COMPARATIVE STUDY OF THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF GALANTAMINE AND LEFLUNOMIDE WITH EMPHASIS ON THE POTENTIAL MECHANISM(S) OF ACTION OF GALANTAMINE IN EXPERIMENTAL ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS IN RATS

Thesis submitted to Faculty of Pharmacy
Cairo University
In fulfillment for the degree of Ph.D.
in
Pharmaceutical Sciences
(Pharmacology and Toxicology)

By

Mennatallah Adel Gowayed

M.D, Alexandria University, 2012

Under the supervision of

Prof. Dr. Hanan Salah El Din El-Abhar

Professor of Pharmacology
Head of Pharmacology and Toxicology Department
Faculty of Pharmacy
Cairo University

Prof. Dr. Christoph Baerwald

Professor of Rheumatology
Head of Rheumatology Department
Universitätsklinikum Leipzig
University of Leipzig, Germany

Dr. Ahmed Sherif Attia

Associate Professor of Microbiology and Immunology
Faculty of Pharmacy
Cairo University

Dr. Rowaida Refaat Shehata

Lecturer of Pharmacology
Medical Research Institute
Alexandria University

Faculty of Pharmacy
Cairo University
2015

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D.M
Serial No : 174
Classification : 615.9

الملخص العربي

التهاب المفاصل الروماتويدى هو أحد الأمراض الناتجة عن خلل ذاتي بالجهاز المناعي، ومن خصائص هذا المرض وجود التهاب مزمن بالمفاصل. ويمكن بالتشخيص والعلاج المبكر وقاية المريض من تآكل المفاصل وكذلك الحفاظ على وظيفتها. وحديثا أصبح دور الجهاز العصبي اللا إرادي في مقاومة الالتهاب من خلال العصب الحائر موضع اهتمام حيث تبين إن له دورا مؤثرا في الحد من الالتهاب.

يتميز عقار الجالانتامين بتأثير مضاد للالتهاب حيث إنه من خلال تأثيره القابل للعكس على الجهاز العصبي المركزي بالإضافة الى تثبيطه لإنزيم أستيل كولين إستيريز يؤدي إلى منع انحلال الأستيل كولين وتجمعه في نقاط الاشتباك العصبي. كما أنه من خلال اتحاده مع مستقبلات الأستيل كولين ألفا ٧ النيكوتينية، والمتواجدة في الخلايا العصبية والالتهابية، يقوم انتقائيا بتقوية المسار النيكوتيني والذي يعد مسئولا جزئيا عن دوره العلاجي. ونظرا لوجود الإنزيمات المسئولة عن إنتاج الأستيل كولين ومستقبلات الأستيل كولين ألفا ٧ النيكوتينية في الأغشية المحيطة بالمفاصل بالإضافة إلى خلايا الكاتيكولامينات فقد كان من المنطقي اختبار إمكانية جالانتامين في تحسين اعراض المرض المحدث تجريبيا في في الجرذان وإمكانية تعديل الاستجابات المناعية ومقاومة الالتهاب في مرضى المفاصل الروماتويدي عن طريق استهداف وتحفيز المسار الكوليني.

تلعب خلايا تى المناعية المنظمة والتي تتواجد بكثرة في الأغشية المحيطة بمفاصل مرضى الروماتويد دورا محوريا في منع إضطرابات المناعة الذاتية والتحكم فيها وذلك نظرا لامتلاكها جهاز كوليني كامل بالإضافة الى وجود العديد من مستقبلات الأستيل كولين النيكوتينية والمسكرينية على سطحها ولذلك كان استهداف تلك الخلايا بالجالانتامين المحفز لتلك المستقبلات في هذا البحث للتأكد من دوره المحتمل في علاج التهاب المفاصل الروماتويدي بالإضافة الى دراسة بعض آليات هذا التأثير.

- **تم تقسيم البحث إلى ثلاثة أجزاء:**
  - الجزء الأول ويهدف إلى تقييم الدور المقاوم للالتهاب للجالانتامين ومقارنة تأثيره بعقار اللفلونامید فى علاج روماتويد المفاصل التجريبي في الجرذان.
  - الجزء الثاني ويهدف إلى اكتشاف بعض آليات مقاومة الجالانتامين للالتهاب من خلال دراسة الارتباط بين العصب السمبثاوي المغذي للطحال ومستقبلات الأستيل كولين ألفا ٧ النيكوتينية وبين تأثير الجالانتامين المقاوم للالتهاب في روماتويد المفاصل التجريبي في الجرذان. كما إن وجود انزيمات تصنيع مادة الأستيل كولين في الأغشية المحيطة بالمفاصل وكثافة مستقبلات الأستيل كولين ألفا ٧ النيكوتينية وخلايا الكاتيكولامينات بها يساعد على دراسة آليات عمل الجلانتامين في الأغشية المحيطة بالمفاصل.

