

ROZPRAWA DOKTORSKA

lek. mgr inż. Julia Krajewska

**Opracowanie nowych form terapii celowanej nieswoistych chorób
zapalnych jelit o zwiększonej biodostępności i efektywności terapeutycznej
w oparciu o związki pochodzenia roślinnego i kompleksy metali
oraz formulacje liposomowe**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jakub Fichna

Zakład Biochemii

Katedra Biochemii i Chemii

Wydział Lekarski

Łódź 2022



Streszczenie w języku polskim

Wstęp

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) to grupa nieuleczalnych, przewlekłych chorób zapalnych układu pokarmowego o wieloczynnikowej patogenezie. Wyróżnia się dwa główne typy NChZJ: wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChL-C). W związku z rosnącą zapadalnością, ciężkim przebiegiem i niesatysfakcjonującymi wynikami obecnych schematów leczenia, istnieje potrzeba wyznaczenia nowych strategii terapeutycznych.

Cel naukowy

Celem pracy doktorskiej była ocena nowych potencjalnych form terapii NChZJ poprzez zdefiniowanie działania przeciwzapalnego liposomów, nanocząstek srebra otrzymanych przy wykorzystaniu ekstraktu z czarnej porzeczki oraz kompleksu złota (III).

Materiały i metody

Liposomy otrzymano metodą hydratacji filmu lipidowego, nanocząstki srebra uzyskane zostały przy wykorzystaniu srebra oraz ekstraktu z czarnej porzeczki, a związek kompleksowy złota za pomocą syntezy chemicznej. Preparaty badano *in vitro*, w mysiej makrofagowej linii komórkowej RAW264.7, gdzie stan zapalny wywoływano lipopolisacharydem (LPS), oraz *in vivo*, w mysich modelach stanu zapalnego jelit wywoływanych przez kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy (TNBS) lub sól sodową siarczanu dekstranu (DSS). *In vitro*, efektywność preparatów oceniano testem Griessa, wykorzystując ich zdolność do hamowania produkcji tlenu azotu (NO). W modelu zwierzęcym nasilenie stanu zapalnego oceniano makroskopowo, mikroskopowo oraz oznaczając aktywność mieloperoksydazy (MPO). Dodatkowo, poszukując mechanizmu działania TGS 121, przeprowadzono badania biomolekularne, dzięki którym oznaczono parametry stresu oksydacyjnego oraz oceniono funkcję bariery jelitowej.

Wyniki badań

W ramach badań scharakteryzowano skuteczność trzech potencjalnych strategii leczenia zapalenia jelit.

W pierwszej kolejności podjęto próbę wykorzystania terapii liposomowej dla zwiększenia skuteczności dostarczania leków do obszarów zmienionych zapalnie. Uzyskano umiarkowanie trwałe, homogenny preparat liposomów o średnicy 163 nm. Liposomy zawierające mesalazynę

wykazały jedynie słabe działanie przeciwzapalne; co istotne; zastosowanie liposomów z kwasem chlorogenowym nasiliło objawy stanu zapalnego.

W następnym etapie zbadano skuteczność nanocząstek srebra o średnicy 95 nm (Ag95) i 213 nm (Ag213). Testowane nanocząstki wykazały działanie przeciwzapalne *in vitro* oraz *in vivo*, jednak występowały między nimi istotne różnice: *in vitro*, Ag95 były bardziej efektywne niż Ag213 w niskich stężeniach, ale nie mogły być wykorzystywane w wyższych stężeniach (> 1 ppm) ze względu na cytotoksyczność. Ag213 nie wykazały cytotoksyczności w wyższych stężeniach, były także bardziej skuteczne *in vivo*. Otrzymane wyniki stanowią potwierdzenie, że efekt przeciwzapalny nanocząstek srebra jest zależny od ich rozmiaru. Preparaty uzyskane metodą przyjazną dla środowiska (w oparciu o ekstrakt z czarnej porzeczki) mogą być podstawą dla terapii NChZJ.

W badaniach poświęcono również uwagę związkowi kompleksowemu złota (III) – TGS 121. Ten nowy związek wykazał działanie przeciwzapalne *in vitro* oraz *in vivo*, które było zależne od aktywności mechanizmów antyoksydacyjnych oraz funkcji bariery jelitowej.

Podsumowanie

W rozprawie doktorskiej zostały wskazane nowe kierunki badań prowadzących do zwiększenia skuteczności leczenia NChZJ poprzez wykorzystanie nośników leków lub zastosowanie nowych związków aktywnych. Odkrycia te mogą doprowadzić do zmian w schematach terapii NChZJ, a w konsekwencji poprawy jakości życia pacjentów.

Streszczenie w języku angielskim

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of incurable, chronic, inflammatory diseases of the gastrointestinal tract, which comprises ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Their pathogenesis is multifactorial. Because of the increasing incidence, severe course of the disease and unsatisfactory results of current treatment regimens, there is a need of developing new therapeutic strategies.

Aims

The aim of the thesis was to investigate new possibilities of IBD treatment through the assessment of the anti-inflammatory activity of liposome preparations, silver nanoparticles obtained with the use of blackcurrant extract and a gold (III) complex.

Materials and methods

Liposomes were obtained through thin film hydration method, silver nanoparticles were acquired with the use of silver and blackcurrant extract, and the gold (III) complex by chemical synthesis. The preparations were tested *in vitro*, in the RAW264.7 murine macrophage cell line which was stimulated with lipopolysaccharide (LPS) to induce inflammation, and *in vivo*, in murine models of colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) or dextran sulfate sodium (DSS). *In vitro*, anti-inflammatory activity of the preparations was assessed through Griess test, using their capacity to inhibit nitric oxide production. In the mouse models, inflammation intensity was evaluated macroscopically, microscopically and through the determination of tissue myeloperoxidase activity. Additionally, to investigate the mechanism of action of TGS 121, biomolecular studies were carried out to determine oxidative stress parameters and evaluate the intestinal barrier function.

Results

Three potential strategies for the treatment of the intestinal inflammation were investigated.

Firstly, an attempt was made to use liposomal therapy in order to increase the efficacy of drug delivery to the inflamed intestinal mucosa. A moderately stable, homogenous preparation of liposomes was obtained. The size of the particles equaled 163 nm. Mesalazine-loaded liposomes showed only a slight anti-inflammatory activity, while liposomes loaded with chlorogenic acid aggravated inflammation.

Next, I examined the efficacy of silver nanoparticles of two sizes: 95 nm (Ag95) and 213 nm (Ag213). They showed anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*, however, important differences between the tested nanoparticles could be observed: *in vitro*, Ag95 was more effective at low concentrations, but they could not be used at higher concentrations (> 1 ppm) because of cytotoxicity. Ag213 did not show cytotoxicity at higher concentrations; *in vivo*, Ag213 was more effective. The studies confirmed that the anti-inflammatory effect of silver nanoparticles is particle size-dependent and the preparations obtained in an environmentally friendly way may be useful in IBD treatment.

Finally, I investigated a new gold (III) complex – TGS 121. This compound showed anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*, and its mechanism of action was related to the antioxidant system and the intestinal barrier function.

Summary

In my PhD thesis I indicated new directions for studies which can result in increasing the efficiency of IBD treatment by employing drug carriers or introducing new active compounds. These discoveries may lead to introducing changes to IBD therapy and, as a consequence, an increase in patients' quality of life.