A study of the interaction of celecoxib, nitric oxide and reactive oxygen species in ischemic acute renal failure in rats

A Thesis

Presented to Faculty of Pharmacy, Alexandria University
In Partial fulfillment of the requirements
For the degree

Of

Master of Pharmaceutical Sciences

In

Pharmacology & Toxicology

جامعة فاروس بالاسكندرية
PUA
Library
C
Pharos University in Alexandria

By

Lobna Mohamed Abdel Moneim Ibrahim Ragab

B.Pharm.Sci.
Faculty of Pharmacy
Alexandria University

P.U.A. Library
Faculty of Pharmacy
Serial No. 01/160
Classification :

2013

الملخص العربي

الفشل الكلوي الحاد الناتج عن منع سريان الدم فى الكلى يعد حدثا طبيا شائع الحدوث كمرحلة تسبق تدهور حالة الكلى ويؤدي إلى أمراض الكلى المزمنة وارتفاع معدل الوفيات. وتشير الفيسيولوجيا الطبية للفشل الكلوى الحاد الناتج عن منع سريان الدم الى تداخل مفعول العديد من الخلايا والتى قد يكون لها مردود طبى فى علاج هذه الحالة. وأثناء عملية زرع الأعضاء يتعرض العضو المنقول حتما فى مرحلة من المراحل للإصابة بالأضرار الناجمة عن عودة سريان الدم فى العضو بعد انقطاعه. والتى قد تعمل على تحفيز الجهاز المناعى وتسهم سلبا فى وظيفة العضو ومدة بقائه فى الجسم قبل عملية رفض الجسم له.

في هذه الدراسة، تم التحقق من إمكانية حدوث تداخل فى المفعول بين أكسيد النيتريك، **وإنزيم سيكلو اوكسجينيز-٢** وكذلك شقائق الأكسجين الحرة النشطة كمسببات لهذا النوع من الفشل الكلوى. وبالاضافة الى ذلك، فقد تمت دراسة التأثير الوقائى المحتمل لبعض الأدوية التى تؤثر على تلك المسارات وذلك باستعمال نموذج مختار للإصابة الناتجة عن إعادة سريان الدم بعد انقطاعه عن الكلى. وشملت الأدوية عقار السليكوكسيب كمثبط **لانزيم سيكلو اوكسجينيز-٢** ول-أرجينين كمانح لأكسيد النيتريك والجمع بينهما. وفى مجموعة أخرى مكملة من التجارب باستعمال الحلقات الأورطية المفصولة من ذكور الجرذان تم دراسة تأثير العقارين السابقين، بالإضافة الى حمض الاسكوربيك، والجمع بينهم على الأوعية الدموية فى حالة نقص الأكسجين ثم إعادة الأكسجين للأنسجة مرة أخرى.

وقد تم إحداث إصابة إعادة تروية الخلايا الكلوية في ذكور الجرذان من النوع (سبراغ داولي) والتى تزن من ٢٥٠-٣٠٠ جم وذلك من خلال ربط الأوعية الدموية المغذية الكليتين لمدة ٤٥ دقيقة ثم إعادة سريان الدم لمدة ٢٤ساعة أو ٤٨ ساعة. وأما عن الحلقات الأورطية المفصولة فقد تم إحداث إصابة نقص الأكسجين باستخدام مزيج من ٥% ثانى أكسيد الكربون و ٩٥% نيتروجين لمدة ٢٠ دقيقة ثم يعاد الأكسجين باستخدام مزيج من ٥% ثانى أكسيد الكربون و ٩٥%أكسجين لمدة ٣٠ دقيقة.

لإجراء بعض التجارب الحيوية يتم منع الطعام عن الجرذان لمدة ١٨ ساعة ثم تخدر بالإيثير للحصول على عينة الدم من محجر العين وإعداد مصل الدم اللازم لتعيين مستويات البولينا والكرياتينين ثم يحفظ عند درجة (-٢٠°) سيليزيس. بعد جمع عينات الدم يتم إزالة الكليتين وتقسم اليمنى الى نصفين. يحفظ نصف فى محلول الفورمالديهيد المضاف لمحلول الملح ثم تصبغ بصبغة الهيماتوكسيلين والإيوزين تمهيدا لفحصها مجهريا لمعرفة مدى إصابة الأنسجة.

