 oraz 300,0 mg/kg omawianego związku BB XII/59.

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwzapalnej [ANOVA : $F(3,44)=19,083$; $p=0,000$] (Ryc. 34B.). Dalsza analiza wpływu komplementarnych dawek ASA BB XII/59 wykazała, że dla wartości AUC odpowiadającej dawce 300,0 mg/kg otrzymana różnica w stosunku do wartości AUC dla grupy kontrolnej osiągnęła znamienność statystyczną ($p\leq 0,05$). Ponadto AUC dla ASA podanej w dawce referencyjnej również różniły się znamienne w porównaniu do wartości kontrolnych ($p\leq 0,01$).

A.



B.

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc.34. Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/59 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmometru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

SUBSTANCJA BB XII/72

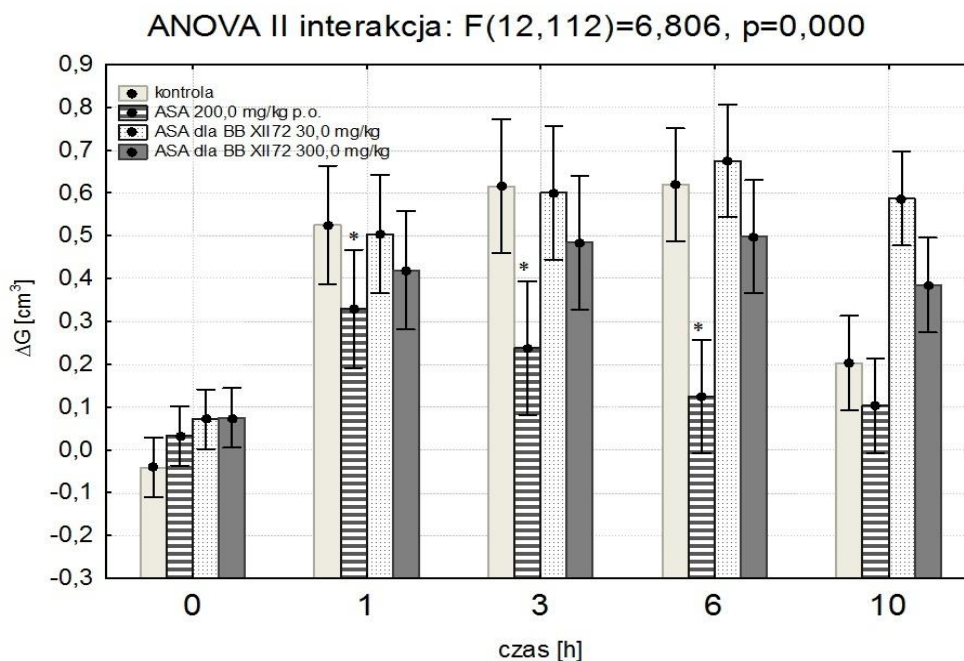
Za pomocą analizy wariancji z powtórzeniami w badanym układzie wskazano na istotny statystycznie wpływ zarówno grupy na aktywność przeciwzapalną [ANOVA: $F(3,28)=8,989$; $p=0,000$], jak i czasu jako czynnika związanego z działaniem przeciwzapalnym w omawianym układzie doświadczalnym [ANOVA: $F(4,112)=68,588$; $p=0,000$]. Wykazano, że również interakcja obu powyższych czynników jest znamienna statystycznie, co wskazuje na istnienie różnic między otrzymanymi wartościami [ANOVA II, interakcja $F(12,122)=6,806$; $p=0,000$] (Ryc. 35A.).

Szczegółowa analiza *post-hoc* (test Duncan'a) wykazała, że jedynie ASA w dawce 200,0 mg/kg (*p.o.*) zmniejszyła obrzęk po podaniu karageniny w 1 h, 3 h ($p\leq 0,05$) oraz 6 h ($p\leq 0,01$) obserwacji w sposób istotny statystycznie w stosunku do odpowiednich wartości kontrolnych.

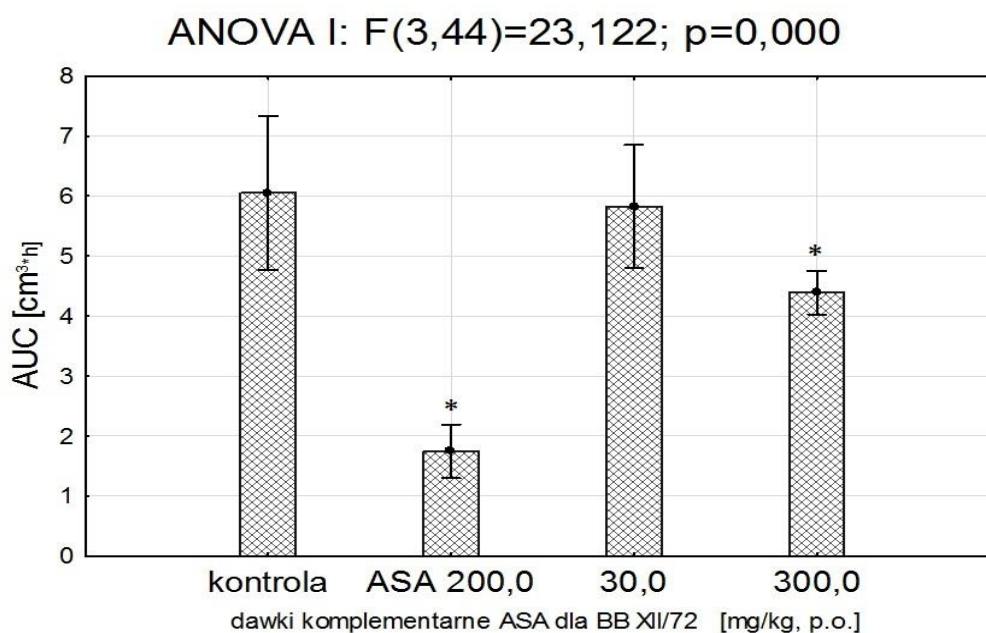
Generalnie nie znaleziono wpływu podania ASA w dawce komplementarnej dla 30,0 i 300,0 mg/kg omawianego związku na aktywność przeciwzapalną. Jedynie słabą znamienność wykazano dla ASA w dawce komplementarnej do 30,0 mg/kg BB XII/72 w 10 h badania ($p=0,055$), jednocześnie dla tego przedziału czasowego zauważono odwrócenie kierunku działania przeciwzapalnego.

Analiza wartości AUC uzyskanych po wyeliminowaniu wpływu czasu na działanie przeciwzapalne w omawianym układzie doświadczalnym badanego związku pozwoliła stwierdzić, iż występowała istotna zmienność między otrzymanymi wartościami [ANOVA I: $F(3,44)=23,122$; $p=0,000$] (Ryc. 35B.). Stwierdzono, że wartości AUC dla dawki referencyjnej oraz komplementarnej dla 300,0 mg/kg BB XII/72 były niższe i różniły się statystycznie znamienne od wartości kontrolnej ($p\leq 0,05$). Natomiast nie zauważono tego efektu dla ASA podanej w dawce komplementarnej dla 30,0 mg/kg omawianego związku.

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc.35. Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/72 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmometru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

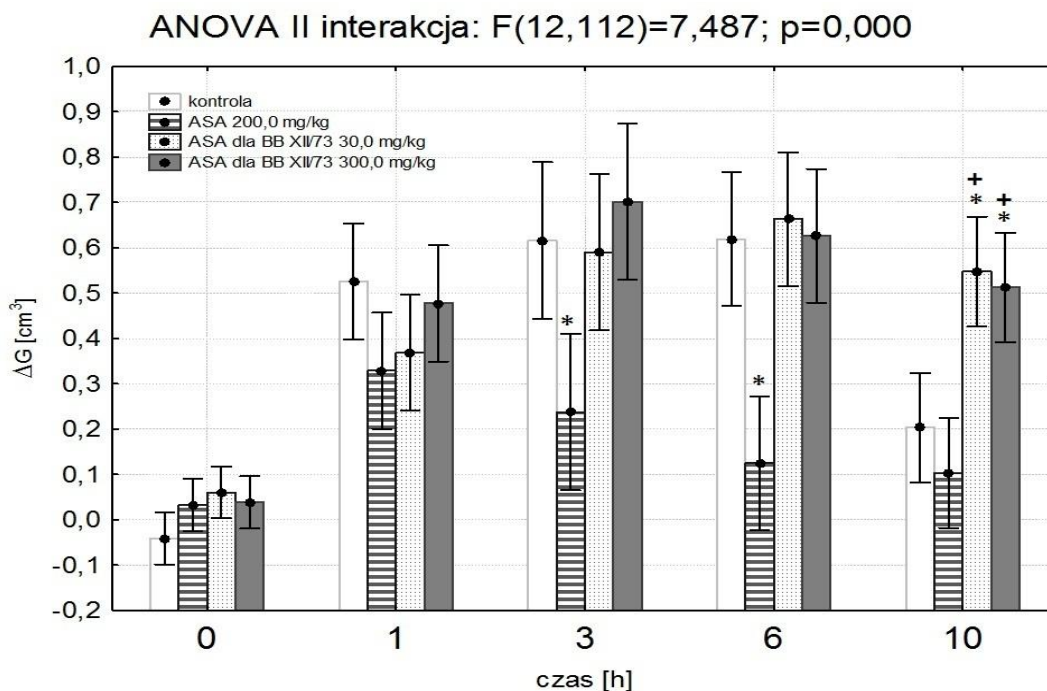
SUBSTANCJA BB XII/73

Zauważono występowanie ogólnej zmienności w zakresie badanych dawek ASA działaniu przeciwzapalnym w podanym układzie doświadczalnym [ANOVA efekt główny $F(3,28)=8,766$; $p=0,000$], jak również wykazano na istotność wpływu czasu na efekt przeciwzapalny [ANOVA wpływ czasu $F(4,112)=72,626$; $p=0,000$]. Rozpatrując oddziaływania powyższych czynników, stwierdzono występowanie silnej zmienności między otrzymanymi wartościami [ANOVA II, interakcja $F(12,112)=7,788$; $p=0,000$] (Ryc. 36A.).

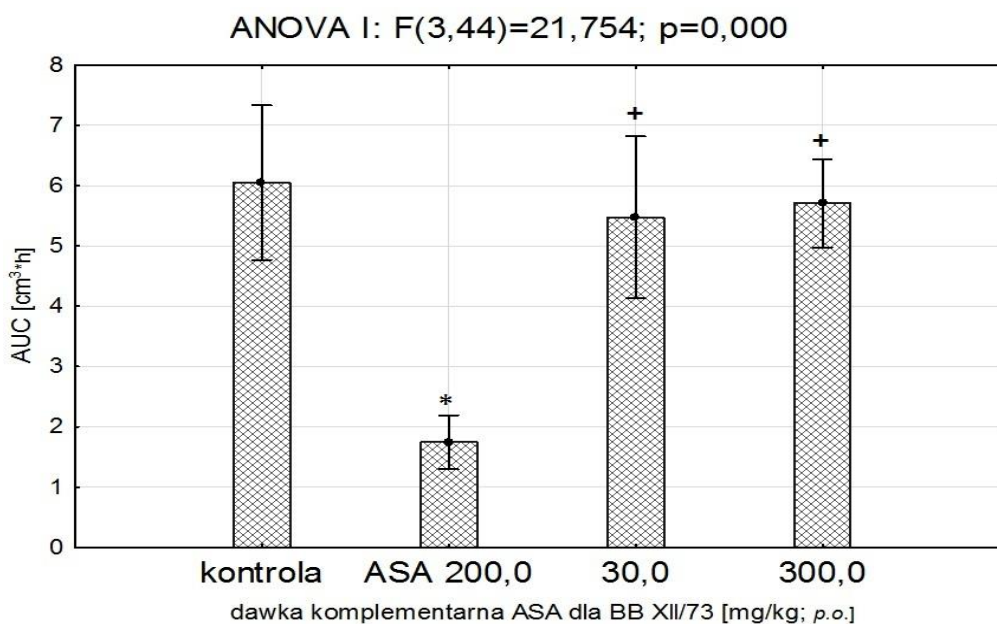
W badanym układzie, działanie przeciwzapalne pojawiło się dopiero w 3 h od rozpoczęcia badania i było wywołane podaniem zwierzętom ASA w dawce 200,0 mg/kg (*p.o.*), które było widoczne jeszcze w 6 h ($p\leq 0,01$), natomiast po 1h otrzymana różnica w stosunku do odpowiednich wartości kontrolnych była słabo znamienne statystycznie ($p=0,0543$). Dla pozostałych badanych grup, tj. o podaniu ASA dawce odpowiadającej 30,0 mg/kg oraz 300,0 mg/kg BB XII/73, efekt przeciwzapalny w omawianych przedziałach czasowych się nie pojawił, natomiast dla ASA w obu stosowanych komplementarnych dawkach w 10 h badania otrzymane różnice były znamienne statystycznie ($p\leq 0,01$), ale jednocześnie dla tego przedziału czasowego zauważono odwrócenie kierunku działania przeciwzapalnego.

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwzapalnej [ANOVA I: $F(3,44)=21,754$; $p=0,000$] (Ryc. 36B.). Dalsza analiza wpływu komplementarnych dawek ASA BB XII/73 wykazała, że otrzymane wartości AUC nie różniły się znamienne względem wartości kontrolnej, a tylko dla ASA podanej w dawce referencyjnej stwierdzono wyraźne, statystycznie istotne zmniejszenie wartości AUC ($p\leq 0,01$).

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
 +różnice znamienne statystycznie względem ASA 200,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

Ryc.36. Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/73 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmometru”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

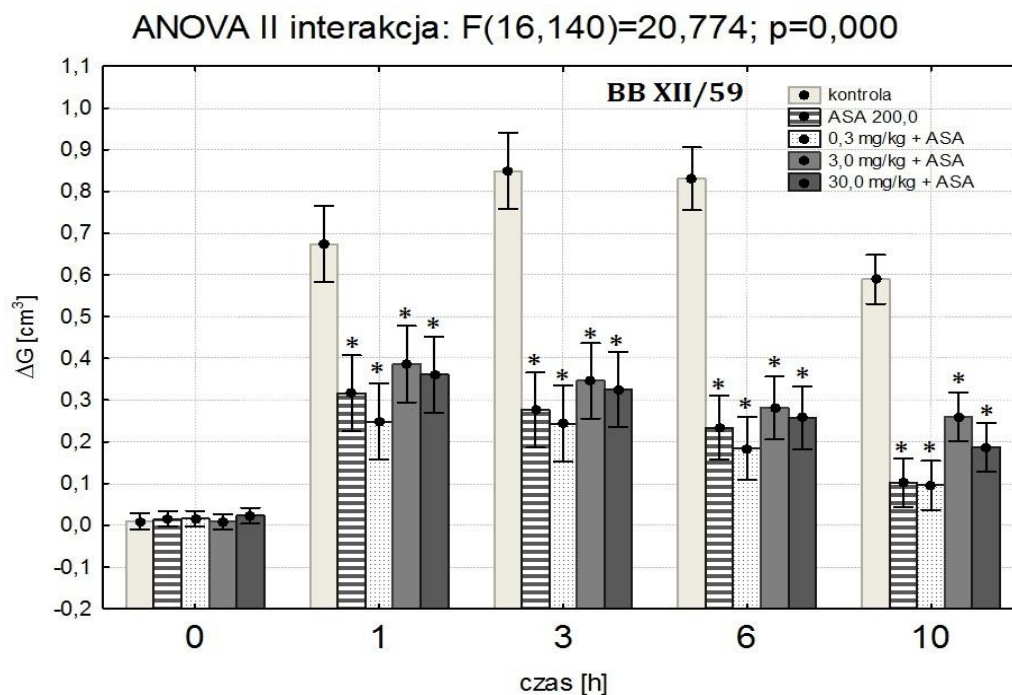
Wpływ łącznego, jednorazowego podania badanych pochodnych kwasu oleanolowego z ASA na reakcję zapalną u szczurów w teście karageninowym.**SUBSTANCJA BB XII/59**

Stwierdzono, że w układzie doświadczalnym na który składało się podawanie substancji BB XII/59 w zakresie stosowanych dawek (0,3 – 30,0 mg/kg) razem z ASA oraz porównanie ich z działaniem samej substancji referencyjnej (ASA) wraz odpowiednią grupą kontrolną wykazywało istotne statystycznie ogólne działanie przeciwzapalne [ANOVA efekt główny $F(4,35)=38,936$; $p=0,000$]. Wykazano ponadto istotność wpływu czasu na efekt działania przeciwzapalnego [ANOVA wpływ czasu $F(4,140)=231,520$; $p=0,000$], jak również uzyskano wysoką znamienność dla wyników interakcji obu powyższych czynników [ANOVA II: interakcja $F(16,140)=20,774$; $p=0,000$] (Ryc. 37A.).

