جامعة الإسكندرية
ALEXANDRIA UNIVERSITY
كلية العلوم
قسم الكيمياء الحيوية

Department of Biochemistry

Neuroprotective effect of combined administration of vitamin A and cannabidiol on Alzheimer's disease- induced in mice model

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy

In

Biochemistry

Presented by

Youmna Magdi Ahmed Shams El-Dine El-Ghamry

BSc/ in Biochemistry, 2012

MSc/ in Biochemistry, 2018

Faculty of Science

University of Alexandria

[2024]

P.U.A. Library
Central Medical Library (B)
Faculty of :
Serial No : 859
Classification : 616.8

الملخص العربي

يُعد مرض الزهايمر هو أول مرض تنكس عصبي شائع وخصوصا بين كبار السن. وترتبط أسباب هذا المرض بالإجهاد التأكسدي، والإلتهاب العصبي، وتراكم صفيحات بيتا المطوية، وارتفاع مستويات فسفرة بروتين تاو، وايضا ارتفاع مستويات إنزيم أستيل كولين إستريز. ويواجه علاج مرض الزهايمر تحديًا صعبًا لأن معظم الأدوية الحالية تحد من الأعراض فقط، ولا يمكنها منع تطور المرض، ولها العديد من الآثار الجانبية.

وتتسبب مادة السكوبولامين في حدوث تغييرات مشابهة لمرض الألزهايمر عن طريق زيادة الإجهاد التأكسدي، والتهاب الأعصاب، وارتفاع مستويات إنزيم أستيل كولين إستريز وتراكم صفيحات بيتا المطوية، وارتفاع مستويات فسفرة بروتين تاو، بالاضافة الي تثبيط مسار الالتهام الذاتي، وكل ذلك يرتبط ارتباطاً مباشراً بالذاكرة والاضطرابات المعرفية. وقد تم استخدام العديد من العلاجات العشبية لفترة طويلة جدًا في جميع أنحاء العالم للوقاية من الأمراض التنكسية العصبية وعلاجها. ويشمل أحدهما الكانابيديول وفيتامين (أ)، وذلك لاحتوائهما علي مجموعة متنوعة من الخصائص الدوائية التي تتضمن مضادات للأكسدة ومضادات للالتهابات وحماية الأعصاب. ومن المثير للاهتمام أن الكانابيديول لا يسبب تأثيرًا نفسيا عند استخدامه في العلاجات.

وأجريت هذه الدراسة الحالية لتقييم التأثير الوقائي للكانابيديول وفيتامين (أ) وذلك باعطائها لفئران التجارب إما بشكل منفصل أو مع بعضهم البعض لدراسة تأثيرهما ضد التغيرات الشبيهة بمرض الألزهايمر التي تسببها مادة السكوبولامين. تم اجراء التجارب في المختبرعن طريق التحقق بالفحص البيولوجي للكانابيديول باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائل عالية الدقة (HPLC)، وذلك بالاضافة الي الاختبارات التي تم اجرائها على فئران التجارب. وفي هذه الدراسة تم استخدام سبعين من ذكور الفئران البيضاء من النوع البينو والتي تتراوح أوزانها بين 17 إلى 25 جرامًا. وتم تقسيم الفئران إلى مجموعتين رئيسيتين.

اولاً: المجموعات الضابطة؛ تنقسم إلى خمسة مجموعات فرعية على النحو التالي:

المجموعة الضابطة الاولي: المجموعة الضابطة (عدد الفئران، ستة) حيث تم تغذية فئران هذه المجموعة بنظام غذائي قياسي وماء الصنبور لمدة ثلاثة أسابيع.

المجموعة الضابطة الثانية: مجموعة زيت الفول السوداني الضابطة (عدد الفئران، ستة) حيث تم إعطاء فئران هذه المجموعة 0.2 ملي لكل 100 جرام من وزن الجسم من زيت الفول السوداني من خلال أنبوب المعدة عن طريق الفم يومياً لمدة ثلاثة أسابيع.

