

CAIRO UNIVERSITY



FACULTY OF PHARMACY

**EVALUATION OF THE POTENTIAL
RENOPROTECTIVE EFFECT OF VITAMIN D
AND/OR RETINOIC ACID ON CISPLATIN-INDUCED
NEPHROTOXICITY IN MALE RATS: ROLE OF
ENDOTHELIN-1 PATHWAY**

Thesis submitted for the
**Doctor of Philosophy Degree in Pharmaceutical Science
(Pharmacology and Toxicology)**

Presented By

Lobna Mohamed Abdel Moneim Ibrahim Ragab

BSc. Pharmacy - Alexandria University, Alexandria, Egypt (2004)
MSc. Pharmacology and Toxicology - Alexandria University, Alexandria, Egypt (2013)
Assistant Lecturer, Department of Pharmacology and Therapeutics – Faculty of
Pharmacy -Pharos University in Alexandria, Egypt

Under the Supervision of

Dr. Rania El Sayed Mohsen

Assistant Professor of Pharmacology
Department of Pharmacology & Toxicology
Faculty of Pharmacy
Cairo University

Prof. Dr. Hanan Salah El Din El-Abhar

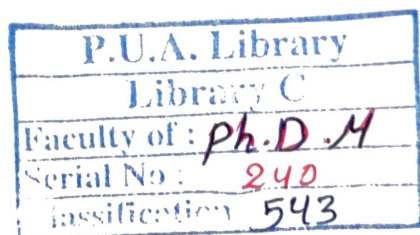
Professor of Pharmacology
Department of Pharmacology & Toxicology
Faculty of Pharmacy
Cairo University

Dr. Maged Wasfy Helmy

Assistant Professor of Pharmacology
Department of Pharmacology & Toxicology
Faculty of Pharmacy
Damanhour University

**Faculty of Pharmacy
Cairo University**

2019



ABSTRACT

Background: Although the modulation of vitamin D receptor (VDR), retinoid X receptor (RXR) and endothelin _A receptor (ET_AR) have been reported previously to offer renoprotection against cisplatin-induced nephrotoxicity and other models of renal injury, the possible interaction between the ET-1, vitamin D and retinoic acid pathways remains obscure. **Methods:** To fulfil this goal, BQ-123 (selective ET_AR blocker), all-trans retinoic acid (ATRA) (RXR agonist; 1 mg/kg) and alfacalcidol (ALF) (vitamin D₃ analogue; 50 ng/kg), were used either alone or in combination against a cisplatin-induced (6 mg/kg, i.p) nephrotoxic model in male Sprague-Dawley rats. Both vitamins were gavaged orally 5 days before and 14 days after cisplatin administration. Meanwhile, BQ-123 (1 mg/kg/day, i.p) was injected one hr before cisplatin and one day after. Nephrotoxicity was evaluated 96 hrs and 14 days following cisplatin administration. **Results:** BQ-123, ALF and ATRA have counteracted cisplatin-induced nephrotoxic changes. They reduced serum creatinine and urea, renal contents of endothelin-1 (ET-1), tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, phosphorylated nuclear factor-kappa-B, and caspase-3 activity. Besides, all regimens downregulated ET_AR expression and improved the cisplatin-induced 'acute tubular necrosis' pattern. Meanwhile, treatments have upregulated VDR, RXR- α and endothelin _B receptor (ET_BR) expression, except BQ-123, which did not affect ET_BR. The effect of the combination regimens surpassed that of each agent alone. **Conclusion:** These findings highlight the potential crosstalk between ATRA, vitamin D and ET-1 trajectories to augment the anti-inflammatory/apoptotic effect of each one alone and pave the way for future preclinical/clinical studies to explore further mechanisms involved in this combination.

Key words: Cisplatin, ET-1, nephrotoxicity, ET_AR, ET_BR, VDR, RXR

املخص العربي

يعد عقار السيسبلاتين أحد أبرز النجاحات في "الحرب ضد مرض السرطان، إلا أن نوعية الحياة في الناجين من مرض السرطان تتأثر بشكل كبير من آثاره الجانبية وخاصة السمية الكلوية التي تعد التأثير السلبي الرئيسي المرتبط بعقار السيسبلاتين في ٢٥-٣٥٪ من المرضى الذين تم علاجهم حتى بجرعة واحدة من هذا العقار.

وتعد الدراسة البحثية الحالية هي الأولى من نوعها لدراسة التفاعل المحتمل بين نظام معامل البروتين المبطن القابض للأوعية-ET-11 ومسارات إشارة فيتامين (د) وحمض الريتينويك ATRA مع مستقبلاتهما النووية في التسمم الكلوي للسيسبلاتين. و شملت العقاقير المستخدمة عقار الألفاكالسيدول كمنظير لفيتامين د٣، وعقار حمض الريتينويك ATRA، كمحفز لمستقبلات فيتامين (أ) RXR، وعقار (ب ك-١٢٣) BQ-123 كحاصر انتقائي لمستقبلات معامل البروتين المبطن القابض للأوعية من النوع (أ) ET_AR.

