جامعة الإسكندرية
ALEXANDRIA
UNIVERSITY

Alexandria University
Medical Research Institute

Medical Research Institute
Department of Pharmacology

Targeting Intracellular Signaling Pathways by Sitagliptin and Tofacitinib in Experimental Adjuvant Arthritis in Rats

Thesis submitted to Department of Pharmacology
Medical Research Institute - Alexandria University
In partial fulfillment of the requirements for the degree of

Ph.D. in
Pharmacology and Experimental Therapeutics

Presented by

Sherihan Salaheldin Abdelhamid
B. Pharmaceutical Sciences, University of 6 October, 2007
M.Sc. in Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2012

Medical Research Institute
Alexandria University

2018

P.U.A. Library
Library C
Faculty of: Ph.D M
Serial No. 231
Classification 615

الملخص العربى

يعتبر التهاب المفاصل الروماتويدي من الامراض المناعية المزمنة التي لها تأثيرات علي المفاصل بالأضافة الي تأثيرات مرضية علي اجهزة الجسم المختلفة و هو يصيب ١% من السكان و نسبة الاصابة بين النساء مقارنة بالرجال ٣:١. و يحدث المرض التهاب بالعديد من المفاصل بالاضافة الي تلف المفاصل التدريجي في كثير من الأحيان، والإعاقة ، والخلل المناعي ، والتهاب الاجهزة المختلفة ، وزيادة الاعتلال المشترك والوفيات المبكرة.

إشارات الخلل الوظيفي داخل الخلايا تشتمل على تنشيط غير متزن لمُحوّلات (JAK / STAT) و "التداخل" بين (JAK / STAT) (SAPK / MAPK) كما يلعب الفوسفاتيديل نيتوسيد-٣-كيناز من مسارات الريباميسين (PI-3K / AKT / mTOR) دوراً حاسماً في التهاب المفاصل الروماتويدي. يتجلى ذلك في الالتهاب المناعي المزمن ، و زيادة التعبير الجيني للماتريكس ميتالوابروتيناز ، وتحفيذ الموت المبرمج للخلايا الغضروفية و "مقاومة الموت المبرمج للخلايا " في النسيج المحيط بالمفاصل .

مستقبلات (TLRs) هي احدي اعضاء عائلة المستقبلات عبر الغشاء ، وهي تلعب دورًا رئيسيًا في كل من الاستجابات المناعية الفطرية والتكيفية. عندما تتعرض لتحفيز مناعي و الاصابة بالجراثيم ، تبدا الاستجابة للالتهابات والاستجابة المناعية عن طريق TLRs مما يؤدي إلى تنشيط خلايا الجهاز المناعي الفطري بما في ذلك الخلايا الوحيدات والبلاعم والخلايا الشجيرية. و يؤدى تنشيط المستقبلات TLRs إلى التعبير السريع عن السيتوكينات المسببة للالتهاب مثل TNF-α ، و chemokines بوساطة تنشيط NF-κB و يعمل هؤلاء الوسطاء علي تنظيم الاستجابة المناعية التي تقوم بتجنيد الخلايا المتعادلة والوحيدات والخلايا الليمفاوية و تقوم الخلايا الضامة والخلايا الشجيرية بتناول ومعالجة العامل الممرض والانتقال إلى الأنسجة الليمفاوية الطرفية حيث تبدأ الخلايا العارضة للمستضد بتوليد المناعة التكيفية مما يؤدي إلى توليد المناعة الخلوية والأجسام المضادة.

عقار توفاسيتنيب مثبط نشطJAK فعال عن طريق الفم ، و ويستخدم لعلاج التهاب المفاصل الروماتويدي وهو مانع تنافسي قابل للانعكاس يرتبط مع موقع ربط ثلاثي الأدينوسين (ATP) في الشق الحفزي لنطاق كيناز من JAK نتيجة للربط مع موقع ATP ، يقوم التفاسيتينيب بتثبيط الفسفرة وتفعيل JAK ، و مما يؤدي الي منع الفسفرة وتفعيل STATs، وبالتالي فإن تنشيط النسخ الجيني يؤدي إلى تقليل إنتاج السيتوكين وتعديل الاستجابة المناعية.

مثبطات (DPP-4) ، مثل السيتاجليبتين، هي فئة من الأدوية المضادة لمرض السكر التي تمنع تحلل incretins الانسولين ، خاصة الببتيد على غرار الجلوكاجون -١ .(GLP-1) وقد ثبت أن DPP-4 القابل للذوبان يعزز مسار TLRوزيادة التفاعلات الالتهابية التي تم تحسينها بواسطة مثبطات .DPP-4 أيضا ، كما ثبت من الابحاث السابقة ان سيتاجليبتين يعزز الحماية من امراض لقلب في الجرذان المصابة بداء السكري من النوع الثاني من خلال تعديل مسار JAK / STATومع ذلك ، لم يتم التحقق من تأثيره على مسارات الإشارات في أمراض المناعة الذاتية.

الهدف من الدراسة الحالية هو التحقق من تأثيرات السيتاجليبتين ، مثبطDPP-4 ، على مسار JAK / STAT ومسارات الاشارة TLR / NF-κB ومقارنة فعاليته مع مثبط JAK ، التوفاسيتنيب ، في المادة المستحثة لالتهاب المفاصل في الجرذان. أيضا تقييم التأثير النافع المحتمل للعقاريين معا.

