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

Effect of Empagliflozin on Neuropilin-1 Signaling Pathway in Experimental Liver Fibrosis.

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

In

Pharmacology

Presented by

Ashraf AlamEldin Noah

PharmD, Faculty of Pharmacy, Alexandria University, 2017

Clinical and Hospital Pharmacy Diploma, Faculty of Pharmacy, Alexandria University, 2013

B.Sc. in Pharm. Sci, Faculty of Pharmacy, Pharos University in Alexandria, 2011

2022

P.U.A. Library
Central Medical Library (B)
Faculty of :
Serial No : 828
Classification : 615,1

الملخص العربي

يعد التليف الكبدي (Liver fibrosis) مرضاً خطيراً ذو انتشار كبير وله انعكاسات ضارة على صحة الإنسان. يحدث التليف الكبدي نتيجة للتلف المزمن لأنسجة الكبد بفعل العديد من المسببات مثل التهاب الكبد الدهني الكحولي (ASH) ، مرض الكبد الدهني غير الكحولي (NAFLD) ، التهاب الكبد الوبائي (HBV / HCV) .

يؤدى التليف الكبدي الى تراكم كمية زائدة من البروتينات الضارة مثل الكولاجين من النوع الأول (Col 1A1) والثالث وترسب تلك البروتينات في خلايا الكبد وفى المسافة الفاصلة بين الخلايا الكبدية والتي تسمى (فضاء ديس Space of Disse). يؤدى تراكم تلك البروتينات إلى تغيير فيسيولوجي في التكوين الطبيعي للخلايا خاصة في الخلايا البطانية للكبد والخلايا النجمية الكبدية HSCs مما يحدث خلل في وصول الدم المحمل بالمواد الغذائية والطاقة الى أنسجة الكبد المختلفة فينتج عن هذا اضطراب وظيفي عام للكبد.

تعد الخلايا النجمية الكبدية هي المحرك الأساسي لعملية التليف؛ فعندما يتم تنشيط تلك الخلايا بفعل الضرر المتكرر على الكبد لفترة طويلة فإنها تتحول إلى خلايا ليفية عضلية نشطة تكتسب صفات غير طبيعية فتصبح قابلة للتكاثر بشكل سريع وتكتسب القدرة على الانقباض العضلي والقدرة على إفراز مادة الكولاجين بغزارة وكذلك تصبح قادرة على الانتقال من مكانها والهجرة إلى مواقع التضرر في الكبد لتحل محل النسيج الطبيعي الكبدي.

ويتم تحفيز وتنشيط الخلايا النجمية الكبدية عن طريق عوامل كيميائية حيوية عديدة أبرزها عامل النمو المشتق من الصفائح الدموية-بيتا (PDGF-β) وعامل النمو المتحول-بيتا (TGF-β) اللذان يعملان على تنشيط شامل لتلك الخلايا على الصعيد الخلوي والجيني. ويعد مسار نيوروبيلين-1 هو المحفز الرئيسي للعوامل التي تنشط الخلايا النجمية الكبدية السابق ذكرها كما أثبتت الدراسات الحديثة، ولهذا المسار أيضاً تأثيرات حيوية أخرى تساعد في احداث التليف الكبدي مثل دعم عامل نمو بطانة الأوعية الدموية (VEGF-A).

إذا لم تتم إزالة العامل المسبب لتلف الكبد بشكل صحيح وسريع، يستمر تليف الكبد حتى يتم تشويه بنية الكبد بشدة، ويؤدى ذلك إلى مراحل متأخرة من التليف تؤدى لتشمع الكبد (Cirrhosis) وسرطان الخلايا الكبدية (Hepatocellular carcinoma)، وبالتالي في النهاية يصل المريض إلى فشل الكبد والموت. كما يسبب التليف الكبدي المزمن العديد من المضاعفات مثل ارتفاع ضغط الدم في الوريد البابي الكبدي (PHT) والخلل الكبدي الوظيفي.

حتى الآن، لم يتم اعتماد أي أدوية أو عقاقير طبية لعلاج تليف الكبد بسبب نقص قدرة الأدوية على استهداف الخلايا المراد علاجها أو انخفاض تركيز الأدوية في أنسجة الكبد ولذلك يبقى إجراء زراعة الكبد هو الحل الوحيد الفعال لمرضى الكبد في مراحل المرض النهائية مع العلم أن هذا الإجراء مكلف للغاية.

