



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-19-0033

Postavenie Rho kinázovej dráhy v patomechanizme alergického zápalu dýchacích ciest a možnosti jej farmakologického ovplyvnenia

Zodpovedný riešiteľ **prof. RNDr. Soňa Fraňová, PhD.**

Príjemca

Univerzita Komenského v Bratislave - Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

-

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

-

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

ADC Franova S, Molitorisova M, Kalmanova L, Palencarova J, Joskova M, Smiesko L, Mazerik J, Sutovska M. The anti-asthmatic potential of Rho-kinase inhibitor hydroxyfasudil in the model of experimentally induced allergic airway inflammation. Eur J Pharmacol. 2023;938:175450. doi:10.1016/j.ejphar.2022.175450.

ADC Mažerik J, Gondáš E, Smieško L, Fraňová S, Šutovská M. Effects of TRPV4 channel blocker on airway inflammation and airway defense reflexes in experimentally induced model of allergic asthma. Respir Physiol Neurobiol. 2023; 316:104123. doi: 10.1016/j.resp.2023.104123.

ADM Mažerik J, Smieško L, Fedorová L, Gondáš E. Experimental evaluation of the nonselective and selective TMEM16 family calcium-activated chloride channel blockers in the airways. Eur. Pharm. J. 70, 2023. doi: <https://doi.org/10.2478/afpuc-2023-0016>

ADC Joskova M, Durdik P, Sutovska M, Grendar M, Koniar D, Hargas L, Banovcin P, Franova S: Negative impact of anesthesia with midazolam, sufentanil, and propofol used in pediatric flexible bronchoscopy on the tracheal ciliary beat frequency in guinea pigs. J Pharmacol Sci 2020; 142(4): 165-171. doi: 10.1016/j.jphs.2020.01.005.

ADC Fraňová, S., Molitorisová, M., Kazimierová, I., Jošková, M., Forsberg Imnoy, C., Nováková, E., Šutovská, M.: Pharmacodynamic evaluation of dihydroxyflavone derivative chrysin in a guinea pig model of allergic asthma. Journal of Pharmacy and Pharmacology 73, (2021), s. 233-240. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgaa008>

ADC Gondáš E, Kráľová Trančíková A, Dibdiaková K, Galanda T, Hatok J, Račay P,

Dobrota D, Murín R. Immunodetection of Pyruvate Carboxylase Expression in Human Astrocytomas, Glioblastomas, Oligodendrogliomas, and Meningiomas. *Neurochem Res.* 2023;48(6):1728-1736. doi: 10.1007/s11064-023-03856-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10119210/>

ADC Jesenak M, Durdik P, Oppova D, Franova S, Diamant Z, Golebski K, Banovcin P, Vojtkova J, Novakova E. Dysfunctional mucociliary clearance in asthma and airway remodeling - New insights into an old topic. *Respir Med.* 2023; 218:107372. doi: 10.1016/j.rmed.2023.107372.

ADC Kocmálová, M., Kazimierová, I., Barboríková, J., Jošková, M., Fraňová, S., Šutovská, M.: The Changes in Expression of Na(V)1.7 and Na(V)1.8 and the Effects of the Inhalation of Their Blockers in Healthy and Ovalbumin-Sensitized Guinea Pig Airways. *Membranes* 11, (2021), s. 1-17. doi: 10.3390/membranes11070511

ADC Vargova D, Kolková Z, Dargaj J, Bris L, Luptak J, Dankova Z, Franova S, Svihra J, Slávik P, Sutovska M. Analysis of HIF-1 α expression and genetic polymorphisms in human clear cell renal cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2024 Jan 11;29:1611444. doi: 10.3389/pore.2023.1611444.

ADC Molitorisová, M., Šutovská, M., Kazimierová, I., Barboríková, J., Jošková, M., Nováková, E., Fraňová, S.: The anti-asthmatic potential of flavonol kaempferol in an experimental model of allergic airway inflammation: *European Journal of Pharmacology* 891 (2021), s. 1-10.

ADC Oppová D., Bánovčin P., Ďurdík P., Babničová M. and Jeseňák M. Bronchial Asthma and Mucociliary Clearance - A Bidirectional Relationship. *Current Respiratory Medicine Reviews*, 2024, 20, 293-301. doi:10.2174/011573398X296504240308070338

ADC Gondáš E., Mažerik J., Dohál M., Báľentová S., Pokusa M., Vargová D., Smieško L., Šutovská M., Jošková M., Fraňová S. Unveiling the therapeutic possibilities of ROCK inhibitor, GSK429286A, as an anti-asthmatic agent in experimentally induced allergic airway inflammation. In: *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. (In press).