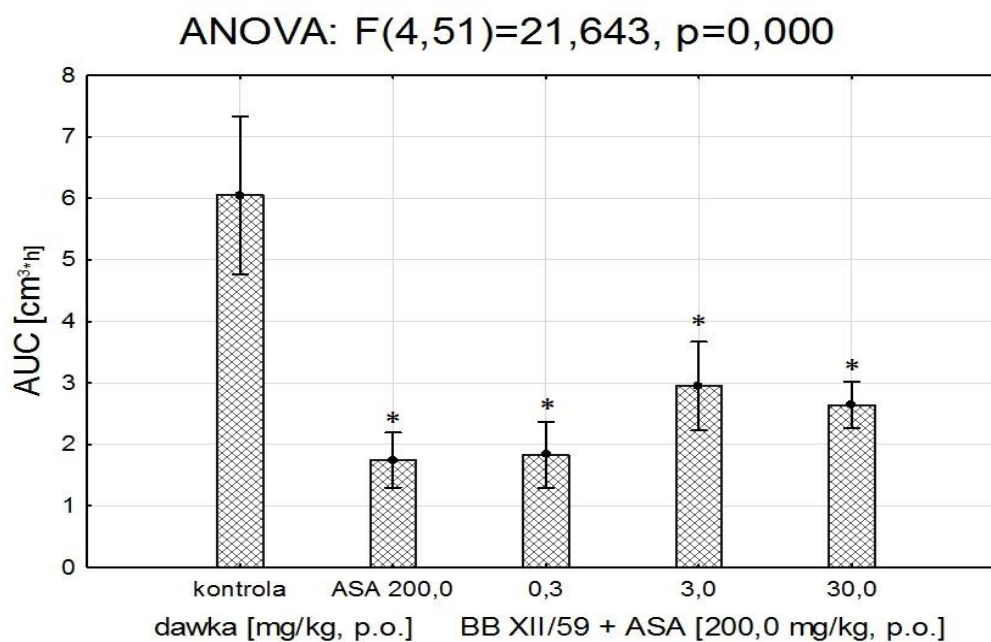
Dalsza analiza pozwoliła wykazać, że w każdym przedziale czasowym od 60 min do 10 h, zarówno ASA w dawce referencyjnej 200,0 mg/kg oraz kombinacja ASA z BB XII/59 we wszystkich zastosowanych dawkach wykazały wysoką znamienność dla działania przeciwzapalnego względem odpowiednich wartości kontrolnych ($p\leq 0,01$). Porównując ze sobą natomiast ASA oraz równoczesne podanie ASA z kolejnymi dawkami BB XII/59 nie zaobserwowano znamienności różnic otrzymanych wartości dla żadnego z badanych przedziałów czasowych.

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwzapalnej po łącznym podaniu ASA w dawce referencyjnej oraz BB XII/59 u szczurów (ANOVA I: $F(4,51)=21,644$; $p=0,000$) (Ryc. 37B.). Stwierdzono, że zarówno podanie ASA w dawce referencyjnej jak i po podaniu łącznym z BB XII/59 we wszystkich zastosowanych dawkach (0,3 – 30,0 mg/kg) otrzymane wartości AUC różniły się znamienne w stosunku do wartości kontrolnych ($p\leq 0,01$). Natomiast nie zaobserwowano znamiennego synergistycznego działania badanego związku z ASA, ponieważ otrzymane wartości AUC dla łącznego podania BB XII/59 we wszystkich zastosowanych dawkach nie różniły się znamienne względem wartości dla ASA w dawce referencyjnej 200,0 mg/kg.

A.



B.

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc.37. Wpływ łącznego, jednorazowego podania BB XII/59 z ASA na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (*s.c.*) badane za pomocą pletyzmometru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

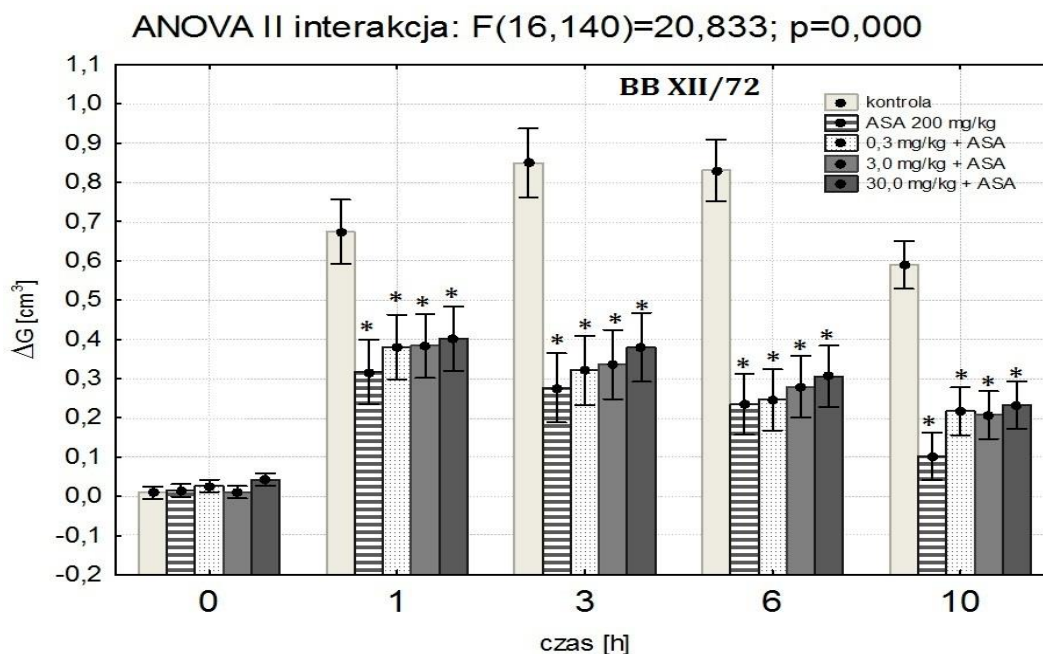
SUBSTANCJA BB XII/72

W badanym układzie doświadczalnym stwierdzono występowanie istotnej zmienności uzyskanych wyników związanych z działaniem przeciwzapalnym po łącznym podaniu ASA w dawce referencyjnej oraz BB XII/72 u szczurów [ANOVA efekt główny $F(4,35)=34,159$; $p=0,000$], a także wskazano istotność wpływu czasu na aktywność zmniejszającą obrzęk po podaniu karageniny w badanym układzie [ANOVA wpływ czasu $F(4,140)=284,261$; $p=0,000$]. Jednocześnie analiza interakcji obu badanych czynników w tym układzie wskazała na znamienność działania ich obu [ANOVA II, interakcja $F(16,140)=20,833$; $p=0,000$] (Ryc. 38A.).

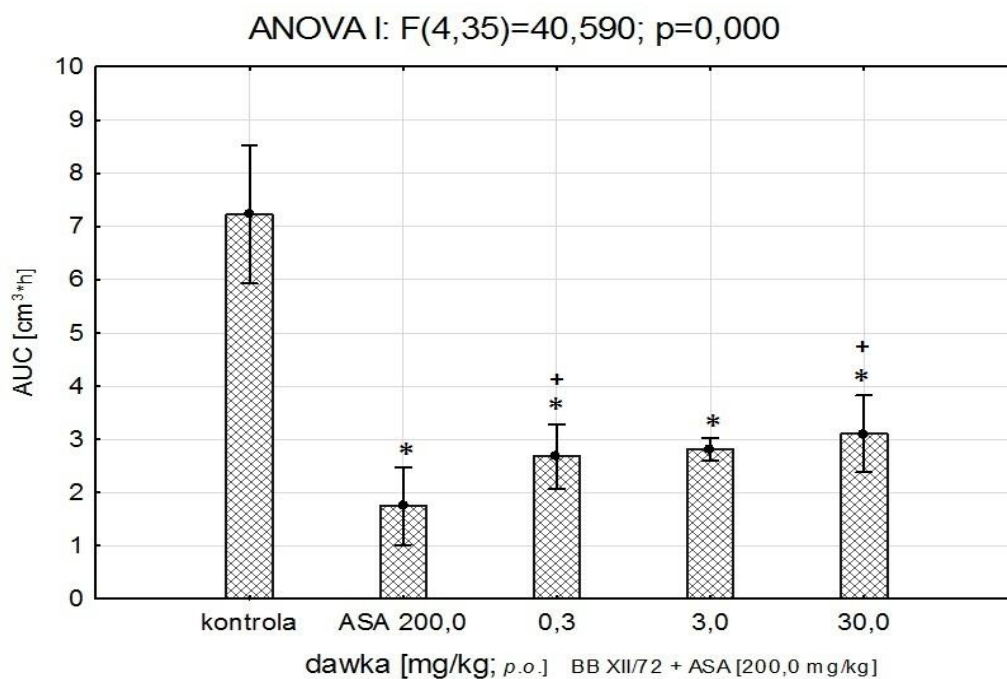
Analiza *post-hoc* wykazała jednoznacznie, że zarówno ASA w dawce 200,0 mg/kg (*p.o.*) oraz po łącznym podaniu ASA z BB XII/72 w całym zakresie stosowanych dawek (0,3 – 30,0 mg/kg) przejawiała aktywność przeciwzapalną w czasie 1, 3, 6 oraz 10 godzin ($p\leq 0,01$) względem odpowiednich wartości dla grupy kontrolnej, której podawano wyłącznie *vehiculum*. Wykazano również, że działanie to nie różniło się pomiędzy badanymi grupami po łącznym podaniu ASA z BB XII/72 we wszystkich dawkach a samym ASA ($p>0,05$).

Analiza wartości AUC uzyskanych po wyeliminowaniu wpływu czasu na działanie przeciwzapalne w omawianym układzie doświadczalnym badanego związku pozwoliła stwierdzić, iż występowała istotna zmienność między otrzymanymi wartościami [ANOVA I: $F(4,35)=40,589$; $p=0,000$] (Ryc. 38B.). Stwierdzono ponadto, że wszystkie uzyskane wartości AUC były znamienne niższe niż wartości kontrolne ($p\leq 0,01$). Niemniej jednak, na podstawie tej analizy zauważono, że łączne podanie ASA oraz BB XII/72 w dawkach 0,3 – 30,0 mg/kg wyraźnie słabiej działało, bowiem uzyskane wartości AUC dla łącznego podania były znamienne wyższe (dla 0,3 i 30,0 mg/kg) niż otrzymane dla ASA w dawce 200,0 mg/kg ($p\leq 0,05$). Dla BB XII/72 w dawce 3,0 mg/kg podanej łącznie z ASA różnica w stosunku do wartości dla ASA w dawce referencyjnej była słabo znamienna ($p=0,0568$).

A.



B.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)
 +różnice znamienne statystycznie względem ASA 200,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc.38. Wpływ łącznego, jednorazowego podania BB XII/72 z ASA na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmometru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

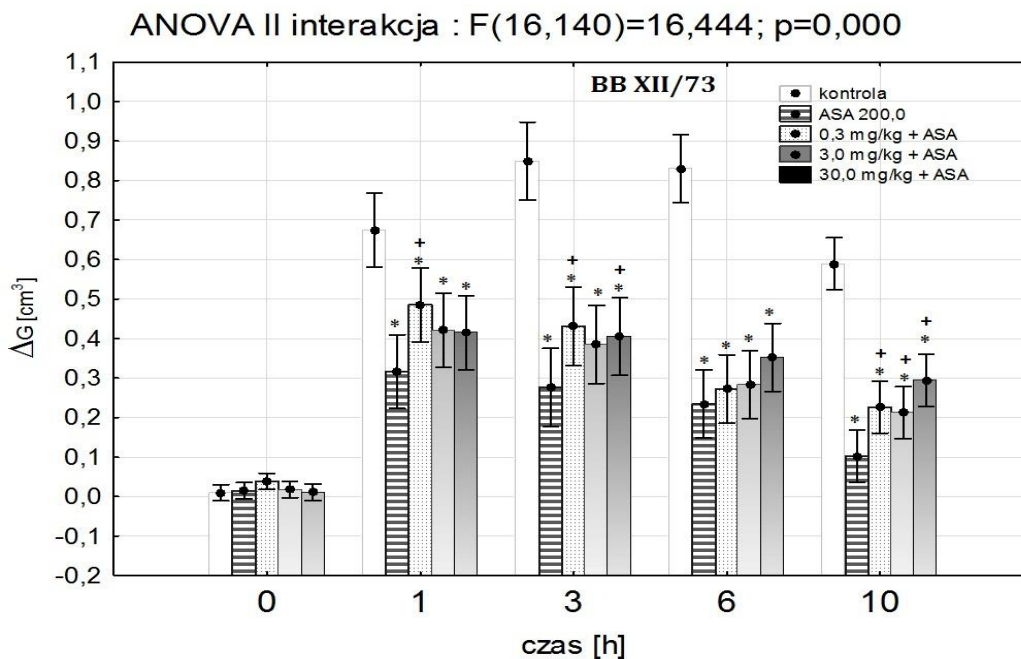
SUBSTANCJA BB XII/73

Stwierdzono, że w układzie doświadczalnym na który składało się podawanie substancji BB XII/73 w zakresie stosowanych dawek (0,3 – 30,0 mg/kg) razem z ASA oraz porównanie ich z działaniem samej substancji referencyjnej (ASA) wraz odpowiednią grupą kontrolną wykazywało istotne statystycznie działanie przeciwwzapalne ze względu na otrzymanie ogólnej zmienności między badanymi wartościami [ANOVA efekt główny $F(4,35)=24,452$; $p=0,000$]. Wykazano ponadto istotny wpływ czasu na aktywność przeciwwzapalną [ANOVA wpływ czasu $F(4,140)=269,140$; $p=0,000$] oraz po zbadaniu interakcji obu efektów stwierdzono wysoką znamienność ich obu w omawianym eksperymencie [ANOVA II, interakcja $F(16,140)=16,444$; $p=0,000$] (Ryc. 39A.).

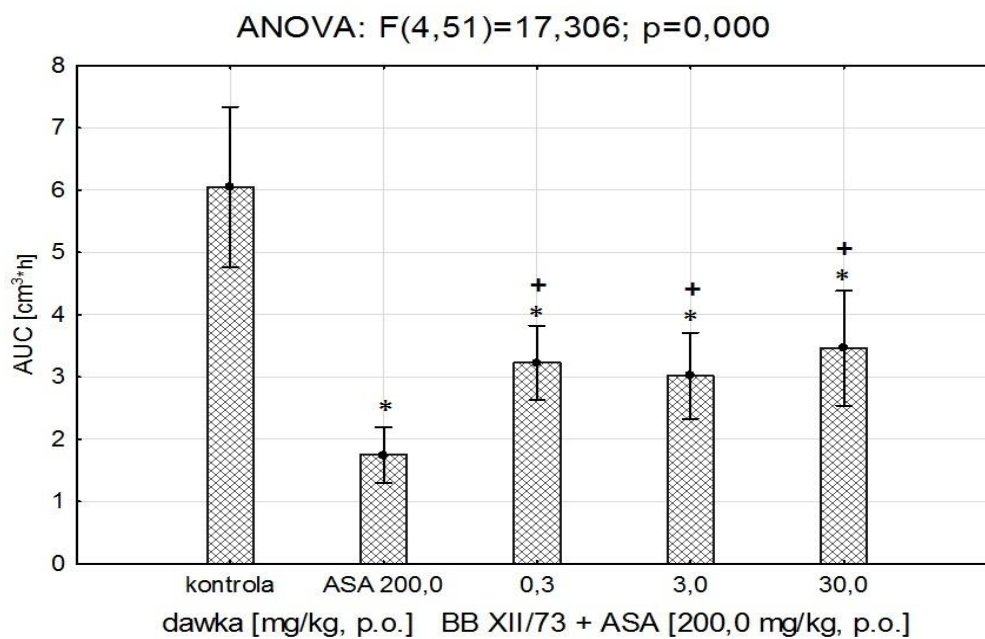
Dokładna analiza powyższej interakcji pozwoliła wskazać na znamiennej aktywność przeciwwzapalną wszystkich badanych grup względem odpowiednich wartości dla grupy kontrolnej w przedziale 1 – 10 h. Uzyskano także znamienność w stosunku do działania ASA w dawce 200,0 mg/kg dla wspólnego podania ASA z omawianym związkiem w dawce 0,3 mg/kg w czasie 1, 3 oraz 10 h, co skutkowało słabszą aktywnością przeciwwzapalną. Dla ASA podanego łącznie z BB XII/73 w dawce 3,0 mg/kg istotnie zmniejszone działanie przeciwwzapalne zaobserwowano w 10 h badania (w pozostałych przedziałach czasowych otrzymane różnice były słabo znamienne statystycznie $p \leq 0,05$). Natomiast dla ASA w połączeniu ze związkiem w dawce 30,0 mg/kg istotne zmniejszenie aktywności ASA wykazano w czasie 3 oraz 10 h (dla przedziału czasowego 6 h różnica była słabo istotne statystycznie, $p \leq 0,05$).

