Medical Research Institute
Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics

Evaluation of the Possible Autophagy Inhibitory Effect of TNF-α Blockers in Experimental Adjuvant Induced Arthritis in Rats

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of PhD

In

Pharmacology and Experimental Therapeutics

Presented by

Ghada Osama Ahmed Ismail

B.Sc. Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy
Alexandria University, 2009
M.Sc. in Pharmacology, Medical Research Institute
Alexandria University, 2014

2020

P.U.A. Library
Central Medical Library (B)
Faculty of :
Serial No : 673
Classification : 616

الملخص العربي

إن إلتهاب المفاصل الروماتويدي هوأحد أمراض المناعة الذاتية ، له أعراض في المفاصل وأعراض أخري خارج المفاصل. و يصاب بهذا المرض أكثر من ١% من سكان العالم و هو أكثر شيوعاً بين النساء مقارنة بالرجال ، ويتأثر معدل حدوث التهاب المفاصل الروماتويدي بالعديد من العوامل منها عوامل جينية، وهورمونية و بيئية. كما أن العديد من السيتوكاينز و الخلايا المناعية تؤثر في حدوث سلسلة من الإلتهابات المسببة للمرض.

يؤدي الإلتهام الذاتي للخلايا العديد من الوظائف الحيوية بالجسم، و بالتالي فإن حدوث اضطرابات به قد يؤدي إلى حدوث الأعراض المرضية لإلتهاب المفاصل الروماتويدي. كما أن هناك علاقة تبادلية بين الإلتهام الذاتي للخلايا و السيتوكاينز المسببة للإلتهاب مثل: عامل نخر الورم ألفا و إنترلوكين-٦ ، حيث يمكن لكل منهما العمل على زيادة فعالية الآخر و تحفيزه.

وبناءً على العلاقة المتشابكة بين الإلتهام الذاتي و الموت الخلية المبرمج، يمكن للإلتهام الذاتي أن يقوم بدور وقائي وعلاجي أو يحث على حدوث الإلتهاب و زيادة رد الفعل المناعي. كما يتحدد مصير الخلايا بناءً على نتيجة العلاقة بين الإلتهام الذاتي للخلايا و موت الخلية المبرمج. ففي حالة نقص الغذاء و عوامل النمو، يسيطر الإلتهام الذاتي للخلايا لحمايتها من موت الخلية المبرمج. و بالتالي فإن اختلال التوازن بينهما يؤدي إلى حدوث أعراض إلتهاب المفاصل الروماتويدي.

ويلعب عامل نخر الورم ألفا دوراً هاماً في زيادة الإلتهاب، كما أنه يحث على زيادة انتاج انترلوكين-١، ٦ و ١٧ مما يؤدي إلى استمرار و تقدم المرض. ويتفاعل عامل نخر الورم ألفا مع العديد من مسارات الإلتهاب مثل مسار PI3K/Akt و NF-κB و التي تتداخل مع مسارات الإلتهام الذاتي وموت الخلية المبرمج. ويعتبر مسار PI3K/Akt/mTOR من المسارات الهامة للنمو والتمايز الخلوي وكذلك تكوّن الأوعية الدموية الجديدة. كما يعتبر هذا المسار منظماً أساسياً لعمليات الإلتهام الذاتي و موت الخلية المبرمج، و أي خلل فيه يؤدي إلى التضخم الزليلي.

يعتبر ٣-ميثيل أدينين أول مثبط شامل ل PI3K كما أنه أكثر موانع الإلتهام الذاتي للخلايا شيوعاً. و تعتبر صعوبة ذوبانه و الحاجة لاستخدام جرعات كبيرة منه أحد أهم عيوبه. و قد تم تطوير العديد من المركبات و فحص قدرتها على منع الإلتهام الذاتي للخلايا و لكنها افتقدت للقدرة الإنتقائية. و بناءً على ذلك فإن اكتشاف مركبات جديدة قادرة على منع الإلتهام الذاتي للخلايا يعتبر مجالاً هاماً للبحث.

يعتبر تثبيط عامل نخر الورم ألفا عن أداء دوره أحد أفضل الخيارات العلاجية لمرض إلتهاب المفاصل الروماتويدي. كما يعتبرعقار ايتانيرسيبت الأكثر شيوعاً في علاج إلتهاب المفاصل الروماتويدي ضمن هذه المجموعة من العقاقير. و قد أثبتت العديد من الدراسات الإكلينيكية فعالية هذا العقار وسلامة استخدامه في مختلف مراحل المرض مقارنة بالعقاقير التقليدية الأخرى أو غيرها من العقاقير البيولوجية. كما اتضح مؤخرا قدرة إيتانيرسيبت على منع الإلتهام الذاتي للخلايا في خلايا الدم وحيدة النواه و كذلك في الخلايا الشبيهة بالخلايا الليفية الموجودة في النسيج المفصلي لمرضى إلتهاب المفاصل الروماتويدي.

