

التأثير الوقائي الكلوي لناهض البيبتيد مثيل
الجلوكاجون-١ ومضاد الصفائح الدموية في مرض
الكلى السكري المحدث تجريبيا في ذكور الفئران
البيضاء

رسالة

للحصول على درجة الدكتوراه في الفيسيولوجيا الطبية

من

الطبيبة / عزة محمد زكي
مدرس مساعد بقسم الفيسيولوجيا الطبية- كلية الطب
(جامعة الفيوم)

تحت إشراف

د/اماني محمد الامين
أستاذ مساعد الفيسيولوجيا الطبية
كلية طب - جامعة الفيوم

أ.د/حامد محمد عثمان
أستاذ الفيسيولوجيا الطبية
كلية الطب - جامعة الأزهر

أ.د/ الفت جميل شاكر
أستاذ الكيمياء الحيوية الطبيه و البيولوجيا الجزيئيه
كلية الطب - جامعة القاهرة

كلية طب
جامعة الفيوم
٢٠٢١

الملخص العربي

في هذه الدراسة ، لاحظنا أن الارتفاع المزمن غير المنضبط للسكر في الدم بعد تناول استربتوزيتوسن STZ أدى إلى تطور مرض الكلية السكري (DN). لقد وجدنا أن مرض الكلية السكري قد تحسن بواسطة كل من الميتفورمين (٧٠ مجم / كجم / يوم) أو دولاجلوتايد (١.٥ مجم / كجم من وزن الجسم / الأسبوع) ومع دمجهم مع كليوستازول (٥ مجم / كجم من وزن الجسم / يوم). تم توضيح التأثير الوقائي لهذه الأدوية من خلال تقييم عوامل مختلفة مثل معايير وظائف الكلى وعلامات الإجهاد الكيميائي الحيوي ، والتشريح المرضي ، والالتهابات ، والأكسدة. علاوة على ذلك ، تم تحديد تعبير الجيني ل eNOS و NFkB لتحديد المسار الميكانيكي المسؤول عن حماية الكلية.

بالرغم من التقدم الملحوظ في الطرق العلاجية لأمراض الكلى المزمنة مثل الأدوية وغسيل الكلى وزراعة الكلى إلا أن هناك تزايد وانتشار لمرض الكلى المزمن (CKD) بشكل تدريجي و قد يصل إلى نسب وبائية. ومع وجود مخاطر عالية للتفاقم الحاد والمضاعفات القاتلة التي تؤدي إلى ارتفاع معدلات المرض والوفيات - خاصة في المرضى ذوي الحالات الحرجة ، يمكن أن يؤخر التدخل المبكر بشكل كبير ف المرض و يعيق التحسن بشكل ملحوظ.

مرض الكلية السكري (DN) هو أحد أخطر مضاعفات الأوعية الدموية الدقيقة لمرض السكري من النوع الثاني ، وهو أحد الأسباب الرئيسية للفشل الكلوي النهائي والوفاة لدى مرضى السكري. كما إنه أحد أكثر أسباب أمراض الكلى المزمنة شيوعاً في جميع أنحاء العالم ، ويرجع ذلك إلى أنه بمجرد حدوث نزول البروتين ف البول ؛ معدل انخفاض وظائف الكلى في اعتلال الكلية السكري أعلى بكثير من معدل الانخفاض في أمراض الكلى الأخرى مما يؤدي إلى تلف سريع للكلى و بتغيرات في انسجة الكلى وكذلك التأثير السريع في الوظائف الكلوية. بالنظر إلى هذه الحقيقة ، جنباً إلى جنب مع الحساسية الضعيفة للمؤشرات الحيوية الوظيفية الكلوية ، ولا سيما اليوريا والكرياتينين في الدم. لذلك ، هناك حاجة ماسة إلى مؤشرات جديدة للتشخيص المبكر وتصنيف مخاطر مرض الكلية السكري.

الميتفورمين هو خط العلاج الأول الأكثر قبولاً على نطاق واسع لخفض مستويات الجلوكوز في الدم لدى مرضى السكري من النوع الثاني. إلى جانب أفعاله المضادة لمرض السكري ، كشفت الدراسات الحديثة عن تأثيرات إضافية لحماية الميتفورمين للكلى في المعامل وفي الجسم. حيث يقوم الميتفورمين بتقليل موت الخلايا المبرمج في ظروف الكلى التجريبية المختلفة. علاوة على ذلك ، فقد تبين أنه يقلل من البول الزلالي في الفئران المصابة بداء السكري وكذلك في المرضى الذين يعانون من داء السكري من النوع الثاني. تم إثبات أن هذه التأثيرات تتم بواسطة محور إشارات AMPK / mTOR. كما تشير هذه البيانات إلى التأثيرات المفيدة والواقعية للميتفورمين في مرض الكلية السكري.