Po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na AUC uzyskano istotne różnice między średnimi w zakresie aktywności przeciwwzapalnej po łącznym podaniu ASA w dawce referencyjnej oraz BB XII/73 u szczurów (ANOVA I: $F(4,35)=30,455$; $p=0,000$). (Ryc. 39B.). W dalszej części analizy statystycznej stwierdzono, że otrzymane wartości AUC wyraźnie były mniejsze i znamienne różniły się od wartości kontrolnej. Jednocześnie zauważono, iż podanie łącznie analizowanego związku we wszystkich dawkach (0,3 – 30,0 mg/kg) istotne spowodowało wzrost wartości AUC w stosunku do AUC dla samego ASA ($p \leq 0,05$), było związane z osłabieniem działania przeciwwzapalnego ASA.

A.



B.

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)+różnice znamienne statystycznie względem ASA 200,0 mg/kg ($p \leq 0,05$)Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc.39. Wpływ łącznego, jednorazowego podania BB XII/73 z ASA na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmometru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

5.5 OKREŚLENIE WPŁYWU ZJAWISKA TOLERANCJI DLA NAJBARDZIEJ AKTYWNEJ SUBSTANCJI

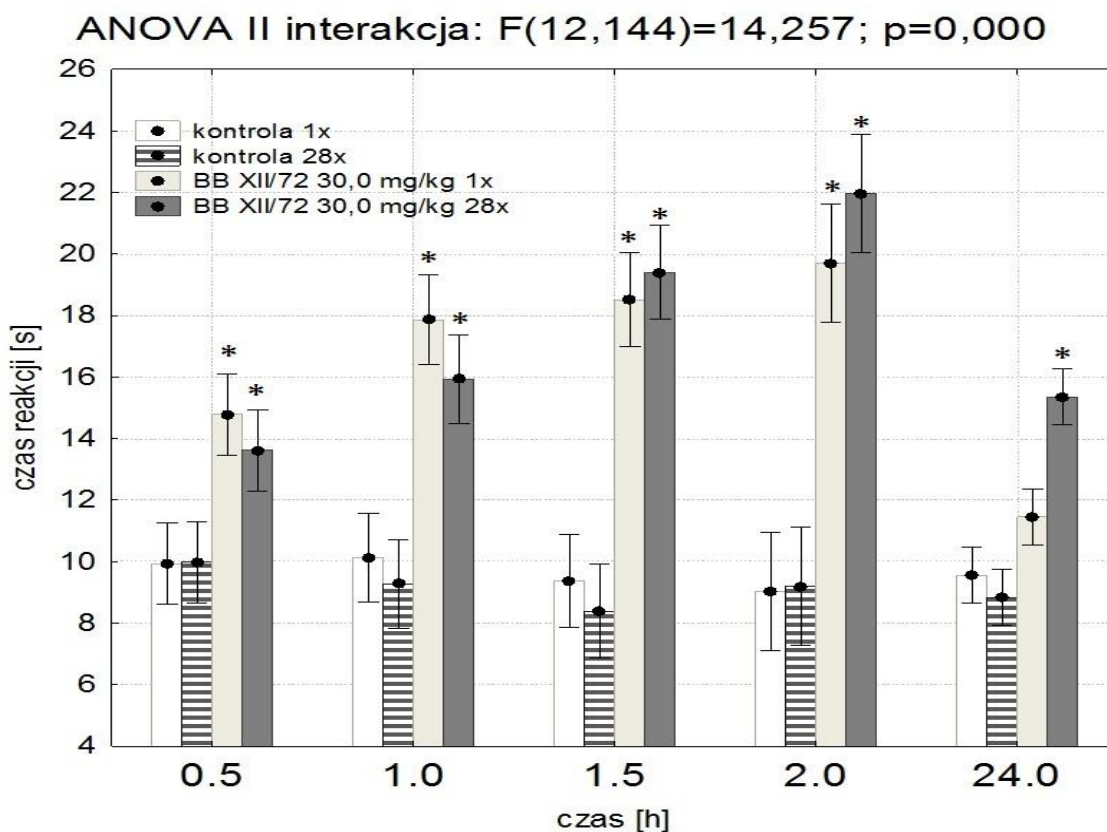
Badania nad wpływem wielokrotnego podawania badanych związków na działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne przeprowadzono z wykorzystaniem substancji **BB XII/72** w dawce **30,0 mg/kg m.c.**

Wpływ na działanie przeciwbólowe

W zastosowanym układzie doświadczalnym wykazano ogólną zmienność pomiędzy badanymi średnimi [ANOVA efekt główny $F(3,36)=76,196$; $p=0,000$] oraz wykazano istotny wpływ czasu na działanie przeciwbólowe z wykorzystaniem testu *hot-plate* [ANOVA: $F(4,144)=25,000$; $p=0,000$]. Tym samym analiza interakcji obu badanych czynników w przyjętym teście wskazała na istotność działania obu [ANOVA: $F(12,144)=14,257$; $p=0,000$] (Ryc. 40.).

Analiza *post-hoc* (test Duncan'a) wskazała występowanie efektu przeciwbólowego badanej substancji w dawce 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*), po podaniu jednorazowym w przedziale czasowym 0,5 – 2,0 h ($p<0,01$), nie znaleziono natomiast potwierdzenia aktywności po upływie 24,0 h względem próby kontrolnej.

Dla substancji BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg m.c. (*p.o.*) podawanej grupie badanych zwierząt raz na dobę przez okres 28 dni wykryto istotne działanie przeciwbólowe dla czasu 0,5 h ($p<0,05$) oraz dla przedziału 1,0 – 24,0 h ($p<0,01$). Nie potwierdzono ewentualnego wpływu zjawiska tolerancji podawanej substancji na aktywność antynocyceptywną u obserwowanych myszy oraz nie wykryto istotnych różnic w działaniu BB XII/72 pomiędzy grupą zwierząt otrzymujących substancję jednokrotnie z grupą myszy otrzymujących badany związek przez 4 tygodnie.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

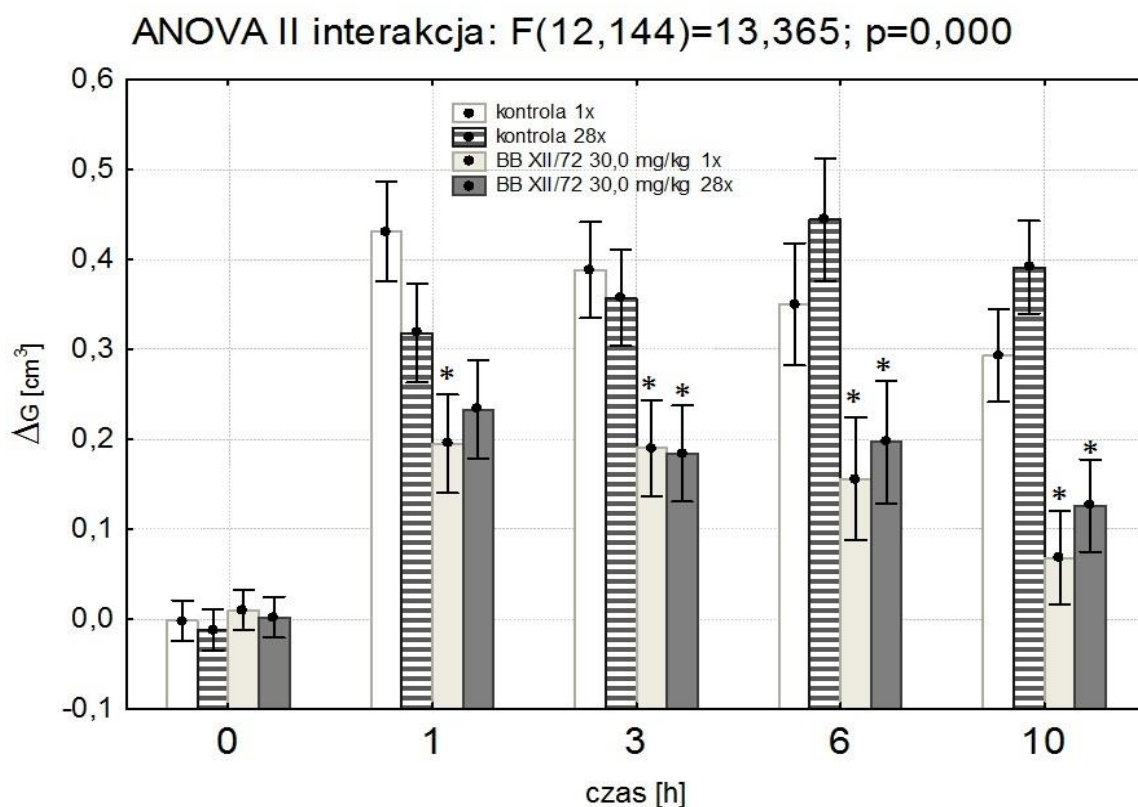
Ryc.40. Wpływ jednorazowego oraz wielokrotnego podania BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg (*p.o.*) na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate” oraz zbadanie zjawiska tolerancji: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu.

Wpływ na działanie przeciwzapalne

Stwierdzono, że w układzie doświadczalnym badającym wpływ podawania BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg m.c. na aktywność przeciwzapalną, badana substancja wykazała istotne statystycznie działanie ze względu na otrzymanie ogólnej zmienności między badanymi wartościami [ANOVA: $F(3,36)=23,264$; $p=0,000$]. Wykazano ponadto istotny wpływ czasu na aktywność przeciwzapalną [ANOVA: $F(4,144)=168,07$; $p=0,000$] oraz po zbadaniu interakcji obu efektów stwierdzono wysoką znamienność ich obu w omawianym eksperymencie [ANOVA II, interakcja $F(12,144)=13,365$; $p=0,000$] (Ryc. 41.).

Dokładna analiza powyższej interakcji za pomocą testu Duncan'a, pozwoliła wskazać na znamienne aktywność przeciwzapalną substancji BB XII/72 podanej

jednorazowo pierwszego dnia testu względem odpowiednich wartości dla grupy kontrolnej w przedziale 1 – 10 h ($p < 0,01$). Dla zwierząt otrzymujących substancję badaną przez kolejne 4 tygodnie wykryto znamienne statystycznie działanie przeciwzapalne dla przedziału 3 – 10 h ($p < 0,01$), nie stwierdzono natomiast różnic względem kontroli po pierwszej godzinie od rozpoczęcia eksperymentu. Ponadto nie zauważono znamienych różnic w działaniu przeciwzapalnym porównując otrzymane wartości testowe po podaniu jedno- i wielokrotnym dla poszczególnych punktów czasowych.



*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Ryc.41. Wpływ jednorazowego oraz wielokrotnego podania BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg (*p.o.*) na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (*s.c.*) oraz zbadanie zjawiska tolerancji: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu.

5.6 WPŁYW POCHODNEJ KWASU OLEANOLEWEGO NA STĘŻNIA WYBRANYCH INTERLEUKIN WE KRWI SZCZURÓW

Analizując profil działania BB XII/72 w najbardziej efektywnej dawce postanowiono określić jej wpływ na poziomy wybranych prozapalnych interleukin we krwi obwodowej szczura. Stwierdzono, że związek ten obniżał stężenie zarówno TNF- α jak i IL-6, chociaż tylko w przypadku IL-6 otrzymane różnice osiągnęły znamienność statystyczną ($p < 0.05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Wpływ wielokrotnego podawania pochodnej kwasu oleanolowego na stężenie wybranych prozapalnych cytokin we krwi obwodowej szczurów

Grupa (po 28 dniach podawania)	N	TNF- α [pg/ml]	IL-6 [pg/ml]
Kontrola	9	1494 \pm 332	55,4 \pm 1,6
BB XII/72 30,0 mg/kg	10	1099 \pm 201	49,3 \pm0,8*

N - ilość ważnych prób

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

5.7. WPLYW POCHODNEJ KWASU OLEANOLEWEGO NA EKSPRESJĘ mRNA WYBRANYCH INTERLEUKIN U SZCZURÓW

Oceniając profil działania BB XII/72 w najbardziej efektywnej dawce postanowiono określić jej wpływ ekspresję mRNA dla genów wybranych prozapalnych interleukin u szczurów. Stwierdzono, że związek ten jednoznacznie zmniejszał ekspresję mRNA dla IL-6 o ok. 40% w stosunku do wartości otrzymanych u zwierząt kontrolnych ($p < 0.05$) (Tabela 6). Natomiast dla TNF- α kierunek działania był odmienny, ponieważ wielokrotne podawanie BB XII/72 zwiększyło ekspresję dla genu tej cytokiny przeszło dwukrotnie ($p < 0.05$).

Tabela 6. Wpływ wielokrotnego podawania pochodnej kwasu oleanolowego na ekspresję mRNA dla wybranych prozapalnych cytokin u szczurów.

Grupa (po 28 dniach podawania)	N	mRNA TNF- α [%]	mRNA IL-6 [%]
Kontrola	10	100 \pm 7	100 \pm 15
BB XII/72 30,0 mg/kg	10	211 \pm 29*	60 \pm 5*

N - ilość ważnych prób

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm SEM

Otrzymane dane obliczono dla ilorazu mRNA TNF- α /mRNA GADPH lub mRNA IL-6 /mRNA GADPH i wyrażono w %.

5.8. WPLYW POCHODNEJ KWASU OLEANOLEWEGO NA EKSPRESJĘ mRNA TLR1 I TLR3 U SZCZURÓW

Oceniano również wpływ wielokrotnego podawania pochodnej BB XII /72 na ekspresję mRNA TLR1 i TLR3. Stwierdzono, że analizowana pochodna do 28-dniach podawania w dawce 30 mg/kg, p.o. zwiększała ekspresję TLR1 w stosunku do wartości otrzymanych w grupie kontrolnej ($p < 0.05$) (Tabela 7). Takiego efektu nie zauważono jednak dla ekspresji mRNA TLR3, które praktycznie pozostała na poziomie bliskim wartości kontrolnych, a niewielki 8% wzrost nie osiągnął znamienności statystycznej.

Tabela 7. Wpływ wielokrotnego podawania pochodnej kwasu oleanolowego na ekspresję mRNA dla wybranych receptorów Toll-podobnych (TLR) u szczurów.

Grupa (po 28 dniach podawania)	N	mRNA TLR1 [%]	mRNA TLR3 [%]
Kontrola	10	100 ± 10	100 ± 13
BB XII/72 30,0 mg/kg	10	138 ± 13*	108 ± 19

N – ilość ważnych prób

*różnice znamienne statystycznie względem grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$)

Wartości przedstawione jako średnie arytmetyczne ±SEM

Otrzymane dane obliczono dla ilorazu mRNA TLR1/mRNA GAPDH lub mRNA TLR3/mRNA GAPDH i wyrażono w %.

6. Dyskusja i omówienie wyników

W kręgu zainteresowania niniejszej pracy znalazły się trzy nowe syntetyczne pochodne kwasu oleanolowego i kwasu acetylosalicylowego: BB XII/73: będąca kwasem 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owym, BB XII/72: morfolidem kwasu 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owego oraz BB XII/59: estrem metylowym kwasu 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owego, uzyskanych przez zespół badaczy pod kierunkiem Prof. dr hab. Lucjusza Zaprutko z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Jako leki wzorcowe do badania wybrano kwas acetylosalicylowy (ASA), lek z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych o nieselektywnym działaniu wobec obu izoform enzymu cyklooksygenazy, COX-1 oraz COX-2, jak również dwa leki działające poprzez centralne receptory opioidowe – morfinę (MF) oraz nalokson (NL).

O wyborze ASA jako leku referencyjnego w hamowaniu reakcji zapalnej zdecydował przede wszystkim fakt, iż jest to jeden z najczęściej stosowanych preparatów w zwalczaniu zapalenia, szeroko dostępnym bez konieczności przepisu lekarza oraz o udowodnionej aktywności przeciwzapalnej. Z drugiej strony, wybrano ten właśnie związek ze względu na jego obecność w strukturze badanych substancji. W tym celu postanowiono porównać działanie przeciwzapalne ASA z nowo zsyntezowanymi strukturami chemicznymi i zbadać czy ewentualne uwolnienie cząsteczki salicylanu w procesie wchłaniania lub dystrybucji nie będzie miał wpływu na wynik wykonywanych testów. W celu zahamowania stanu zapalnego u szczurów po podaniu karageniny wybrano dawkę 200,0 mg/kg *p.o.* [Guilhon C.C. *i wsp.*, 2011; Marinho D.G. *i wsp.*, 2011; Raymundo L.J. *i wsp.*, 2011], natomiast w modelu z zastosowaniem czynnika termicznego (test *hot-plate*) u myszy, dawkę 300,0 mg/kg *p.o.* [Heidari M.R. *i wsp.*, 2004].

W celu sprawdzenia czy badane substancje wykazują aktywność antynocyceptywną związaną z interakcją poprzez układ opioidowy, postanowiono w badaniu z wykorzystaniem testu *hot-plate* porównać ich aktywność z czystym agonistą receptorów opioidowych, MF. Sugerując się wcześniejszymi badaniami prowadzonymi w Katedrze Farmakologii wybrano w tym celu dawkę 5,0 mg/kg podawaną zwierzętom podskórnie [Siekierkowska A. *i wsp.*, 2007] oraz mieściła się w zakresie dawek stosowanych przez innych badaczy [Maldonado R. *i wsp.*, 1998; Sammons M.J. *i wsp.*, 2000;

Tsai Y-Ch. i wsp., 2000]. W ten sam sposób podawano NL, będący antagonistą tych samych receptorów w dawce 3,0 mg/kg [Bodnar R.J. i wsp., 1978; Mena N.B. i wsp., 1996; Li G. i wsp., 2004; McGaraughty S. i wsp., 2005].

