Targeting Hepatic Stellate Cells Using Valsartan and Imatinib Nanomedicine in Experimentally Induced Liver Fibrosis in Rats

Thesis submitted for the partial fulfillment of doctor of philosophy degree in pharmaceutical science
(Pharmacology and Toxicology)

Presented By:

Nesrine Saeid Ibrahim Abdel Quader El-Mezayen

Master degree in Pharmacology & Toxicology (2014)
Assistant lecturer of Pharmacology & Toxicology
Faculty of Pharmacy–Pharos University in Alexandria

Under the Supervision of:

Prof. Dr. Aiman S. El-Khatib
Professor of Pharmacology and Toxicology
Faculty of Pharmacy
Cairo University

Prof. Dr. Mahmoud M. Khattab
Professor of Pharmacology and Toxicology
Faculty of Pharmacy
Cairo University

Prof. Dr. Thanaa I. Shalaby
Professor of Medical Biophysics
Medical Research Institute
Alexandria University

Asst. Prof. Wessam F. El-Hadidy
Assistant Professor
Pharmacology and Experimental Therapeutics
Medical Research Institute
Alexandria University

Faculty of Pharmacy
Cairo University
2018

P.U.A. Library
Fac. Ph.D.M
Serial No. 220
Classification 615.05

الملخص العربى

يعد تليف الكبد مشكلة صحية خطيرة واسعة الانتشار على مستوى العالم. حتى الأن لم يتم اعتماد اي من العقارات المختبرة المضادة للتليف كعلاج لتليف الكبد نظراً لعدم التخصص النسيجي و قلة تركيز العقار في العضو المستهدف. الابحاث المكثفة عن الخلايا و العوامل المسببة للتليف التي تتحكم في تكون التليف الكبدي القت الضوء على حقيقتين متفق عليهما دولياً؛ الأولى هي القدرة المحتملة على تجديد الكبد وعكس تليف الكبد و أما الثانية فهي ان الخلايا الكبدية النجمية (الخلايا الكبدية الوحيدة المخزنة لفيتامين أ) هي الخلايا الرئيسية المتحكمة في حدوث تليف الكبد. ان التلف الكبدي المزمن يؤدي الى تنشيط الخلايا الكبدية النجمية و تميزها الى خلايا شديد التكاثر مع فقد القدرة على تخزين فيتامين أ. هذه الحقائق مهدت الطريق الى فكرة ان العلاج الموجه للخلايا الكبدية النجميه قد يمثل علاجا شافيا لهذه الحالة المميته القابلة للانعكاس.

إن عقاري الفا لسارتان و الايماتينيب يعدان مرشحين جيدين لاستهداف الخلايا الكبدية النجمية؛ حيث أن الفالسارتان منشط عكسي لمستقبل انجيوتنسين ٢ من النوع الأول (AT1R) المتواجدة بكثرة على الخلايا الكبدية النجمية. كما أنه منشط جزئي للمستقبلات المستحثة لمستقبل البيروكسيزوم-جاما (PPAR-γ) الناضبة من الخلايا الكبدية النجمية. و من جانب آخر فإن عقار الإيماتينيب يعتبر مانعاً لمستقبل التيروزين كاينيز والذي يمنع مسارين أساسيين مؤيبين لتليف الكبد و هما؛ عامل النمو المشتق من الصفائح (PDGF) وعامل النمو المتحول-بيتا (TGF-β)، و بذلك فإن كلا العقارين لديهما فعالية محتملة ضد تليف الكبد. إلا أن فعالية عقار الفالسارتان على كل من AT1R وPPAR-γ تتطلب قدرة عاليه على التخلل و التي يفتقر إليها عقار الفالسارتان. كما أن فعالية علاج الإيماتينيب التقليدي يعوقها التركيز القليل للعقار في النسيج المستهدف و زيادة السمية للأنسجة الأخرى و بالأخص القلب، الرئة و الكبد.