تعد الفوائد الكلوية لدواء الـدولاجلوتايد ، مثل انخفاض معدل الترشيح الكبيبي (GFR) وانخفاض الألبومين ف البول ، أكثر وضوحًا في مرضي الكلي السكري الذين كانوا يعانون من نزول كميات كبيرة من البروتين ف البول. ل دواء دولاجلوتايد ، آثار مفيدة مثل فقدان الوزن وانخفاض معدلات نقص السكر في الدم كما أن ناهضات GLP1 تحمي الكلى عن طريق تقليل الإجهاد التأكسدي والالتهاب. و ايضا دولاجلوتايد له تأثير وقائي كلوي مستقل عن تنظيمه لسكر الدم وضغط الدم في المرضى الذين يعانون من امراض الكلي المزمنة المتقدمة ، عن طريق تأثيره علي الأوعية الدموية الكلوية ، أو التأثير المضاد للالتهابات أو انخفاض في تصلب الشرايين الكبيبي ، أو عن طريق التأثيرات الأخرى غير المكتشفة لمنبهات مستقبلات GLP1 ، و التي لم يتم توضيحها بعد.

يؤدي العلاج ب دواء سيلوستازول في الفئران المصابة بداء السكري إلى إحداث تأثيرات عن طريق تقليل الإجهاد التأكسدي. ينظم أيضًا التعبير عن NF-B و TGF- β ، اللذين يساهمان في تطور أمراض الكلى وبالتالي يحسن اعراض مرض الكلي السكري ، كما يؤخر سيلوستازول تقدم المرض ، ويعيد الشكل الفسيولوجي للميتوكوندريا وتغييرات رقم نسخة الحمض النووي ، ويؤخر موت الخلايا المبرمج. في خلايا ميسانجيل ، يحسن سيلوستازول الإجهاد التأكسدي ، ويمنع موت الخلايا المبرمج ، ويقلل السيتوكينات المرتبطة بـ DN. يدعم هذا الدليل إمكانية استخدامه علاج مساعد ف مرض الكلي السكري .

أجريت هذه الدراسة على ٦ مجموعات رئيسية (كل منها تحتوي على ١٠ فئران) من ذكور الفئران البيضاء. أولهم هي المجموعة الضابطة الطبيعية و التي لم تتلق أي أدوية. جميع المجموعات الأخرى كانت مصابة بداء السكري من النوع الثاني. المجموعة الثانية كانت الفئران المصابة بداء السكري ولم تتلق أي علاج. تلقت المجموعة الثالثة من مرضى السكر الميتفورمين بجرعة (٧٠ مجم / كجم / يوم) ، وتم إعطاؤه يوميًا لمدة ٨ أسابيع. تلقت المجموعة الرابعة المصابة بداء السكري دولاجلوتايد بجرعة (١.٥ مجم / كجم من وزن الجسم / أسبوع) ، وتم إعطاؤه لمدة ٨ أسابيع. المجموعة الخامسة المصابة بداء السكري تلقت كلا من الميتفورمين بجرعة (٧٠ مجم / كجم / يوم) وكليوستازول بجرعة (٥ مجم / كجم من وزن الجسم / يوم) عن طريق الفم. كلاهما اعطيت لمدة ٨ أسابيع. تلقت المجموعة السادسة من مرضى السكر كل من دولاجلوتايد بجرعة (١.٥ مجم / كجم من وزن الجسم / أسبوع) وكليوستازول بجرعة (٥ مجم / كجم من وزن الجسم / يوم) عن طريق الفم. كلاهما اعطيت لمدة ٨ أسابيع.

و تم قياس المؤشرات التالية لتقييم مرض الكلية السكري ونتائج العلاج بالميتفورمين ودولاجلوتايد وكليوستازول هي الجلوكوز والأنسولين و الهيموجلوبين السكري HbA1c التراكمي في الدم ، وتم تقييم وظائف الكلى بواسطة اليوريا والكرياتينين والألبومين في الدم.

- كولسترول عالي الكثافة - كولسترول منخفض الكثافة و الدهون الثلاثية.

تم أيضًا قياس $TGF\beta$ و كولاجين الرابع collagen IV و FOXO1 و FN و PKB و نيتريك اوكسيد NO و SOD و جلوتاثايون GSH في مصل دم الفئران بواسطة ELISA.

