Evaluation of the Plausible Anti-lipogenic/-inflammatory Molecular Mechanisms of Sulforaphane as a Natural Supplement in High Fat Obese Rats

Thesis Submitted for the Degree of Ph.D.
in

Pharmaceutical Sciences
(Pharmacology and Toxicology)

By

Ahmed Ibrahim Hassan Ashmawy
Teacher Assistant at the Department of Pharmacology & Therapeutics
Faculty of Pharmacy
Pharos University in Alexandria (PUA)

Under the Supervision of

Prof. Dr. Dalaal Moustafa Abdallah
Professor of Pharmacology
Department of Pharmacology & Toxicology
Faculty of Pharmacy
Cairo University

Prof. Dr. Hanan Salah El Din El-Abhar
Professor of Pharmacology
Department of Pharmacology, Toxicology & Biochemistry
Faculty of Pharmacy
Future University in Egypt

Dr. Mennatallah Ahmed Ismail
Assistant Professor of Pharmacology
Department of Pharmacology & Therapeutics
Faculty of Pharmacy
Pharos university in Alexandria

Faculty of Pharmacy
Cairo University
2022

P.U.A. Library
Central Medical Library (B)
Faculty of :
Serial No : 826
Classification : 615.19

الملخص العربي

يعد مرض السمنة من الأمراض المزمنه المعقدة والمنتشرة على مستوى العالم. ويعتبر الالتهاب النظامي منخفض الدرجة من اهم المسببات لمرض السمنة وهو المفتاح الذي يؤدي إلى تنشيط عوامل الالتهابات في وقت مبكر مما يؤدي إلى مقاومة الأنسولين أولا ومن ثم اضطراب شحميات الدم الأيضي في النهاية.

ومن المعروف أن العديد من عوامل الالتهاب بما فيها الإنترلوكين-٦ ((IL-٦ والإنترلوكين-٢٢ ((IL-٢٢، بالإضافة الي هرمون اللبتين هم جميعا من العوامل المنشطة لعملية فسفرة المسار الخاص بمحولات إشارات (Janus kinase (JAK ومنشطات مسار إشارات النسخ (STAT) المحفوظ تطوريًا عن طريق مجموعة متنوعة من مستقبلات السيتوكينات المختلفة مما يكمن وراء أمراض كثيرة واضطرابات مختلفة، بما في ذلك مرض السمنة.

بالإضافة إلى ذلك فإن الأدلة المستجدة تشير إلى ارتباط الالتهام الذاتي في تنظيم مخازن الدهون داخل الكبد والأنسجة الدهنية البيضاء الحشوية (vWAT). وانه لمن المعروف أن الالتهام الذاتي يتم تنظيمه من خلال العديد من جزيئات الإشارة، خاصة البروتين المرتبط بالأنابيب الدقيقة-٢ السلسلة الخفيفة-٣ (-LC3 II)، بيكلين-١، وعائلة البروتين الالتهام الذاتي (ATG)، والتي تم تحديدها في الأصل في الخميرة ويمكن ان تتواجد في صور مختلفة في الخلايا حقيقية النواة.

هناك عنصر آخر له تأثيرات مثيرة للجدل على السمنة وهوmicroRNA-٢٠٠)). ومن المعروف أن miRNAs تشكل مرحلة إضافية من التنظيم على مستوى ما بعد النسخ وهي مهمة في توازن التمثيل الغذائي في الجسم. بالإضافة الي ذلك فلقد تبين ان miR-200a لديه القدرة في تعديل عملية الفسفرة الخاصة بال STAT-٣ عن طريق تقليل عدد مستقبلات اللبتين. ومع ذلك فإن دور عائلة miR-٢٠٠ في السمنة لم يتم تأكيده بعد.

وقد تم تصميم هذه الدراسة لتسليط الضوء على الدور العلاجي لعقار السلفورافان (SFN)، وهو عبارة عن مركبisothiocyanate الكيميائي النباتي المتواجد في الخضروات الصليبية، في العلاج من مرض السمنة المفرطة والالتهابات المصاحبة لها، بالإضافة لعقار الكلوروكين (CQ)، وهو في الاصل دواء مضاد للملاريا، بالإضافة الي ذلك فهو يعتبر حاليا مثبط الالتهام الذاتي الوحيد المعتمد من قبل إدارة الغذاء والدواء الامريكية (FDA).