و في ضوء ما تقدم فإن في الدراسة الحالية تم استغلال فقد قدرة الخلايا الكبدية النجمية النشطة على تخزين فيتامين أ كآلية لاستهدافها باستخدام ليبزومات مقرونة بفيتامين أ بعد تحميلها بأي من عقار الفالسارتان أو الإيماتينيب. باستخدام نموذج تليف الكبد المستحدث في الجرذان برابع كلوريد الكربون فإننا نهدف إلى إثبات أن الليبزومات المقرونة بفيتامين أ التي تم إعدادها قادرة على استهداف الكبد و بالأخص الخلايا الكبدية النجمية. بالإضافة إلى أننا بغرض توضيح بعض آليات المستقبل المحتملة ، التحقق من الفعالية المضادة للتليف و احتمالية عكس تلف الخلايا الكبدية لعلاجي الفالسارتان و الإيماتينيب الموجهين للخلايا الكبدية النجمية بالمقارنة بالصورة التقليديه و الليبزوميه الغير مقرونة بفيتامين أ لكليهما

و لإجراء هذه الدراسة تم تحضير ليبزومات محملة بعقار الفالسارتان مقرونة بفيتامين أ (VLC) و كذلك ليبزومات محملة بعقار الايماتينيب مقرونة بفيتامين أ (ILC) تحضيرا أمثلا من حيث الخصائص الشكلية (تم التأكد منها عن طريق الميكروسكوب الإلكتروني)، الخصائص الفيزيوكيميائية (الحجم الجسيمي، الشحنة و معامل التشتت المتعدد)، فعالية انحباس العقار داخل الليبزومات و تحرر العقار من الليبزومات معملياً ثم تم استحداث تليف الكبد عن طريق حقن ١,٥ مل/كجم رابع كلوريد الكربون سبق تخفيفه بزيت الزيتون بنسبة ١: ١ في الغشاء البريتوني مرتين أسبوعيا لمدة ستة أسابيع.

كما أنه تم إثبات التراكم التفضيلي للتركيبات التي تم اختيارها عن طريق تتبع ليبزومات محملة بصبغة النيل الأحمر و مقرونة بفيتامين أ (NRLC) بعد حقنها في الغشاء البريتوني أو إعطاءها عن طريق الفم لجرذان قد سبق استحداث تليف الكبد بها عن طريق التصوير الفسفوري للحيوانات الحية. بالإضافة إلى أنه تم تتبع NRLC باستخدام الميكروسكوب متحد البؤرداخل أنسجة الكبد المجمدة التي أظهرت كمية فسفورية ضخمة في تجربة التصوير الفسفوري للحيوانات الحية. كما تم صبغ الخلايا الكبدية النجمية في تلك الأنسجة المجمدة للكبد مناعياً و فسفورياً باستخدام جسم مضاد ل PDGFR-β مقرون بمادة فسفورية. كمية التركيبة التي تم إيصالها للكبد بالمقارنة بالأعضاء الأخرى تم قياسها بوسيلة مختلفة لكل عقار؛ بالنسبة لعقار الفالسارتان تم قياس الشدة الفسفورية في الأعضاء التي تم فصلها و هي الكبد، الكلية، القلب، الرئة، الطحال، المخ و الأمعاء في نقاط وقتية مختلفة من جرذان تم إعطاؤها NRLC عن طريق الفم. أما بالنسبة لعقار الإيماتينيب فإن التوزيع الحيوي لILC في الأعضاء المختلفة بعد حقنة واحدة في الغشاء البريتوني تم قياسها في الوقت المقدر لأقصى تراكم في الكبد في تجربة التصوير الفسفوري للحيوانات الحية باستخدام تقنية الHPLC.

ثم تم بدء تقسيم المجموعات العلاجية لكل عقار كالآتي:

١.العلاج بعقار الفالسارتان

من أجل دراسة فعالية الصور العلاجية المختلفة لعقار الفالسارتان، تم استخدام ٤٨ جرذاً أبيضاً أوزانها (٢٠٠±٢٠) جراماً، ستة عشرة منهم تم اعتبارها مجموعة طبيعية و بسيطة و قد تم تقسيمها إضافياً إلى مجموعتين كل منهما تكونت من ثمان جرذان؛ مجموعة تم إعطاؤها ١ ملي من الليبزومات غير المحملة و الأخرى تم إعطاؤها ١ ملي من الليبزومات غير المحملة و المقرونة بفيتامين أ عن طريق الفم.