المجموعة الضابطة الثالثة: مجموعة الكانابيديول الضابطة (عدد الفئران، ستة) حيث تم إعطاء فئران هذه المجموعة محلول الكانابيديول بجرعة 20 ملجم لكل كيلوجرام من وزن الجسم من خلال أنبوب المعدة عن طريق الفم يومياً لمدة ثلاثة أسابيع.

المجموعة الضابطة الرابعة: مجموعة فيتامين (أ) الضابطة (عدد الفئران، ستة) حيث تم إعطاء فئران هذه المجموعة محلول فيتامين (أ) بجرعة 6 ملجم لكل كيلوجرام من وزن الجسم من خلال أنبوب المعدة عن طريق الفم يومياً لمدة ثلاثة أسابيع.

المجموعة الضابطة الخامسة: مجموعة الكانابيديول وفيتامين (أ) (عدد الفئران، ستة) حيث تم إعطاء فئران هذه المجموعة محلول الكانابيديول بجرعة 20 ملجم لكل كيلوجرام من وزن الجسم ومحلول فيتامين (أ) بجرعة 6 ملجم لكل كيلوجرام من وزن الجسم من خلال أنبوب المعدة عن طريق الفم يومياً لمدة ثلاثة أسابيع.

ثانياً: المجموعات المستحثه والمعالجة؛ تنقسم إلى اربعة مجموعات فرعية على النحو التالي:

المجموعة المستحثة الاولي: مجموعة مستحثة بمادة السكوبولامين (عدد الفئران، عشرة) حيث تم حقن فئران هذه المجموعة باستخدام محلول السكوبولامين (0.75 مجم / كجم) في داخل التجويف البطني لمدة اربعة عشر يوماً غير متتالية من أجل إحداث تغييرات شبيهة بمرض الألزهايمر.

المجموعة المستحثة والمعالجة الثانية: مجموعة مستحثة بمادة سكوبولامين ومعالجة بالكانابيديول (عدد الفئران، عشرة) حيث تم إعطاء فئران هذه المجموعة يوميًا محلول الكانابيديول بجرعة 20 ملجم لكل كيلوجرام من وزن الجسم من

خلال أنبوب المعدة عن طريق الفم يوميًا لمدة ثلاثة أسابيع وتم حقنهم بمحلول السكوبولامين (0.75 مجم / كجم) في داخل التجويف البطني لمدة أربعة عشر يوماً غير متتالية.

المجموعة المستحثة والمعالجة الثالثة: مجموعة مستحثة بمادة سكوبولامين والمعالجة بفيتامين (أ) (عدد الفئران، عشرة) حيث تم إعطاء فئران هذه المجموعة محلول الفيتامين (أ) بجرعة 6 ملجم لكل كيلوجرام من وزن الجسم من خلال أنبوب المعدة عن طريق الفم يومياً لمدة ثلاثة أسابيع وتم حقنهم بمحلول السكوبولامين (0.75 مجم / كجم) في داخل التجويف البطني لمدة اربعة عشر يوماً غير متتالية.

المجموعة المستحثة والمعالجة الرابعة: مجموعة مستحثة بمادة سكوبولامين والمعالجة بكلا من الكانابيديول وفيتامين (أ) (عدد الفئران، عشرة) حيث تم إعطاء فئران هذه المجموعة محلول الكانابيديول بجرعة 20 ملجم لكل كيلوجرام من وزن الجسم ومحلول الفيتامين (أ) بجرعة 6 ملجم لكل كيلوجرام من وزن الجسم من خلال أنبوب المعدة عن طريق الفم يومياً لمدة ثلاثة أسابيع وتم حقنهم بمحلول السكوبولامين (0.75 مجم / كجم) في داخل التجويف البطني لمدة اربعة عشر يوماً غير متتالية.

