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

Evaluating the effect of Probenecid and L-carnitine in ameliorating osteoarthritis via modulating P2X7/NLRP3/NF-kB pathway

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

In

Pharmacology

Presented by

Rawan Mahfouz

B.Sc. in Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Pharos University in Alexandria, 2018

2023

P.U.A. Library
Central Medical Library (s)
Faculty of :
Serial No : 847
Classification : 615

الملخص العربي

خشونة المفاصل (OA) هو مرض تنكسي في المفاصل انتشر بسبب العديد من العوامل مثل العمر والجنس الأنثوي والسمنة وإصابات المفاصل . يتميز بأنه التهاب تدريجي يؤدي إلى تغييرات هيكلية مثل تآكل الغضروف المفصلي ، تكوين زوائد عظمية، وتضييق مساحة المفصل اللاحق بالإضافة إلى مشاركة عظم تحت الغشاء للمفاصل الزليلي مما يؤدي إلى الألم أثناء أنشطة تحمل الوزن ، بما في ذلك المشي والوقوف.

وقد اتضح مؤخرًا أن السيتوكينات الالتهابية تلعب دورًا رئيسيًا باسباب المرض. يتم إنتاج السيتوكينات المؤيدة للالتهابات مثل عامل نخر الورم α- (TNF) و interleukin-1β (IL-1β) و IL-6 و IL-18 بواسطة chondrocytes في synovium, وتؤدي إلى إنتاج عوامل مثل (MMPs) التي تحفز تآكل الغضروف وموت الخلايا المبرمج.

من بين الأساليب الجديدة في مجال البحث الأدوية التي تستهدف مسارات نقل الإشارات داخل الخلايا غير المنظمة التي يتم تنشيطها في أنسجة غضروف OA ولها دور مهم في الألم والالتهاب مثل مسار /(P2X7R) (NLRP-3)/NF-kB.

تنتمي مستقبلات P2X7 إلى أحد أفراد عائلة مستقبلات قناة P2X الأيونية التي يشار إلى دورها فى تسبب الألم والالتهاب في خشونة المفاصل. بالإضافة إلى ذلك، أوضحت دراسات أخرى أن تنشيط مستقبلات P2X7 بمستويات مرتفعة من ATP بوساطة قنوات pannexin يمكن أن يؤدي إلى تنشيط NF-kB زيادة انتاج لـ IL-1β، IL-6, TNF-α و MMP13 و PGE2 . بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يؤدي تنشيط P2X7 إلى تقليل تركيز K^+ داخل الخلايا والذي يسمح بتنشيط (NLRP3) و زيادة انتاج 1β -IL و IL-18. لذلك، قد يكون استهداف مسار إشارة مستقبلات P2X7 استراتيجية علاج جيدة لخشونة المفاصل.

تبين أن microRNAs (MiRNAs) ، التي تنظم التعبير الجيني وتشكل طبقة إضافية من التنظيم على مستوى ما بعد النسخ، لها دور اساسى في مرض خشونة المفاصل. أفيد سابقًا أن التعبير غير المنظم لـ (miR-373) في الخلايا الغضروفية من مرضى OA يسبب تكاثر الخلايا الغضروفية وزيادة في العوامل الالتهابية مثل IL-6 عن طريق زيادة مستوى مستقبلاتح P2X7R.

عقار البروبينسيد هو مثبط لناقلات الأنيون العضوي في الأنابيب الكلوية القريبة و هو يستخدم لمنع امتصاص حمض اليورك اسيد من البول ويستخدم كخط ثاني لعلاج مرض النقرس في البشر. أظهرت الدراسة السابقة أن البروبينسيد كان فعالًا في تخفيف الالتهاب المفرط ومرض الإنفلونزا الشديد في الفئران من خلال استهداف مستقبل P2X7R. ذكرت دراسات أخرى أنه يمكن أن يضعف أيضًا قناة1-pannexin المسئوله عن زيادة انتاج ATPالذى يمكن أن يتفاعل بشكل مباشر مع P2X7 عند البشر والقوارض.

