Faculty of Pharmacy, Pharos University in Alexandria
Department of Pharmacology and Therapeutics

Effect of Combined Therapy with Rosuvastatin and Memantine on TGF-β1/Smad Signaling Pathway in Experimental Model of Alzheimer's Disease in Rats

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master

In

Pharmacology

Presented by

Esraa Fayez Rashad Zidan

Bachelor Degree *in Pharmaceutical Sciences (2012)*

Faculty of Pharmacy

Alexandria University

2022

P.U.A. Library
Central Medical Library (B)
Faculty of :
Serial No : 321
Classification : 616.8

الملخص العربي

يُعد مرض الزهايمر اضطراب عصبي مزمن ومتفاقم، كما أنه يُعتبر من أهم أسباب التدهور العقلي و ضعف الذاكرة. يتصف مرض الزهايمر بحدوث تغيرات تنكسية؛ تدمر الذاكرة ومهارات التفكير تدريجيًا، ثم يتدهور إلى فقدان القدرات الوظيفية؛ مؤديًا في النهاية إلى الاعتماد التام على الآخرين. كما يتصف الزهايمر مرضيًا بترسيب لويحات بروتين بيتا أميلويد خارج الخلية، وحبيكات عصبية ليفية بداخلها. ويعد مرض الزهايمر اضطراب متعدد العوامل وله مسببات كثيرة ومسارات متعددة. حيث يعد بروتين بيتا أميلويد عامل مشترك فيها، بالإضافة إلى وجود تغيرات جزيئية متعددة، كتلك التي تحدث بالأوعية الدموية ومقاومة الإنسولين والالتهاب العصبي والإجهاد التأكسدي. تشتمل عوامل الخطورة الأخرى على: التاريخ المرضي وحدوث إصابة رضخية بالرأس وزيادة نسبة كل من الكولستيرول وضغط الدم بالإضافة إلى السمنة. ويتوفر حاليًا القليل من العلاجيات الدوائية المعتمدة - أحادية ومركبة - لعلاج أعراض مرض الزهايمر، ولكن دائمًا ما تكون الفوائد العلاجية لهذه المواد هامشية وغير مستمرة؛ مما يؤدي إلى ضرورة البحث عن مستهدفات دوائية جديدة لمعالجة مرض الزهايمر. تُقيّم الدراسة الآتية عواقب المرض السلوكية والبيوكيميائية والجزيئية والتشريح المرضي النسيجي بالإضافة إلى دراسة آليات الجزيئيات المتسببة في الزهايمر المُحدَث بمادة ستربتوزوتوسين. كما تهدف هذه الدراسة إلى تقييم مدى فعالية عقار ميمانتين الذي يعمل عن طريق غلق مستقبلات NMDA و عقار الروسفاستاتين الخافض لكولسيرول الدم على إشارات بروتين بيتا أميلويد و TGF-β1 وبروتين p-Smad2. علاوة على ذلك، فقد تناولت الدراسة إمكانية الحصول على فوائد إضافية باستخدام كلًا من الميمانتين والروسفاستاتين في تقليل الالتهاب والإجهاد التأكسدي للحد من الزهايمر.

أجريت هذه الدراسة على ذكور الجرذان التي يتراوح وزنهما بين ٢٠٠ – ٢٢٠ جم والتي تم حقنها – لاستحداث نموذج محاكي للزهايمر – بمادة ستربتوزوتوسين داخل البطينات الدماغية بجرعة تبلغ ٣ مجم/كجم، وتعد هذه الجرعة أقل من تلك المحدِثة للسكري. وقد تم تقسيم الجرذان عشوائيًا إلى خمس مجموعات، كل منها تشتمل على ثمانية جرذان. تلقت المجموعة الأولى (المجموعة الظابطة) مياه مقطرة. وقد تم تقسيم الجرذان التي تلقت الستربتوزوتوسين داخل البطينات الدماغية إلى أربع مجموعات: المجموعة الثانية (AD) وتلقت مياه مقطرة، المجموعة الثالثة (Mem) وعولجت بالميمانتين (٣٠ مجم/كجم/يوم) (٣٠)، والمجموعة الرابعة (Ros) وعولجت بالروسفاستاتين (٢٠ مجم/كجم/يوم) (٣١)، والمجموعة الخامسة وقد تلقت كلًا من الميمانتين والروسفاستاتين. وقد تم تناول الجرعة عن طريق الفم يوميًا لمدة أربعة أسابيع.

تعرضت الجرذان بعد آخر يوم من العلاج إلى اختبارات سلوكية مختلفة، مثل: متاهة موريس المائية، واختبار إدراك الأشياء، وواختبار متاهة شكلY، و اما عن القياسات المستخدمة في فى تلك الدراسه لتقييم مدى تأثير هذا العلاج الدوائي على حماية الخلايا العصبية فهى كالتالى: تعيين بروتين بيتا أميلويد ($A\beta_{1-42}$) و TGF-β1 و Smad2 باستخدام تقنية لطخة ويسترن، وكذلك تعيين التعبير الجيني لبروتين p21 بتفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، قياس مادة جلوتاثيون (GSH) ومالون داي ألدهيد (MDA) في نسيج حصين المخ، كما تم فحص التشريح المرضي النسيجي وتحليل قياس أشكال الأنسجة في نسيج حصين المخ.

فيما يلي، تلخيص للاستدلالات والنتائج في هذه الدراسة.