W celu uzyskania informacji czy badana substancja posiada właściwości antynocyceptywne, często wykorzystuje się trzy bólowe testy termiczne: test z wykorzystaniem gorącej płytki (z ang. *hot-plate test*), test usuwania ogona (z ang. *tail-flick test*) oraz test zanurzenia ogona (z ang. *tail immersion test*). W celu wykazania ewentualnego działania hamującego powstawanie i rozprzestrzenianie się procesu zapalnego, wywołuje się obrzęk łapy albo ucha zwierzęcia doświadczalnego za pomocą podania niewielkiej ilości substancji drażniącej. Najczęściej są to substancje wysoko immunogenne, takie jak cząsteczka lipopolisacharydu, alergeny, TPA, karagenia, kwasy i aldehydy. W niniejszej pracy wykorzystano test *hot-plate* jako test weryfikujący wpływ badanych substancji na aktywność przeciwbólową u badanych zwierząt oraz sprawdzono wpływ na działanie przeciwzapalne po wywołaniu obrzęku za pomocą 1% roztworu karageniny, po podaniu której pojawia się stan zapalny z wszystkimi charakterystycznymi znamionami dla reakcji zapalnej (zwiększenie ciepłoty ciała, zaczerwienie, ból, obrzęk, wpływ na zmianę funkcjonowania tkanki lub narządu). Zmiany w przyroście łapy zwierzęcia zbadano wykorzystując pletyzmometr [Safayhi H. i wsp., 1997; Guay J. i wsp., 2004; Jung H.J. i wsp., 2005].

W pierwszym etapie zaplanowanych doświadczeń przeprowadzono test toksyczności ostrej granicznej metodą ustalonej dawki. Zdecydowano się na powyższą metodę ze względu na przeprowadzone wcześniej badania toksyczności ostrej prowadzone na podobnej grupie związków [Bednarczyk-Cwynar B. i wsp., 2012], w której ustalono, iż dawka graniczna określana wg OECD 2,0 g/kg jest dawką stosunkowo bezpieczną, nie powodująca zgonu lub agonii badanych zwierząt. Z podanych powyżej wyników obserwacji wynika, iż badane substancje: BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 charakteryzują się bardzo niską toksycznością wynosząca co najmniej 2,0 g/kg m.c.

W kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić czy badane substancje wpływają w sposób znamieny na ruchliwość zwierząt, co było niezbędne aby właściwie interpretować wyniki w teście bólowym *hot-plate*. Nadmierne pobudzenie u badanych zwierząt mogłoby zamaskować ewentualny efekt przeciwbólowy badanej substancji poprzez zwiększenie ruchliwości i skrócenie czasu pozostawienia łap na powierzchni płyty, sedacja natomiast ewentualnie sugerować ocenianą aktywność, poprzez wydłużenie tego czasu. Badanie to wykonuje się również w celu uzyskania odpowiedzi czy nowa

substancja posiada wpływ na zachowanie behawioralne, badając m.in. aspekty poznawcze i odczuwanie lęku [Piazza P.V. i wsp., 1989; Cools A.R.; Gringras M.A., 1998].

Dla substancji BB XII/59 oraz BB XII/73 nie stwierdzono znamienych różnic w ruchliwości poziomej dla żadnej zastosowanej dawki w stosunku do grupy kontrolnej. Wykazano natomiast istotne obniżenie aktywności pionowej (wertykalnej) dla dawek 3,0; 30,0 i 300,0 mg/kg ($p < 0,01$) w przypadku BB XII/59 (Ryc. 13B.) oraz dla dawki 3,0 i 30,0 mg/kg ($p < 0,01$) BB XII/73 (Ryc. 15B.), co mogłoby mieć wpływ na ocenę aktywności w kolejnym teście. W przypadku substancji BB XII/72 jedynie dla dawki 3,0 mg/kg wykazano znamienne hiperlokomocję w płaszczyźnie horyzontalnej ($p = 0,03$), dla pozostałych badanych dawek nie wykazano odstępstw w stosunku do kontroli. Świadczyć to może o braku wpływu BB XII/72 na aktywność motoryczną zwierząt, tym samym brak wpływu na wyniki uzyskane w teście *hot-plate*.

W celu określenia wpływu badanych substancji na aktywność przeciwbólową, wykorzystano model z zastosowaniem gorącej płytki (*hot-plate*), który został pierwszy raz zaproponowany w 1953 roku przez Eddy'ego i Leimbach'a., bazując na zachowaniu zwierząt w zetknięciu ze szkodliwym bodźcem termicznym. Lizanie tylnych łap wskazywało bezpośrednio na przekroczenie progu bólowego, natomiast skoki reakcję opóźnioną i bardziej złożoną, obejmującą komponentę emocjonalną związaną z ucieczką i uniknięciem ostrego bólu ośrodkowego [Eddy N.B., Leimbach D., 1953]. Obok testu *tail-flick*, test *hot-plate* stanowi podstawowy farmakologiczny model w badaniach nad właściwościami antynocyceptywnymi różnych substancji i jest najczęściej stosowany przez badaczy w celu udowodnienia, bądź też zaprzeczenia, opioidowego mechanizmu działania tych związków [Matthes H.W. i wsp., 1996; O'Neill L.A., Greene C. 1998; Jung H.J. i wsp., 2005]. W niniejszej pracy test *hot-plate* wykorzystano do zbadania zależnego od dawki efektu substancji BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73, jak również zbadania ewentualnego wpływu dawek komplementarnych kwasu acetylosalicylowego (ASA) na działanie przeciwbólowe związków oraz zbadanie interakcji badanych substancji z morfiną (MF), naloksonem (NL) oraz ASA.

Stwierdzono, że wszystkie trzy badane pochodne kwasu oleanolowego wykazywały efekt antynocyceptywny w zastosowanym modelu z wykorzystaniem testu *hot-plate*. Działanie przeciwbólowe związku BB XII/59 po podaniu jednorazowym utrzymywało się nawet do 24 godziny od rozpoczęcia testu. Wykazano ponadto, iż dla każdej podanej dawki w badanym przedziale czasowym obserwujemy znamieny efekt, który najsilniej zaznaczony był po 60 minutach dla dawki 300,0 mg/kg. Jednakże po wyeliminowaniu czynnika czasu i przeliczeniu wartości na AUC okazało się, że dla dawki

3,0 oraz 30,0 mg/kg nastąpiło niewielki spadek aktywności. Dla substancji BB XII/72 odnotowano najsilniejszą aktywność antynocyceptywną dla dawki 30,0 i 300,0 mg/kg już od 30 minuty badania i była zauważalna nawet po 24 godzinach od rozpoczęcia. Podobną sytuację zauważono dla dawki 0,3 oraz 30,0 mg/kg. Dzięki analizie AUC udało się ustalić, iż najsilniej działającą przeciwbólowo dawką BB XII/72 jest dawka 30,0 mg/kg. Ostatnia z analizowanych substancji, BB XII/73 najsilniejszą aktywność przeciwbólową wykazywała w dawce 3,0 oraz 300,0 mg/kg w przedziale 30 do 120 minut. Po 24 godzinach jedynie dawka 3,0 mg/kg nie wykazywała istotnego statystycznie działania obniżającego doznania bólowe. Jednakże po obliczeniu poszczególnych wartości AUC dla badanych dawek BB XII/73 wykazano, że to dawka 0,3 mg/kg jest dawką najsilniej działającą, a dawka 3,0 mg/kg okazała się być dawką o najsłabszym potencjale działania.

Celem sprawdzenia hipotezy, na podstawie, której za działanie badanych związków BB XII/59, BB XII/72 i BB XII/73 odpowiedzialna byłaby powstająca w wyniku odłączenia od związku macierzystego cząsteczka ASA, postanowiono określić działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne ASA podanej w ilości odpowiadającej danej dawce dla poszczególnych pochodnych kwasu oleanolowego. W tym celu podano zwierzętom odpowiednio wyliczone dawki ASA komplementarne do zawartości ASA w substancji BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 jedynie dla dawek 30,0 oraz 300,0 mg/kg, gdyż podawanie komplementarnych niższych dawek ASA obarczone byłoby ze względu na zastosowaną procedurę względnie dużym błędem. Jako substancję referencyjną podano ASA w dawce 300,0 mg/kg, która typowo wykazuje aktywność antynocyceptywną w zastosowanym modelu *hot-plate* [Heidari M.R i wsp., 2004]. Z przeprowadzonego doświadczenia generalnie wynikało, iż ASA w komplementarnej dawce do ilości występującej w cząsteczce BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73 nie wpływa na aktywność przeciwbólową. Wynikałoby stąd, że działanie przeciwbólowe wykazuje cała cząsteczka występująca w badanych pochodnych, a udział w nocycepcji ewentualnie odłączonej cząsteczki ASA może być wykluczony, zwłaszcza w w komplementarnej dawce 30,0 mg/kg.

W celu podjęcia próby wyjaśnienia ewentualnego mechanizmu działania badanych pochodnych w kierunku hamowania bólu, w kolejnym etapie eksperymentu substancje BB XII/59, B XII/72 oraz BB XII/73 podano interakcji z ASA w dawce 300,0 mg/kg (*p.o.*), MF w dawce 5,0 mg/kg (*s.c.*) oraz NL w dawce 3,0 mg/kg (*s.c.*). Pierwszy z powyżej wymienionych należący do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) używany jest w stanach zapalnych z towarzyszącym bólem i gorączką, spowodowanych

głównie poprzez aktywację izoenzymu cyklooksygenazy typu 2 (COX-2) przez czynniki prozapalne.

Podobnie jak w przeprowadzonym badaniu dawko-zależności analizowanych substancji na aktywność przeciwbólową u myszy, pochodne kwasu oleanolowego i kwasu acetylosalicylowego w przedziale dawek 0,3 – 300,0 mg/kg, (*p.o.*) podano jednorazowo wraz z ASA w dawce 300,0 mg/kg (*p.o.*). Grupę kontrolną stanowiły myszy otrzymujące *vehiculum*, natomiast grupę referencyjną zwierzęta którym podano ASA w dawce 300,0 mg/kg (*p.o.*). Dla substancji BB XII/59 w dawce 30,0 oraz 300,0 mg/kg *p.o.* wykazano zwiększenie aktywności przeciwbólowej ASA po wyeliminowaniu wpływu czasu (wartości AUC), które wskazują jednoznacznie na występowanie interakcji łącznego podania badanych związków, aczkolwiek wynikającą prawdopodobnie z odrębnego profilu działania obu substancji, co można zauważyć na rycinie „dawka-efekt bez ASA” (Ryc. 16A.) oraz „interakcja z ASA –zależność od czasu” (Ryc. 22A.). W przypadku substancji BB XII/72 jedynie dla najniższej z podawanych dawek nie odnotowano synergistycznego wpływu na aktywność ASA w zastosowanym modelu, natomiast dla pozostałych efekt był znaczący i w każdym przypadku utrzymywał się na poziomie istotności $p < 0,01$ (Ryc. 23B.). Analiza ostatniej badanej pochodnej, BB XII/73, wykazała znaczący statystycznie wpływ na aktywność antynocyceptywną zastosowanego w teście NLPZ, dla dawek 3,0 oraz 300,0 mg/kg (*p.o.*) ($p < 0,05$), co również świadczy o występowaniu efektu synergistycznego.

W kolejnym etapie doświadczenia postanowiono sprawdzić wpływ badanych pochodnych na aktywność układu opioidowego, poprzez wspólne podanie z agonistą receptorów opioidowych, morfiną (MF) w dawce 5,0 mg/kg m.c., a także z czystym antagonistą tych receptorów, naloksonem (NL) w dawce 3,0 mg/kg, w obu przypadkach podawanych podskórnie (*s.c.*). Badanie wykazało interakcję pomiędzy badanymi związkami a agonistą opioidowym, nie wykazano natomiast wpływu na wynik testu u myszy po wspólnym zastosowaniu z NL. Każda z badanych substancji w sposób istotny zmniejszała aktywność antynocyceptywną MF w pierwszej godzinie badania, kiedy efekt przeciwbólowy opioidu był najsilniejszy w porównaniu do działania samego agonisty. Efekt hamujący analgezję wywołaną przez MF najsilniej zauważalny był w przypadku związku BB XII/59 i to dla jego całego przedziału dawkowania. W przypadku dwóch pozostałych związków jedynie dawka 30,0 mg/kg BB XII/72 oraz BB XII/73 w dawce 3,0 oraz 30,0 mg/kg w sposób istotny zmniejszała analgezję wywołaną centralnym działaniem opioidu. Należy jednak wspomnieć, że ze względu na profil działania MF, wynikający ze stosunkowo krótkiego $t_{0.5}$ tego opioidu oraz zastosowanej drogi podania,

jednoznaczne wnioskowanie o powstającej interakcji i jej kierunku może być niewłaściwe, zwłaszcza w odniesieniu do dalszych punktów czasowych. Stąd też wyniki otrzymane po wyeliminowaniu wpływu czasu i przeliczeniu otrzymanych wartości na wartości AUC sugerują, iż nie występuje hamowanie aktywności MF, a wręcz synergizmem addycyjny. Jednak taki wniosek jest nieuprawniony. Jak już zauważono w przypadku zbadania dawko-zależności badanych substancji na aktywność bólową w teście *hot-plate*, jak również zależności tego działania od czasu mogliśmy zauważyć, iż badane substancje charakteryzował wyjątkowo długi czas działania, gdyż znamioną aktywność przeciwbólową wykazano także po 24 godzinach od ich podania i rozpoczęcia badania. Z kolei działanie MF jest stosunkowo krótkotrwałe i maksimum aktywności przypada na pierwsze 60 minut od jej podania, co wynika zarówno z profilu farmakologicznego tego opioidu (stosunkowo krótki $t_{0.5}$) jak i zastosowanej drogi podania. W tym właśnie bowiem czasie zaobserwowano najsilniejsze obniżenie aktywności przeciwbólowej w porównaniu do MF podanej jedynie z *vehiculum*. W późniejszym czasie, działanie samej MF słabnie, a w 2 godzinie od rozpoczęcia badania nie różni się znacząco od kontroli. W tym samym czasie aktywność pochodnych rośnie i znosi ból nawet do 24 godzin. Obszar pola pod krzywą zależności badanego efektu analgezji od czasu jest znacznie większy, aniżeli pole pod krzywą dla samej MF. Dlatego też zwiększone wartości wyliczone dla AUC po wspólnym zastosowaniu badanych substancji i opioidu świadczą raczej o profilu działania (działanie nawet do 24 godzin) badanych pochodnych kwasu oleanolowego, aniżeli o wzroście siły działania MF w zastosowanym modelu. Uzyskane wyniki wykluczają raczej aktywność analgetyczną dla badanych pochodnych kwasu oleanolowego poprzez mechanizm opioidowy zaproponowany przez *Maia i wsp.* [*Maia J.L. i wsp., 2006*], związany ze zwiększonym uwalnianiem endogennych opioidów lub agonistycznego wpływu na receptory opioidowe. Dodatkowym potwierdzeniem braku agonistycznego wpływu pochodnych OA na receptory opioidowe jest brak wpływu po wspólnym podaniu (dla pochodnych OA podanych w dawce 30,0 mg/kg), z czystym antagonistą NL, który nie odwracał działania badanych pochodnych i nie hamował tym samym antynocycypcji.

Po zbadaniu wpływu substancji na aktywność przeciwbólową w teście *hot-plate*, w kolejnym etapie postanowiono ocenić dawko-zależny wpływ substancji BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73, jak również dawek ASA komplementarnych do odpowiednich dawek pochodnych, oraz zbadano interakcję badanych triterpenoidów z ASA w dawce 200,0 mg/kg (*p.o.*) na działanie przeciwzapalne w teście karageninowym. Po raz pierwszy karageninę w postaci ekstraktu mukopolisacharydowego odkrył brytyjski farmaceuta Stanford w roku 1862, wyodrębniając ją ze śluzu czerwonych alg morskich.

Karageniny pod względem chemicznym są siarczanowanymi galaktanami zawierającymi D-galaktozę i jej pochodne powiązane ze sobą dzięki powtarzającej się sekwencji wiązań β (1→4) i α (1→3). Wśród nich możemy wyodrębnić trzy główne typy polisacharydów: κ , λ oraz ι różniące się pomiędzy sobą właściwościami żelowymi, w każdym przypadku odwracalnymi pod wpływem temperatury. λ -karagenina jako jedyna w temperaturze pokojowej nie ulega przekształceniu w żel, co wpływa na korzyść jej zastosowana w postaci iniekcji w celu wywołania odpowiedzi zapalnej, co zostało szeroko być wykorzystywane w celu zbadania aktywności przeciwzapalnej różnych substancji, w tym pochodnych kwasu oleanolowego [Jung H.J. i wsp., 2005; Vasconcelos M.A.L. i wsp., 2006; Chung J.W. i wsp., 2008; Akihisa T. I wsp., 2010; Wu C.R. i wsp., 2011; Bednarczyk-Cwynar B. i wsp., 2011; Fezai M. i wsp., 2013].