أما L-carnitine [LC]، فهو يمثل الشكل النشط حيويًا من الكارنيتين، هو مشتق من الأحماض الأمينية المتفرعة غير الأساسية التي تلعب دورًا حاسمًا في إنتاج الطاقة عن طريق نقل الأحماض الدهنية طويلة السلسلة من السيتوبلازم إلى الميتوكوندريا حتى يمكن أكسدة لإنتاج الطاقة. ثبت أن الالكارنيتين يوفر إمكانات علاجية كبيرة ضد العديد من الحالات المزمنة بما في ذلك أمراض القلب والأوعية الدموية والسكري والالتهابات. و ثبت الدراسات السابقة أن الجرعات العالية منه يمكن أن تسبب اضطراب الجهاز الهضمي و رائحة الجسم " السمكية " وضعف العضلات والنوبات.

كان الهدف من الدراسة الحالية هو التحقيق في التأثيرات المضادة للالتهابات للبروبينسيد و الالكارنيتين في علاج خشونة المفاصل عن طريق تعديل مسار P2X7/NLRP3/NF-κB .

تم إحداث خشونة المفاصل بركبة واحدة فقط تحت التخدير الخفيف عن طريق حقن MIA داخل المفصل من ٣ ملليجرام (سيجما ، الولايات المتحدة الأمريكية). تم إذابة MIA في محلول فوسفات ملحي معقم ٠.٩ ٪ PBS وتم إعطاؤه بحجم ٥٠ ميكرولتر. تم ثني الركبة بعد الحقن للسماح بالتوزيع المتساوي لـ MIA في الفضاء الزليلي. في الضوابط ، تم حقن ٥٠ ميكرولتر من PBS المعقم وحده. تم تطوير نموذج خشونة المفصل بعد ٢٠ يومًا من حقن ال MIA.

تم تقسيم الحيوانات إلى ٥ مجموعات على النحو التالي:

المجموعة ١: سته فئران بصحة جيدة.

المجموعة ٢: تلقت سته فئران مصابة بخشونة المفاصل المادة التى استخدمت لذوبان عقارى البروبنسيد و الالكارنتين.

المجموعة ٣: تم علاج سته فئران مصابة بخشونة المفاصل عن طريق الحقن IP من البروبينسيد ، ((درجة الحموضة ٧.٣) المحضرة في ٠.٩٪ من محلول كلوريد الصوديوم الذي يحتوي على ٠.١ م تريس و ٠.١ م NaOH, ولتعديل درجة الحموضة مع (2 M HCl)، بجرعة ٥٠ مليجرام / كيلو جرام / يوم (سيجما ألدريتش).

المجموعة ٤: تم علاج سته فئران مصابة بخشونة المفاصل عن طريق الفم باستخدام L-carnitine المذاب في الماء بجرعة ١٠٠ مجم / كجم / يوم (سيجما ألدريتش).

المجموعة ٥: تم علاج سته فئران مصابة بخشونة المفاصل بكلا من العقاريين بالجرعات المذكورة أعلاه.

تم إعطاء الأدوية المختبرة يوميًا لمدة ١٤ يومًا ، بدأ من اليوم العشرين حتى نهاية الدراسة.

تم تقييم حجم ارتشاح الركبة في الأيام ٠ (قبل حقن MIA)، ١ ، ٧ ، ١٤ ، ٢١ ، ٢٨ ، ٣٣. تم ذلك لتقييم تقدم و تطور مرض خشونة المفاصل. تم قياس قطر الركبة باستخدام فرنير كاليبر الرقمي المعاير، وتم تحديد النسبة المئوية للتغير في قطر الركبه المصابه بخشونه المفاصل عن الركبة الغير مصابه.

باستخدام اختبار أداء روتارود المتسارع ، تم قياس وقت السقوط. تعرضت الفئران لسرعة تسارع من ٥ إلى ١٦ دورة في الدقيقة ، على مدى دقيقة واحدة، بينما تم رصد وقت الفشل الأول في البقاء فوق القضيب وتم حساب متوسط ٣ قياسات مختلفة. تم اختبار أداء روتارود المتسارع في اليوم صفر واليوم ٣٣. تم حساب النسبة المئوية للتغير في الأداء بالرجوع إلى قيم اليوم الصفري.