تعد الأدوية المثبطة لناقلات الصوديوم والجلوكوز Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors من أهم أدوية علاج مرض السكرى والتي تمت الموافقة عليها مؤخرًا في عام 2013 من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية لخفض نسبة السكر في الدم لدى المرضى البالغين. طبقاً للأبحاث العلمية الحديثة، فإن هذه الفئة من الأدوية لديها قدرات علاجية عديدة تتخطى دورها الأساسي في علاج مرض السكرى، ولهذا فإن أغلب الأبحاث العلمية تحاول اكتشاف أدوار علاجية جديدة لهذه الفئة الدوائية في العديد من الأمراض.

عقار الإمباجليفلوزين هو علاج لداء السكرى ينتمي لفئة الأدوية المثبطة لناقلات الصوديوم والجلوكوز، يؤخذ عن طريق الفم ولديه قدرة عالية على انتقاء ومنع ناقلات الصوديوم والجلوكوز من النوع الثاني المسؤولة عن 90% من إعادة الامتصاص الكلوي للجلوكوز مما يعمل على زيادة إفراز الجلوكوز في البول فتنخفض مستوياته في بلازما الدم بشكل قوى. ويمتلك الإمباجليفلوزين نفس صفات الفئة الدوائية التابع لها؛ ولهذا تتم تجربته ودراسته معملياً وإكلينيكياً في علاج أمراض أخرى غير مرض السكرى، إلا أنه حتى الآن لم تتم تجربته كعلاج تليف الكبد.

تصميم التجربة:

في هذه التجربة تم استخدام 40 من الجرذان الذكور من نوع سبراغ داولي يبلغ وزن الواحد منها 200 ± 20 جم. تم الحصول على الجرذان من بيت الحيوان التابع لكلية الصيدلة بجامعة فاروس في محافظة الإسكندرية وتم إجراء جميع الاختبارات على الجرذان ورعايتها وفقًا لـ "دليل المجلس القومي للبحوث لرعاية واستخدام حيوانات المختبر" ولجنة اعتماد أخلاقيات البحث العلمي بجامعة فاروس بالإسكندرية.

تم إبقاء جميع الجرذان تحت المراقبة لمدة أسبوع قبل إجراء التجربة مع السماح لها بشرب الماء واتباع نظام غذائي موحد حتى تتأقلم الجرذان على الأقفاص والبيئة المحيطة. بعد سبعة أيام من التأقلم، تم إحداث تليف الكبد في 32 من الجرذان عن طريق حقنهم في التجويف البريتوني مرتين أسبوعياً بمادة الكربون رباعي الكلوريد (المخفف في زيت الزيتون بنسبة 1: 1) بجرعة 1.5 مل / كجم لمدة ستة أسابيع.

تم تقسيم الجرذان لخمس مجموعات كل منها تشتمل على ثمانية جرذان:

- مجموعة ضابطة لا تعاني من التليف ولم تتلق أي مركبات كيميائية أو أدوية.
- مجموعة مصابة بالتليف الكبدي نتيجة لحقنها بالكربون رباعي الكلوريد لمدة ستة أسابيع تم تقسيمها الى أربع مجموعات فرعية:
  - مجموعة تم حقنها بالكربون رباعي الكلوريد ولم تتلق أي علاج.
  - ثلاث مجموعات يتم معالجتها بجرعات يومية مختلفة من عقار الإمباجليفلوزين وذلك بعد إصابتها بالتليف الكبدي نتيجة لحقنها بالكربون رباعي الكلوريد.

بعد حدوث التليف الكبدي بنجاح؛ تم إعطاء جرعة يومية محددة عن طريق الفم من عقار الإمباجليفلوزين بثلاث تركيزات مختلفة لكل مجموعة من مجموعات العلاج وهي 20 مجم / كجم و40 مجم / كجم و60 مجم / كجم يومياً لمدة ثلاثة أسابيع متتالية. في نهاية فترة الدراسة البالغة عشرة أسابيع، تم تخدير جميع الجرذان بإستخدام ثايوبنتال بتركيز 50مج/كجم وتم الحصول على عينات الدم وفصلها الى "بلازما" و"سيرم" بالطرد المركزي عند 4 درجات مئوية وتخزينها عند -80 درجة مئوية لحين تحليلها كيميائياً.