ويتم تجميد باقى أنسجة الكلى وتحفظ عند (-٨٠°) سيليزيس لتستخدم فى تعيين بعض المواد مثل: المواد التفاعلية لحمض الثيوباربيتيورات، على هيئة ثانى الدهيد المالونيل ، كدليل على الأكسدة الفوقية للدهون، و الجلوتاثيون المختزل، ونشاط فوق أكسيد الديسميوتاز، ومستوى أكسيد النيتريك، والمحتوى الكلى للبروتين.

أما بالنسبة للتجارب على الحلقات الأورطية المفصولة، فقد تمت مقارنة تأثير نقص الأكسجين وعودته وكذلك الأدوية قيد البحث بإستخدام منحنى الجرعة والاستجابة للأسيتيل كولين و نيتروبروسيد الصوديوم. ويمكن تلخيص النتائج الرئيسية لهذه الدراسة على النحو التالي:

١. أدت إصابة إعادة تروية الخلايا الكلوية إلى إختلال ملحوظ بوظائف الكلى وتراكم ملحوظ فى مستوى كل من الكرياتينين والبولينا في مصل الدم. وصاحب هذا الفشل الكلوى الحاد زيادة ملحوظة، بالجناسة الكلوية، فى الإجهاد التأكسدى والتي تميزت بزيادة في مستويات ثانى الدهيد المالونيل وانخفاض مستويات الجلوتاثيون المختزل ونشاط ديسميوتاز الفوق أكسيد. بالإضافة إلى استنفاد مستوى أكسيد النيتريك والزيادة فى مستوى انزيم السيكلو اوكسجينيز-٢. كما كشف فحص الأنسجة عن نخر أنبوبى حاد و اتساع أنبوبى داخلى، مصاحب بنزيف. وارتفاع كبيرة فى درجة إصابة الأنسجة إلى ٤ بالمقارنة مع مجموعة الجرذان العادية. وبالمثل، أدى نقص الأكسجين ثم إعادته إلى ضعف ملحوظ فى الإرتخاء المعتمد والغير معتمد على البطانة الفارشة للعضلات.

٢. تناول الجرذان للسليكوكسيب (١٠ ملغم / كغم لمدة ٧ أيام) عن طريق الفم قبل إحداث إصابة إعادة تروية الخلايا الكلوية أدى إلى تحسن ملحوظ فى وظائف الكلى وزيادة التوافر الحيوى لأكسيد النيتريك وإنخفاض مستوى انزيم السيكلو اوكسجينيز-٢ مما يشير إلى دور الأخير، على الأرجح كمصدرا لشقائق الأكسجين الحرة النشطة في العمليات البيولوجية، والتى قد تؤدى الى التسبب في الفشل الكلوى الحاد الناتج عن منع سريان الدم. وتعد هذه الدراسة أول دراسة تشير الى الدور الإيجابي للسليكوكسيب على الإجهاد التأكسدى المصاحب للفشل الكلوى الحاد الناتج عن منع سريان الدم. كما أدى السليكوكسيب إلى تصحيح التغيرات المرضية بالأنسجة بدرجات

مختلفة. وبالإضافة إلى ذلك، أدى السليكوكسيب (٢×١٠-٧ مولر) إلى زيادة ملحوظة فى كل من الإرتخاء المعتمد والغير معتمد على البطانة الفارشة للعضلات.

٣. توضح الدراسة أن للسليكوكسيب أكثر من آلية للعمل فهو يحدث تأثيراً يؤدى إلى إرتخاء الحلقات الأورطية المفصولة من الجرذان، وهذا التأثير لا يعتمد على دوره كمثبط لإنزيم سيكلو اوكسجينيز-٢. وقد يكون هذا التأثير ناتج عن تضخيم المسار العصبى لأكسيد النيتريك/جوانوزين أحادى الفوسفات نتيجة لتثبيط مفعول انزيم الفوسفو داى استريز النوع ٥. ويؤكد ذلك انعدام هذا التأثير بإستخدامعن طريق استخدام مادة استر ن ج نيترو ل-أرجينين الميثيل (ل- نام) المثبط للإنزيم المصنع لأكسيد النيتريك. ونظراً لإنتشار انزيم الفوسفو داى استريز النوع ٥ فى الكلى قد تسهم هذه الآلية فى الدور الإيجابى للسيليكوكسيب فى تحسين وظائف الكلى.

