Potential Antidiabetic Effect of Galantamine, a Known-Centrally Acting Drug with or without Vildagliptin in Type 2 Diabetic Rats

Thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy

in

Pharmaceutical Sciences
(Pharmacology and Toxicology)

By

Mennatallah Ahmed Ismail Ali
B. Pharm- Ain Shams University-2007
Masters in Pharmacology-Medical Research Institute- Alexandria University- 2012
Assistant Lecturer- Department of Pharmacology and Toxicology
Faculty of Pharmacy and Drug Manufacturing
Pharos University in Alexandria

Under the supervision of

Prof. Dr. Hanan Salah El Din El-Abhar
Professor of Pharmacology and Toxicology
Head of Pharmacology and Toxicology Department
Faculty of Pharmacy
University of Cairo

Dr. Ahmed Sherif Mohamed Hussein Attia
Assistant Professor of Microbiology and Immunology
Department of Microbiology and Immunology
Faculty of Pharmacy
University of Cairo

Dr. Maher Abd El-Nabi Kamel
Assistant Professor of Biochemistry
Department of Biochemistry
Medical Research Institute
University of Alexandria

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D.M
Serial No : 175
Classification : 615.9

Faculty of Pharmacy
Cairo University
2015

ABSTRACT

Ali MA, El-Abhar HS, Kamel MA, Attia AS (2015) Antidiabetic Effect of Galantamine: Novel Effect for a Known Centrally Acting Drug. PLoS ONE 10(8): e0134648. doi:10.1371/journal.pone.0134648

The cholinergic anti-inflammatory pathway is one of the putative biochemical pathways that link diabetes with Alzheimer disease. Hence, we aimed to verify the potential antidiabetic effect of galantamine, unveil the possible mechanisms and evaluate its interaction with vildagliptin. The n5-STZ rat model was adopted and the diabetic animals were treated with galantamine and/or vildagliptin for 4 weeks. Galantamine lowered the n5-STZ-induced elevation in body weight, food/water intake, serum levels of glucose, fructosamine, and ALT/AST, as well as AChE in the tested organs. Moreover, it modulated successfully the lipid profile assessed in serum, liver, and muscle, and increased serum insulin level, as well as % β-cell function, in a pattern similar to that of vildagliptin. Additionally, galantamine confirmed its antioxidant (Nrf2, TAC, MDA), anti-inflammatory (NF-κB, TNF-α, visfatin, adiponectin) and anti-apoptotic (caspase-3, cytochrome c) capabilities by altering the n5-STZ effect on all the aforementioned parameters. On the molecular level, galantamine and vildagliptin have improved the insulin (p-insulin receptor, p-Akt, GLUT4/GLUT2) and Wnt/β-catenin (p-GSK-3β, β-catenin) signaling pathways. On almost all parameters, the galantamine effects surpassed that of vildagliptin, while the combination regimen showed the best effects. The present results clearly proved that galantamine modulated glucose/lipid profile possibly through its anti-oxidant, -apoptotic, -inflammatory and -cholinesterase properties. These effects could be attributed partly to the enhancement of insulin and Wnt/β-catenin signaling pathways. Galantamine can be strongly considered as a potential antidiabetic agent and as an add-on therapy with other oral antidiabetics.

(Key words: Neonatal streptozotocin rat model; type 2 diabetes; n5-STZ; galantamine; vildagliptin; AChE; Nrf2; caspase-3; cytochrome C; insulin signaling pathway; Wnt pathway)

الـمـلـخـص العربي

لقد أصبح النوع الثاني من مرض البول السكري أحد الأمراض الوبائية الأكثر إنتشارا حول العالم حيث يبلغ عدد المصابين به ٣٠٠ مليون شخصًا على الأقل ومن المتوقع أن يزداد هذا العدد ليصبح ٤٤٠ مليون فى عام ٢٠٣٠. إن مقاومة عمل الإنسولين وعجز خلايا بيتا بالبنكرياس عن الحفاظ على المعدل العالي لإفراز الإنسولين كما كان يتم من قبل هما أهم العيوب الأيضية التي تتسبب في هذا المرض.