Zapalenie wywołane poprzez ten polisacharyd po raz pierwszy został opisany sto lat później przez Winter'a i kontynuowane przez Lence'a, jako: ostre, nieimmunologiczne, dobrze zbadane oraz wysoce powtarzalne [Winter C.A. i wsp.; Lence P. i wsp., 1962], a stan zapalny cechują wszystkie klasyczne objawy miejscowego odczynu zapalnego: obrzęk, hiperalgezia, zaczerwienienie, zwiększona reakcja cieplna i upośledzający wpływ na tkanki i narządy [Safayhi H., Sailer E.R., 1997; Jung H.J. i wsp., 2005], związana z działaniem prozapalnych czynników – histaminy, bradykininy, układu dopełniacza, reaktywnych form tlenu (generowane przez neutrofile) oraz tlenku azotu. Zapalenie wywołane karageniną charakteryzują dwie fazy: pierwsza wczesna trwająca zazwyczaj 1-2 godzin związana z uwolnieniem histaminy i 5-HT, oraz faza późna związana przede wszystkim z wytwarzaniem BK oraz prostaglandyn [Vinegar R. I wsp., 1969]. W poniższym badaniu użyto 1% roztworu karageniny, a wielkość stanu zapalnego mierzona była poprzez pomiar obrzęku łapy szczura za pomocą pletyzmometru. Obrzęk osiąga swoje maksimum około 5 h od podania karageniny, a płyn wypełniający łapę szczura charakteryzuje się zwiększoną ilością pochodnych kwasu arachidonowego, tromboksanu i prostaglandyn charakterystycznych dla drugiej fazy zapalenia [Vinegar R. i wsp., 1969; Guay J. i wsp., 2004].

Uzyskane wyniki dla wszystkich pochodnych okazały się znamienne względem kontroli, co pozwoliło na wyznaczenie zależności dawka-efekt. Zarówno dla substancji BB XII/59, jak i BB XII/72 zaobserwowano najsilniejsze działanie w dawce 30,0 mg/kg, zarówno dla analizy poszczególnych przedziałów czasowych, jak i analizy wartości AUC, a sama zależność dawka-efekt była opisana odwróconym kształtem litery „U”. Dla BB XII/73 wykryto znamienne działanie względem kontroli, natomiast rozkład otrzymanych

wartości poszczególnych dawek pochodnej był równomierny, czego potwierdzeniem był brak występowania różnic istotnych statystycznie między otrzymanymi wartościami.

Jak już wspomniano poprzednio, celem sprawdzenia hipotezy na podstawie, której za działanie badanych związków BB XII/59, BB XII/72 i BB XII/73 odpowiedzialna byłaby powstająca w wyniku odłączenia od związku macierzystego cząsteczka ASA, postanowiono określić działanie również przeciwzapalne ASA podanej w ilości (dawce) odpowiadającej danej dawce dla poszczególnych badanych pochodnych kwasu oleanolowego. Zauważono podczas analizy zależności efekt względem czasu, że podanie ASA w komplementarnych dawkach dla pochodnych BB XII/72 i BB XII/73 nie wykazało działania przeciwzapalnego. Natomiast pochodna BB XII/59 w przedziale czasowym 1-6h działała przeciwzapalnie, choć efekt ten nie był tak silny jak działanie ASA w dawce 300 mg/kg. Natomiast należy się ostrożnie odnosić do wyników dla uzyskanych po 10 h, bowiem wartości testowe są znacznie większe niż otrzymane dla grupy kontrolnej, tym samym teoretycznie mogą świadczyć o utrzymywaniu się obrzęku. Tym samym wnioski wynikające z analizy AUC, zwłaszcza dla kompletnej dawki 300,0 mg/kg dla wszystkich pochodnych mogą być obarczone błędem wynikającym jakby z odwrócenia działania w tym ostatnim punkcie czasowym.

Badanie interakcji ASA i nowych pochodnych OA wykazała wysoką znamienność wobec kontroli oraz brak znamiennej różnicy w stosunku do referencyjnej dawki ASA dla poszczególnych przedziałów czasowych dla BB XII/59 oraz BB XII/72. Dla BB XII/73 zaobserwowano natomiast istotne zmniejszenie aktywności przeciwzapalnej ASA już w dawce 0,3 mg/kg już od pierwszej godziny eksperymentu oraz dla dawki 3,0 mg/kg BB XII/73 po 3 h czyli w drugiej fazie odczynu zapalnego. Analiza z wykorzystaniem wartości AUC potwierdziła jednoznacznie obniżenie aktywności przeciwzapalnej ASA, zwłaszcza po łącznym podaniu z BB XII/73.

Z uzyskanych wyników oceny aktywności przeciwbólowej, z wcześniej wykonanym badaniem lokomotorycznej aktywności poziomej i pionowej, jak również oceny i badania działania przeciwzapalnego wywnioskowano, że najlepszą substancją pod względem farmakodynamicznym w zastosowanych testach okazała się pochodna morfolidowa: BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg, którą zakwalifikowano do dalszych badań.

Próbując ocenić wpływ zjawiska tolerancji na aktywność przeciwbólową i przeciwzapalną BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg, (*p.o.*) zwierzętom podawano badany związek przez kolejne 4 tygodnie. Zarówno dla działania przeciwbólowego (Ryc. 40.), jak i działania przeciwzapalnego (Ryc. 41.) nie odnaleziono różnic znamiennych

statystycznie w aktywności BB XII/72 ani po podaniu jednorazowym, ani wielokrotnym. Co oznaczało, że w zaplanowanych testach związek ten nie wykazywał tolerancji w działaniu zmniejszającym ból i obrzęk, przynajmniej w czasie 4-tygodniowego podawania.

Po tym czasie pobrano również próbki krwi i osocza do dalszych badań genetycznych, z których oznaczono stężenie wybranych prozapalnych cytokin za pomocą testu ELISA – TNF- α oraz IL-6, a także za pomocą techniki Real-Time PCR (rt-PCR) określono ekspresję mRNA dla genów-powyższych cytokin w limfocytach, jak również ekspresję dla genu TLR1 i TLR3. Badanie ekspresji dla genu TLR3 wybrano ze względu na szeroko spekulowany wśród badaczy, znaczący udział tych receptorów w powstawaniu bólu przewlekłego [Qi J i wsp., 2011; Qian N.S. i wsp., 2011; Liu T. i wsp., 2012b]. TLR3 zlokalizowano w astrocytach, mikrogleju, komórkach dendrytycznych oraz w komórkach krwi, m.in. limfocytach B, natomiast TLR1 występują dodatkowo na powierzchni komórek żernych (makrofagów) oraz na monocytach [Hornung V. i wsp., 2002; Akira S. i wsp., 2006; Nicotra L. i wsp., 2012]. Pomimo głównej roli TLR1 w odpowiedzi na bakteryjne zakażenie i udział w odporności, zarówno wrodzonej, jak i nabytej [Peng Y., Zhang L., 2014] postanowiono sprawdzić ewentualny jego wpływ na reakcję bólową i zapalną.

Nie wykryto istotnych zmian w stężeniu TNF- α w badanych próbkach surowicy względem grupy kontrolnej, natomiast wykazano istotne zwiększenie ekspresji dla genu badanej cytokiny, a także zwiększenie ekspresji genu dla TLR1, bez jednoczesnego wpływu na ekspresję genu dla TLR3 (Tabela 7). Dla IL-6 w obu przypadkach, zarówno stężenia, jak i oceny ekspresji mRNA wykazano znaczące obniżenie wartości względem grupy przyjmującej *vehiculum*.

Otrzymany obraz zjawisk wskazuje, iż w profilu działania badanych pochodnych hybrydowych połączeń z ASA oprócz wyraźnego działania przeciwbólowego o mechanizmie, jak już wspomniano, raczej niezwiązanym z wpływem na receptory opioidowe, występuje składowa działania przeciwzapalnego. Wydaje się, że koreluje ona częściowo, zwłaszcza po przebadaniu substancji BB XII/72, z hamowaniem wyrzutu IL-6 jako reakcji na indukowany proces zapalny, zarówno na poziomie białka jak na poziomie ekspresji mRNA dla tej cytokiny, która jest w większości przypadków cytokiną o jednoznacznym działaniu prozapalnym [Scheller J. i wsp., 2011].

Niemniej właściwości przeciwzapalne analizowanego związku nie są jasne, ponieważ mimo tendencji do obniżania stężenia TNF- α , to jednak na poziomie ekspresji mRNA dla tej cytokiny otrzymano wyniki przeciwne. Podobnie należy interpretować

wpływ na analizowanego związku na ekspresję TLR1, która była podwyższona pod wpływem podawania substancji BB XII/72. Chociaż czasami takie zjawisko braku korelacji pomiędzy wynikami na poziomie powstawania białka i procesów transkrypcji występuje i jest wyrazem skomplikowanych wzajemnych oddziaływań na poziomie transkrypcji i translacji zwłaszcza dla substancji pochodzenia naturalnego [Ożarowski M. i wsp., 2013, Mikołajczak P.Ł. i wsp., 2015; Ożarowski M. i wsp., 2015], to jednak jednoznaczne określenie profilu działania przeciwzapalnego substancji BB XII/72 i odpowiedzialnych za to mechanizmów nie jest możliwe na podstawie uzyskanych wyników.

7. Wnioski

1. Trzy pochodne będące hydrokyminowymi hybrydami kwasu oleanolowego i kwasu acetylosalicylowego: BB XII/73: BB XII/72 oraz BB XII/59 wykazują działanie przeciwbólowe w zakresie dawek 0,3-300,0 mg/kg, *p.o.*
2. Wszystkie trzy hybrydy posiadają w swoim profilu farmakologicznym składową odpowiedzianą za działanie przeciwzapalne w zakresie stosowanych dawek.
3. Działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne wykazuje cała cząsteczka badanych trzech pochodnych, a udział w tych efektach ewentualnie odłączonej cząsteczki kwasu acetylosalicylowego może być wykluczony.
4. Najlepszą substancją pod względem farmakodynamicznym w zastosowanych testach okazała się pochodna BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg, *p.o.*
5. Nie stwierdzono występowania zjawiska tolerancji na działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne dla związku BB XII/72 po podaniu wielokrotnym w dawce 30,0 mg/kg, *p.o.*
6. Mechanizm działania przeciwbólowego nie jest najprawdopodobniej związany z oddziaływaniem na układ opioidowy.
7. Mechanizm leżący u podstaw działania przeciwzapalnego jest niejasny i nie pozostaje w prostej relacji z wpływem na wydzielanie prozapalnych cytokin czy oddziaływaniem na receptory TRL1 i TRL3.

7. Streszczenie

BADANIA AKTYWNOŚCI PRZECIWBÓLOWEJ I PRZECIWZAPALNEJ WYBRANYCH ACYLOWANYCH POCHODNYCH HYDROKSYIMINOWYCH KWASU OLEANOLEWEGO

Acylowane pochodne kwasu oleanowego są znanymi związkami farmakologicznie czynnymi, stąd przedmiotem niniejszej pracy była ocena właściwości przeciwbólowej i przeciwzapalnej nowych hybrydowych połączeń kwasu oleanolewego i kwasu acetylosalicylowego (BB XII/59, BB XII/72 oraz BB XII/73). Działanie przeciwbólowe wymienionych pochodnych w zakresie dawek 0,3 – 300,0 mg/kg (*p.o.*), zostało przeprowadzone na myszach przy wykorzystaniu testu *hot-plate*. Dla badanych związków w tych samych dawkach została zbadana ich aktywność przeciwzapalna u szczurów po uprzednim wywołaniu obrzęku za pomocą roztworu karageniny.

Stwierdzono, że jedynie związek BB XII/72 nie wpłynął znacząco na aktywność lokomotoryczną u badanych zwierząt, podczas gdy u zwierząt po podaniu BB XII/59 oraz BB XII/73 wykazano statystycznie istotny efekt hamujący aktywność wertykalną, który mógł wpływać na sedację zwierząt w kolejnych testach.

Badane związki wykazały wprost-proporcjonalną aktywność przeciwbólową do zastosowanej dawki, a ponadto wykazały silne działanie przeciwzapalne. Zależność „dawka-efekt”, dla aktywności przeciwzapalnej została opisana odwróconym kształtem litery „U”, a najsilniej działającą pochodną okazało się połączenie BB XII/72, w dawce 30,0 mg/kg (*p.o.*). Skojarzone podanie badanych związków z morfiną (MF 5,0 mg/kg, *s.c.*) wprawdzie wykazało obniżenie efektu przeciwbólowego, natomiast wspólne podanie antagonisty opioidowego, naloksonu (NL 3,0 mg/kg, *s.c.*) nie miało wpływu na ich aktywność przeciwbólową, dlatego też mechanizm działania poprzez receptory opioidowe został raczej wykluczony.

Badane pochodne nie wpłynęły na aktywność przeciwbólową ASA podanego w dawce 300,0 mg/kg (*p.o.*) w teście *hot-plate*, podczas gdy dla wspólnego podania z ASA w dawce 200,0 mg/kg (*p.o.*) w badaniu zmiany aktywności przeciwzapalnej, jedynie BB XII/73 zmniejszała w sposób istotny efekt zastosowanego w badaniu NLPZ.

Wykluczono też ewentualny wpływ ASA pochodzący z cząsteczek badanych pochodnych, na aktywność przeciwbólową i przeciwzapalną w przeprowadzanych testach, po zastosowaniu dawek komplementarnych dla ASA.

Z uzyskanych wyników oceny aktywności przeciwbólowej, aktywności lokomotorycznej horyzontalnej i wertykalnej, jak również oceny i badania działania przeciwzapalnego wywnioskowano, że najlepszą substancją pod względem farmakodynamicznym w zastosowanych testach okazała się pochodna morfolidowa: BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg (*p.o.*), którą zakwalifikowano do dalszych badań. Zarówno dla działania przeciwbólowego, jak i działania przeciwzapalnego nie odnaleziono różnic w aktywności BB XII/72 pomiędzy podaniem jednorazowym a wielokrotnym, stąd można sądzić, że związek ten nie wykazuje zjawiska tolerancji, przynajmniej w czasie 4-tygodniowego podawania.

Z uzyskanych wyników analizy biochemicznej i genetycznej można wnioskować, że mechanizm aktywności przeciwzapalnej BB XII/72 jest raczej skomplikowany i niejednoznaczny. Stwierdzono bowiem, że wielokrotne podawanie tego związku obniżyło zarówno stężenie jak i ekspresję mRNA IL-6, podczas gdy wpływ BB XII/72 na te parametry dla TNF- α był przeciwny. Co więcej, nie można jasno zinterpretować działania tego związku na ekspresję mRNA dla TLR1 i TLR3.

Otrzymane wyniki dotyczące aktywności badanych związków pochodnych kwasu oleanolowego są interesujące, ale w celu poznania mechanizmu ich przeciwbólowego i przeciwzapalnego działania niezbędne są dalsze szczegółowe badania.

8. Abstract

ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF SELECTED ACYLATED HYDROXYIMINO DERIVATIVES OF OLEANOLIC ACID

Acyl derivatives of oleanolic acid oximes are pharmacologically active compounds therefore, the assessment of analgesic and anti-inflammatory action of a new hybrid of oleanolic acid derivative and acetylsalicylic acid (BB XII/59, BB XII/72 and BB XII/73) was the aim of this study. Analgesic effect of the hybrids (0,3-300,0 mg/kg, *p.o.*) was performed in mice using a *hot plate* test. Anti-inflammatory activity was assessed on carrageenan-induced paw edema in rats for the same range of doses. Only BB XII/72 did not significantly change locomotor activity of mice, meanwhile either BB XII/59 or BB XII/73 lowered vertical activity during examination; therefor sedative properties of these two compounds should be included. The compounds showed a simple, proportional, dose-dependent analgesic action and expressed strong anti-inflammatory activity showing a reversed U-shaped, dose-dependent relation with its maximum at 30,0 mg/kg, especially for BB XII/72.

After their combined administration with morphine (MF 5,0 mg/kg, *s.c.*) the lowering of analgesic activity was found; however, the interaction with naloxone (NL 3,0 mg/kg, *s.c.*) did not affect the anti-analgesic effect of the hybrids, therefore their opioid mechanism of action should be rather excluded. After combined administration with ASA (300,0 mg/kg, *p.o.*) in *hot-plate* test, examined compounds did not change their analgesic activity in significant way. Moreover, the acetylsalicylic acid anti-inflammatory activity (ASA 200,0 mg/kg, *p.o.*) was not affected by simultaneous BB XII/72 or BB XII/59 application. On the contrary, BB XII/73 decreased the anti-inflammatory effect of ASA. It should be stressed that both the analgesic and anti-inflammatory effect of ASA present in the structure of the hybrids can generally be excluded since the use of complimentary doses of ASA did not show any measurable activities.