٤. حقن الجرذان ب ل-أرجنين (١٢٥ ملغ / كغ) فى الغشاء البريتونى قبل إصابة إعادة تروية الخلايا الكلوية ب ٣٠ دقيقة أدى إلى تحسن ملحوظ فى وظائف الكلى وإنخفاض ملحوظ فى الإجهاد التأكسدى وزيادة التوافر الحيوى لأكسيد النيتريك. كما أدى إلى إنخفاض مستوى انزيم السيكلو اوكسجينيز-٢ بعد إعادة ضخ الدم ب ٤٨ ساعة مع تصحيح التغيرات المرضية بالأنسجة بدرجات مختلفة. وبالإضافة إلى ذلك، أدى ل-أرجنين (١٠-٢ مولر) إلى زيادة كل من الإرتخاء المعتمد على البطانة الفارشة للعضلات والمستقل عنها.

٥. كان ل-أرجنين متفوقا على السليكوكسيب في تحسين الخلل بوظائف الكلى الناتج عن منع سريان الدم، وربما يرجع ذلك إلى زيادة التوافر الحيوى لأكسيد النيتريك مع ل-أرجنين بنسبة أكبر عنه مع السليكوكسيب.

٦. الجمع بين ل-أرجنين والسيليكوكسيب أظهر تأثيراً تآزريا في تحسين الإرتخاء المعتمد والغير معتمد على البطانة الفارشة للعضلات بعد نقص الأكسجين وإعادته فى الحلقات الأورطية المفصولة من الجرذان.

٧. ويمكن إرجاع التأثيرات الواقية لكل من السيليكوكسيب وال ل-أرجينين ضد إصابة إعادة تروية الخلايا الكلوية الى النشاط المضاد للأكسدة لكل الدوائين، إلى جانب قدرة السليكوكسيب على إبطال مفعول انزيم الفوسفو داى استريز النوع ٥.

٨. أدى حمض الأسكوربيك (١٠ ميكرو مولر) ، كونه مضاداً للأكسدة، الى زيادة الإرتخاء المعتمد على البطانة الفارشة للعضلات بعد نقص الأكسجين وإعادته فى الحلقات الأورطية المفصولة من الجرذان. ولكن الجمع بينه وبين ل-أرجنين والسليكوكسيب لم يسفر عن المزيد من التحسن فى إرتخاء الحلقات الأورطية. وقد يرجع ذلك الى أن النشاط المانع للتأكسد ل ل-أرجنين والسليكوكسيب مجتمعين يفوق نشاط حمض الأسكوربيك منفرداً.

٩. تلقى هذه الدراسة بالضوء على تداخل مفعول أكسيد النيتريك وإنزيم السيكلو اوكسجينيز-٢ فى الفيزيولوجيا المرضية لإصابة إعادة تروية الخلايا الكلوية، ويتضح ذلك من انخفاض مستوى السيكلو اوكسجينيز-٢ بعد استخدام ل-أرجنين، والذى يزيد تصنيع أكسيد النيتريك في النظم البيولوجية. كما ألقت الدراسة الضوء على التداخل بين أكسيد النيتريك وشقائق الأكسجين الحرة النشطة، كما اتضح من انخفاض مستوى أكسيد النيتريك بعد إصابة إعادة تروية الخلايا الكلوية والذى صاحبه ارتفاغ ملحوظ فى الإجهاد التأكسدى فى الكلى، مما أدى إلى استنفاد مستوى أكسيد النيتريك.

١٠. وعلاوة على ذلك، فإن نتائج هذه الدراسة تشير إلى إمكانية استخدام السيليكوكسيب مع ل-أرجينين كأحد الطرق العلاجية المستحدثة لعلاج الفشل الكلوى الحاد الناتج عن اعادة سريان الدم بعد انقطاعه مع ضرورة إجراء تجارب إكلينيكية لتأكيد فاعلية هذا النظام العلاجي.