في الجزء الأول والثاني من البحث تم حقن الجرذان بجرعة قدرها ٠,١ مللي من معلق ميكوبكتريوم بيتيركوم، وتركيزه ١٢مجم/مللي بعد معالجته حراريا، وتم الحقن في الجلد عند قاعدة الذيل، ثم تركت الجرذان دون علاج لمدة أربعة عشر يوما، وهي المدة اللازمة لظهور علامات الالتهاب المزمن بالمفاصل.

- الجزء الثالث فيهدف إلى التحقق من دور خلايا تى المناعية المنظمة في التأثير المناعي للجالانتامين.

- **<u>في الجزء الأول</u>** تم تقسيم الجرذان المصابة برومانويد المفاصل إلى ستة مجموعات كل منها يتكون من ثمانية جرذان واستمر العلاج لمدة أسبوعين كما يلي:

المجموعة الأولى: الجرذان الاصحاء غير المعالجة تناولت يوميا محلول ملح معقم عن طريق الفم.

المجموعة الثانية: الجرذان المصابة برومانويد المفاصل وغير المعالجة أعطيت (محلول ملح معقم) يوميا عن طريق الفم.

المجموعة الثالثة: عولجت الجرذان المصابة برومانويد المفاصل بعقار الجالانتامين (١,٢٥ مجم/كجم يوميا) عن طريق الفم.

المجموعة الرابعة: عولجت الجرذان المصابة برومانويد المفاصل بعقار الجالانتامين (٢,٥ مجم/كجم يوميا) عن طريق الفم.

المجموعة الخامسة: عولجت الجرذان المصابة برومانويد المفاصل بعقار الجالانتامين (٥ مجم/كجم يوميا) عن طريق الفم.

المجموعة السادسة: عولجت الجرذان المصابة برومانويد المفاصل بعقار اللفونامید (١٠ مجم/كجم يوميا)، عن طريق الفم.

خلال فترة العلاج تم:

١- تقييم حدة وتطور التهاب المفاصل بقياس مدى تورم الأقدام الخلفية.

٢- في نهاية مدة العلاج تم ذبح الجرذان وتعيين القياسات الآتية في مصل الدم:

- الأجسام المضادة للبيبتيدات الحلقية
- عامل نخر الورم -ألفا
- إنترلوكين ١٠
- بروتين الجاذب الكيميائى للوحيدات-١

٣- تم فصل الأقدام الخلفية وفحصها إشعاعيا لبيان الضرر اللاحق بها

٤- كما تم فصل أكباد وطحال الجرذان وتعيين أوزانهم.

- **وفى الجزء الثاني** تم تقسيم الجرذان المصابة برومانويد المفاصل إلى سبعة مجموعات كل منها يحتوي على ستة جرذان واستمر العلاج لمدة خمس أيام بدءا من اليوم الرابع عشر بعد حقن المعلق حتى اليوم التاسع عشر كما يلي:

المجموعة الأولى: الجرذان الاصحاء غير المعالجة أعطيت يوميا محلول ملح معقم عن طريق الفم.

المجموعة الثانية: الجرذان المصابة برومانويد المفاصل وغير المعالجة أعطيت (محلول ملح معقم) يوميا عن طريق الفم.

المجموعة الثالثة: أعطيت الجرذان المصابة برومانويد المفاصل الجالانتامين (٢,٥ مجم/كجم) يوميا عن طريق الفم.

المجموعة الرابعة: أعطيت الجرذان المصابة برومانويد المفاصل جرعتين متتاليتين من ٦ هيدروكسي دوبامين (٥٠ مجم/كجم) للقضاء على عمل الجهاز السمبتاوي كيميائيا. أعطيت الجرعتان خلال ٢٤ ساعة عن طريق الحقن في التجويف البريتوني في اليوم التاسع من حقن المعلق إلى جانب العلاج بمحلول الملح المعقم يوميا عن طريق الفم. وللحفاظ على هذا التأثير أعيد حقن الجرذان ب٦ هيدروكسي دوبامين (١٠٠ مجم/كجم) بعد أسبوع من الحقن الأول.

المجموعة الخامسة: أعطيت الجرذان المصابة برومانويد المفاصل ٦ هيدروكسي دوبامين بنفس طريقة المجموعة الرابعة إلى جانب العلاج يوميا بالجالانتامين (٢,٥ مجم/كجم) عن طريق الفم.

المجموعة السادسة: أعطيت الجرذان المصابة برومانويد المفاصل ميثيل أكونتين (٥,٦ مجم/كجم) يوميا عن طريق الحقن في التجويف البريتوني.

المجموعة السابعة: أعطيت الجرذان المصابة برومانويد المفاصل ميثيل أكونتين (٥,٦ مجم/كجم يوميا) عن طريق الحقن في التجويف البريتوني ١٥ دقيقة قبل إعطائها الجالانتامين (٢,٥ مجم/كجم) عن طريق الفم.

وفى نهاية مدة العلاج تم ذبح الجرذان:

١- تم فصل الطحال لقياس مستوى النورأدرينالين وعامل نخر الورم ألفا.

٢- تم فصل الأقدام الخلفية والحصول على الأنسجة المحيطة بالمفاصل لقياس تركيز أر إن إيه الكلي لعامل نخر الورم ألفا وإنزيم التيروزين هيدروكسيليز.

