

## 7. Streszczenie

Choroba Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego należą do nieswoistych zapaleń jelit charakteryzujących się wieloletnim przebiegiem i występującymi naprzemiennie okresami zaostrzeń i remisji. Początkowe objawy kliniczne w obu schorzeniach są podobne. W miarę trwania choroby pojawiają się powikłania jelitowe i pozajelitowe, a różnice między ChLC a WZJG stają się bardziej widoczne.

Etiologia NZJ jest niejasna, ale aktualnie najbardziej prawdopodobna wydaje się koncepcja o wieloczynnikowym podłożu nieswoistych zapaleń jelit. Współdziałanie czynników genetycznych i środowiskowych w połączeniu z oddziaływaniem flory jelitowej może prowadzić do nasilonej odpowiedzi immunologicznej polegającej na zwiększeniu migracji, proliferacji i aktywacji limfocytów Th1, Th2, Th17 oraz zwiększeniu stężeń cytokin prozapalnych, w tym TNF- $\alpha$  oraz IL-17, które warunkują rozwój i utrzymanie stanu zapalnego.

Leczenie farmakologiczne NZJ obejmuje stosowanie aminosalicylanów, glikokortykosteroidów, leków immunosupresyjnych i biologicznych. Wobec przewlekłego przebiegu NZJ oraz nie zawsze skutecznej i obciążonej działaniami niepożądanymi farmakoterapii, wciąż aktualne i uzasadnione są próby poszukiwania nowych metod terapii. W badaniach nad nimi stosuje się eksperymentalne modele NZJ, które pomagają w wyjaśnieniu złożonej patogenezy choroby, jak również pozwalają, co jest szczególnie istotne w kontekście niniejszej pracy, ocenić skuteczność nowych, potencjalnie leczniczych substancji. Wyróżnia się cztery grupy modeli doświadczalnych: zapalenie indukowane bodźcem chemicznym, wywołane manipulacjami immunologicznymi, genetycznymi oraz rozwijające się spontanicznie.

W niniejszej pracy oceniano wpływ mangiferyny na przebieg eksperymentalnego zapalenia jelit wywołanego podaniem kwasu trinitrobenzenosulfonowego (TNBS). Mangiferynę otrzymano z kłącza *Belamcanda chinensis* w wyniku kilkuetapowego procesu. W celu potwierdzenia tożsamości chemicznej otrzymanej mangiferyny przeprowadzono ultraszybką chromatografię cieczową sprzężoną ze spektroskopią mas, a weryfikację jej czystości wykonano przez oznaczenie ilościowe. Badanie przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar przydzielonych losowo do 8 grup

doświadczalnych (K, C, M<sub>10</sub>, M<sub>30</sub>, M<sub>100</sub>, CM<sub>10</sub>, CM<sub>30</sub>, CM<sub>100</sub>). Zapalenie jelit wywoływano przez doodbytnicze podanie etanolowego roztworu TNBS. Mangiferynę rozpuszczoną w wodzie destylowanej podawano dożołądkowo za pomocą metalowej sondy. Po indukcji zapalenia szczury usypiano przez podanie dootrzewnowe pentobarbitalu i uśmiercano przez dyslokację kręgow szyjnych. Następnie pobierano 8-centymetrowy odcinek jelita grubego, który oczyszczano, ważono, oceniano makroskopowo i dzielono wzdłuż na 2 części. Pierwszą część utrwalano w formalinie do badań histopatologicznych, a drugą zamrażano do badań biochemicznych. Przy użyciu gotowych zestawów oznaczano kolorymetrycznie stężenie MDA i aktywność SOD oraz immunofluorescencyjnie stężenia TNF- $\alpha$  i IL-17.

Różnice w nasileniu zmian zapalnych między poszczególnymi badanymi grupami szczurów oceniano, uwzględniając masę ciała zwierząt, masę jelita grubego, wielkość uszkodzeń makro- i mikroskopowych tkanek jelita grubego oraz wartości stężeń TNF- $\alpha$ , IL-17, MDA i aktywność SOD w homogenatach pobranych tkanek jelit.

Podanie TNBS wywołało u wszystkich szczurów spadek masy ciała oraz zwiększenie masy względnej jelita grubego, a także powodowało powstawanie uszkodzeń tkanek jelita grubego ocenianych makro- i mikroskopowo. W zmienionych zapalnie tkankach jelita grubego dochodziło do zwiększonego wywarzania TNF- $\alpha$ , IL-17 i MDA oraz zmniejszenia aktywności SOD w porównaniu do tkanek zwierząt kontrolnych. Mangiferyna stosowana u zwierząt bez TNBS nie wpływała na wartości tych parametrów. Mangiferyna działała ochronnie, zmniejszając nasilenie uszkodzeń wywołanych podaniem TNBS. Mangiferyna w dawkach 30 i 100 mg/kg zmniejszała oceniane makroskopowo i mikroskopowo uszkodzenia tkanek jelita grubego. Zdolność mangiferyny do hamowania wystąpienia objawów doświadczalnego zapalenia jelit wynika z jej działania przeciwzapalnego i antyoksydacyjnego. Ocena stężeń cytokin prozapalnych wykazała, że istnieje tendencja do ich mniejszego wytwarzania w tkankach jelit u zwierząt przyjmujących mangiferynę przed podaniem TNBS niż u otrzymujących tylko TNBS. Stężenia TNF- $\alpha$  i IL-17 były mniejsze, gdy stosowano mangiferynę w dawce 100 mg/kg. Ocena stężenia MDA i aktywności SOD wykazała, że mangiferyna w każdej ze stosowanych dawek zmniejszała ilość

MDA powstającego w tkankach jelita grubego, a w dawce 100 mg/kg zwiększała aktywność SOD.