لتطوير نموذج التهاب المفاصل التجريبي، تم حقن الجرذان ب١.٠ مل من معلق يحتوي علي بكتيريا الميكوبكتريم بيتريكم المقتولة بالحرارة (شركة مختبرات ديفكو ، الولايات المتحدة الأمريكية) ١٢ ملغم / مل في مساعد Freund الغير مكتمل (Sigma Aldrich Co-USA) (FIA) ، داخل الجلد في قاعدة الذيل .وقد سمح للالتهاب المزمن بالتطور في كل الحيوانات لمدة ١٤ يومًا. و تم تقسيم الحيوانات إلى خمس مجموعات على النحو التالي:

المجموعة الاولي: المجموعة الضابطة و تتكون من ثمانية جرذان غير مصابة بالتهاب المفاصل.

المجموعة الثانية: ستة عشر من الجرذان غير المعالجة ،ثمانية منها تلقت المذيب لتوفاسيتينيب (سليلوز الميثيل) و ثمانية تلقت المياه المقطرة) المذيبة ل السيتاجليبتين (شفويا يوميا).

المجموعة الثالثة: ثمانية من الجرذان تم علاجها عن طريق الفم مع توقاسيتنيب الذائب في الميثيل سليلوز بجرعة مقدارها ٦،٢ مغ / كغ / يوم)

المجموعة الرابعة: ثمانية من الجرذان اعطيت عن طريق الفم السيتاجليبتين المذابة في الماء المقطر بجرعة ١٠٠ ملغ / كغ / يوم (MSD) ، الولايات المتحدة الأمريكية)

المجموعة الخامسة: ثمانية جرذان تمت معالجتها عن طريق الفم بكل من سيتاجليبتين وتوفاسيتينيب بالجرعات المذكورة أعلاه.

تم تقييم خطورة وتطور التهاب المفاصل من خلال تقييم تورم القدم الخلقية. و اعطيت الأدوية المختبرة يوميا لمدة عشرة أيام ، من الخامس عشر يوم حتى نهاية الدراسة (حتي اليوم الرابع و العشرين). في نهاية الفترة التجريبية ، تمت التضحية بالجرذان وتم جمع عينات الدم لقياس المعلمات التالية بمصل الدم :

١. Anti-CCP.
٢. RANKL
٣. TNF-α
٤. IL-6
٥. الكوليسترول الكلي ، الدهون الثلاثية ، الليبو بروتين مرتفع و منخفض الكثافة .
٦. مستوى السكر صائم في الدم.
٧. انزيمات الكبد (ALT وAST).
٨. وظائف الكلى (كرياتينين و البولينا).

تم عزل الأنسجة من المفاصل ووزنها لتحديد القياسات التالية :

١- JAK-1 و JAK-2 وJAK-3
٢- STAT-3
٣- TLR-4
٤- NF-κB

وقد أوضحت نتائج الدراسة أن التفاسيتينيب و السيتاجليبتين اما منفردين او مجتمعين كان لهم اثر فعال في تقليل حدة التهاب المفاصل ، مما قلل من قياسات الالتهاب في نموذج التهاب المفاصل التجريبي . وقد ثبت ان التوفاسيتينيب كان أكثر فعالية ، من السيتاجليبتين في تخفيض درجة تورم القدم الخلفية احصائيا ، مكافحة CCP ، RANKL، TNF-α و IL-6. و كان تاثير التوفاستينيب المضاد للالتهاب بسبب انخفاض مستوى JAK-3 و JAK1 وإلى حد أقل JAK-2 ، و ايضا انخفاض مستوى TLR-4 و STAT-3 و.NF-κB فى الخلايا المحيطة بالمفاصل للجرذان.

وكانت آلية السيتاجليبتين في مكافحة الالتهابات هي تثبيط ذا دلاله احصائية ال JAK-1 و لل JAK3 إلى حد أقل من التوفاستينيب ونفس المدى من تثبيط لل JAK-2 كما التوفاستينيب ، كما كان السيتاجليبتين اكثر كفاءة من التوفاسيتنيب فى تخفيض مستوى TLR-4 وخفض ايضا اسيتاجليبتين بشكل كبير مستوى STAT-3و NF- κB ولكن إلى حد أقل من التوفاستينيب

كان التوفاستينيب قادرا على خفض مستوي السكر الصائم فى الدم احصائيا ولكن كان الانخفاض اقل من السيتاجليبتين.

وقد احدث التوفاستينيب منفردا زيادة ذات دلالة احصائية في مستويات الكوليسترول ، الدهون الثلاثية ، ليبوبروتين عالي الكثافة ، ليبوبروتين منخفض الكثافة والكرياتينين بمصل الدم ، مع عدم وجود تأثير على البولينا. أيضا التوفاستينيب سبب زيادة في مستويات انزيمات الكبد . لم تظهر سيتاجليبتين أي تأثير على انخفاض مستويات المصل من الكوليسترول الكلي ، الدهون الثلاثية ، ليبوبروتين منخفض الكثافة في الجرذان لكنه زاد مستوى ليبوبروتين عالي الكثافة بشكل ملحوظ في الجرذان . المصابة بالتهب المفاصل التجريبي كما احدث السيتاجليبتن انخفاضا ذا دلاله احصائية في الكرياتنين و البولينا و انزيمات الكبد في الجرذان المصابة بالتهب المفاصل التجريبي.

وبالتالي فإن الجمع بين كلي العقارين يمنح فعالية علاجية افضل مقارنة بكل عقار منفرد و هذا يعني ان العلاج بالعقارين معا يكون اكثر فعالية كمضاد للالتهابات و اقل اثارا جانبية مقارنة بكل عقار منفردا.