يعمل عقار إنفليكزيماب كجسم مضاد وحيد النسيلة ويعد الأول من نوعه من حيث إجازة استخدامه في علاج إلتهاب المفاصل الروماتويدي. و لقد أثبتت العديد من التجارب الإكلينيكية مدى فعاليته في تقليص ضرر المفاصل وتخفيف حدة أعراض المرض. وقد تمت دراسة تأثير هذا العقارفي منع الإلتهام الذاتي للخلايا في داء الأمعاء الإلتهابي بينما لم يتم التطرق لتأثيره على مرض التهاب المفاصل الروماتويدي حتى الآن.

إن الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الدور المحتمل للإلتهام الذاتي للخلايا في تنظيم التأثير المانع للإلتهاب لعقارين من مثبطات عامل نخر الورم ألفا و هما عقاري إيتانيرسيبت و إنفليكزيماب. و كذلك تقييم دور كل منهما على المسار المتحكم في فعالية الالتهام الذاتي للخلايا و المعروف بPI3K/Akt/mTOR . كما تمت مقارنة تأثير العقارين بالمانع الشامل ل PI3K و المعروف باسم ٣-ميثيل أدينين. كما شملت الدراسة الحالية تعيين التأثير المحتمل ل٣-ميثيل أدينين على دلالات الإلتهاب في نموذج إلتهاب المفاصل المستحث في الجرذان.

لإحداث نموذج التهاب المفاصل ، تم حقن مجموعة من الجرذان من فصيلة سبراج داولي داخل الأدمة عند قاعدة الذيل، ب ٠.١ مل من المعلق المكون من بكتريا المتفطرة الزبدية المقتولة بالحرارة و الممزوجة بخليط فرويند غير المكتمل. وتمت متابعة حدوث الإلتهاب المزمن في الحيوانات لمدة أربعة عشر يوماً و بعدها تم تقسيمهم إلى خمس مجموعات وتتكون كل مجموعة من ثمان جرذان وهي كالآتي:

- المجموعة الأولي: المجموعة الضابطة
- المجموعة الثانية: المجموعة المصابة بإلتهاب المفاصل و قد تركت دون معالجة و تم حقنها بالماء المقطر، و هو المذيب المستخدم مع العقاقير الأخرى.
- المجموعة الثالثة: المجموعة المعالجة بعقار إيتانيرسيبت المذاب في الماء المقطر. وقد تم حقن الجرذان تحت الجلد ب ١٠ مجم/كجم/ كل ثلاثة أيام لمدة أسبوعين.
- المجموعة الرابعة: المجموعة المعالجة بعقار إنفليكزيماب المذاب في الماء المقطر. و تم حقن الجرذان داخل الصفاق ب ٧ مجم/كجم/ كل ثلاثة أيام لمدة أسبوعين.
- المجموعة الخامسة: المجموعة المعالجة ب ٣-ميثيل أدينين المذاب في الماء المقطر. و تم حقن الجرذان داخل الصفاق ب ١٠ مجم/كجم/ يوميا لمدة أسبوعين.

تم تقييم حدة إلتهاب المفاصل عن طريق قياس درجة التورم في القدم الخلفية للحيوانات و كذلك شدة الإلتهاب باستخدام مقياس المفاصل. و قد تلقت الجرذان العلاج لمدة أربعة عشر يوم بداية من اليوم الخامس عشر بعد حث التهاب المفاصل بالطريقة السابق ذكرها. وفي اليوم التاسع و العشرين، تمت التضحية بالجرذان عن طريق خلع العنق و تجميع مصل الدم لاستخدامها في تعيين دلالات الإلتهاب التالية:

- Anti-CCP
- RANKL
- TNF-α
- IL-6

كما تم فصل النسيج المحيط بالكاحل لقياس دلالات الإلتهام الذاتي موت الخلية المبرمج و المسار المنظم لهما باستخدام تقنية ELISA و التحليل المناعي للطخة ميسترن:

- Beclin-I
- LC3-I
- LC3-II
- Caspase-3
- p-Akt.
- PI3K

لقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن عقاري إيتانيرسيبت و إنفليكزيماب قد قاما بتهدئة حدة الإلتهاب. هذا التأثير تم اثباته بحدوث إنخفاض ذي دلالة إحصائية في دلالات الإلتهاب بالإضافة إلى قدرتهما على تحسين إلتهاب المفاصل. كما قام العقاران بتثبيط انتاج بروتينات Beclin-1, LC3-I و LC3-II تثبيطاً ذا دلالة إحصائية إلا أن تأثير العقارين كان أقل من التأثير المستحث بواسطة ٣-ميثيل أدينين. وقد لوحظ أن استخدام إيتانيرسيبت و إنفليكزيماب أدي إلى زيادة ذات دلالة إحصائية في موت الخلية المبرمج. هذا التأثيرارتبط بصورة عكسية مع قدرة العقارين على منع الإلتهام الذاتي للخلايا. علاوة على ذلك، قام كل من إيتانيرسيبت و إنفليكزيماب و ٣-ميثيل أدينين بكبح فعالية مسار PI3K/Akt، و كان ٣-ميثيل أدينين الأكثر فعالية على منع هذا المسار. بناءً على ذلك، فإنه من المعتقد أن العقاقير الثلاثة تتشارك معاً في حث الموت المبرمج للخلايا عن طريق تثبيط فسفرة PI3K و Akt. ومما يجب الإشارة إليه، أن ٣-ميثيل أدينين قد أظهر قدرة ذات دلالة إحصائية على منع الإلتهاب و حماية العظام عن طريق تخفيض مستوى كل من TNF-α, IL-6, anti-CCP و RANKL بالإضافة إلى تحسين أعراض المرض. هذه التأثيرات مجتمعة، تشير إلى إمكانية استخدام مثبطات الإلتهام الذاتي للخلايا في علاج إلتهاب المفاصل الروماتويدي.

الاستنتاجات و التوصيات:

إن الأسباب المرضية المؤدية لحدوث إلتهاب المفاصل الروماتويدي تتضمن شبكة من العوامل شديدة التعقيد. و يظهر التفاعل المتبادل ما بين الإلتهام الذاتي للخلايا وموت الخلية المبرمج و تداخلهم مع المسارات المختلفة بعض التأثيرات المتناقضة، و بالتالي فإنه لا يوجد نموذج موحد يمكن أن يعمم على موقف الخلايا المختلفة من عملية الإلتهام الذاتي. كما يؤدي الإلتهام الذاتي للخلايا دوراً مختلفاً في كل عضو من أعضاء الجسم وفي كل مجموعة مستقلة من الخلايا تبعاً لعدة عوامل، منها العوامل الجينية و المسارات المفعلة و المسؤولة عن هذه الخلايا و التي قد تختلف جذريا من عضو لأخر و من مرض لآخر. و من ثم، فإنه من المقترح أن يتم تقييم مبدئي لحالة الخلايا من حيث فعالية كل من الإلتهام الذاتي أو موت الخلية المبرمج وذلك قبل تحديد طريقة العلاج. والمتوقع أن يساعد ذلك في استخدام العلاج الأمثل الذي يستهدف المسبب الرئيسي للمرض في كل حالة على حدة.

تدعم الدراسة الحالية التأثير الجلي لمثبطات عامل نخر الورم ألفا و هما عقاري إيتانيرسيبت و إنفليكزيماب في كبح الإلتهام الذاتي و المتمثل في قدرتهم على منع انتاج دلالات الإلتهام الذاتي Beclin-1, LC3-I and LC3-II في النسيج المحيط بالكاحل. إن وجود علاقة طردية بين دلالات الإلتهام الذاتي للخلايا وحدة مرض إلتهاب المفاصل الروماتويدي و تطوره مع دلالات الإلتهاب بالإضافة إلى تواجد علاقة عكسية مع دلالات موت الخلية المبرمج، يدعم مشاركة الإلتهام الذاتي للخلايا في الأعراض المرضية لمرض إلتهاب المفاصل الروماتويدي.

و بالمقارنة مع ٣-ميثيل أدينين والمعروف بالمانع الشامل ل PI3K، تبين أن كلاً من عقاري إيتانيرسيبت و إنفليكزيماب له قدرة نوعية على تثبيط الإلتهام الذاتي للخلاية مكافئة ل ٣-ميثيل أدينين بالرغم من أنهم أقل من الناحية الكمية الإحصائية، مما يفسر لنا التأثير القوي المضاد للإلتهاب ل٣-ميثيل أدينين مقارنة بكل من العقارين الآخرين. وجدير بالذكر أن قدرة ٣-ميثيل أدينين على كسر حلقة الإلتهابات المتسلسلة قد تفتح آفاقاً جديدة لتطوير مثبطات للإلتهام الذاتي بحيث يمكن استخدامها إكلينيكياً في علاج إلتهاب المفاصل الروماتويدي.

و ينصح أيضاً بدمج العلاج بمثبطات عامل نخر الورم ألفا مع أحد موانع الإلتهام الذاتي للخلايا و ذلك لتعزيز فعاليتهم بالإضافة إلى استخدام جرعات أقل مما يعود على المريض بالفائدة ، بالإضافة إلى تقليل التأثيرات الجانبية للعقاقير قدر المستطاع. و نأمل أن توفر هذه المقترحات حلولاً محتملة لعدم استجابة عدد لا يستهان به من مرضى إلتهاب المفاصل الروماتويدي للعلاج.