تم استحداث تليف الكبد في ٣٢ جرذاً تم تقسيمهم عشوائياً إلى ٤ مجاميع (كل مجموعة تتكون من ٨ جرذان) على النحو الآتي:

مجموعة ضبط مصابة بتليف الكبد و لا تتلقى علاجاً؛ حيث أعطيت الجرذان ١ ملي من ١% ثنائي ميثيل أكسيد الكبريت يومياً عن طريق الفم.

مجموعة معالجة بعقار الفالسارتان التقليدي؛ حيث عولجت الجرذان باعطائها ١ملي من الفالسارتان المعلق في١% ثنائي ميثيل أكسيد الكبريت بجرعة قدرها ٤٠ مجم/كجم يومياً عن طريق الفم.

مجموعة معالجة بعقار الفالسارتان الليبوزومي؛ حيث عولجت الجرذان باعطائها ١ملي من عقار الفالسارتان الليبوزومي بجرعة تعادل ٤٠ مجم/كجم من الفالسارتان يومياً عن طريق الفم.

مجموعة معالجة بعقار الفالسارتان الليبوزومي المقرون بفيتامين أ؛ حيث عولجت الجرذان باعطائها ١ملي من عقار الفالسارتان الليبوزومي المقرون بفيتامين أ بجرعة تعادل ٤٠ مجم/كجم من الفالسارتان يومياً عن طريق الفم.

٢.العلاج بعقار الإيماتينيب

فعالية الصور العلاجية المختلفة لعقار الإيماتينيب تم دراستها باستخدام ٤٨ جرذاً أبيضاً أوزانها (٢٠٠±٢٠) جراماً، ستة عشرة منهم تم اعتبارها مجموعة طبيعية و بسيطة و قد تم تقسيمها إضافياً إلى مجموعتين كل منهما تكونت من ثمان جرذان؛ مجموعة تم إعطاؤها ١ ملي من الليبزومات غير المحملة و الأخرى تم إعطاؤها ١ ملي من الليبزومات غير المحملة و المقرونة بفيتامين أ عن طريق الحقن في الغشاء البريتوني.

تم استحداث تليف الكبد في ٣٢ جرذاً تم تقسيمهم عشوائياً إلى ٤ مجاميع (كل مجموعة تتكون من ٨ جرذان) على النحو الآتي:

مجموعة ضبط مصابة بتليف الكبد و لا تتلقى علاجاً؛ حيث أعطيت الجرذان ١ ملي من المياه منزوعة الأيونات يومياً عن طريق الحقن في الغشاء البريتوني.

مجموعة معالجة بعقار الإيماتينيب التقليدي؛ حيث عولجت الجرذان باعطائها ١ملي من محلول الإيماتينيب الذائب في ميام منزوعة الأيونات بجرعة قدرها ٢٠ مجم/كجم يومياً عن طريق الحقن في الغشاء البريتوني.

مجموعة معالجة بعقار الإيماتينيب الليبوزومي؛ حيث عولجت الجرذان باعطائها ١ملي من عقار الإيماتينيب الليبوزومي بجرعة تعادل ٢٠ مجم/كجم من ا الإيماتينيب يومياً عن طريق الحقن في الغشاء البريتوني.

مجموعة معالجة بعقار الإيماتينيب الليبوزومي المقرون بفيتامين أ؛ حيث عولجت الجرذان باعطائها ١ملي من عقار الإيماتينيب الليبوزومي المقرون بفيتامين أ بجرعة تعادل ٢٠ مجم/كجم من الإيماتينيب يومياً عن طريق الحقن في الغشاء البريتوني.

جميع الأدوية و المذيبات تم اعطاؤها لمدة ٦ أسابيع متتالية. و في نهاية مدة الدراسة تم تخدير الجرذان و سحب عينات الدم منها. ثم تم فصل عينات مصل الدم و استخدمت لقياس مستوى الألانين أمينوترانسفيريز (ALT) والأسبارتات أمينوترانسفيريز (AST) و الزلال. كما تم فصل عينات البلازما لتعيين زمن البروثرومبين (PT). و بعد ذلك تم ذبح الجرذان و استئصال الكبد ثم إعداد شرائح الأنسجة للصبغ بثلاثية صبغة ماسون و من ثم فحصها هستوباثولوجياً و تصنيفها طبقاً لتصنيف إسحاق (و ذلك لجميع المجموعات). بعض الشرائح تم صبغ مستقبل الماس