تم إجراء اختبار السلوك العصبي المعروف ب Morris Water Maze لتقييم الوظيفة الإدراكية للفئران وقدرات الذاكرة المكانية. وفي نهاية التجربة، تم صيام الفئران طوال الليل، ثم تم تخديرها بحقنهم بمادة بنتوباربيتال الصوديوم (100 مجم/كجم) في داخل التجويف البطني لجمع الدم وأنسجة الحُصين (hippocampus) من أجل قياس الدلالات الجزيئية والكيميائية الحيوية. حيث تم قياس مجموعة متنوعة من المعاملات الكيميائية الحيوية التي تشمل دلالات مضادات الاكسدة ومنها إنزيم سوبر أكسيد ديسميوتاز (SOD) ، مستويات الجلوتاثيون (GSH)، وإنزيم الجلوتاثيون- S- ترانسفيراز (GST)، وعلامات الإجهاد التأكسدي (المواد المتفاعلة لحمض الثيوباربيتوريك- TBARS ، وأكسيد النيتريك- NO) ، وايضا مستوي السيتوكينات المؤيدة للالتهابات، والمؤشرات الحيوية المرتبطة بالمرض الألزهايمر ومنها تراكم صفيحات بيتا المطوية، ومستويات فسفرة بروتين تاو، ومستويات إنزيم أستيل كولين إستريز، والمستوى الجيني لعامل التغذية العصبية المشتق من الدماغ BDNF، بالاضافة الي التعبيرات الجينية والبروتينية للعلامات الحيوية المرتبطة بالالتهام الذاتي.

أظهرت نتائج اختبار السلوك العصبي في الفئران المستحثة بمادة السكوبولامين ارتفاعاً كبيراً في وقت الهروب، وإجمالي طول مسافة السباحة بالنسبة لمجموعة الفئران الضابطة. علاوة على ذلك، أظهرت هذه الفئران انخفاضًا كبيرًا في كلا من متوسط الوقت الذي يقضيه الفئران في الربع المستهدف، وعدد الفئران التي عبرت الربع المستهدف، ومتوسط سرعة السباحة، عند مقارنتها بالمجموعة الضابطة. ومع ذلك، أدى العلاج بالكانابيديول وفيتامين (أ) إلى تحسين أداء الفئران بشكل كبير في اختبار السلوك العصبي بما في ذلك تقليل وقت الهروب، وإجمالي مسافة السباحة. بالإضافة إلى ذلك، زاد بشكل ملحوظ متوسط الوقت الذي يقضيه الفئران في الربع المستهدف، وعدد الفئران التي تعبر الربع المستهدف، ومتوسط السباحة، عند مقارنتها بالمجموعة المستحثة بمادة السكوبولامين.

بالإضافة، أظهر الحُصين للفئران المستحثة بمادة السكوبولامين زيادة ملحوظة في معايير الإجهاد التأكسدي، والسيتوكينات المؤيدة للالتهابات، بالإضافة إلى المؤشرات الحيوية المرتبطة بمرض الزهايمر علي مستوي التعبير الجيني والبروتيني. وأيضًا، إنخفضت المؤشرات الحيوية المرتبطة بالالتهام الذاتي (LC3II/LC3I، beclin-1) بشكل كبير، ومع ذلك، ارتفع مستوى p62 بشكل ملحوظ في حُصين الفئران المستحثة بمادة السكوبولامين. وقد أظهر الفحص النسيجي للفئران المستحثة بمادة السكوبولامين تأثيرات سلبية على بنية الحُصين والقشرة المخية.

على الرغم من ذلك، أدى تناول الكانابيديول وفيتامين (أ) إلى تقليل الإجهاد التأكسدي بشكل كبير عن طريق منع تكوين بيروكسيدات الدهون، ومنع إنتاج مستويات أكسيد النيتريك في الحُصين. وأيضا، قلل الكانابيديول وفيتامين (أ) من السيتوكينات المؤيدة للالتهابات بما في ذلك (IL-1 β وIL-6 وIL-12 وTNF- α وiNOS). علاوة على ذلك، انخفضت مستويات المؤشرات الحيوية والمرتبطة بمرض الألزهايمر بشكل ملحوظ في الفئران المعالجة بالكانابيديول وفيتامين (أ).