Podsumowując wyniki uzyskane w niniejszym badaniu, można stwierdzić, że mangiferyna łagodziła przebieg doświadczalnego zapalenia jelit wywołanego podaniem roztworu TNBS u wszystkich szczurów. Ochronny wpływ mangiferyny wynika z jej działania przeciwzapalnego, a także w mniejszym stopniu z działania antyoksydacyjnego.

## 8. Summary

Inflammatory bowel diseases (IBD), including Crohn's disease and ulcerative colitis, is characterized by chronic relapsing inflammatory condition of the gastrointestinal tract, with both overlapping and distinct pathological and clinical features. Symptoms range from mild to severe during relapses and may disappear during remissions. Symptoms depend on the segment of the gastrointestinal tract involved. With the duration of the disease intestinal and extraintestinal complications occurs. The differences between Crohn's disease and ulcerative colitis patients become more visible.

The pathogenesis of IBD is multifactorial and remains still not completely understood. A complex interaction between the genetic, environmental or microbial factors can lead to enhanced immune response, which involves increase migration, proliferation and activation of Th1, Th2 and Th17 cells and increase concentrations of pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-17, which determine the development and maintenance of inflammation.

Drugs used in inflammatory bowel diseases are chosen on the basis of disease severity, responsiveness drug toxicity and comprise aminosaliclates, glucocorticosteroids, immunosuppressant and biological agents. Pharmacological treatment is not always effective and fraught with side effects of drugs. Thus there is a need to identify new, more efficient and safe therapy for IBD. A variety of animal models of intestinal inflammation have been developed to investigate disease pathogenesis and novel treatment modalities. There are four groups of experimental models: chemically induced, caused by immune or genetic manipulation and developing spontaneously.

The aim of this study was to elucidate the impact of mangiferin on 2,4,6-trinitrobenzensulfonic (TNBS) acid-induced colitis in rats. Mangiferin was isolated from *Belamcanda chinensis* rhizome by a multistage process. To confirm the chemical identity and purity of obtained mangiferin liquid chromatography-mass spectrometry and quantitative analysis were carried out, respectively. After adaptation period, seventy nine male Wistar rats were randomly divided into 8 groups: rats receiving distilled water *i.g.* and once saline *p.r.* (K), rats receiving mangiferin at the doses of 10 or 30 or 100 mg/kg *i.g.* and once saline *p.r.* (M<sub>10</sub>, M<sub>30</sub>, M<sub>100</sub>, respectively), rats receiving distilled water *i.g.* and once TNBS solution

*p.r.* (C), groups receiving mangiferin at the doses of 10 or 30 or 100 mg/kg *i.g.* and a single administration of TNBS solution *p.r.* (CM<sub>10</sub>, CM<sub>30</sub>, CM<sub>100</sub>, respectively). Distilled water and mangiferin were given for 16 consecutive days by gastric tube; saline and TNBS solution were given by rectal catheter at 15<sup>th</sup> day of experiment. Rats were sacrificed by the cervical dislocation under deep pentobarbital anesthesia on the 17<sup>th</sup> day. For each animal, the distal 8 cm segment of the colon was removed and longitudinally opened, cleaned, weighed and examined for macroscopic changes and scored as described in Tab. 2. Then samples were divided into two pieces. One piece was fixed in 4% buffered formalin for histopathology assessment and the other was homogenized and kept frozen until biochemical analyses. Determination of TNF- $\alpha$  and IL-17 concentrations were quantified in large intestinal tissues homogenates by ELISA kits; determination of MDA concentration and SOD activity were performed using colorimetric methods. Animal experiments were conducted under principles in good laboratory animal care, and approved by First Local Ethics Committee for Experiments on Animals in Wroclaw.

The change of body weight, large intestine mass, macroscopic damage scores, microscopic damage scores, concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-17, MDA and SOD activity were the parameters for evaluating the degree of inflammation in IBD in rats.

In the present study, the rats from the TNBS-treatment group developed colitis resulted in the body weight decrease, the large intestine mass increase and intestinal tissues damage in comparison to the control group. Lesions in the intestinal tissues were quantified by a macro- and microscopic damage score. These lesions were associated with increased expression of TNF- $\alpha$ , IL-17, MDA and decreased SOD activity compared to the control group. The administration of mangiferin in the rats not treated with TNBS did not exert any changes of all studied parameters. Mangiferin exerted a protective effect reducing the intensity of damage caused by TNBS. Mangiferin at the dose of 30 and 100 mg/kg reduced macroscopic and microscopic colonic damage score. Assessment of concentrations pro-inflammatory cytokines showed that there is a tendency for the lower secretion of TNF- $\alpha$  and IL-17 from intestinal tissues in animals treated with mangiferin prior to administration of TNBS compared to animals receiving only

TNBS. Only at the dose of 100 mg/kg mangiferin decreased TNF- $\alpha$  and IL-17 concentrations in intestinal tissues compared to the colitis group.

Upon treatment with mangiferin at the doses of 10 and 30 and 100 mg/kg MDA concentration in intestinal tissues was lower compared to the colitis group. Mangiferin increased SOD activity in intestinal tissues only at the dose of 100 mg/kg compared to the colitis group.

In summary, mangiferin alleviated the course of TNBS-induced colitis in all rats. Mangiferin exerted a protective effect on experimental colitis in rats by modifying the inflammatory response and promoting damaged tissue repair to improve colonic oxidative stress.