Mgr. Jozef Mažerik – 1 miesto na súťaži XVI. Interaktívna Konferencia Mladých Vedcov 2024, Preveda 2024.

Prezentácia práce autorov: Jozef Mažerik, Eduard Gondáš, Matúš Dohál, Lukáš Smieško, Marta Jošková, Soňa Fraňová and Martina Šutovská. Modulácia obranných reflexov a zápalu dýchacích ciest účinkom amarogentínu na receptory horkej chuti (TAS2R) v experimentálnom modeli alergickej astmy u morčiat.

Mgr. Jozef Mažerik - 1. miesto na medzinárodnej konferencii „XIV. Studentské vedecké konferenci Lékařské fakulty Ostravské univerzity“, dňa 24 apríla 2024 v Ostrave.

Prezentácia práce autorov Jozef Mažerik, Eduard Gondáš, Lukáš Smieško, Marta Jošková, Soňa Fraňová a Martina Šutovská: Skúmanie vplyvu amarogentínu na aktiváciu mastocytov prostredníctvom agonizmu na receptoch horkej chuti (TAS2R).

Uplatnenie výsledkov projektu

- Hľadanie nových zdrojov látok v liečbe alergickej astmy je opodstatnené zvyšujúcou sa prevalenciou uvedeného ochorenia v populácii. Súčasná farmakoterapia je založená na podávaní látok s bronchodilatačným účinkom tzv. uvoľňovačov a látok s protizápalovým pôsobením tzv. kontrolórov astmy. Každá skupina antiastmatík má svoje limitácie použitia buď v samotnom mechanizme pôsobenia alebo výskyte nežiaducich účinkov. Z uvedeného dôvodu je potrebné sa orientovať na látky s komplexným antiastmatickým pôsobením, ktoré sú schopné ovplyvniť obranné mechanizmy, alergický zápal a zároveň aj remodeláciu dýchacích ciest.
- Výsledky našich experimentov poukázali na skupinu inhibítorov alebo modulátorov aktivity RhoA/Rho-kinázovej signálnej dráhy ako skupinu látok s komplexným účinkom na obranné mechanizmy, priebeh alergického zápalu a remodeláciu v dýchacích cestách. Z uvedených faktov vyplýva, že sú vhodným kandidátom na látky, ktorým je potrebné venovať pozornosť z dôvodu farmakoterapie závažnej alergickej astmy.
- Zároveň sme presvedčení, že výsledky projektu prispievajú k prehĺbeniu a spresneniu poznatkov o funkcii Rho-kinázovej dráhy a jednotlivých izoforiem Rho-kináz v alergickom zápale a remodelácii dýchacích ciest.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Projekt bol zameraný na štúdium úlohy Rho-kinázovej signálnej dráhy v patomechanizme alergického zápalu, objasnenie úlohy jednotlivých izoform Rho kináz ROCK1 a ROCK2 pri regulácii alergického zápalu, remodelácie a obranných mechanizmov dýchacích ciest v podmienkach experimentálne vyvolanej alergickej astmy. V experimentoch boli sledované účinky priamych selektívnych a neselektívnych inhibítorov ROCK. Zároveň bola študovaná účinnosť látok nepriamo ovplyvňujúcich Rho-kinázovú signálnu dráhu: blokátorov TRP receptorov (TRPV4, TRPA1) a modulátorov iónových kanálov (blokátorov CRAC kanálov, modulátorov aktivity K⁺ a Cl⁻ iónových kanálov), ktoré stimulujú ROCK alebo sú substrátom Rho-kináz.

Použitými experimentálnymi postupmi boli komplexne stanovené parametre charakterizujúce stupeň zápalu prebiehajúceho v dýchacích cestách (zápalové cytokíny, chemokíny, aktivita buniek imunitného systému) a faktory remodelácie (rastové faktory, markery charakterizujúce hypersekreciu hlienu). Okrem protizápalovej a antiremodelačnej aktivity sledovaných látok bol hodnotený ich vplyv na obranné mechanizmy dýchacích ciest: kašľový reflex, bronchokonstrikciu a frekvenciu pohybu cilií riasinkového epitelu, ako jedného z najdôležitejších súčastí mukociliárneho klérensu.