لقد أصبح تأثير مرض السكري على الجهاز العصبي المركزي ذوأهمية كبيرة. فإن إشارات الكوليني المركزية تدخل في تنظيم إفراز السيتوكينات، إنتاج الجلوكوز / الجليكوجين من الكبد. ومن المرجح أن هذه الآليات الكولينية والتي تشارك في توازن الجلوكوز في الجسم، تختل في حالات البدانة ومقاومة الإنسولين. وبالتالي، فإن النهج الجديد فى إستهداف الأستيل كولين إستريز، لزيادة نشاط المسار الكوليني قد يكون نافذة دوائية مفيدة لعلاج مرض السكري.

استناداً إلى ما سبق، تم إجراء هذا البحث لتقييم التأثيرات / الآليات المحتملة للجالنتامين كعلاج لمرض السكري، وذلك بإستخدام ذكور الجرذان المصابة بالنوع الثاني من مرض البول السكري. بجانب دراسة تأثيره على ضبط مستوى السكر بالدم ومنظور الدهون، و مقاومة عمل الإنسولين والضغط التأكسدي وموت الخلايا المبرمج والإلتهاب ، تناولت هذه الدراسة إمكانية مشاركة من كلا من مسار WNT / بيتا-كاتنين ومسار الإنسولين في التأثير الناتج عن إستخدام الجالنتامين في علاج النوع الثاني من مرض البول السكري. وأجريت هذه الدراسة أيضًا لتقييم الأثر الإيجابي المحتمل للجالنتامين كإضافة لعقار الفيلدجليبتين، الدواء القياسي المستخدم في هذه الدراسة.

في هذه الدراسة، تم تقسيم الذكور الجراء البيضاء التي تبلغ من العمر ٥ أيام إلى مجموعاتين، المجموعة الضابطة ومجموعة الجرذان المصابة بمرض البول السكري، حيث تم حقنهم بمادة الستربتوزوتوسين بجرعة ٩٠ مجم/كجم وتلقت المجموعة الضابطة الحمية التقليدية، في حين تلقت المجموعة الثانية نظام غذائي من خليط الشوكولاته والكعك. وبعد اثني عشر أسبوعا والتأكد من إصابتهم بمرض البول السكري، تم إدراجهم في الدراسة.

إلى جانب مجموعة الضابطة (المجموعة الأولى)، تم تقسيم الجرذان المصابة بمرض البول السكري بشكل عشوائي إلى ثماني مجموعات (إحتوت كل واحدة على ١٠ جرذان) وأبقيت الجرذان على نفس النظام الغذائي حتى نهاية الفترة التجريبية. ومنها،

- المجموعة الثانية: جرذان مصابة بالبول السكري، استُخدمت كمجموعة ضابطة، لم تتلقى أي علاج.
- المجموعات الثالثة والرابعة والخامسة: جرذان مصابة بالبول السكري، أعُطيت الجالنتامين عن طريق الفم بجرعات ٢.٥ و ٥ و ١٠ مجم/كجم يوميا.
- المجموعات السادسة، السابعة، الثامنة: جرذان مصابة بالبول السكري، أعُطيت الفيلدجليبتين عن طريق الفم بجرعات ٣ و ١٠ و ٣٠ مجم/كجم يوميا.
- المجموعة التاسعة: جرذان مصابة بالبول السكري، أعُطيت الجالنتامين (٥ مجم/كجم) والفيلدجليبتين (٣٠ مجم/كجم) عن طريق الفم يوميا.

تم تلقي الأدوية عن طريق الفم لمدة ٤ أسابيع وتم رصد التغيرات في وزن الجسم، فضلا عن كم تناول الغذاء (جم/اليوم) والماء (مل/اليوم) خلال الفترة التجريبية. وقد أجري إختبار تحمل الجلوكوز عن طريق الفم للفئران الصائمة وحسبت المساحة تحت المنحنى لمستوى السكر في الدم خلال هذا الإختبار.

