

دراسة الآليات الجزيئية والسلوكية لتراكيب علاجية جديدة في مرض التصلب المتعدد

إعداد

خلود مرزوق سحلي العتيبي

إشراف

ا.د ألفت الشيخ

ا.د مريم الغامدي

د. غلام محمد أشرف

المستخلص العربي

مرض التصلب اللويحي المتعدد هو مرض مناعي ذاتي مزمن يصيب الجهاز العصبي المركزي ويسبب إزالة الميالين من الأعصاب، مما ينتج عنه مجموعة واسعة من المضاعفات السريرية التي تؤثر سلباً على جودة حياة المريض. يعد تحفيز الميالين أمراً بالغ الأهمية لعلاج مرض التصلب اللويحي المتعدد لتخفيف الأعراض وحماية غمد الميالين من المزيد من الضرر. بالتالي هدفت هذه الدراسة إلى التحقيق في الآثار العلاجية المحتملة للجمع بين فيتامين د³ و السيبيونيمود في تعزيز إعادة الميالين وتحسين التغيرات السلوكية والمورفولوجية وتعديل الأنماط الظاهرية للخلايا الدبقية الصغيرة في نموذج الكوبريزون الحيواني لمرض التصلب المتعدد. تم تقسيم الدراسة إلى مرحلتين: مرحلة إزالة الميالين (الأسابيع الخمسة الأولى) ومرحلة إعادة الميالين (الأسابيع الأربعة الأخيرة). في الأسابيع الخمسة الأولى تم تقسيم خمسة وثمانين فأراً سويسرياً من ذكور الألبينو بشكل عشوائي إلى مجموعتين: مجموعة التحكم (م= 20: الطعام العادي) ومجموعة الكوبريزون (م= 60: 30٪ من الكوبريزون ممزوجاً بالطعام لمدة ستة أسابيع، متبوعاً بثلاث أسابيع من الطعام العادي). في الأسبوع الخامس، تم إعادة تقسيم مجموعة الكوبريزون إلى أربع مجموعات (م= 14): مجموعة الكوبريزون غير المعالجة (0.2 مل من الكاربوكسي ميثيل سيليلوز عن طريق الفم)، مجموعة الكوبريزون المعالجة بفيتامين د³ (800 وحدة دولية/كجم عن طريق الفم)، مجموعة الكوبريزون المعالجة بالسيبيونيمود (1.5 مجم/كجم عن طريق الفم)، مجموعة الكوبريزون المعالجة بفيتامين د³ والسيبيونيمود معا (800 وحدة دولية/كجم من فيتامين د³ و 1.5 مجم/كجم من السيبيونيمود عن طريق الفم). تداخل التعرض للكوبريزون والعلاج لمدة أسبوع واحد للتأكد من أن إعادة الميالين ناتجة عن العلاجات وليس بسبب الإنسحاب التلقائي للكوبريزون. تم إجراء العديد من الاختبارات السلوكية لتقييم الأداء الحركي، القلق، والذاكرة. تشمل اختبار المجال المفتوح، اختبار مقياس قوة القبضة، اختبار الروتارود، اختبار المتاهة المرتفعة، اختبار متاهة Y، ومهمة التعرف على الأشياء الجديدة. بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم درجة إزالة وإعادة الميالين في الجسم النفثي بصبغة Luxol fast blue، كما تم فحص التغيرات النسيجية في قشرة الفص الجبهي والحصين بصبغة الهيماتوكسيلين والإيوسين. تم التنبؤ من صحة عمل فيتامين د³ والسيبيونيمود على تثبيط iNOS بالالتحام الجزيئي. ومن ثم تم قياس مستوى التعبير عن الجينات المستهدفة في الدراسة في منطقة الجسم النفثي من أدمغة الفئران. أدى الجمع بين فيتامين د³ والسيبيونيمود إلى تحسين النشاط الحركي للفئران في اختبار المجال المفتوح خلال مرحلة إعادة الميالين المبكرة وتحسين قوة القبضة والتنسيق الحركي والتوازن بشكل ملحوظ في اختبار مقياس قوة القبضة والروتارود على التوالي، خلال مرحلة إعادة الميالين المتأخرة مقارنة بمجموعة الكوبريزون والمجموعات المعالجة بفيتامين د³ والسيبيونيمود لوحدهما. كما عزز العلاج المشترك بفيتامين د³ والسيبيونيمود إعادة الميالين بشكل كبير من خلال زيادة التعبير عن البروتين الأساسي للميالين (MBP) خلال مراحل إعادة الميالين المبكرة والمتأخرة، وتحسين الضرر العصبي في قشرة الفص الجبهي والحصين الناتج عن تسمم الكوبريزون. في الختام، أظهرت نتائجنا لأول مرة أن العلاج المشترك بفيتامين د³ والسيبيونيمود عزز عملية إعادة الميالين في نموذج الكوبريزون للتصلب المتعدد اللويحي ويمكن أن يساعد في تحسين علاج مرض التصلب اللويحي.