Ciele projektu boli naplnené a riešenie projektu prinieslo množstvo originálnych výsledkov. Výsledky preukázali antiastmatický potenciál priamych inhibítorov Rho-kináz. Sledované látky (hydroxyfasudil, GSK 429286A a H-1152 dihydrochlorid) inhibovali obranné mechanizmy, alergický zápal (znižovaním zápalových Th1, Th2 cytokínov a leukocytov). Študované inhibítory Rho kináz preukázali aj významný antiremodelačný účinok demonštrovaný znížením koncentrácie rastových faktorov a ich receptorov (TGFβ1, EGF, EGFR), a proteínov typických pre subepiteliálnu fibrózu (kolagén III a V). Účinnosť jednotlivých látok bola porovnávaná s referenčnými antiastmatikami používanými v súčasnosti v klinickej praxi. Pravdepodobne schopnosť priamych inhibítorov ROCK ovplyvniť hyperreaktivitu DC alebo zápal a remodeláciu závisí od selektivity inhibície jednotlivých izoformy enzýmu (ROCK1 alebo ROCK2). Látky so zvýšenou selektivitou k ROCK2 preukázali výraznejší protizápalový a antiremodelačný účinok. Látka so zvýšenou inhibičnou aktivitou na ROCK1 výraznejšie ovplyvňovala hyperreaktivitu hladkej svaloviny dýchacích ciest.

Z hľadiska aktivity nepriamych modulátorov Rho-kinázovej dráhy, možno konštatovať, že viaceré iónové kanály priamo alebo sprostredkované cestou Rho-kináz zohrávajú úlohu v patomechanizme bronchiálnej astmy a preto modulácia ich aktivity môže zmierniť príznaky ochorenia. Preukázali sme výrazný antiastmatický potenciál blokátora CRAC kanálov, TRPV4, KCa3.1 a agonistu TAS2R. Z klinického hľadiska sa ako najperspektívnejšia javí inhibícia aktivity TRPV4. Okrem toho aktuálne vedecké štúdie naznačujú aj úlohu Rho-kináz pri regulácii expresie membránových TRPV4 a funkčné prepojenie s relatívne novo objaveným pannexin1 iónovým kanálom, ktorý uvoľňuje ATP a hrá významnú úlohu v medzibunkovej komunikácii.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The project was focused on the study of the role of the Rho-kinase signalling pathway in the pathomechanism of allergic inflammation, elucidation of the role of individual isoforms of Rho kinases ROCK1 and ROCK2 in the regulation of allergic inflammation, remodelling and defence mechanisms of the respiratory tract in conditions of experimentally induced allergic asthma. The effects of direct selective and non-selective ROCK inhibitors were monitored in the experiments. At the same time, the effectiveness of substances indirectly influencing the Rho-kinase signalling pathway was studied: TRP receptor blockers (TRPV4, TRPA1) and ion channel modulators (CRAC channel blockers, K⁺ activity modulators and Cl⁻ ion channels) that stimulate ROCK or are a substrate of Rho-kinases.

Our experimental procedures were designed to comprehensively determine the parameters characterizing the degree of inflammation in the respiratory tract (inflammatory cytokines, chemokines, activity of immune system cells) and remodelling factors (growth factors, markers characterizing mucus hypersecretion). In addition to the anti-inflammatory and anti-remodelling activity of the monitored substances, we evaluated their effect on the respiratory tract defence mechanisms: cough reflex, bronchoconstriction and frequency of movement of ciliated epithelium, as one of the most critical components of mucociliary clearance.

The objectives of our project were fulfilled, and the solution brought several original results.

The results demonstrated the anti-asthmatic potential of direct Rho-kinase inhibitors. The monitored substances (hydroxyfasudil, GSK 429286A and H-1152 dihydrochloride) inhibited allergic inflammation defence mechanisms, showing a significant anti-remodeling effect. The efficacy of the individual substances was compared with the reference anti-asthmatics currently used in clinical practice. The ability of direct ROCK inhibitors to affect DC hyperreactivity or inflammation and remodelling depends on the selectivity of inhibition of a single isoform of the enzyme (ROCK1 or ROCK2). Substances with increased selectivity for ROCK2 showed a more pronounced anti-inflammatory and anti-remodeling effect. A substance with increased inhibitory activity on ROCK1 had a more pronounced effect on the hyperreactivity of airway smooth muscle.

From the point of view of the activity of indirect modulators of the Rho-kinase pathway, it can be stated that multiple ion channels directly or indirectly through the Rho-kinase pathway play a role in the pathomechanism of bronchial asthma and, therefore, modulation of their activity can alleviate the symptoms of the disease. We demonstrated the significant anti-asthmatic potential of the CRAC channel blocker, TRPV4, KCa3.1 and the agonist TAS2R. From a clinical point of view, inhibition of TRPV4 activity is the most promising. In addition, current scientific studies also suggest a role for Rho-kinases in regulating the expression of membrane TRPV4 and a functional link to the relatively newly discovered pannexin1 ion channel, which releases ATP and plays a vital role in intercellular communication.