ومع ذلك، تم تنظيم مستويات التعبير الجيني لعامل التغذية العصبية المشتق من الدماغ في المجموعات المعالجة بالكانابيديول وفيتامين (أ). علاوة على ذلك، تم زيادة المؤشرات الحيوية المتعلقة بالالتهام الذاتي (LC3II / LC3I، beclin-1) بشكل كبير، ولكن انخفضت مستويات p62 بشكل ملحوظ بواسطة الكانابيديول وفيتامين (أ) في الفئران المستحثة بمادة السكوبولامين مما أدى إلى منع موت الخلايا العصبية والخلل الوظيفي. والأهم من ذلك، أظهرت النتائج المرتبطة بتناول الكانابيديول وحده كفاءة أكثر من تناول كلا من مزيج الكانابيديول وفيتامين (أ) أو تناول فيتامين (أ) وحده.

ختاماً، فأن مادة السكوبولامين تثير تغييرات تشبه التي تحدث في مرض الألزهايمر عن طريق زيادة الإجهاد التأكسدي والالتهاب العصبي وزيادة وتراكم صفيحات بيتا المطوية، وارتفاع مستويات فسفرة بروتين تاو، وايضا ارتفاع مستويات إنزيم أستيل كولين إستريز وتثبيط مسارات الالتهام الذاتي في الدماغ. كل ذلك يرتبط بشكل مباشر بالذاكرة والتدهور المعرفي. لذلك، من نتائج الدراسة الحالية، يمكننا أن نستنتج أن تناول الكانابيديول وفيتامين (أ) يمنع تطور التغيرات المشابهة لمرض الألزهايمر. ويتم تحقيق هذا التأثير من خلال تثبيط الإجهاد التأكسدي العصبي، والتهاب الأعصاب، والمؤشرات الحيوية المرتبطة بمرض الألزهايمر، وتفعيل مسار الالتهام الذاتي. وقد أظهرت النتائج أن تناول الكانابيديول وفيتامين (أ) له إمكانات علاجية لمرض الألزهايمر. ومن المثير للدهشة أننا أظهرنا لأول مرة في دراستنا أن تناول الكانابيديول وفيتامين (أ) معاً أظهرا تأثيرًا عصبيًا كبيرًا على الذاكرة وأكبر مما كان عليه عندما تم تناول فيتامين (أ) بمفرده ضد ضعف الإدراك وخلل الذاكرة في الفئران المستحثة بمادة السكوبولامين. ومع ذلك فأن تناول الكانابيديول وحده يعد أعلى فاعلية من الدمج المشترك مع فيتامين (أ) أو تناول فيتامين (أ) وحده.

التوصيات

أظهرت النتائج الحالية التي توصلنا إليها أن لكلا من الكانابيديول وفيتامين (أ) تأثيرات إيجابية على الأعصاب عن طريق منع التغيرات المشابهة لمرض الألزهايمر التي تسببها مادة السكوبولامين. وبالتالي، قد يوصى بتناول الكانابيديول وفيتامين (أ) لتنظيم اضطرابات الذاكرة والضعف الإدراكي.

ومن اللافت للنظر أن الكانابيديول له تأثير أكبر بكثير من فيتامين (أ)، فقد عزز المزيج من الكانابيديول وفيتامين (أ) من تأثيره. في الختام، تُمهد هذه النتائج الطريق للاستخدام المرتقب للكانابيديول وفيتامين (أ) في حماية ومنع السمية العصبية والالتهاب العصبي المرتبط بالعمر والنظام الغذائي والعوامل البيئية في مرض الألزهايمر. ومع ذلك، نحتاج إلى المزيد من الدراسات المتعلقة بالكانابيديول وفيتامين (أ) جنبًا إلى جنب مع التجارب السريرية إلى جانب تطوير الأدوية الجديدة للتحقق من كفاءتهما في الحماية والوقاية من مرض الالزهايمر.