بعد ذلك، تم استئصال الكبد بسرعة بعد قتل الجرذان عن طريق حقنهم بجرعة زائدة من ثايوبنتال (100مج/كجم) وفصل الفقرات العنقية. تم تقسيم الكبد المستأصل من كل جرذ الى قسمين:

- القسم الأول تم غسله بمحلول ملحي بارد ثم تجميده سريعاً بالنيتروجين السائل ثم تخزينه عند درجة حرارة -80 لحين إجراء الفحوصات اللازمة بتقنية الELISA والPCR والwestern blot.
- القسم الثاني تم تثبيته في محلول الفورمالين الملحي بنسبة 10٪ عند 25 درجة مئوية لتحضيره للفحص التشريحي للأنسجة الكبدية حيث تم تثبيته على شرائح زجاجية ثم ترطيبه وصبغه باستخدام صبغة ماسون ثلاثية الألوان للكشف عن ترسب الكولاجين وتحديد درجة التليف باستخدام المجهر الضوئي.

لكل مجموعة من الجرذان، تم قياس المعايير الحيوية الدالة على تأثير عقار الإمباجليفلوزين على مسار نيوروبيلين-1 (NRP-1) وكذلك المعايير الدالة على حدوث تليف الكبد و وظائف الكبد و ارتفاع ضغط الوريد البابي الكبدي و وظائف الكلى و مستوى السكر في الدم و كذلك تم التحليل الهيستولوجي الدال على ترسب الكولاجين في أنسجة الكبد المأخوذة من الجرذان بعد صبغها بصبغة الماسون ثلاثي الألوان، وتم قياس درجة التليف الكبدي طبقاً لمقياس إسحاق للتليف الكبدي ذو السبع درجات حيث يشير الصفر الى عدم حدوث تليف و يشير الرقم ستة الى حدوث تليف و تشمع و ضرر بالغ للكبد.

نتائج التجربة:

1- المعايير الدالة على تأثير عقار الإمباجليفلوزين على مسار نيوروبيلين-1:

تم قياس مستوى NRP-1 عن طريق الPCR وقد أظهر التحليل أنه بمقارنة المجموعة الضابطة بالمجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد وجدت زيادة ذات دلالة إحصائية في النيوروبيلين-1، وبمقارنة المجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد ومجموعات العلاج بعقار الإمباجليفلوزين وجد انخفاض ذو دلالة إحصائية في تلك المعايير بعد معالجة الجرذان بعقار الإمباجليفلوزين بتركيز 40 مجم / كجم و60 مجم / كجم، بينما لم يكن هناك فرق ذو دلالة إحصائية بعد العلاج بمجموعة 20 مجم / كجم.

ولتأكيد هذه النتائج تم قياس بروتين جالاكتين-1 بواسطة western blot. هذا البروتين يرتبط بالنيوروبيلين-1 حتى يستطيع الأخير القيام بالعمليات الحيوية الخاصة به. تمت مضاهاة الجلاكتين-1 ببروتين طبيعي لا يتأثر بالتليف الكبدي يسمى بيتا-أكتين وبقسمة مستوى الجلاكتين-1 على مستوى البيتا-أكتين في كل مجموعة تم الحصول على النسبة الحسابية بينهم، هذه النسبة تعبر عن وجود الجلاكتين-1 في الأنسجة الكبدية ومن ثم أمكن تحليل النتائج إحصائياً وقد جاءت مطابقة لنتائج فحص الPCR الخاص بالنيوروبيلين-1 المذكورة أعلاه.

2- المعايير الدالة على التليف الكبدي:

بمقارنة المجموعة الضابطة بالمجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد وجدت زيادة ذات دلالة إحصائية في المعايير الحيوية الدالة على حدوث التليف الكبدي وهي (TGF-β – PDGFR-β – VEGF-A – Col 1A1). وبمقارنة المجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد ومجموعات العلاج بعقار الإمباجليفلوزين وجد انخفاض ذو دلالة إحصائية في تلك المعايير بعد معالجة الجرذان بعقار الإمباجليفلوزين بتركيز 40 مجم / كجم و60 مجم / كجم، بينما لم يكن هناك فرق ذو دلالة إحصائية بعد العلاج بمجموعة 20 مجم / كجم.

3- المعايير الدالة على وظائف الكبد:

بمقارنة المجموعة الضابطة بالمجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد وجدت زيادة ذات دلالة إحصائية في المعايير الحيوية الدالة على وظائف الكبد الموجودة في سيرم الدم وهي (ALT – AST). وبمقارنة المجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد ومجموعات العلاج بعقار الإمباجليفلوزين وجد انخفاض ذو دلالة إحصائية في تلك المعايير بعد معالجة الجرذان بعقار الإمباجليفلوزين بجميع تركيزاته.