وقد اجري هذا البحث للتحقق من دورهما المحتمل منفردين أو مجتمعين في تعديل الاثار السلبية لمرض السمنة. ذلك بالإضافة أيضًا الى تأثيرهما المفيد المحتمل في تنظيم مسار p-JAK-2 /p-STAT-٣/SOCS-3 والنشاط الذاتي، ومستوى التعبير الجيني الخاص ب miR-200a في الجرذان مرتفعة البدانة.

وقد تم اجراء هذه الدراسة على سته وثلاثين من ذكور الجرذان البيضاء من فصيلة واستر والتي تتراوح اوزانها ما بين ١٨٠-٢٠٠ جرام في بيت الحيوان الخاص بجامعة فاروس (الإسكندرية، مصر).

وبالنسبة لخطة العمل فإنه قد تم توزيع الجرذان على مجموعتين مختلفتين عن بعضهما في شكل النظام الغذائي لمدة ستة أسابيع متتالية، المجموعة الاولي تتكون من سته جرذان قد تم تغذيتها بنظام غذائي يحتوي على نسبة طبيعية من الدهون. والمجموعة الأخرى تتكون من ثلاثين جرذاً وقد تم تغذيتها على نظام غذائي عالي الدهون.

في نهاية فترة الحمية الغذائية (٦ أسابيع)، فإنه قد تم تقسيم الجرذان إلى ست مجموعات تحتوي كل منها على سته جرذان. احتوت المجموعة الأولى على الجرذان التي تلقت نظام غذائي معتدل الدهون (NFD) وتعتبر هذه المجموعة بمثابة الضوابط العادية؛ وقد أعطيت المذيب المستخدم في التجربة وهو محلول (DMSO) بدون أي عقاقير عن طريق الفم. بالإضافة الي ذلك تم تقسيم الجرذان مرتفعة الدهون إلى خمس مجموعات والتي تشتمل بداية على المجموعة الثانية وفي هذه المجموعة، تلقت الجرذان المصابة بمرض السمنة محلول (DMSO) فقط لتكون بمثابة المجموعة الضابطة الإيجابية. اما بالنسبة للمجموعات الثالثة والرابعة فقد تم اعطاء الجرذان في هذه المجموعات عقار السلفورافان (SFN) عن طريق الفم بجرعة ٠,٥ مجم / كجم / يوم و١ مجم / كجم / يوم على التوالي بالإضافة الي المجموعة الخامسة، وقد تم اعطاء هذه المجموعة عقار الكلوروكين (CQ) أيضا بجرعة ٥ مجم / كجم / يوم. ثم تأتي المجموعة السادسة، وفي هذه المجموعة عولجت الجرذان بجرعة منخفضة من عقار السلفورافان (SFN) (٠,٥ مجم / كجم / يوم) عن طريق الفم أيضاً لتقليل أي تفاعل دوائي محتمل، بالإضافة إلى ٥ مجم / كجم / يوم من عقار الكلوروكين (CQ).

وقد تم اعطاء جميع العقاقير المستخدمة في التجربة عن طريق الفم لمدة ستة أسابيع متتالية وتم تسجيل التغيرات في وزن الجسم الكلي (BW) طوال فترة التجربة بأكملها.

في نهاية فترة البروتوكول العلاجي، تم تحديد نسبة الجلوكوز في الدم أثناء الصيام (FBG) في الحيوانات الصائمة طوال الليل باستخدام مقياس تلقائي للجلوكوز باستخدام عينات الدماء المأخوذة من طرف الذيل. ثم تم تخديرهم باستخدام ثيوبنتال (٦٠ مجم / كجم)، وتم جمع الدم عن طريق ثقب في القلب لفصل المصل وبعد جمع عينات الدم مباشرة، تم استئصال الكبد والأنسجة الدهنية البيضاء الحشوية، وغسلهما بمحلول ملحي بارد، وتقسيمهما إلى ٣ اجزاء باستخدام الاساليب المناسبة، ثم تم حفظهما عند -٨٠ درجة مئوية حتى الفحص.

المعلومات المستنتجة من خلال نتائج الدراسة الحالية:

١- أسفر نموذج السمنة التي يسببها النظام الغذائي مرتفع الدهون (HFD) المستخدم في الدراسة بنفس السمات الكلاسيكية التي شوهدت أثناء تطور مرض السمنة، حيث أظهر زيادة كبيرة في الوزن الكلي للجسم، وارتفاعًا ملحوظًا في مستوى الجلوكوز واللبتين في الدم.