وقد تم إحداث التسمم الكلوي باستخدام دواء السيسبلاتين في جرعة واحدة (٦ مجم / كجم) في نكور الجرذان من فصيلة سبراج داوولي بالحقن في الغشاء البريتوني. تم إعطاء الألفاكالسيدول (٥٠ نانوجرام/كجم) وحمض الريتينويك ATRA (١مجم/كجم) عن طريق الفم لمدة ٥ أيام قبل جرعة السيسبلاتين و١٤ يوماً بعدها. أما ال ب ك-١٢٣ BQ-123 (١مجم/كجم) فقد أعطى بالحقن في الغشاء البريتوني كجرعتين، أحدهما قبل جرعة السيسبلاتين بساعة، والأخرى بعدها بيوم. وتم تقسيم الجرذان إلى مجموعتين رئيسيتين الأولى تم قتل الحيوانات بعد ٩٦ ساعة والثانية بعد ١٤ يوماً عقب إعطاء السيسبلاتين. في كلتا المجموعتين تم تخدير الجرذان بعد صيام ١٢ ساعة وجمع عينات الدم (من الوريد الفخذي) في أنابيب بدون هيبارين. وإجراء الطرد المركزي للعينات لإستخلاص مصل الدم لتحديد مستويات الكرياتينين والبولينا في الدم.

بعد جمع عينات الدم، تم قتل الجرذان واستخراج الكلى حيث تم حفظ الكلى اليمنى في محلول ملحي للفورمالدهايد (١٠٪) وتضمينها في كتل البارافين لفحص الأنسجة ودراسة التعبير البروتين المناعي لمستقبلات فيتامين د (VDR) و RXR المحفز ب ATRA و كل من ET_AR و ET_BR. أما الكلية اليسرى فقد تم وزنها وطحنها في محلول ملحي بارد لتحضير محلول متجانس من النسيج الكلوي واستخراج كل من البروتينات السيتوبلازمية/النوية من عينات الأنسجة وتقسيمها وتخزينها في -٧٠ درجة مئوية. استخدمت هذه الكلية في تحليل المؤشرات باستخدام تقنية الممتص المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) لتحديد المعاملات القياسية الكلوية المختلفة مثل TNF- α , TGF- β 1, pS536-NF- κ Bp65, caspase-3 activity. تحديد جميع المعاملات في المستخلصات السيتوبلازمية، باستثناء ال dephosphorylated β -catenin. و pS536-NF- κ Bp65 في المستخلصات النووية. وفي النهاية تم تجميد الحيوانات الميتة حتى حرقها بطريقة آمنة.

النتائج:

ارتبط التسمم الكلوي للسيسبلاتين بضعف وظائف الكلى الذي ظهر كزيادة ملحوظة في مستويات الكرياتينين والبولينا في الدم وزيادة المحتوى الكلوي لكل من TNF- α , TGF- β 1, pNF κ Bp65, ET-1, active dephosphorylated β -catenin and caspase-3 activity بالكلية. كما أظهر التعبير البروتين المناعي عن انخفاض VDR مع ارتفاع محتوى ET_AR فقط وعدم تأثير RXR- α /ET_BR. كما كشف الفحص النسيجي للكلية حدوث نخر مرضي أنبوبي حاد مع ارتفاع كبير في النتيجة الإجمالية للإصابة النسيجية الكلوية.

من هذه النتائج أثبتت الرسالة الآتي:

١. أن خفض مستوى مستقبل فيتامين (د) (VDR) يلعب دوراً في الأحداث المؤدية للإصابات الكلوية الهيكلية والكيموحيوية والوظيفية لعقار السيسبلاتين. وفي الوقت نفسه، قد تلعب إعادة تنظيم مستقبلات معامل البروتين المبطن للأوعية من النوع (ب) ET_BR دوراً هاماً في حماية الكلى.

٢. أن غلق مستقبل ET_AR والذي أدى الى خفض معدل التعبير البروتيني لمستقبل ET_AR، قد خفف أيضا من التلف الناجم عن السيمبلاتين في وظائف الكلى وخفض درجة الإصابة النسيجية المرضية واستعادة تعبير مستقبل فيتامين (د) وفيتامين (أ) كما يظهر عند استخدام (ب ك-١٢٣) BQ-123. كما قام هذا المركب بخفض المحتوى الكلوي للمؤشرات ET-1/pNF-κBp65/TNF-α/ TGF-β1.
 ٣. المعالجة الممبقة بحمض الريتينويك ATRA أو الألفاكالسيدول، ساهمت في تحسين وظيفة الكلى والإقلال من الإصابة النسيجية. ويرجع ذلك جزئياً إلى تثبيط حلقة ET-1/TNF-α/TGF-β1/pNF-κB و RXR واستعادة تعبير ET_AR و VDR.
 ٤. أن السيمبلاتين ينشط مسار ال Wnt/β-catenin. وأن قدرة كل مركب بمفرده أو في المجموعات المستخدمة، على إيقاف هذا المسار يضيف إلى تأثيرها الوقائي ضد السمية الكلوية للسيمبلاتين.
 ٥. أن الجمع بين الفيتامينات المستخدمة أو جمع أي منهما مع غالق مستقبل ET_AR قد أعطى نتائج تفوق تأثير أي منها على حدة سواء على مستوى المؤشرات البيوكيماوية أو التعبير النسيجي المناعي للمستقبلات المختلفة أو التقليل الملحوظ للضرر بالهيكل النسيجي الناتج عن دواء السيمبلاتين.
- ولذلك نستخلص من هذه الدراسة أهمية نظام ال ET-1 ومستقبلاته في سمية الكلى المحدثة بالسيمبلاتين وأن استخدام فيتامين د و أ معا أو أي منهما مع غالق مستقبل ET_AR يعطي تأثيرا فعالا في حماية/علاج الكلى ضد سمية السيمبلاتين. أما عن التفاعل بين المستقبلات المختلفة على المستوى النووي فيحتاج الى مزيد من الدراسة المستقبلية.