Since the pharmacological profile of BB XII/72 hybrid seemed to be the most promising, the chronic analgesic and anti-inflammatory activity of this compound was assessed after a 4-week treatment in the dose of 30,0 mg/kg, *p.o.* The occurrence of tolerance was not observed, since the effects after chronic administration of the hybrid

analgesic and anti-inflammatory were on the same level as after its single treatment. It seemed that the anti-inflammatory mechanism of action of BB XII/72 is not simple, since even its chronic administration lowered both blood concentration of IL-6 and mRNA IL-6 expression. However, the effects of the hybrid on TNF- α level and mRNA expression were opposite. Moreover, it did not change unequivocally mRNA, TLR1, and TLR3 expression.

Concluding, the obtained results regarding the activities of BB XII/59, BB XII/72 and BB XII/73 are interesting, but for explanation of the mechanism of their action, more detailed studies are necessary.

9. Piśmiennictwo

1. **Ahmad R.**, Raina D., Meyer C., Kharbanda S., Kufe D. (2006). Triterpenoid CDOO-Me blocks the NF- κ B pathway by direct inhibition of IKK β on Cys-179. *Journal of Biology and Chemistry*; 281(47):35764-69.
2. **Ahn K.S.**, Agarrwal B.B. (2005). Transcription factor Nf- κ B a sensor for smoke and stress signal. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1056,218-233.
3. **Akihisa T.**, Kojima N., Kikuchi T., Yasukawa K., Tokuda H., Masters E., Manosroi A., Manosroi J. (2010). Anti-inflammatory and chemopreventive effects of triterpene cinnamates and acetates from shea fat. *Journal of Oleo Science*; 59(6):273-280.
4. **Alberti C.**, Brun-Buisson C., Chevret S., Antonelli M., Goodman S.V., Martin C., Moreno R., Ochagavia A.R., Palazzo M., Werdan K., Le Gall J.R. (2005). Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 171:461-468.
5. **Akira S.** (2003). Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*; 278:38105-108.
6. **Allouche Y.**, Jimenez A., Uceda M., Aguilera M.P., Gaforio J.J., Beltran G. (2009). Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 57:3604-10.
7. **Atkinson G.P.**, Nozell S.E., Benveniste E.T. (2010). Nf- κ B and STAT3 signaling in glioma: targets for future therapies. *Expert Review of Neurotherapeutics*; 10(4),575-586.
8. **Balkwill F.** (2004). Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*; 4:540-550.
9. **Barrientos S.**, Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*; 16:585-601.
10. **Beatty K.**, Bieth J., Travis J. (1980). Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha - 1 - proteinase inhibitor and alpha - 1 - antitrypsin. *Journal of Biological Chemistry*; 255(9):3931-34.
11. **Bednarczyk-Cwynar B.**, Zaprutko L., Marciniak J., Lewandowski G., Szulc M., Kamińska E., Wachowiak N., Mikołajczak P.Ł. (2012). The analgesic and anti - inflammatory effect of new oleanolic acid acyloxyimino derivative. *European Journal of Pharmaceutical Science*; 47:549-555.
12. **Beutler B.**, Hoebe K., Du X., Ulevitch R.J. (2003). How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *Journal of Leukocyte Biology*; 74:479-485.
13. **Bhoola K.D.**, Figuerola C.D., Worthy K. (1992). Bioregulation of kinins, kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacological Reviews*; 44:1-80.
14. **Bieth J.G.** (1984). In vivo significance of kinetics constants of protein proteinase inhibitors. *Biochemia Medica*; 32:387-397.
15. **Bodnar R.J.**, Kelly D.D., Spiaggia A., Ehrenberg C., Glusman M. (1978). Dose-dependent reductions by naloxone of analgesia induced by cold-water stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; 8(6): 667-672.

16. **Boyer R.F.**, Schori B.E. (1983). The incorporation of iron into apoferritin as mediated by ceruloplasmin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 116:244-250.
17. **Bujniewicz E.** (2002). Współdziałanie układu immunologicznego z neuro – endokrynowym – znacząca rola interleukiny – 1 (IL – 1) i beta – endorfiny (BE). *Diagnostyka Laboratoryjna*; 38:223-236.
18. **Burh R.M.**, Connor J.R., Tiffany C.W. (1989). The kallikrein – kininogen – kinin system in chronic inflammation. *Agent Actions*; 27:258-260.
19. **Burstein E.**, Duckett C.S. (2003). Dying for NF- κ B? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery. *Current Opinion in Cell Biology*; 15:732-737.
20. **Całkosiński I.**, Dobrzyński M., Haloń A., Fita K., Całkosińska M., Majda J., Siewińska M. (2007). Odpowiedź krążeniowo – humoralna w odruchu somatyczno – wegetatywnym wywołanym przez czynniki bólowe. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*; 61:331-337.
21. **Całkosiński I.**, Dobrzyński M., Całkosińska M., Seweryn, E., Bronowiecka-Szydełko, A., Dzierżba, K., Ceremuga, I., Gamian, A. (2009). Charakterystyka odczynu zapalnego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 63:395-408.
22. **Carroll M.C.** (2008). Complement and humoral immunity. *Vaccine*; 26(suppl.8):128-133.
23. **Casseli E.**, Fiorentini S., Amici C., Luca D.D., Caruso A., Santoro M.G. (2007). Human herpesvirus 8 acute infection of endothelial cells induces monocyte chemoattractant protein 1-dependent capillary – like structure formation: role of IKK/Nf- κ B pathway, *Blood*; 108,2718-2726.
24. **Cheng T.**, Matthew K., Abrams-Ogg A., Wood D. (2011). The link between inflammation and coagulation: influence on the interpretation of diagnostic laboratory tests. *Compendium Continuing Education for veterinarians*, 33:E1-E12.
25. **Choi C.Y.**, You H.J., Jeong H.G. (2001). Nitric oxide and tumor necrosis factor – alpha production by oleanolic acid via nuclear factor – kappaB activation in macrophages. *Biochemical and Biophysical research Communications*; 288(1):49-55.
26. **Cholewa J.B.** (2004). Receptory *Toll-like* a współdziałanie odporności wrodzonej i nabytej w obliczu zagrożenia. *Wszechświat*; 105:93-96.
27. **Chołuj, A.**, Janiszewska, W. 2005. Pochodne kwasu oleanolowego i ich działanie farmakologiczne. *Herba Polonica*, 51: 66-75.
28. **Chomczynski P.**, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*; 162:156-159.
29. **Chrousos G.P.** (1995). The hypothalamic – pituitary – adrenal axis and immune – mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine*; 332:1351-62.
30. **Chung J.W.**, Noh E.J., Zhao H.L., Sim J.S., Ha Y.W., Shin E.M., Lee E.B., Cheong C.S., Kim Y.S. (2008). Anti-inflammatory activity of prosapogenin methyl ester of platycodin D via nuclear factor- κ B pathway inhibition. *Biological&Pharmaceutical Bulletin*; 31(11):2114-20.
31. **Cieślik, K.**, Kołaczowska, E. (2012). Układ krzepnięcia a reakcja zapalna. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*; 61(3):433-443.
32. **Cirinio G.**, Peers S.H., Wallace J.L., Flower R.J. (1989). A study of phospholipase A2-induced oedema in rat paw. *European Journal of Pharmacology*; 166: 505-510.
33. **Cohen M.S.** (1994). Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. *Clinical Infectious Diseases*; 18:170-179.

34. **Cools A.R.**, Gingras M.A. (1998). Nijmegen high and low responders to novelty: a new tool in the search after the neurobiology of drug abuse liability. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*; 60:151-159.
35. **Corretero M.E.**, Lopez-Perez J.L., Abad M.J., Bermego P. (2008). Preliminary study of anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Serg. (Burseraceae) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*; 116: 11-15.
36. **Cotran R.S.**, Kumar V., Collins T., Robbins S.L. (1998). Robbins pathologic basis of disease. Saunders, Philadelphia; 28-35.
37. **Dai Y.**, Hang B.Q., Meng Q.Y., Ma S.P., Tan L.W. (1988). Inhibition of hypersensitivity reaction by oleanolic acid. *Acta Pharmacologica Sinica*; 9:562-565.
38. **Dai Y.**, Hang B.Q., Tan L.W. (1989a). Anti - inflammatory effect of oleanolic acid. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*; 3:96-99.
39. **Dai Y.**, Hang B.Q., Li P.Z., Tan L.W. (1989b). Effects of oleanolic acid on immune system and type I allergic reaction. *Acta Pharmacologica Sinica*; 10:381-384.
40. **De Leo J.A.**, Tawfik V.L. LaCroix-Fralish M.L. (2006). The tetrapartite synapse: path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain*; 122:17-21.
41. **Demkow U.**, van Overveld F.J. (2010). Role of elastases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: implications for treatment. *European Journal of Medical Research*. 15 Suppl 2:27-35.
42. **Dewald B.**, Rindler-Ludwig R., Bretz U., Baggiolini M. (1975). Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*; 141:709-723.
43. **Dinarello C.C.A.** (1997). Proinflammatory and anti - inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*, 112:321S-329S.
44. **Dobrogowski J.**, Wrodliczek J. (2004). *Medycyna bólu. Rozdział 1: Patofizjologia bólu*; Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
45. **Dray A.** (1995). Inflammatory mediators of pain. *British Journal of Anaesthesia*; 75:125-131.
46. **Dziedziczko A.**, Kuźmiński A., Przybyszewski M., Żbikowska-Gotz M. (2004). Ocena stężenia eozynofilowego białka kationowego I równowagi elastaza - antytryptaza u chorych z zaostrzeniem astmy oskrzelowej. *Alergia Astma Immunologia*; 9(3):143-147.
47. **Eddy N.B.**, Leimbach D. (1953). Synthetic analgesics: II. Dithieny butenyl- and benzomorphans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 107(3):385-393.
48. **Facino R.M.**, Carini M., Stefani R., Aldini G., Saibene L. (1995). Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Archiv Der Pharmazie*, 328(10): 720-724.
49. **Feng J.**, Feng Z.Y., Wang J.M., Cui Y. (2011). Study on the triterpenoids from the fruits of *Ligustrum lucidum*. *Zhong Yao Cai. Journal of Chinese Medicinal Materials*; 34(10):1540-44.
50. **Fezai M.**, Senovilla L., Jemaa M., Ben-Attita M. (2013). Analgesic, anti-inflammatory and anticancer activities of extra virgin oil. *Journal of Lipids; Hindawi Publishing Corporation*: 1-7.
51. **Filipczak-Bryniarska I.**, Bryniarski K., Woroń J., Wrodliczek J. (2010). Mechanizmy przewodzenia bólu. Rola układu odpornościowego w regulacji odczuwania bólu. *Anestezjologia i Ratownictwo*, 4:500-509.

52. **Fokuda Y.**, Sakai K., Matsunaga S. Tanaka R. (2006). Lupene and oleanane triterpenoids from the cones of *Liquidamber styraciflua*. *Journal of Natural Products*, 69: 142-144.
53. **Fukuda Y.**, Sakai K., Tokuda R. (2005). Cancer chemoprotective activity of lupane- and oleanane-type triterpenoids from the cones of *Liquidamber styraciflua*. *Chemistr&Biodiversity*; 2: 421-427.
54. **Gao X.**, Deeb D., Danyluk A., Media J., Liu Y., Dulchavsky S.A., Gautam S.C. (2008). Immunomodulatory activity of synthetic triterpenoids: inhibition of lymphocyte proliferation, cell – mediated cytotoxicity and cytokine gene expression through suppression of NF- κ B. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*; 30(3):581-600.
55. **Gao X.**, Liu Y., Deeb D., Arbab A.S., Guo A.M., Dulchavsky S.A., Gautam S.C. (2011). Synthetic oleanane triterpenoid, CD00-Me, induces apoptosis in ovarian cancer cells by inhibiting pro-survival AKT/NF- κ B/mTOR signaling. *Anticancer Research*; 31(11):3673-81.
56. **Giese S.P.**, Leake D.S., Flavall E.M., Amit Z., Reid L., Yang Y.T. (2009). Macrophage antioxidant protection within atherosclerotic plaques. *Frontiers in Bioscience*; 14:1230-46.
57. **Ginger-Larza E.M.**, Manez S., Recio M.C., Ginger R.M., Prieto J.M., Cerada-Nicolas M., Rios J.L. (2001). Oleanolic acid, a 3-oxotriterpene from Pistacia, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *European Journal of Pharmacology*; 428: 137-143.
58. **Glaros T.**, Larsen M., Li L. (2009). Macrophages and fibroblasts during inflammation, tissue damage and organ injury. *Frontiers in Bioscience*; 14:3988-93.
59. **Gołab J.**, Jakóbiński M., Lasek W. (2013). *Immunologia*. Rozdział 11: Cytokiny; Rozdział 13: Układ dopęlnicza; Rodział 15: Fagocytoza i mechanizmy cytotoksycznych komórek żernych; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
60. **Gryglewski R.J.**, Chłopicki S., Uracz W., Marcinkiewicz E. (2001). Significance of endothelial prostacyclin and nitric oxide in peripheral and pulmonary circulation. *Medical Science Monitor*; 7:1-16.
61. **Guay J.**, Bateman K., Gordon R., Mancini J., Riendeau D. (2004): Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. *Journal of Biological Chemistry*; 279 (23): 24866-24872.
62. **Guilhon C.C.**, Raymundo L.J., Alviano D.S., Blank A.F., Arrigoni-Blank M.F., Matheus M.E., Cavalcanti S.C., Alviano C.S., Fernandes P.D. (2011). Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*; 135(2):406-413.
63. **Gupta M.B.**, Bhalla T.N., Gupta G.P., Mitra C.R., Bhangava K.P. (1969). Antiinflammatory activity of natural products – Triterpenoids. *European Journal of Pharmacology*;6(1): 67-70.
64. **Guo L.-H.**, Schluesener H.J. (2007). The innate immunity of the central nervous system in chronic pain: The role of Toll-like receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 64:1128-1136.
65. **Hagemann T.**, Biswas S.K., Lawrence T., Sice A., Lewis C.E. (2009). Regulation of macrophages function in tumors: the multifaceted role of Nf- κ B. *Blood*; 113:3139-1346.
66. **Hasegawa H.**, Yang Z., Davanger S., Hay J.C. (2004). Intramolecular protein-protein and protein-lipid interactions control the conformation and subcellular targeting of neuronal Ykt6. *Journal of Cell Science*; 117(Pt19):4495-4508.

67. **Hashimoto C.**, Hudson K.L., Anderson K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*; 52(2):26-279.
68. **Haverman J.W.**, Kobold A.C., Tervaert J.W., van der Berg A.P., Tulleken J.E., Kallenberg C.G., The T.H. (1999). The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Netherlands Journal of Medicine*; 55:132-141.
69. **Heidari M.R.**, Mandagary A., Enayati M. (2004). Antinociceptive effects and toxicity of *Fumaria parviflora* Lam. in mice and rats. *DARU*; 12(4):136-140.
70. **Heinzen R.A.**, Scidmore M.A., Rockey D.D., Hackstadt T. (1996). Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorus vacuoles of *Coxiella brunette* and *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*; 64:796-809.
71. **Hess J.F.**, Borkowski J.A., Young G.S., Strader C.D., Ransom R.W. (1992). Cloning and pharmacological characterization of human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochemical and Biophysical research Communications*; 184:260-268.
72. **Hoffmann A.**, Leung T.H., Baltimore D. (2003). Genetic analysis of Nf-kB/Rel transcription factors defines functional specificities, *EMBO Journal*; 22,5530-5539.
73. **Hornung V.**, Rothenfusser S., Britsch S., Kruq A., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S., Hartmann S. (2002). Quantitive expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology*; 168(9):4531-4537.
74. **Ishii S.**, Nagase T., Schimizu T. (2002). Platelet – activating factor receptor. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*; 68-69:599-609.
75. **Jack C.S.**, Arbour N., Manusow J., Montgrain V., Blain M., McCrea E., Shapiro A., Antel J.P. (2005). TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *Journal of Immunology*; 175:4320-4330.
76. **Jager S.**, Trojan H., Kopp T., Laszczyk M.N., Scheffler A. (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi – potent plant extracts. *Molecules*; 14:2016-31.
77. **Janoff A.** (1985). Elastase in tissue injury. *Annual Review of Medicine*; 36:207-216.
78. **Johansson S.**, Goransson U., Luijendijk T., Backlund A., Cleason P., Bohlin L. (2002). A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti – inflammatory natural products. *Journal of Natural Products*; 65:32-41.
79. **Jost P.J.**, Rulad J. (2007). Aberrant Nf-kB signaling in lymphoma mechanisms, consequences and therapeutic implications. *Blood*; 108,2700-2702.
80. **Juan M.E.**, Wenzel U., Ruiz-Gutierrez V., Daniel H., Planas J.M. (2006). Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Journal of Nutrition*; 136:2553-57.
81. **Jung H.J.**, Nam J.H., Choi J., Lee K.T., Park H.J. (2005): 19 α -hydroxyursane- type triterpenoids: Antinociceptive anti-inflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*. *Biological&Pharmaceutical Bulletin*; 28 (1): 101-104.
82. **Jung K.**, Chin Y.W., Yoon K.D., Chae H.S., Kim C.Y., Yoo H., Kim J. (2013). Anti – inflammatory properties of a triterpenoidal glycoside from *Momordica cochinchinensis* in LPS – stimulated macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*; 35(1):8-14.
83. **Kapil A.**, Sharma S. (1994). Anti – complement activity of oleanolic acid: an inhibitor of C3 – convertase of the classical complement pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 46:922-923.