٢- ارتفاع مستويات الدهون الثلاثية والكوليسترول الكلي والكوليسترول الضار والأحماض الدهنية الحرة بينما انخفض مستوى الكوليسترول الحميد بشكل ملحوظ. بالإضافة الي ذلك فقد تبين أيضا ان هناك علاقة ما بين اضطراب مستويات الدهون في مصل الدم وارتفاع مستويات SREBP-1c وACC وFAS وmiR-200a في أنسجة الكبد والدهون على حد سواء.

٣- النظام الغذائي مرتفع الدهون (HFD) وتطور مرض السمنة أدى أيضاً إلى الارتفاع الملحوظ في عوامل قياس الالتهاب؛ NF-κB وIL-٢٢ وp-JAK-٢ وp-STAT-٣ وSOCS-٣ مما يشير إلى أن الالتهاب يلعب دورًا رئيسيًا مهمًا في التسبب في الإصابة بمرض السمنة وتطور مراحله.

٤- النظام الغذائي مرتفع الدهون (HFD) أدى إلى تغير مؤشرات الالتهام الذاتي بيكلين -١و ATG-٧ وLC3-II.

النتائج الإيجابية المترتبة على استخدام عقار السلفورافان (SFN) و الكلوروكين (CQ) او كليهما معاً في علاج مرض السمنة المفرطة:

١- اثبت عقار السلفورافان (SFN) فاعلية في تخفيض الارتفاع الناجم عن النظام الغذائي مرتفع الدهون ((HFD في إجمالي وزن الجسم، بالإضافة الي تخفيض مستويات مصل الجلوكوز واللبتين.

٢- كما نجح عقار السلفورافان (SFN) أيضًا في تعديل مستويات الدهون في مصل الدم وخفض مستوى SREBP-1c وACC وFAS، بالإضافة الي miR-200a في أنسجة الكبد والدهون بطريقة تتناسب مع الجرعة المستخدمة.

٣- بالإضافة إلى ذلك اظهر عقار السلفورافان (SFN) قدراته المضادة للالتهابات من خلال عكس التأثيرات الضارة للنظام الغذائي مرتفع الدهون على العديد من المعايير مثل NF-κB وIL-٢٢ وp-JAK-٢ وp-STAT-٣.

٤- ومن ناحية أخرى، تسبب عقار السلفورافان (SFN) في زيادة قوية في جميع مؤشرات الالتهام الذاتي التي تشتمل على بيكلين-١ وATG-٧ وLC3-II.

٥- علاوة على ذلك، كشفت النتائج أيضًا أن للكلوروكين (CQ) تأثيرات مفيدة في جميع المؤشرات المذكورة أعلاه تقريبًا. وقد أظهرت هذه التأثيرات بطريقة ما نمطًا مشابهًا للسلفورافان (SFN) ولكن بدرجة أقل بكثير، باستثناء بعض مؤشرات الالتهام الذاتي، حيث نجحت في خفض مستوى ATG-٧ إلى حد ما بينما لم تظهر أي تأثير في محتوى بيكلين١-. ومن خلال مناقشة هذه النتائج فإنه يمكن الاستدلال على قدرة كل من السلفورافان (SFN) والكلوروكين (CQ) في تخفيف الآثار الخطيرة لأكسدة الدهون ومقاومة اللبتين والالتهاب وحالات الإجهاد التأكسدي المصحوبة بتطور مرض السمنة. وقد أوضحت النتائج أن عقار السلفورافان (SFN) كان أفضل تأثيراً من الكلوروكين (CQ) في العديد من المؤشرت.

ومن المثير للاهتمام ايضا أن أعطاء دوائي السلفورافان (SFN) والكلوروكين (CQ) معاً لمدة سته أسابيع على جميع المؤشرات كان أكثر تفوقا مقارنة بتأثيرات أي من الأدوية عند استخدامها بمفردها، مما يشير إلى آثارهما المضافة أوالتآزرية.

ولذا فإن الدراسة الحالية، تؤكد الآثار المفيدة والعلاجية التي يمكن أن تنتج عن استخدام عقار طبيعي مضاد للأكسدة، له تأثير مضاد للالتهابات، بالاشتراك مع مثبط الالتهام الذاتي الذي يحمل بعض مضادات الالتهاب وخصائص مضادة للسمنة. يجب التنويه إلى أن هذه النتائج تحتاج إلى المزيد من الدراسات من أجل اكتساب المزيد من المعلومات حول آلية عمل كل من العقاقير وطريقة تفاعلهما مع بعضهما البعض.