٣- هذا بالإضافة إلى تعيين مستوى الجلوتاثيون المختزل وبروتين عامل نخر الورم ألفا في الأنسجة.

- **وفى الجزء الثالث** من البحث تم الحصول على عينات من دم ثمانية من مرضى الروماتويد كما استخدمت عينات دم من خمسة أشخاص أصحاء غير مصابين بأية أمراض كمجموعة ضابطة.

١- تم فصل خلايا تى المناعية المنظمة وتحضينها مع الجالانتامين (١٠ ملى مولار) لمدة أربعة وعشرون ساعة وتعيين عدد الخلايا ونشاط المرض قبل وبعد فترة الحضانة.

٢- كما تم جمع السائل الطافي من زرع الخلايا لتعيين عامل نخر الورم ألفا وإنترلوكين ١٠

النتائج التي تم الحصول عليها:

أثبتت نتائج الجزء الأول:

١- أن الجرذان المصابة بالتهاب المفاصل كانت تعاني من انخفاض في الوزن وتورم ملحوظ في الأقدام الخلفية وتغيرات في جميع القياسات بمصل الدم وأيضا تغيرات في نتائج الفحص الإشعاعي للمفاصل.

٢- أدى استخدام الجالانتامين بجميع الجرعات الى انخفاض ملحوظ متدرج بزيادة الجرعة في جميع دلالات الالتهاب وكان التأثير المضاد للالتهاب للجرعة العالية هو الأفضل مقارنة بالليفلوناميد في معظم القياسات.

وفى الجزء الثاني من البحث:

١- أدت الإصابة بالروماتويد إلى زيادة ملحوظة في تركيز النورأدرينالين وعامل نخر الورم ألفا في طحال الجرذان وزيادة في كثافة انزيم التيروزين هيدروكسيليز وعامل نخر الورم ألفا بالمفاصل.

٢- تمكن الجالانتامين بمفرده من إحداث أفضل تأثير على جميع القياسات في الطحال وأنسجة المفاصل.

٣- أدى الحقن ب ٦ هيدروكسي دوبامين، للقضاء على عمل الجهاز السمبثاوي، مما أدى إلى تقليل الزيادات التي رأيناها في جميع القياسات، مما يشير الى احتمالية ان يلعب النورأدرينالين دورا في الأعراض الالتهابية في هذا المرض. أما مع إضافة الجلانتامين فقد أتضح أن الحقن ب ٦ هيدروكسي دوبامين كان له أثر سلبيا على عمل الجلانتامين.

٤- في المجموعة المعالجة بالميثيل أكونتين والجالانتامين معا لم يظهر أي تأثير للجالانتامين إلا في تأثير الخلايا الكاتيكولامينية في المفاصل، حيث انه أظهر وجود مستقبلات الأستيل كولين ألفا ٧ النيكوتينية على سطح انزيم التيروزين هيدروكسيليز المتواجد في أنسجة المفاصل.

من هذه النتائج يتضح أن كلا من مستقبلات الأستيل كولين ٧ ألفا النيكوتينية والجهاز العصبي السمبثاوي لهما دورا رئيسيا في تأثير الجالانتامين المضاد للالتهاب في روماتويد المفاصل التجريبي. كما تثبت نتائج البحث أن عقار الجالانتامين يعتمد في أداء عمله، على الجهاز السمبثاوي في الطحال، بينما يعتمد على الجهاز الكوليني بصورة أكبر في المفاصل. كما أثبتت الدراسة أيضًا، باستخدام ميثيل أكونتين والجالانتامين، وجود مستقبلات الأستيل كولين ألفا ٧ النيكوتينية على سطح التيروزين هيدروكسيليز المتواجد في أنسجة المفاصل. وهذا أول بحث يثبت هذه الحقيقة.

أما في الجزء الثالث من البحث:

١- فقد أثبتت النتائج ضعف كفاءة خلايا تى المناعية المنظمة في منع اضطرابات المناعة الذاتية ومنع إفراز عامل نخر الورم ألفا في مرضى روماتويد المفاصل مقارنة بالأشخاص الأصحاء، ولكنها أظهرت زيادة في مستوى إنترلوكين ١٠ المضاد للالتهاب مما يشير الى محاولة مناعة الجسم من التغلب على المرض.

٢- أدى تحفيز مستقبلات الأستيل كولين ٧ ألفا النيكوتينية الموجودة على خلايا تى المناعية المنظمة بالجالانتامين إلى زيادة في نشاطها القمعي في مرضى الروماتويد وأيضا الأصحاء مما يعد آلية جديدة لعمل الجالانتامين فى علاج الروماتويد بالإضافة لكونه مثبط لإنزيم الأستيل كولين إستيريز ومحفز لمستقبلات ألفا ٧.

مما سبق يتضح أن إستخدام الجالانتامين يمكن أن يمثل استراتيجية جديدة فعالة وغير مكلفة لعلاج التهاب المفاصل الروماتويدي.