كما تم قياس التعبير الجيني لـ eNOS و NFkB بواسطة PCR في الوقت الحقيقي الكمي في أنسجة الكلى.

٣- فحص هستولوجي ل خلايا و أنسجة الكلى.

يمكن تلخيص النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الدراسة على النحو التالي:

• أدى تحفيز داء السكري من النوع الثاني في الفئران إلى ارتفاع السكر في الدم ومقاومة الأنسولين والتي أدت الي زيادة في مستويات الجلوكوز والأنسولين و HbA1c الهيموجلوبين السكري التراكمي في الدم ، كما ادي الي زيادة نسبة الكرياتينين في الدم واليوريا وألبومين و ارتفاع في مستوى الكوليسترول المنخفض الكثافة والدهون الثلاثية.

كما ادي الي زيادة ملحوظة في مستويات الدم من $TGF\beta$ ، الكولاجين الرابع ، FOXO1 ، FN ، SOD وانخفاض كبير في مستويات الدم من HDL-كولسترول عالي الكثافة ، نيتريك اوكسيد NO، GSH جلوتاثايون و بروتين كينيز بي PKB. أظهر فحص eNOS انخفاضًا بينما أظهر جين NFkB زيادة في أنسجة الكلى التي تم فحصها.

• عند دراسة التأثيرات الوقائية للكلى للميتفورمين بجرعة (٧٠ مجم / كجم) كان هناك انخفاض معنوي في مستويات مصل الدم من الجلوكوز والأنسولين و الهيموجلوبين السكري التراكمي HbA1c واليوريا والكرياتينين والألبومين. انخفاض كبير في مستويات مصل الدم من $TGF\beta$ ، الكولاجين الرابع ، FOXO1 ، FN ، SOD ، LDL- الكوليسترول منخفض الكثافة والدهون الثلاثية.

و ادي الي زيادة ملحوظة في مستويات مصل الدم من كولسترول عالي الكثافة ، و نيتريك اوكسيد ، جلوتاثايون و بروتين كينيز بي PKB. كما أظهر فحص eNOS زيادة ملحوظة بينما أظهر جين NFkB انخفاضًا ملحوظًا في أنسجة الكلى التي تم فحصها.

• عند دراسة التأثيرات الوقائية للكلى لدولاجلوتيد بجرعة (١.٥ ملجم / كجم من وزن الجسم / أسبوع) كان هناك انخفاض ملحوظ في مستويات الجلوكوز والأنسولين و HbA1c الهيموجلوبين السكري التراكمي واليوريا والكرياتينين والألبومين في الدم. انخفاض كبير في مستويات مصل الدم من $TGF\beta$ ، الكولاجين الرابع ، FOXO1 ، FN ، SOD ، LDL- الكوليسترول المنخفض الكثافة والدهون الثلاثية.

بينما كانت هناك زيادة ملحوظة في مستويات مصل الدم من - كولسترول العالي الكثافة ، نيتريك اوكسيد NO، GSH الجلوتاثايون و PKB بروتين كينيز بي. كما أظهر فحص eNOS زيادة ملحوظة بينما أظهر جين NFkB انخفاضًا ملحوظًا في الأنسجة التي تم فحصها.

• عند دراسة التأثيرات الوقائية للكلية لكل من ميتفورمين وكليوستازول بجرعة (٥ مجم / كجم) كان هناك انخفاض في مستويات الجلوكوز والأنسولين و HbA1c الهيموجلوبين السكري التراكمي واليوريا والكرياتينين والألبومين في الدم. انخفاض كبير في مستويات الدم من $TGF\beta$ ، الكولاجين الرابع ، FOXO1 ، FN ، SOD ، الكوليسترول المنخفض الكثافة والدهون الثلاثية.

بينما كانت هناك زيادة ملحوظة في مستويات مصلى الدم من كولسترول عالي الكثافة ، نيتريك اوكسيد، الجلوتاثايون و بروتين كينيز بي PKB. كما أظهر فحص eNOS زيادة ملحوظة بينما أظهر جين NFkB انخفاضاً ملحوظاً في الأنسجة التي تم فحصها.

• عند دراسة التأثير الوقائي لكل من دولاجلوتايد و كليوستازو بجرعة (٥ mg / kg) ، كان هناك انخفاض ملحوظاً في مستويات مصلى الدم من الجلوكوز والأنسولين و الهيموجلوبين السكري التراكمي HbA1c واليوريا والكرياتينين والألبومين. انخفاض كبير في مستويات مصلى الدم من $TGF\beta$ ، الكولاجين الرابع ، FOXO1 ، FN ، SOD ، LDL- الكوليسترول منخفض الكثافة والدهون الثلاثية.