4- المعايير الدالة على ارتفاع ضغط الوريد البابي الكبدي:

بالنسبة لمعيار eNOS وبمقارنة المجموعة الضابطة بالمجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد وجد انخفاض ذو دلالة إحصائية في هذا المعيار. وبمقارنة المجموعة المصابة بالتليف الكبدى بالكربون رباعي الكلوريد ومجموعات العلاج بعقار الإمباجليفلوزين وجدت زيادة ذات دلالة إحصائية في هذا المعيار بعد معالجة الجرذان بعقار الإمباجليفلوزين بتركيز 60 مجم / كجم، بينما لم يكن هناك فرق ذو دلالة إحصائية بعد المعالجة بتركيزي 40 مجم / كجم و20 مجم / كجم.

بالنسبة لمعيار ET-1 وبمقارنة المجموعة الضابطة بالمجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد وجد ارتفاع ذو دلالة إحصائية في هذا المعيار. وبمقارنة المجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد ومجموعات العلاج بعقار الإمباجليفلوزين وجد انخفاض ذو دلالة إحصائية في هذا المعيار بعد معالجة الجرذان بعقار الإمباجليفلوزين بتركيز 60 مجم / كجم، بينما لم يكن هناك فرق ذو دلالة إحصائية بعد المعالجة بتركيزي 40 مجم / كجم و20 مجم / كجم.

5- المعايير الدالة على وظائف الكلى:

بمقارنة المجموعة الضابطة بالمجموعة المصابة بالتليف الكبدى بالكربون رباعي الكلوريد وجدت زيادة ذات دلالة إحصائية في المعايير الحيوية الدالة على وظائف الكبد وهي (BUN - Creatinine). وبمقارنة المجموعة الضابطة بمجموعات العلاج بعقار الإمباجليفلوزين لم يوجد فرق ذو دلالة إحصائية بعد معالجة الجرذان بعقار الإمباجليفلوزين بجميع تركيزاته.

6- معيار السكر الصائم في الدم:

بمقارنة المجموعة الضابطة بالمجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد وجد انخفاض ذو دلالة إحصائية في معيار السكر الصائم (FBG) في الدم. وبمقارنة المجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد ومجموعات العلاج بعقار الإمباجليفلوزين وجد أنخفاض ذو دلالة إحصائية في هذا المعيار بعد معالجة الجرذان بعقار الإمباجليفلوزين بتركيز 40 مجم / كجم و60 مجم / كجم، بينما لم يكن هناك فرق ذو دلالة إحصائية بعد العلاج بمجموعة 20 مجم / كجم.

7- الفحص الهيستولوجى وتعيين درجة التليف الكبدي:

أولاً: الفحص المجهري وتقييم درجة التليف:

تم تحديد درجة التليف الكبدي وفقًا لنظام تقييم إسحاق بعد صبغ عينات الكبد من جميع المجموعات باستخدام صبغة ماسون ثلاثي ألوان لبيان ترسب الكولاجين ولتقييم التغيرات في الأنسجة وتلف الخلايا الكبدية ورؤيتها بالمجهر الضوئي وتصويرها رقمياً بواسطة كاميرا مثبتة على المجهر الضوئي. أظهر الفحص أن لدى جميع الجرذان من المجموعة الضابطة أنسجة ليفية دقيقة تقتصر على مناطق محدودة وبعض الأوردة المركزية؛ ومن ثم سجلت هذه المجموعة صفرًا على مقياس إسحاق.

كشفت غالبية المقاطع التي تم الحصول عليها من المجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد عن وجود العديد من الجسور الليفية بين مجموعات الأوردة والتي تشكلت بواسطة تكدس حواجز ليفية ممتدة بين تلك المجموعات الوريدية، كما لوحظ ترسب ليفي كثيف في المساحات الفاصلة بين الخلايا الكبدية، ولذلك سجلت تلك المجموعة درجة 3 و4 على مقياس إسحاق. بينما أظهرت الأنسجة التي تم فحصها من مجموعة علاج إمباجليفلوزين 20 مجم / كجم حواجز ليفية خارجية تحيط بالمجموعات الوريدية بالإضافة إلى ترسب ليفي في المساحات المحيطة بالخلايا الكبدية، ولذلك سجلت درجة 3 على مقياس إسحاق.