بعد نهاية فترة العلاج، ذُبحت الفئران بعد منعها من تناول الطعام لمدة ١٢ساعة. وتم جمع عينات من الدم، ثم فصلت عينات مصل الدم لتعيين السكر الصائم، الفروكتوزامين ،الإنسولين، الدهون الثلاثية، الكوليسترول الكلي، الأحماض الدهنية الحر، الكوليسترول ذي البروتينات الدهنية عالية الكثافة، النشاط الإنزيمي لناقل أمين الأسبارتات، النشاط الإنزيمي لناقل أمين الألانين، عامل نخر الورم ألفا، الفيسفاتين والأديبونيكتين. ثم تم حساب النموذج الاستتبابي لتقييم مقاومة الإنسولين ونسبة وظائف الخلاية بيتا في البنكرياس و الكوليسترول ذي البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة وذلك بإستخدام المعادلات المقابلة لهم. وعقب جمع عينات الدم مباشرة، تم فصل الكبد والعضلات والمخ حيث استُخدمت فى تعيين النشاط الإنزيمي للأستيل كولين إستريز، محتوى الدهون في الكبد / العضلات، مستقبلات الإنسولين الفوسفاتية، AKT الفوسفاتي، ناقل الجلوكوز-٢ ، ناقل الجلوكوز-٤ ، الجليكوجين سينسيز كينازبيتا ٣ الفوسفاتي، البيتا-كاتنين، FOXO1، العامل النووي كابا ب، Nrf2، إجمالي القدرة المضادة للأكسدة، تركيز المالون داي الدهايد، كاسباس-٣، السيتوكروم-ج ومحتوى البروتين.

أظهرت النتائج أن النوع الثاني من مرض البول السكري المستحدث تجريبياً كان مصحوباً بالصورة الكلاسيكية لهذا المرض حيث أظهر زيادة فى الجلوكوز والفركتوزامين و إضطراب في منظور الدهون وإنخفاض شديد في مخازن الإنسولين في البنكرياس، وإنخفاض مستويات الإنسولين القاعدي إلى جانب النهام والعطش اللذان تفاقما من جراء حالة المقاومة لعمل الإنسولين في مرحلة البلوغ. وهذه الحالة تشبه التطور الطبيعي للنوع الثاني من مرض البول السكري فى الإنسان. وقد أسفرت النتائج أيضاً عن أن الإصابة بالنوع الثاني من البول السكري نتج عنه زيادة فى الضغط التأكسدي حيث زاد مستوى المالون داي الدهايد، الذي نتج عن تأكسد الدهون. وكان ذلك مصحوباً بإنخفاض مستوى النشاط النسخي Nrf2 و إجمالي القدرة المضادة للأكسدة. وهذه الأدلة توضح تأثر بيئة الأكسدة الخلوية بشكل واضح. وكذلك ترتبط النتائج التي أوضحت ارتفاعاً ملحوظاً فى مستوى مؤشرات الإلتهاب مثل عامل نخر الورم ألفا و الفيسفاتين والعامل النووي كابا ب ومؤشرات موت الخلايا المبرمج مثل كاسباس-٣ و السيتوكروم-ج بالنظرية التي تؤكد أن الإلتهاب وموت االخلايا المبرمج يلعبان دوراً هاماً وأساسياً فى مقاومة عمل الإنسولين مما يؤدي إلى الإصابة بالنوع الثاني من مرض البول السكري.

وقد أسفرت النتائج أيضاً عن تأثير العلاج بعقار الجالنتامين والذي أحدث انخفاضاً ملحوظاً إحصائياً فى إرتفاع وزن الجسم، وتناول الغذاء / المياه، السكر الصائم و الفركتوزامين والنشاط الإنزيمي لناقل أمين الأسبارتات والنشاط الإنزيمي لناقل أمين الألانين بمصل دم الجرذان المصابة بمرض البول السكري، كما أحدث انخفاضاً واضحاً فى النشاط الإنزيمي للأستيل كولين إستريز في الأعضاء المختبرة. وعلاوة على ذلك، فإن عقار الجالنتامين قد أدى إلى تحسين منظور الدهون في مصل الدم والكبد والعضلات وزيادة مستوى الإنسولين في مصل الدم، ونسبة وظائف الخلاية بيتا في البنكرياس في نمط مماثل للتأثير الذي أحدثه عقار الفيلدجليبتين. بالإضافة إلى ذلك، أكد الجالنتامين تأثيره كمضاد