بينما كانت هناك زيادة ملحوظة في مستويات مصلى الدم من HDL- كولسترول عالي الكثافة ، نيتريك اوكسيد NO ، جلوتاثايون GSH و بروتين كينيز بي PKB. كما أظهر فحص eNOS زيادة ملحوظة بينما أظهر جين NFkB انخفاضاً ملحوظاً في الأنسجة التي تم فحصها.

• من خلال مقارنة المجموعات المعالجة معاً ، أظهرت مجموعة دولاجلوتايد انخفاضاً ملحوظاً في مستويات مصلى الدم الأنسولين ، HbA1c الهيموجلوبين السكري التراكمي، الكرياتينين ، الألبومين ، $TGF\beta$ ، الكولاجين IV ، SOD و FOXO1 وكذلك أظهر جين NFkB انخفاضاً ملحوظاً مقارنة بالمجموعة المعالجة بالميتفورمين. بينما كانت هناك زيادة كبيرة في مستويات مصلى الدم NO نيتريك اوكسيد و HDL- كولسترول عالي الكثافة. مع وجود أقرب المستويات إلى مجموعة التحكم العادية في معظم المؤشرات ، لذلك يمكننا اعتبارها أفضل مجموعة في دراستنا.

• من خلال مقارنة المجموعات المعالجة مجتمعة معاً ، أظهرت كل من مجموعة الميتفورمين وكليوستازول انخفاضاً ملحوظاً في مستويات الكوليسترول الضار LDL و SOD في الدم مقارنة بالميتفورمين وحده. بينما كانت هناك زيادة في مستويات جلوتاثايون GSH في الدم ، أظهر جين NFkB انخفاضاً ملحوظاً مقارنة بالميتفورمين.

• من خلال مقارنة المجموعات المعالجة مجتمعة معاً ، أظهرت كل من مجموعة دولاجلوتايد و كليوستازول انخفاضاً ملحوظاً في مستويات مصلى الدم من الجلوكوز ، الألبومين ، LDL- الكوليسترول منخفض الكثافة ، TGS ، الكولاجين الرابع ، SOD مقارنة بمجموعة دولاجلوتايد وحدها. بينما كانت هناك زيادة كبيرة في مستويات NO نيتريك اوكسيد في مصلى الدم، مع وجود أقرب مستويات لمجموعة التحكم العادية في معظم المؤشرات ، لذلك يمكننا اعتبارها ثاني أفضل مجموعة في دراستنا.

• فحص الأنسجة من DN ، هناك توسع في الميزانجيوم وسماكة في الغشاء القاعدي للكبيبات. تظهر الأنابيب الكلوية تضخمًا في البداية في المراحل المبكرة ، ولكن في نهاية المطاف يتجمع التليف الخلالي مع ضمور أنبوبي ، جنبًا إلى جنب مع التهاب الشرايين الشرياني جنبًا إلى جنب مع الارتشاح مع البلاعم والخلايا اللمفاوية الثانية في المراحل المتأخرة. على مستوى البنية التحتية ، هناك فقدان للخلية البودوسية وكذلك انخفاض في نمو الخلايا البطانية. علاوة على ذلك ، فإن التغيير الهيكلي مصحوب أيضًا بفقدان وظيفي ، أظهر العلاج بالميتفورمين أو دولاجلوتيد تحسنًا ، لكن هذه التغييرات تحتاج إلى وقت أطول من ٨ أسابيع للعودة إلى وضعها الطبيعي مرة أخرى.

من النتائج المذكورة سابقًا نستنتج أن السبب في أمراض الكلى السكري يتم جزئيًا من خلال ارتفاع السكر في الدم والالتهاب والإجهاد التأكسدي والتليف وموت الخلايا المبرمج وأن الميتفورمين أو دولاجلوتيد جنبًا إلى جنب مع كليوستازول لهما تأثير أكثر حماية للكلى.

توصيات:

• مزيد من الدراسات حول التأثيرات الوقائية للكلى لدولاجلوتيد على مرض السكري لدى البشر يمكن أن يكون لها تطبيقات سريرية أم لا. نوضح فقط تأثير دولاجلوتيد وحده و مع كليوستازول على مستوى التعبير الجيني في أنسجة الكلى.

• مزيد من الدراسات حول كليوستازول إذا كان يمكن أن يكون لها تأثير وقائي محتمل في حالات مرض الكلى السكري.