اوضحت نتائج الدراسة تدهورا ملحوظا في الوظائف الإدراكية في الجرذان المحقونة بمادة ستربتوزوتوسين داخل البطينات الدماغية ، وزيادة ملحوظة في مستوى كلا من بروتين بيتا أميلويد ($A\beta_{1-42}$) و TGF-β1 و Smad2 والتعبير الجيني لبروتين p٢١. بالإضافة إلى ذلك، أدى انخفاض جلوتاثيون وارتفاع مالون داي ألدهيد؛ إلى زيادة الإجهاد التأكسدي. كما تسبب الحَقن بستربتوزوتوسين داخل البطينات الدماغية؛ في حدوث اضطرابات بالتشريح المرضي النسيجي، وتأكد ذلك بتحليل قياس أشكال الأنسجة، الذي أظهر انخفاضا في عدد الخلايا العصبية الطبيعية وزيادة في عدد الخلايا العصبية التالفة و الخلايا الدبقية.

وقد ظهر جليًا أن العلاج بالميمانتين منفردًا أو مع الروسفاستاتين قد احدث تحسنا ملحوظا في التشويش الإدراكي، حيث إنه قد حسن استرجاع الذاكرة، والاستحواذ المكاني، والأداء الإدراكي، والذاكرة المكانية العاملة قصيرة الأمد، والسلوك الاستكشافي، وذاكرة التعرف على الأشياء الجديدة، وتحسين القدرة على التمييز؛ بالاعتماد على التركيز في الثلاث اختبارات السلوكية. وهذا التحسن قد تأكد إحصائيًا بارتفاع معامل الارتباط في المجموعة التي تلقت ميمانتين (Mem) والمجموعة التي تلقت ميمانتين وروسفاستاتين، مقارنة بالمجموعة (AD).

احدثت جميع العقاقير على المستوى الجزيئي نقصا ملحوظا في مستوى كل من بروتين بيتا أميلويد ($A\beta_{1-42}$) و TGF-β1 و Smad2 في حصين المخ للفئران المصابة بمرض الزهايمر. بالإضافة إلى ذلك، فقد أدى العلاج الدوائي إلى تعديل التعبير الجيني لبروتين p٢١. وأشار تحليل ارتباط معامل بيرسون بوضوح إلى وجود ارتباط طردي بين مستوى بيتا أميلويد ($A\beta_{1-42}$) ومستوى كل من TGF-β1، وبروتين Smad2 و التعبير الجيني لبروتين p٢١. كما أنه قد تبين وجود ارتباط طردي واضح بين مستوى TGF-β1 ، ومستوى بروتين Smad2 والتعبير الجيني لبروتين p٢١.

أوضحت نتائج المؤشرات البيوكيميائية ان العلاج بالأدوية المستخدمة قد أحدث ارتفاعا ملحوظا في مستوى الجلوتاثيون وانخفاضا ملحوظا في مستوى المالون داي ألدهيد بأنسجة الحصين مما يوضح فاعلية العلاج الدوائي في تعديل الاجهاد التأكسدي في مرض الزهايمر. وأظهر تحليل ارتباط معامل بيرسون وجود ارتباط عكسي بين مستوى كل من بيتا اميلويد ($A\beta_{1-42}$) و TGF-β1 ، وارتباط طردي بين مستوى كل من جلوتاثيون ومالون داي ألدهيد. علاوة إلى ذلك، فقد أحدث العلاج تحسنا ملحوظا في التغيرات التشريحية المرضية النسيجية، وخاصة انخفاض عدد الخلايا الدبقية. وأظهر تحليل الارتباط وجود ارتباط عكسي واضح بين بيتا أميلويد ($A\beta_{1-42}$) أو TGF-β والتعداد التفريقي للخلايا العصبية الطبيعية، بينما أوضحت النتائج وجود ارتباط طردي بين التعداد التفريقي للخلايا العصبية والدبقية التالفة وبين بيتا أميلويد ($A\beta_{1-42}$) أو TGF-β1.

ومما يثير الاهتمام، الانخفاض الملحوظ في المؤشرات الجزيئية المؤذية، حيث إنه يوجد ارتباط عكسي بين بيتا أميلويد ($A\beta_{1-42}$) أو TGF-β1 وبين مؤشرات الإدراك المُقاسة في الثلاث اختبارات السلوكية؛ مؤكدة على فائدة العلاج المركب بالميمانتين والروسفاستاتين في التحكم في الأعراض المتدهورة لمرض الزهايمر كما هو واضح في النموذج التجريبي. وعلى نحو لافت للنظر، تبين في المؤشرات المحددة أن التأثير التحسيني لاستخدام كلًا من ميمانتين وروسفاستاتين معًا أفضل من استخدام أي منهما على حدة. وجدير بالذكر، أنه بالرغم من أهمية روسفاستاتين في العلاج المركب، إلا أنه منفردا لم يحقق تحسن واضح في الأداء الإدراكي.

وفي النهاية، نستنتج مما سبق، أن إضافة روسفاستاتين إلى ميمانتين - في نموذج الجرذان المحاكي للزهايمر - إمكانية علاجية ملحوظة. ونزيد على ما سبق أن مركب ميمانتين/روسفاستاتين يستهدف مسار -p Aβ/TGF-β1/ Smad2، الذي يمثل دورًا جوهريًا في تدهور الزهايمر. فتجعل هذه التأثيرات النافعة، بالإضافة إلى أمان كلا العقارين، من هذا المركب مادة علاجية واعدة للتحكم في وعلاج الزهايمر.