أظهرت المقاطع التي تم الحصول عليها من مجموعة العلاج الإمباجليفلوزين بتركيز 40 مجم / كجم عدم وجود حواجز ليفية ممتدة أو جسور ليفية بين المجموعات الوريدية، ولكن تم اكتشاف آثار ترسب ليفي في بعض المساحات البينية ولذلك سجلت تلك المجموعة درجة 2 على مقياس إسحاق. وقد أظهرت المقاطع التي تم الحصول عليها من مجموعة العلاج بالإمباجليفلوزين بتركيز 60 مجم / كجم وجود توسعات ليفية محدودة فقط لعدد قليل من الممرات البابية مع حواجز ليفية قصيرة تشبه السنبلة مع أنسجة ليفية محدودة حول بعض مناطق الأوعية الدموية ولذلك سجلت تلك المجموعة درجة 1 على مقياس إسحاق.

ثانياً: الفحص الرقمي للون الطيفي لمادة الكولاجين:

بعد انتهاء عملية التصوير لمقاطع أنسجة الكبد من كل المجموعات تمت معالجتها رقميا لتحديد نسبة اللون الأزرق الدال على ترسب الكولاجين (بفعل صبغة الماسون ثلاثي الألوان) في كل مجموعة ومن ثم تم احتسابها رقمياً. بمقارنة المجموعة الضابطة بالمجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد وجدت زيادة ذات دلالة إحصائية في النسبة اللونية لمادة الكولاجين بعد صبغها بالماسون ثلاثي الألوان. وبمقارنة المجموعة المصابة بالتليف الكبدي بالكربون رباعي الكلوريد ومجموعات العلاج بعقار الإمباجليفلوزين وجد انخفاض ذو دلالة إحصائية في النسبة اللونية لمادة الكولاجين بعد معالجة الجرذان بعقار الإمباجليفلوزين بتركيز 40 مجم / كجم و60 مجم / كجم، بينما لم يكن هناك فرق ذو دلالة إحصائية بعد العلاج بمجموعة 20 مجم / كجم.

مناقشة نتائج التجربة:

أثبتت النتائج السابقة فعالية عقار الإمباجليفلوزين (تركيزي ال 40 و60مجم) في علاج التليف الكبدي وتحسين وظائف الكبد وخفض المعايير الدالة على إرتفاع ضغط الوريد البابي الكبدي وأيضاً تم اثبات مأمونية تلك التركيزات حيث إنها لا تؤثر على وظائف الكلى وتحافظ على مستوى منضبط لسكر الدم.

من نتائج التحاليل السابقة وجد أن الكاربون رباعي الكلوريد أثر سلبياً على كافة المعايير التي تم اختبارها في هذه التجربة، كما وجد أن الجرعة اليومية لعقار الإمباجليفلوزين بتركيز ال 20 مجم/كجم لم يكن لها تأثير ذو دلالة إحصائية على أي من المعايير الحيوية المختبرة، بينما أدت الجرعة اليومية من عقار الإمباجليفلوزين بتركيزي ال 40 و 60 مجم/كجم الى تقليل فعالية مسار نيوروبيلين-1 و كذلك الى تخفيض المعايير الحيوية الدالة على التليف الكبدي وأعادت المعايير الدالة على وظائف الكبد الى المستوى الطبيعي، كما أكدت نتائج الفحص الهيستولوجي تلك النتائج.

نجحت الجرعة اليومية من عقار الإمباجليفلوزين بتركيز 60 مجم/كجم في التأثير بشكل إيجابي على المعايير الدالة على ارتفاع ضغط الوريد البابي الكبدي حيث رفعت تلك الجرعة مستوى الeNOS وأحدثت انخفاضا في مستوى الET-1 بشكل ذو دلالة إحصائية. جميع تركيزات عقار الإمباجليفلوزين لم يكن لها تأثير ذو دلالة إحصائية على معايير وظائف الكلى ومستوى السكر الصائم في الدم.

الاستنتاج:

أثبتت هذه التجربة فعالية عقار الإمباجليفلوزين (تركيزي ال 40 و60مجم) في علاج التليف الكبدي عن طريق التأثير على مسار نيوروبيلين-1، وكذلك تحسين وظائف الكبد وخفض المعايير الدالة على ارتفاع ضغط الوريد البابي الكبدي وأيضاً تم اثبات مأمونية تلك التركيزات حيث إنها لا تؤثر على وظائف الكلى وتحافظ على مستوى منضبط من السكر في الدم.