الكلمات المفتاحية: التصلب اللويحي المتعدد، فيتامين د³، سيبيونيمود، الكوبريزون، إعادة الميالين

Studying The Molecular and Behavioral Mechanisms of Novel Therapeutics Combinations in Multiple Sclerosis Disease

By

Kholoud Marzooq Sehli AL-Otaibi

Supervised By

Prof. Ulfat Omar

Prof. Maryam AL-Ghamdi

Dr. Ghulam Md Ashraf

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disorder of the central nervous system (CNS) that destroys the myelin sheath, accompanied by a wide range of clinical complications that negatively impact the quality of life. Stimulation of remyelination is critical for treating MS to alleviate symptoms and protect the myelin sheath from further damage. The current study aimed to investigate the possible therapeutic effects of combining vitamin D3 (Vit D3) and siponimod (Sipo) on enhancing remyelination and modulating microglia phenotypes in the cuprizone (CPZ) demyelination mouse model. The study was divided into two stages; demyelination (first five weeks) and remyelination (last four weeks). In the first five weeks, 85 mice were randomly divided into two groups, control (n=20, standard rodent chow) and CPZ (n=65, 0.3% CPZ mixed with chow for six weeks, followed by three weeks of standard rodent chow). At the end of week 5, the CPZ group was re-divided into four groups (n=14) for remyelination stages; untreated CPZ (0.2 ml of carboxy methyl cellulose orally), CPZ+Vit D3 (800 IU/kg Vit D3 orally), CPZ+ Sipo (1.5 mg/kg Sipo orally), and CPZ+Vit D3 (800 IU/kg Vit D3) + Sipo (1.5 mg/kg Sipo) orally. One week overlapped between CPZ exposure and drug treatment, to be sure that remyelination was brought on by the medications and not by spontaneous withdrawal of CPZ. Various behavioral tests were performed to evaluate motor, anxiety, and memory performance. These include the open field, grip strength meter, rotarod, elevated plus maze, Y-maze, and novel object recognition tests. Luxol Fast Blue (LFB) staining, and the expression level of target genes were assessed in the corpus callosum (CC). In addition, histopathological changes in the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HIP) were examined by hematoxylin and eosin (H & E). A molecular docking was used to predict the action of Vit D3 and Sipo on inhibiting iNOS. The results showed that the combination of Vit D3 and Sipo improved locomotor activity in an open field test at the early remyelination stage and significantly improved grip strength in the grip strength meter test and motor coordination in the rotarod test at the late stage compared with CPZ. In addition, the combination also significantly promoted remyelination by increasing the expression of myelin basic protein (MBP) at the early and late remyelination stages. Moreover, the combination of these treatments significantly attenuated the degenerative changes in the PFC and HIP regions. In conclusion, these results demonstrate for the first time that a combination of Vit D3 and Sipo can enhance the remyelination process in the CPZ mouse model. This could help to improve the treatment of MS patients.

Key words: Multiple sclerosis, vitamin D3, Siponimod, cuprizone, remyelination