84. **Karasawa K.** (2006). Clinical aspects of plasma platelet – activating factor – acetylhydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1761:1359-72.
85. **Karin M., Ben – Neriah Y.** (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity, *Annual Review of Immunology*; 18,621-663.
86. **Karin M., Lin A.** (2002). NF- κ B of the crossroads of life and death. *Nature Immunology*; 3,221-222.
87. **Karpel E.** (2001). Mediatory ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej – znaczenie w praktyce klinicznej i intensywnej terapii. *Anestezjologia Intensywna Terapią*; 3/2001:181-190.
88. **Kida H., Akao T., Meselhy M.R., Hattori M.** (1998). Metabolism and pharmacokinetics of orally administered saikosaponin b1 in conventional, germ-free and Eubacterium sp. A-44-infected gnotobiotic rats. *Biological&Pharmaceutical Bulletin*, 21(6):588-93.
89. **Kielian T.** (2006). Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *Journal of Neuroscience Research*; 83:711-730.
90. **Kim H.S., Han S.Y., Sung H.Y., Park S.H., Kang M.K., Han S.J., Kang Y.H.** (2014). Blocked of visfatin induction by oleanolic acid via disturbing IL-6-TRAF6_NF- κ B signaling of adipocytes. *Experimental Biology and Medicine*; 239(3):284-292.
91. **Klaska I., Nowak J.Z.** (2007). Rola układu dopełniacza w fizjologii i patologii. *Postępy higieny i Medycyny Doświadczalnej*; 61:167-177.
92. **Koch A., Pernow M., Barthuber C., Mersmann J., Zacharowski K., Grottemeyer D.** (2012). Systemic inflammation after aortic cross clamping is influenced by Toll-like receptor 2 preconditioning and deficiency. *Journal of Surgical Research*; 178: 833-841.
93. **Kołodziejczyk A.** (2003). Naturalne związki organiczne. Księgarnia PWN; Rozdz. 8. Terpenoidy (Izoprenoidy): 523-525.
94. **Krajnik M., Żylicz Z.** (2003). Mechanizmy działania przeciwbólowego opioidów. *Polska Medycyna Paliatywna*; 2:111-118.
95. **Kubo I., Matsumoto A.** (1984). Mollusciscides from Olive *Olea europea* and their efficient isolation by counter current chromatographies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 32:687-688.
96. **Kuhlicke J., Frick J.S., Morote-Garcia J.C., Rosenberger P., Eltzhig H.K.** (2007). Hypoxia inducible factor (HIF)-1 coordinates induction of Toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia. *PLoS One*; 2(12):e1364.
97. **Kujawa-Warchala K., Nazaruk K.** (2012). Aktywność farmakologiczna pentacyklicznych związków triterpenowych. *Postępy Fitoterapii*; 1:35-47.
98. **Kwok Y.H., Tuke J., Nicotra L.L., Grace P.M., Rolan P.E.** (2013). TLR 2 and 4 responsiveness from isolated peripheral blood mononuclear cells from rats and humans as potential chronic pain biomarkers. *PLoS One*; 8(10):e77799.
99. **Lan L.S., Ping Y.J., Na W.L., Miao J., Cheng Q.Q., Ni M.Z., Lei L., Fang L.C., Guang R.C., Jin Z., Wei L.** (2010). Down-regulation of Toll-like receptor 4 gene expression by short interfering RNA attenuates bone cancer pain in a rat model. *Molecular Pain*; 6:2.
100. **Lawrence T., Fong C.** (2009). The resolution of inflammation: anti-inflammatory role of Nf- κ B. *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology*; 42,519-523.
101. **Lee M.H., Jeong J.H., Seo J.W., Shin C.G., Kim Y.S., In J.G., Yang D.C., Yi J.S., Choi Y.E.** (2004). Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant and Cell Physiology*; 45 (8):976-84.
102. **Lee W.L., Downey G.P.** (2001). Leukocyte elastase – physiological functions and role in acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 164:896-904.

103. **Lemaitre B.**, Nicolas E., Michaut L., Reichhart J., Hoffmann J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*; 86:973-983..
104. **Li G.**, Rhodes J.S., Girard I., Gammie S.C., Garland T. (2004). Opioid-mediated pain sensitivity in mice bred for high voluntary wheel running. *Physiology&Behavior*; 83:515-524.
105. **Li Q.**, Verna I.M. (2002). Nf- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*; 2:725-734.
106. **Li X.**, Stark G.R. (2002). NF- κ B-dependent signaling pathways. *Experimental Hematology*; 30:285-296.
107. **Liu J.** (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*; 49: 57-68.
108. **Liu J.** (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*; 100: 92-94.
109. **Liu T.**, Berta T., Xu Z-Z., Park C-K., Zhang L., Lu N., Liu Q., Liu Y., Gao Y-J., Liu Y-C., Ma Q., Dong X., Ji R-R. (2012a). TLR3 deficiency impairs spinal cord synaptic transmission, central sensitization, and pruritus in mice. *Journal of Clinical Investigation*; 122(6):2195-2207.
110. **Liu T.**, Gao Y-L., Ji R-R. (2012b). Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neuroscience Bulletin*; 28(2):131-144.
111. **Loeser J.D.**, Treede R. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*; 137: 473-477.
112. **Łukaszewicz M.**, Mroczo B., Szmitkowski M. (2007). Znaczenie kliniczne interleukiny 6 (IL-6) jako czynnika rokowniczego w chorobie nowotworowej. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*; 117(5-6):247-251.
113. **Maharaj C.**, Laffey J.G. (2004). New strategies to control the inflammatory response in cardiac surgery. *Current Opinion in Anesthesiology*; 17:35-48.
114. **Maia J.L.**, Lima-Júnior R.C., Melo C.M., David J.P., David J.M., Campos A.R., Santos F.A., Rao V.S. (2006): Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: possible mechanisms. *Pharmacological Research*; 54 (4):282-286.
115. **Maillard M.**, Adwenumi C.O., Hostettmann K. (1992). A triterpene glycoside from the fruits of *Tetrapleura tetraptera*. *Phytochemistry*; 31:1321-23.
116. **Majno G.**, Joris I. (2004). Cells, tissues and disease: Principles of general pathology. *Oxford University Press*, Second edition.
117. **Male D.**, Bristoff J., Roth D., Roitt I. (2012). *Immunology*. Section 1: *Complement*. 8th Edition.
118. **Maldonado R.**, Valverde O., Turcaud S., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P. (1998). Antinociceptive response induced by mixed inhibitors of enkephalin catabolism in peripheral inflammation. *Pain*; 58: 77-83.
119. **Marceau F.A.**, Luissier D.R., Griound J.P. (1983). Pharmacology of kinins: the relevance to tissue injury and inflammation. *General Pharmacology*; 14:2009-29.
120. **Marinho D.G.**, Alviano D.S., Matheus M.E., Alviano C.S., Fernandes P.D. (2011). The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*; 135(2):530-537.

121. **Marinho H.S.**, Real C., Cyrne L., Soares H., Antunes F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology*; 2:535-562.
122. **Maśliński S.** (1998). Molekularne podstawy odczynu zaplanego, Patofizjologia, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 248-301.
123. **Mathiak G.**, Szewczyk D., Abdullah F., Ovadia P., Rabinovici R. (1997). Platelet – activating factor (PAF) in experimental and clinical sepsis. *Shock*; 7:391-404.
124. **Matthes H.W.**, Maldonado R., Simonin F., Valverde O., Slowe S., Kitchen I., Befort K., Dierich A., Le Meur M., Dollé P., Tzavara E., Hanoune J., Roques B.P., Kieffer B.L. (1996): Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*; 383 (6603): 819-823.
125. **McGarughty S.**, Honore P., Wismer C.T., Mikusa J, Zhu C.Z., McDonald H.A., Bianchi B., Faltynek C.R., Jarvis M.F. (2005). Endogenous opioid mechanisms partially mediate P2X3/P2X2/3-related antinociception in rat models of inflammatory and chemogenic pain but not neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology*; 146(2):180-188.
126. **McGeer E.G.**, Klegeris A., McGeer P.L. (2005). Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *Neurobiology of Aging*; 26(suppl.1):94-97.
127. **McGuire W.**, Sprraag R.G., Cohen A.B., Cochrago C.G. (1982). Studies on the pathogenesis of adult respiratory distress syndrome. *Journal of Clinical Investigation*; 69:543-553.
128. **McMahon S.B.**, Cafferty W.B., Marchand F. (2005). Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Experimental Neurology*; 192:444-462.
129. **McPhail L.C.**, Strum S.L., Leone P.A. (1992). The neutrophil respiratory burst mechanism. *Immunology Series*; 57:46-76.
130. **Medzhitov R.**, Preston-Hulburt P., Janeway C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*; 388(6640):394-397.
131. **Mena N.B.**, Mathur R, Nayar U. (1996). Influence of low and high doses of naloxone on tonic pain and motor activity in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*; 40(4):289-96.
132. **Meng L.**, Zhu W., Jiang S., He X., Hou W., Zhang F., Holmdahl R., Lu S. (2010). Toll-like receptor 3 upregulation in macrophages participates in the initiation and maintenance of pristane-induced arthritis in rats. *Arthritis Research&Therapy*; 12(3):R103.
133. **Mikołajczak P.Ł.**, Kędzia B., Ożarowski M., Kujawski R., Bogacz A., Bartkowiak-Wieczorek J., Białas W., Gryszczyńska A., Buchwald W., Szulc M., Wasiak N., Górską-Paukszta M., Baraniak J., Czerny B., Seremak-Mrozikiewicz A. (2015). Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of extracts from herb of *Chelidonium majus L.*, *Central European Journal of Immunology*; DOI:10.5114/ceji.2015.54607.
134. **Milliken G.A.**, Johnson D.E. (1984). Analysis of Messy Data Volume I: Designed Experiments, Belmont, CA: *Lifetime Learning Publications*.
135. **Mitchell R.N.**, Cotran R.S. (2005): Zapalenie ostre i przewlekłe. W: *Robbins Patologia*; Pod red. Olszewskiego W. T.: 35-65.
136. **Mitchell R.N.**, Cotran R.S. (1997). Repair cell regeneration, fibrosis and wound healing. W: Mitchell R.N., Cotran R.S., Robbins S.L. *Basic Pathology*. Philadelphia; W.B.Saunders Company: 47-59.
137. **Mohr W.**, Wessinghage D. (1978). The relationship between polymorphonuclear granulocytes and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *The Journals of Rheumatology*; 37:81-86.

138. **Nichols D.P.**, Ziady A.G., Shank S.L., Eastman J.F., Davis P.B. (2009). The triterpenoid CDDO limits inflammation in preclinical models of cystic fibrosis lung disease. *American journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*; 297(5):L828-L836.
139. **Nicotra L.**, Loram L.C., Watkins L.R., Hutchinson M.R. (2012). Toll-like receptors in chronic pain. *Experimental Neurology*; 234(2):316-329.
140. **Niederberger E.**, Geisslinger G. (2010). Analysis of Nf- κ B signaling pathways by proteomic approaches. *Expert Review of Proteomics*; 7(2),189-203,
141. **Nihiem N.X.**, Lim H.Y., Kiem P.V., Minh C.V., Thu V.K., Tai B.H., Quang T.H., Song S.B., Kim Y.H. (2011). Oleanane - type triterpene saponins from the bark of *Aralia elata* and their NF- κ B inhibition and PPAR activation signal pathway. *Bioorganic Medicine and Chemistry Letters*; 21(20):6143-47.
142. **Nowak J.Z.** (2005). Druzy, złogi podstawowe, proces zapalny i zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD). *Magazyn Okulistyczny*; 2:174-186.
143. **Nowak J.Z.** (2006). Age - related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacological Reports*; 58:353-363.
144. **Nowak J.Z.**, Waszczyk M. (2006). Rola zapalenia i układu dopełniacza w etiopatogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. *Magazyn Okulistyczny*; 3:142-151.
145. **Olson J.K.**, Miller S.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *Journal of Immunology*; 173:3916-3924.
146. **O'Neill L.A.**, Greene C. (1998): Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *Journal of Leukocyte Biology*; 63 (6): 650-657
147. **O'Neill L.A.** (2006). Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. *Nature reviews Drug Discovery*; 5:549-563.
148. **Ovsemi Z.**, Kozics K., Slamenova D. (2006). Protective effect of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutation Research*; 600: 131-137.
149. **Ożarowski M.**, Mikołajczak P.L., Bogacz A., Gryszczynska A., Kujawska M., Jodynis-Liebert J., Piasecka A., Napieczynska H., Szulc M., Kujawski R., Bartkowiak-Wieczorek J., Cichocka J., Bobkiewicz-Kozłowska T., Czerny B., Mrozikiewicz P.M. (2013). *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia*; 91, 261-271.
150. **Ożarowski M.**, Thiem B., Mikołajczak P.L., Piasecka A., Kachlicki P., Szulc M., Kamińska E., Bogacz A., Kujawski R., Bartkowiak-Wieczorek J., Kujawska M., Jodynis-Liebert J., Budzianowski J., Kędziora I., Seremak-Mrozikiewicz A., Czerny B., Bobkiewicz-Kozłowska T. (2015). Improvement in long-term memory following chronic administration of *Eryngium planum* root extract in scopolamine model - behavioral and molecular study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; Article ID 145140, 1-13.
151. **Ozinsky A.**, Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A. (2000). The repertoire for patterns recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between *Toll-like* receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 97:13766-71.
152. **Paszal A.** (2008). Syntetyczne pochodne kwasu oleanolowego jako aktywatory apoptozy oraz modulatory oporności wielolekowej komórek białaczkowych in vitro. Rozprawa doktorska; Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

153. **Papalois A.**, Gioxari A., Kaliora A.C., Lymperopoulou A., Agrogiannis G., Papada E., Andrikopoulos N.K. (2012). Chios mastic fraction in experimental colitis: implication of the nuclear factor κ B pathway in cultured HT29 cells. *Journal of Medicine Food*; 15(11):974-983.
154. **Pasare C.**, Medzhitow R. (2005). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 560:11-18.
155. **Peng Y.**, Zhang L. (2014). Activation of the TLR1/2 pathway induces the shaping of immune response status of peripheral blood leukocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*; 7:1708-1712.
156. **Pham C.T.** (2008). Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 40:1317-33.
157. **Piazza P.V.**, Deminiere J.M., Le Moal M., Simon H. (1989). Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*; 245:1511-1513.
158. **Prescott S.M.**, Zimmerman G.A., Stafforini D.M., McIntyre T.M. (2000). Platelet – activating factor and related lipid mediators. *Annual Review of Biochemistry*; 69:419-445.
159. **Prohaska J.R.** (2008). Role of copper transporters in copper homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 88:826S-829S.
160. **Qi J.**, Buzas K., Fan H., Cohen J.I., Wang K., Mont E., Klinman D., Oppenheim J.J., Zack Howard O.M. (2011). Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons. *Journal of Immunology*; 186:6417-6426.
161. **Qian N.S.**, Liao Y-H., Feng Q-X., Tang Y., Dou K-F., Tao K-S. (2011). Spinal toll like receptor 3 is involved in chronic pancreatitis-induced mechanical allodynia of rat. *Molecular Pain*; 7:15.
162. **Raghavendera V.**, Tanga F.Y., DeLeo J.A. (2004). Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *European Journal of Neuroscience*; 20:467-473.
163. **Rather L.J.** (1971). Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*; 47(3): 303-322.
164. **Raymundo L.J.**, Guilhon C.C., Alviano D.S., Matheus M.E., Antonioli A.R., Cavalcanti S.C., Alves P.B., Alviano C.S., Fernandes P.D. (2011). Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*; 134(3):725-732.
165. **Recio M.C.**, Ginger R.M., Manes S., Rios J.L. (1995). Structural requirements for the antiinflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Medica*; 15: 182-185.
166. **Reilly C.A.**, Sorlie M., Aust S.D. (1998). Evidence for a protein – protein complex during iron loading into ferritin by ceruloplasmin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 354:165-171.
167. **Rivest S.** (2003). Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain, Behaviour and Immunity*; 17(1):13-19.
168. **Robak T.** (1991). Właściwości biologiczne kachektyny (TFN) I jej potencjalna rola w terapii. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*; 45:281-297.
169. **Robak T.** (1995). Biologia i farmakologia cytokin. Wydawnictwo Naukowe PZWN, Warszawa; 122-133.
170. **Roberts R.A.**, Gullick W.J. (1989). Bradykinin receptor number and sensitivity to ligand stimulation of mitogenesis is increased by expression of a mutant ras oncogene. *Journal of Cell Science*; 94:527-535.
171. **Rojkjaer R.**, Schmaier A.H. (1999). Activation of the plasma kallikrein/kinin system on endothelial cells. *Proceedings of the Association of American Physicians*; 111:220-227.