للأكسدة (Nrf2، إجمالي القدرة المضادة للأكسدة، المالون داي الدهايد)، ومضاد للإلتهابات (العامل النووي كابا ب، عامل نخر الورم ألفا، فيسفاتين، أديبونيكتين) ومضاد لموت الخلايا المبرمج (كاسباس-٣، السيتوكروم-ج) عن طريق تغيير وتحسين الأثار الناتجة من النوع الثاني من مرض البول السكري في الجرذان على جميع المعايير المذكورة أعلاه. وعلى المستوى الجزيئي، أحدث الجالنتامين / الفيلدجليبتين تأثيرهما عن طريق تحسين مسارات الإشارات لكل من الإنسولين (مستقبلات الإنسولين الفوسفاتية، AKT، ناقل الجلوكوز-٢، ناقل الجلوكوز-٤) وWnt / بيتا-كاتنين (الجليكوجين سينسيز كيناز-بيتا ٣ الفوسفاتي، البيتا-كاتنين، FOXO1). هذه الآثار تعكس قدرته على التخفيف من الآثار الخطرة لمصاحبة تأكسد الدهون، موت الخلايا المبرمج، والإلتهاب والضغط التأكسدي مع مرض البول السكري. وظهر تأثير أفضل للجالنتامين عن الفيلدجليبتين تقريبا على جميع المعايير التي تم قياسها.

ومن المثير للاهتمام، أن تأثير العلاج بإستخدام عقار الجالنتامين والفيلدجليبتين معاً لمدة ٤ أسابيع على كل المعايير، سواء كانت مُقاسة أو محسوبة، كان أقوى وأفضل بكثير من تأثير أي عقار منهما على حدة، مما يشير إلى إضافة أو تعاون كل منهما للأخر. مع أخذ كل هذا فى الاعتبار، فإن نتائجنا تشير إلى أن زيادة مستوى السكر الصائم والإضطرابات الضارة التى تحدث فى منظور الدهون، بالإضافة إلى الإلتهاب وموت الخلايا المبرمج وحالة الضغط التأكسدي الزائد الناتجة عن البول السكري قد تحسنت تحسناً ملحوظاً إحصائياً بنسبة كبيرة بعد إعطاء عقاري الجالنتامين والفيلدجليبتين معاً مقارنة بكل عقار على حدة.

ومن ثم فإن نتائج هذه الدراسة، والتي حصلنا عليها عند إعطاء عقار الجالنتامين والفيلدجليبتين معاً، جاءت لتؤكد على الفوائد الناجمة عند إستخدام عقار مضاد للأكسدة، له تأثيرات مضادة للإلتهاب، يعمل كمضاد للأستيل كولين إستريز كإضافة جديدة للعقاقير المعروفة التي تستخدم فى علاج النوع الثاني من مرض البول السكري. ويجب أن يمتد البحث فيه إلى مرضى البول السكري بنوعيه الأول والثاني، حيث يمكن إستخدام الجالنتامين كعلاج إضافي لخفض الإجهاد التأكسدي وموت الخلايا المبرمج والإلتهابات الأوعية الدموية وكذلك للتقليل من حدة المضاعفات التى تحدث عن هذا المرض، خاصة أمراض القلب والجهاز الدوري.

وتُعد هذه الدراسة إضافة جديدة إلى المعرفة الحالية عن الإضطرابات التى تحدث فى النوع الثاني من مرض البول السكري وطرق تقييمه. كما تكشف هذه الدراسة عن الآليات الجزيئية الجديدة لتأثير الجالنتامين والفيلدجليبتين عن طريق تحسين مسارات الإشارات لكل من الإنسولين وWnt / بيتا-كاتنين.

وفي الختام، فإن نتائج هذه الدراسة تظهر قدرة الجالنتامين على تخفيف النوع الثاني من مرض البول السكري والمكونات الأخرى للمتلازمة الأيضية. فقد أوضحت هذه الدراسة تأثير الجالنتامين على سكر الدم المرتفع وتحسين بعض إضطرابات منظور الدهون، ربما من خلال عمله وخصائصه كمضاد للأكسدة ومضاد لموت الخلايا المبرمج ومضاد للإلتهابات بجانب عمله كمضاد للأستيل كولين إستريز. ويمكن أن ترجع هذه الآثار إلى تفعيل مسارات الإشارات لكل من الإنسولين وWnt / بيتا-كاتنين. وتشير هذه الدراسة إلى التأثير المفيد لإستخدام الجالنتامين في علاج مرض البول السكري وكإضافة للعقاقير المعروفة التي تستخدم فى علاج هذا المرض، وهو اتجاه وفكر جديد في الوقت الحالى لعلاج النوع الثاني من مرض البول السكري.