(Mas) بها بالصبغة المناعية الهستوكيميائية (و ذلك لمجموعات العلاج بعقار الفالسارتان) أو صبغ PDGFR-β بها بالصبغة المناعية الفسفورية (و ذلك لمجموعات العلاج بعقار الإيماتينيب). جميع الأنسجة المصبوغة تم قياس العنصر المصبوغ بها شبه كمياً عن طريق برنامج imageJ. و لجميع المجموعات تم استخدام الكبد أيضاً لقياس مستوى كل من ماتركس ميتالوبروتينيز-٢ (MMP-2)، PPAR-γ و TGF-β باستخدام تقنية ال ELISA. كما تم قياس مستوى الهيدروكسي برولين (HP) بيوكيميائياً.

و قد أبرزت نتائج هذا البحث أن VLC و ILC التي تم إعدادها عبارة عن حويصلات كروية بأحجام نانو تقل عن ٢٠٠ نانومتر مما يساعد على توجهها تلقائياً للكبد. كما أنهم يعدوا ليبزومات كاتيونية مما يجعلها تفضل التوجه للخلايا الكبدية النجمية أيضاً يساعدها على الارتباط الغشاء الخلوي و امتصاصها نوويا.

كما أن تتبع NRLC التي تم إعطاؤها للجرذان عن طريق الفم أو بالحقن في الغشاء البريتوني قد أسفر عن تجمعها في الكبد و بالأخص في الأماكن المتليفة بالكبد. و بقياس الشدة الفسفورية كمياً في الأعضاء المستأصلة بعد إعطاء NRLC عن طريق الفم فقد وجد تركزها في الكبد بكمية كبيرة و في الأمعاء بدرجة أقل و قد استمر تواجدها حتى ستة أيام و دل ذلك على أنه تم امتصاصها عن طريق الخلايا المعوية النجمية و التي كانت بمثابة مخزن يطلق سراحها ببطء مع مرور الوقت. كما أكد الفحص بالميكروسكوب متحد البؤر لأنسجة الكبد المجمدة، التي تم صبغ الخلايا الكبدية النجمية بها و التي احتوت على كمية كبيرة من NRLC، استهداف NRLC للخلايا الكبدية النجمية و أيضاً أكد امتصاصها نووياً. أما بالنسبة للتوزيع البيولوجي لILC بع حقنها لمرة واحدة في الغشاء البريتوني فقد كشف عن تركزها في الكبد بمقدار ١٣,٥ مرة أكثر من عقار الأيماتينيب التقليدي بالإضافة إلى توزيع ILCتوزيعاً بيولوجياً محدوداً للأعضاء الأخرى بما فيهم القلب و الرئة مما عكس تضاؤل الآثار الجانبية.

وقد أسفر علاج الجرذان المصابة بتليف الكبد باستخدام VLC، عقار الفالسارتان الليبوزومي أو عقار الفالسارتان التقليدي لمدة ستة أسابيع عن تفوق VLC على الصور العلاجية الأخرى. فبسبب استهدافه للخلايا الكبدية النجمية و امتصاصه نووياً فقد أظهر تأثيراً عميقاً على التعبير الكبدي للمستقبلين Mas و PPAR-γ و بالتالي فإن مستوى العوامل الوسيطة المسببة للتليف (TGF-β، MMP-2 و HP)، مؤشرات تلف الخلايا الكبدية (ALT و AST) و مؤشرات وظايف الكبد التصنيعية (الزلال و PT) قد عادت تقريبا إلى مستواها الطبيعي. و قد زاد هذه النتائج تأكيداً قياس كمية النسيج الليفي المصبوغ بثلاثية صبغة ماسون شبه كمياً بالإضافة إلى انخفاض قيمة تصنيف إسحاق و انعكاس تلف الخلايا الكبدية هستولوجياً و الذي كان قد تسبب به رابع كلوريد الكربون. و بذلك فإن العلاج ب VLC قد أعطى نشاطاً مضاداً للتليف استثنائياً و ممتد المفعول مع تنشيطاً إضافياً ل PPAR-γ و هكذا فهذه الطريقة العلاجية تعد طريقة واعدة لعلاج تليف الكبد.