-
172. **Rueff A.**, Patel I.A., Urban I., Dray A. (1994). Regulation of bradykinin sensitivity in peripheral sensory fibres of the neonatal rat by nitric oxide and cyclic GMP. *Neuropharmacology*; 33:1139-45.
173. **Ruszkowski D.**, Szakiel A., Janiszowska W. (2006). Biosynthesis of oleanolic acid glycosides in protoplasts isolated from *Calendula officinalis* L. roots. *Acta physiologiae Plantarum*; 54(4):733-740.
174. **Ryan K.M.**, Ernst M.K., Rice N.R., Vousden K.H. (2000). Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature*; 404:892-897.
175. **Safayhi H.**, Sailer E.R. (1997): Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Medica*; 63: 487-493.
176. **Sakai K.**, Fukuda Y., Matsunaga S., Tanaka R., Yamori T. (2004). New cytotoxic oleano-type triterpenoids from the canes of *Liquidamber styraciflua*. *Journal of Natural Products*; 67: 1088-1093.
177. **Sammons M.J.**, Raval P., Davey P.T., Rogers D., Parsons A.A. (2000). Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Research*; 876: 48-54.
178. **Santoro M.G.**, Rossi A., Amici C. (2003). NF- κ B and virus infection: who controls whom. *EMBO Journal*; 22,2552-2560.
179. **Santos-Rosa C.**, Garcia-Gimenez M.D., Saenz-Rodriguez M.T., De La Puerta-Veraquez R. (2007). Antihistaminic and antieicosanoid effects of oleanolic acid and ursolic acid fraction from *Helichrysum picardii*. *Pharmazie*; 62(6): 459-462.
180. **Sauer R.S.**, Hackel D., Morschel L., Sahlbach H., Wang Y., Mousa S.A., Roewer N., Brack A., Rittner H.L. (2014). Toll like receptor (TLR)-4 as a regulator of peripheral endogenous opioid-mediated analgesia in inflammation. *Molecular Pain*; 10:10.
181. **Scheller J.**, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1813(5):878-888.
182. **Schifere A.S.** (2010). Protein – protein interactions involving IKKgamma (NEMO) that promote the activation of NF- κ B. *Journal of Clinical Physiology*; 223:558-561.
183. **Schimizu T.** (2009). Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*; 49:123-150.
184. **Schishodia S.**, Sethi G., Konopleva M., Andreeff M., Aggarwal B.B. (2006). A synthetic triterpenoid, CDDO-Me, inhibits I κ B kinase and enhances apoptosis induced by TNF and chemotherapeutic agents through down – regulation of expression of nuclear factor κ B – regulated gene products in human leukemic cells. *Clinical Cancer Research*; 12(6):1828-38.
185. **Schmaier A.H.** (2008). Assembly, activation and physiologic influence of the plasma kallikrein/kinin system. *International Immunopharmacology*; 8:161-165.
186. **Schmelz M.**, Schmidt R., Ringkamp M., Handwerker H.O., Torebjork H.E. (1994). Sensitization of intensive branches of C nociceptors in human skin. *Journal of Physiology*; 480:389-394.
187. **Schulze-Topphoff U.**, Prat A., Bader M., Zipp F., Aktas O. (2008). Roles of the kallikrein/kinin system in the adaptive immune system. *International Immunopharmacology*; 8:155-160.
188. **Schuster H.P.**, Schuster F.P., Ritschel P., Wilts S., Bodmann K.F. (1997). The ability of the simplified acute physiology score (SAPS II) to predict outcome in coronary care patients. *Intensive Care Medicine*; 23(10):1056-61.
189. **Sen R.**, Baltimore D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*; 46: 705-716.
-

190. **Soldi C.**, Pizzolatti M.G., Luiz A.P., Marcon R., Meotti F.C., Mito L.A., Santos A.R.S. (2008). Synthetic derivatives of the a- and b-amyrin triterpenes and their antinoceptive properties. *Bioorganic&Medicinal Chemistry*; 16:3377-86.
191. **Sharp B.M.** (2006). Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain, Behaviour and Immunity*; 20:9-14.
192. **Simonsen J.**, Owen L.N., sir Barton D., Ross W.C.J. (1957). The triterpenes and their derivates. University Press, California University.
193. **Siekierkowska A.**, Okulicz-Kozaryn I., Kamińska E., Szulc M., Mikołajczak P. (2007): Effect of molsidomine on peripheral antinociceptive activity of morphine. *7th International Congress of Young Medical Scientists. Poznań, Poland, May 20-22, 2007. Abstract book. Poznań*, s. 198.
194. **Sochocka M.**, Błach-Olszewska Z. (2005). Mechanizmy wrodzonej odporności. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*; 59:250-258.
195. **Sporn M.B.**, Liby K.T., Yore M.M., Fu L., Lopchuk J.M., Gribble G.W. (2011). New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by infammatory and oxidative stress. *Journal of Natural Products*; 74(3):537-45.
196. **Stanley P.L.**, Steiner S., Havens M., Tramposch K.M. (1991). Mouse skin inflammation induced by multiple topical aplication of 12-o-tetradecanoyphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacology*; 4: 262-271.
197. **Su Y.**, Zhang Z., Trautmann K., Xu S., Schluesener H.J. (2005). TLR and NOD2 ligands induce cell proliferation in the rat intact spinal cord. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*; 64:991-997.
198. **Suh S.J.**, Jin U.H., Kim K.W., Son J.K., Lee S.H., Son K.H., Chang H.W., Lee Y.C., Kim C.H. (2007). Triterpenoid saponin, oleanolic acid 3-O-b-D-glucopyranosyl (1-3)-a-L-rhamnopyranosyl(1-2)-a-L-arabinopyranoside (OA) from *Aralia elata* inhibits LPS-induced nitric oxide production by down-regulated NF-kB in raw 264.7 cells. *Archives of Biochemistry&Biophysics*; 467: 227-233.
199. **Szakiel A.**, Janiszowska W. (2002). The mechanism of oleanolic acid monoglycosides transport into vacuoles isolated from *Calendula officinalis* leaf protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*; 40:203-209.
200. **Szakiel A.**, Grzelak A., Dudek P., Janiszowska W. (2003). Biosynthesis of oleanolic acid and its glycosides in *Calendula officinalis* suspension culture. *Plant Physiology and Biochemistry*; 41:271-275.
201. **Szakiel A.**, Ruszkowski D., Janiszowska W. (2005). Saponins in *Calendula officinalis* L. – structure, biosynthesis, transport and biological activity. *Phytochemistry Reviews*; 4:151-158.
202. **Takeda K.**, Akira S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*; 16:3-9.
203. **Takeda K.**, Akira S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*; 17:1-14.
204. **Takeda K.**, Nakane T., Masuda K., Ishii H. (2010). Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoid acids, supress TNF- α -induced E – selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells. *Phytomedicine*; 17(14):1114-19.
205. **Tramullas M.**, Finger B.C., Moloney R.D., Golubeva A.V., Moloney G., Dinan T.G., Cryan J.F. (2014). Toll-like receptor 4 regulates chronic stress-induced visceral pain in mice. *Biological Psychiatry*; 76(4):340-348.
206. **Travis J.**, Salvesen G.S. (1983). Human plasma proteinase inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*; 52:655-709.

-
207. **Tsai Y-Ch.**, Won S-J., Lin M-T. (2000). Effects of morphine on immune response in rats with sciatic constriction injury. *Pain*; 88: 155-160.
208. **Tsan M.F.**, Gao B. (2004). Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology*; 76:514-519.
209. **Vasconcelos M.A.L.**, Royo V., Ferreira D.S., Miller-Crotti A.E., Andrade e Silva M.L., Carvalho J.C.T., Bastos J.K., Cuhna W.R. (2006). *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Zeitschrift fur naturforschung*; 61c:477-482.
210. **Vinegar R.**, Schreiber W., Hugo R. (1969). Biphasic development of carrageenan oedema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 166:96-103.
211. **Watkins L.R.**, Maier S.F. (2005). Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to chronic pain. *Journal of Internal Medicine*; 257:139-155.
212. **Weitz J.I.**, Huang A.J., Landman S.L., Nicholson S.C., Silverstone S.C. (1987). Elastase - mediated fibrynogenolysis by chemoattractant - stimulated neutrophils occurs in the presence of physiologic concentration of antiproteinas. *Journal of Experimental Medicine*; 166(6):1836-50.
213. **White C.**, Kambe T., Fulcher Y.G., Sachdev S.W., Bush A.I., Fritsche K., Lee J., Quinn T.P., Petris M.J. (2009). Cooper transport into the secretory pathway is regulated by oxygen in macrophages. *Journal of Cell Science*; 122:1315-21.
214. **Winsauer G.**, de Martin R. (2007). Resolution of inflammation: intracellular feedback loops in the endothelium. *Thrombosis and Haemostasis*; 97:364-369.
215. **Winter C.A.**, Risley E.A., Nuss G.W. (1962). Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceeding of Society of Experimental Biology and Medicine*; 111: 544-547.
216. **Wrodliczek J.**, Dobrogowski J. (2007). *Leczenie bólu. Rozdział 1: Mechanizm powstawania bólu*; Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
217. **Wrzeczono U.**, Zaprutko L. (2001). *Chemia związków naturalnych; Rozdział 4 - Terpenoidy*; UM Poznań, (Wydanie 1);
218. **Wu C.R.**, Hseu Y.C., Lien J.C., Lin L.W., Lin Y.T., Ching H. (2011). Triterpenoid contents and anti-inflammatory properties of the methanol extracts of ligustrum species leaves. *Molecules*; 16(1):1-15.
219. **Wust S.K.**, Blumenthal M.N., Corazalla E.O., Benson B.A., Dalmasso A.P. (2006). Complement in asthma: sensitivity to activation and generation of C3a and C5a via the different complement pathways. *Translational Research*; 148:157-163.
220. **Yamamoto Y.**, Ganyor R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the Nf- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer, *Journal of Clinical Investigation*; 107(2), 135-142.
221. **Yasukawa K.**, Akihisa T., Kanno H., Kaminaga T., Izumida M. (1996). Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biological&Pharmaceutical Bulletin*; 19: 573-576.
222. **Ying Q.L.**, Rinehart A.R., Simon S.R., Cheronis J.C. (1991). Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. *Biochemistry Journal*; 277:521-526..
223. **You Z.**, Luo C., Zhang W., Chen Y., He J., Zhao Q., Zuo R., Wu Y. (2011). Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: Involvement in depression. *Behavioural Brain Research*; 225(1):135-141.
-

-
224. **Yost C.C.**, Weyrich A.S., Zimmerman G.A. (2011). The platelet activatinf factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie*; 92(6):692-697.
225. **Zabłocka A.** (2001). Współzależność układu immunologicznego i nerwowego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*; 55:3-15.
226. **Zha L.Y.**, Mao L.M., Lu X.C., Deng H., Ye J.F., Chu X.W., Sun S.X., Luo H.J. (2011). Anti-inflammatory effect of soyasaponins through suppressing nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 267.4 cells by attenuation of Nf-kappaB-mediated nitric oxide synthase expression. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*; 21(8):2415-8.
227. **Zhang Z.**, Trautmann K., Schluesener H.J. (2005). Microglia activation in rat spinal cord by systemic injection of TLR3 and TLR7/8 agonists. *Journal of Neuroimmunology*; 164:154-160.
228. **Zipfel P.F.**, Heinen S., Jozsi M., Skerka C. (2006). Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Molecular Immunology*; 43:97-106.
229. **Żelawski W.**, Witalińska-Łabuzek J., Stadnicki A. (2005). Rola układu kalikreina – kininy w chorobach przewodu pokarmowego. *Wiadomości Lekarskie*; LVIII:331-334.
230. **Żylicz Z.**, Krajnik M. (2003). Jak powstaje ból? Neurofizjologia bólu dla początkujących. *Polska Medycyna Paliatywna*; 2:49-55.

10. Wykaz rycin i tabel

ZBIÓR RYGIN WYKORZYSTANYCH W PRACY	
Lp.	Opis
1.	Proces powstawania ogniska zapalnego
2.	Klasyczny szlak nocycypcji
3.	Chemiczne mediatory bólu i zapalenia
4.	Klasyczny szlak aktywacji czynnika NF- κ B
5.	Budowa oraz ogólny schemat szlaku przekazywania sygnału przez receptory <i>Toll-like</i>
6.	Różne szlaki aktywacji receptorów <i>Toll</i> -podobnych: TLR2, TLR4 oraz TLR3 w komórkach mikrogleju rdzenia kręgowego w przebiegu powstawania bólu przewlekłego
7.	Biosynteza kwasu oleanolowego
8.	Budowa kwasu oleanolowego i strategiczne miejsca wpływające na aktywność przeciwbólową oraz przeciwzapalną: grupa hydroksylowa przy węglu C ₃ oraz grupa karboksylowa przy C ₁₇
9.	Struktura chemiczna 3-O- β -D-glukuronidu kwasu oleanolowego
10.	Ester metylowy kwasu 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owego (BB XII/59)
11.	Morfolid kwasu 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owego (BB XII/72)
12.	Kwas 3-(2-acetoksy-1-benzoil)oksyiminoolean-12-en-28-owy (BB XII/73)
13.	Wpływ substancji BB XII/59 na aktywność lokomotoryczną horyzontalną (A) oraz wertykalną (B) u myszy badaną w ciągu 5 minut po 30 minutach od jednorazowego podaniu
14.	Wpływ substancji BB XII/72 na aktywność lokomotoryczną horyzontalną (A) oraz wertykalną (B) u myszy badaną w ciągu 5 minut po 30 minutach od jednorazowego podaniu <i>p.o.</i>
15.	Wpływ substancji BB XII/73 na aktywność lokomotoryczną horyzontalną (A) oraz wertykalną (B) u myszy badaną w ciągu 5 minut po 30 minutach od jednorazowego podaniu <i>p.o.</i>
16.	Wpływ jednorazowego podania BB XII/59 na reakcję bólową u myszy w teście „ <i>hot plate</i> ”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
17.	Wpływ jednorazowego podania BB XII/72 na reakcję bólową u myszy w teście „ <i>hot plate</i> ”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność

	zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
18.	Wpływ jednorazowego podania BB XII/73 na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
19.	Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/59 na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
20.	Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/72 na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
21.	Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/73 na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
22.	Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/59 z ASA na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
23.	Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/72 z ASA na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
24.	Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/73 z ASA na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
25.	Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/59 z MF na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
26.	Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/72 z MF na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
27.	Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/73 z MF na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
28.	Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/59 z NL na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
29.	Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/72 z NL na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
30.	Wpływ jednorazowego, łącznego podania BB XII/73 z NL na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
31.	Wpływ jednorazowego podania BB XII/59 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badana przy pomocy pletyzmometru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).

32.	Wpływ jednorazowego podania BB XII/72 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badana przy pomocy pletyzmetru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
33.	Wpływ jednorazowego podania BB XII/73 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badana przy pomocy pletyzmetru: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
34.	Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/59 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmetru”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
35.	Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/72 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmetru”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
36.	Wpływ jednorazowego podania ASA w dawkach komplementarnych do stosowanych dawek BB XII/73 na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmetru”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
37.	Wpływ łącznego, jednorazowego podania BB XII/59 z ASA na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmetru”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
38.	Wpływ łącznego, jednorazowego podania BB XII/72 z ASA na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmetru”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
39.	Wpływ łącznego, jednorazowego podania BB XII/73 z ASA na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) badane za pomocą pletyzmetru”: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu (A) oraz zależność zastosowanej dawki do wartości pola pod krzywą (B).
40.	Wpływ jednorazowego oraz wielokrotnego podania BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg (p.o.) na reakcję bólową u myszy w teście „hot plate” oraz zbadanie zjawiska tolerancji: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu.
41.	Wpływ jednorazowego oraz wielokrotnego podania BB XII/72 w dawce 30,0 mg/kg (p.o.) na reakcję zapalną u szczurów po podaniu karageniny (s.c.) oraz zbadanie zjawiska tolerancji: wykres przedstawiający wynik interakcji efektu grupy i czasu.

ZBIÓR TABEL WYKORZYSTANYCH W PRACY	
Lp.	Opis
1.	Wykaz receptorów <i>Toll</i> -podobnych zlokalizowanych u człowieka wraz z ligandami zewnątrz- oraz wewnątrzpochodnymi
2.	Naturalne źródła występowania kwasu oleanolowego
3.	Sekwencje starterów użytych do rt-PCR
4.	Warunki rt-PCR dla poszczególnych genów
5.	Wpływ wielokrotnego podawania pochodnej kwasu oleanolowego na stężenie wybranych prozapalnych cytokin we krwi obwodowej szczurów
6.	Wpływ wielokrotnego podawania pochodnej kwasu oleanolowego na ekspresję mRNA dla wybranych prozapalnych cytokin u szczurów.
7.	Wpływ wielokrotnego podawania pochodnej kwasu oleanolowego na ekspresję mRNA dla wybranych receptorów <i>Toll</i> -podobnych (TLR) u szczurów