تم تخدير الحيوانات بالثايوبنتال ٥٠ ميجرام / كيلوجرام. تم جمع عينات الدم من Posterior vena cava، وتم فصل المصل واستخدامه لتحديد الاتى: IL-1β, TNF-α، IL- 6 و IL-18. تمت إزالة أنسجة غضروف مفصل الركبة من الفئران المصابة بال OA واستخدامها في تحديد مستويات التعبير البروتيني: P2X7R، NLPR-3، Pro-Caspase-1، Cleaved caspase-1، NF-κB p65، IκB وأيضاً تعين مستوى miRNA-373 .

تم صبغ شرائح من غضروف الركبة المفصول بالصبغات التالية: H and E وSafrranin-O- Fast green لتقييم التغيرات النسيجية. تم إجراء التصنيف النسيجي الكمي وفقا لنظام modified mankin and OARSI.

في هذه الدراسة، كانت هناك زيادة تدريجية مستمرة حتى نهاية الدراسة في حجم الارتشاح بالركبة في الفئران المصابة بخشونة الركبة وغير المعالجة، كما كان للعلاج المركب بعقارى البروبينيسيد بجرعة ٥٠ مليجرام/كجم/يوم و/أو الالكارنتين بجرعة ١٠٠ مليجرام/كجم/يوم التأثير الأكثر أهمية في تقليل حجم الارتشاح بالركبة مقارنة بكل دواء عند استخدامه بمفرده. أدى العلاج بكلا الدوائين معاً إلى أن حجم الركبة كان معادلاً تقريبًا لتلك الفئران العادية في اليومين ٢٨ و٣٣. تم استخدام اختبار أداء الروتارود المتسارع لحساب نسبة التغيير في الأداء في اليوم ٣٣ بالرجوع إلى اليوم.

وفقًا لنتائجنا، كان أداء الفئران المصابة بخشونة مفصل الركبة وغير المعالجة أقل بكثير من أداء الفئران العادية. كانت علاجات البروبنسيد أو الالكارنتين قادرة على تقليل الانخفاض في الأداء، بنفس المدى تقريبًا. أدى العلاج بكلا الدوائين معاً إلى أداء يعادل تقريبًا أداء الفئران العادية. أظهرت نتائج تحقيقنا أن مستوى miR-373 في غضروف الركبة لدى الفئران المصابة بخشونة مفصل الركبة كان أقل بكثير من مستوى الفئران العادية. في حين أن العلاج بالبروبنسيد أو الالكارنتين زاد بشكل كبيرمن مستوى miR-373 بالتساوي تقريبًا. أدى العلاج المشترك لكلا الدوائين إلى أكبر زيادة في مستوى miR-373. كما كانت هناك زيادة كبيرة في مستوى مستقبلات P2X7 في غضروف الفئران المصابة بالتهاب المفاصل مقارنة بالفئران العادية. من الناحية الإحصائية، أظهرت نتائجنا ارتباطًا سلبيًا بين miR-373 و P2X7R. علاوة على ذلك، كان هناك ارتفاع كبير في مستوى NF- κ B p65 وانخفاض في I κ B في غضاريف الركبة المصابة بالخشونة مع زيادة لاحقة في مستويات المصل من IL-6 و TNF- α. علاوة على ذلك، زاد

مستوى NLRP3، caspase-1 بالغضروف الفئران المصابة بخوشنة الركبة، و قل مستوى procaspase-1 مع زيادة لاحقة في مصل IL-1 β و IL-18. علاوة على ذلك، كان هناك ارتباط إحصائي إيجابي بين P2X7 وNLRP3 وNF- κ B p65 التي تشكل حلقة لا نهائية من الالتهاب. يسلط هذا الضوء على دور NF- κ B وNLRP3 في التسبب في خشونة المفاصل. علاوة على ذلك، قلل العلاج بالبروبينسيد بشكل كبير من التعبير عن P2X7، NF- κ B p65، NLRP3، وcleaved caspase-1 وزاد بشكل كبير التعبير عن I κ B و procaspase-1. أيضًا، تم تخفيف مستويات السيتوكينات الالتهابية في المصل مثل IL-6 و IL-18 و IL-1 β و TNF- α بشكل كبير مع العلاج بالبروبنسيد. لم يكن هناك فرق كبير بين التأثير الذي لوحظ مع علاج البروبنسيد أو الالكارنتين. كان للمجموعة التي تلقت العلاج المركب التأثير الأكثر بروزًا.