وقد أبرزت النتائج أيضاً عن المنع القوي لفسفرة PDGFR-β و تنشيط PPAR-γ الناتج عن العلاج ب ILC بالمقارنة بعلاج الإيماتينيب التقليدي. و بالتبعية فإن هناك تحسن ملحوظ إحصائياً في نتائج اختبارات وظائف الكبد و انعكاس تلف الخلايا الكبدية و تليف الكبد. هذا التأثير المضاد لتليف الكبد قد أثبته أيضاً انخفاض تصنيف إسحاق الهستولوجي و أيضاً الإنخفاض الملحوظ في معدل العوامل الوسيطة المسببة لتليف الكبد (TGF-β، MMP-2 وHP). و بذلك فإن العلاج بعقار الإيماتينيب الموجه للخلايا الكبدية النجمية قد أظهر تأثيراً مضاداً للتليف غير اعتيادي مصاحباً لنقص السمية للخلايا بالمقارنة بعقار الإيماتينيب التقليدي و يعد وسيلة جديدة لعلاج تليف الكبد.

ومن خلال هذه الدراسة يمكن استخلاص الاستنتاجات التالية:

١. من بين جميع الطرق المتبعة لاستهداف الخلايا الكبدية النجمية فإن الليبزومات المقرونة بفيتامين أ قد مثلت طريقة واعدة، غير سامة و انتقائية لاستهداف لخلايا الكبدية النجمية.

٢. تتبع الليبزومات المقرونة بفيتامين أ المعطاه عن طريق الفم مساراً فريداً داخل الجسم حيث يتم امتصاصها بواسطة الخلايا الكبدية النجمية و كذلك الخلايا المعوية النجمية و الأخيرة تكون بمثابة مخزن لليبزومات المقرونة بفيتامين أ يطلق سراحها ببطء مع مرور الوقت. هذه الخاصية الفريدة تتيح تقليل تكرار إعطاء جرعات الليبزومات عن طريق الفم.

٣. الليبزومات الكتيونية تعد بمثابة حاملات نانوية لعقار الفالسارتان ذو القدرة الضعيفة على الاختراق مما يتيح اختراق الغشاء الخلوي من أجل الوصول إلى موقع الارتباط ب AT1R و قد انعكس ذلك على تنشيط مستقبل ال

الملخص العربي

Mas. بالإضافة إلى أن هذه التركيبة قد حسنت من اختراق عقار الفالسارتان للنواة للوصول إلى PPAR-γ لتنشيطه.

٤. اقتران الليبزومات المحملة بعقار الفالسارتان بفيتامين أ حقق تركيزاً عالياً لها في الخلايا الكبدية النجمية و بالتبعية فإن لها تأثيراً عميقاً مضاداً للتليف من خلال نشاط محكم على AT1R و PPAR-γ مما يجعل الليبزومات المحملة بعقار الفالسارتان و المقرونة بفيتامين أ مرشح واعد لعلاج تليف الكبد.

٥. عقار الإيماتينيب التقليدي يتم توزيعه توزيعاً بيولوجياً واسعاً بين الأعضاء مما يؤدي إلى وصول تركيزات عالية من عقار الإيماتينيب إلى الرئة، القلب و الخلايا الكبدية البارنكيمية مما يسبب السمية و الأعراض الجانبية. علاج الإيماتينيب المستهداف للخلايا الكبدية النجمية حول توزيع الإيماتينيب الحيوي لجهة الخلايا الكبدية النجمية مما قلل ما يسببه عقار الإيماتينيب من سمية للخلايا.

٦. يعد عقار الإيماتينيب مانعاً لمستقبلات التيروزين كاينيز و بذلك فهو يمنع فسفرة PDGFR-β. الدراسة الحالية أيدت بشدة تلك الحقيقة من خلال المنع القوي لفسفرة PDGFR-β عندما تم إيصاله بتركيز عالي إلى المواقع التي تعبر عنه بكثرة.

٧. التركيبة الليبزومية لكل من عقاري الفالسارتان و الإيماتينيب أكسبهما خاصية إضافية من خلال تنشيط PPAR-γ. تلك الخاصية ألقت الضوء عن احتمالية التطبيق الجديد لكلا العقارين في الإضرابات التمثيلية المختلفة بما فيها مرض الداء السكري.