كان الهيكل التشريحي لمفصل الركبة سليمًا في فئران الطبيعية، وفقًا للتحليل النسيجي لجزء مفصل الركبة المصبوغ بـ H و E في دراستنا. بينما أظهرت المجموعة المصابة بخشونة الركبة غير المعالجة التهاب واضح. كانت مساحة المفصل محدودة بسبب عدم استواء سطح قصبة الساق وعظم الفخذ. تضرر الغضروف المفصلي، وكان هناك تصلب. شوهد فرط التنسج الزليلي بالإضافة إلى تليف الأنسجة تحت الزليلية. كانت هناك مناطق من التسلل اللمفاوي المختلط والمناطق شديدة الأوعية الدموية. علاوة على ذلك، كانت النتيجة الإجمالية المقدمة عند تقييم الغشاء الزليلي بمفصل الركبة للأقسام المصبوغة H و E في فئران المصابة بخشونة الركبة أعلى بكثير من الفئران العادية، مما يشير إلى وجود فرط التنسج والالتهاب.

أظهرت الأقسام المصبوغة باللون Safranin O-Fast green أن الغضروف المفصلي السميك الطبيعي مع المستوى الطبيعي من الخلايا الغضروفية والبروتيوجليكان في مجموعة الفئران الاصحاء. كان هناك نقص فى سمك الغضروف المفصلي و الذى اقترن بملاحظة خلايا غضروفية غير منظمة واستنفاد البروتيوجليكان فى مجموعة الفئران المصابة بخشونة مفصل الركبة. تم زيادة إجمالي modified mankin scores و OARSI عند تقييم الغضروف المفصلي للأقسام المصبوغة لمفصل الركبة safranin-O-fast green في فئران المصابة بخشونة مفصل الركبة مقارنة بالفئران العادية، مما يشير إلى حدوث تآكل الغضروف وانخفاض محتوى البروتيوجليكان.

عكس كل من البروبينسيد والكارنيتين بشكل كبير التغيرات الهيستوباثولوجية و لوحظ ذلك بشكل كبير عند استخدام العقاريين معاً. وذلك يوضح أهمية استخدام عقارى البروبنسيد و الالكارنتين في علاج خشونة الركبة.

قام الالكارنتين بزيادة تأثير البروبينسيد المضادة للالتهابات لتخفيف خشونة المفاصل الناجمة عن MIA في الفئران عن طريق زيادة مستوى miRNA-373 وتثبيط مسار P2X7 / NLRP3 / NF-κB. و قد نتج عن ذلك انخفاض في مستويات السيتوكينات الالتهابية (IL-1β، IL-18، IL-6، TNF-α) كان للعلاج المركب بعقارى الالكارنتين و البروبينسيد التأثير الأبرز في تقليل حجم الارتشاح بالركبة، وتعزيز التوازن الحركي، وعكس التغيرات التي لوحظت في مقاطع الركبة للفئران المصابة بخشونة المفصل المصبوغة بال H و E و Safranin O-Fast green.وقد لوحظت التأثير الفعال المثبط لخشونة مفصل الركبة في العلاج الثنائى للعقاريين معاً و هذا التأثير الملحوظ جعل الفئران المصابة بخشونة المفاصل تشفى بدرجة أنها تشبة الفئران الطبيعية ولكنها تختلف بشكل كبير عن أي من العلاجين وحدهما. وهذا يوضح أهمية استخدام عقارى الالكارنتين و البروبينسيد معاً في علاج خشونة المفاصل.