

دور الأجسام المضادة المعدلة للبيتيد LEAP2 في

تسكين الألم لدى جرذان Wistar

(1) ياسر ناعورة* (2) أ.م. د شادي سكرية (3) أ.د جرجس ديب

¹ طالب دكتوراه، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، اختصاص فيزيولوجيا

حيوانية، yaser.naoura@damascusuniversity.edu.sy

² أستاذ مساعد، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، اختصاص علم الجنين

الجزئي، Chadi.Soukkarieh@damascusuniversity.edu.sy

³ أستاذ، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، اختصاص فيزيولوجيا الوسط

الداخلي،

Jerjes.deeb@damascusuniversity.edu.sy

الملخص:

يهدف البحث الحالي إلى دراسة دور الأجسام المضادة المعدلة للبيتيد LEAP2 (Anti-LEAP2) في تسكين الألم لدى جرذان Wistar وعلاقته بالغريلين، والتعرف على بعض جوانب الآليات الداخلية التي تتوسط هذا الدور.

بينت نتائج الدراسة الحالية أن التهاب المفاصل الروماتيدي المحرض بالبريستان أدى إلى ارتفاع ملحوظ في تركيز البيتيد LEAP2، وانخفاض في تركيز الغريلين وعتبة الشعور بالألم. كما بينت أيضاً قدرة البيتيد LEAP2 على تثبيط مستقبل الغريلين وكبح مسار الغريلين في تسكين الألم وتعزيز الشهية. وكذلك قدرة Anti-LEAP2 على رفع عتبة الشعور بالألم البدئية من خلال الارتباط بالموقع الفعال للبيتيد LEAP2 وإبطال تأثيره على عتبة الشعور بالألم وتعزيز الشهية.

الأمر الذي يمكن البناء عليه في تطوير أدوية فعالة في تسكين الألم بعيداً عن الآثار الجانبية التي تسببها أدوية تسكين الألم الأخرى.

الكلمات المفتاحية: الغريلين، Anti-LEAP2، تسكين الألم، البريستان، جرذان ويسترن

Role Of Antibodies Neutralizing The Peptide LEAP2 In Analgesia In Wistar Rats

Yaser Naoura^{1*}, Dr. Chadi Soukkarieh², Dr. Gerges Deeb³

- ^{1.} *Ph.D. student, Department of Animal Biology, Faculty of Damascus University, animal physiology, yaser.naoura@damascusuniversity.edu.sy.
- ^{2.} Assistant professor, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Molecular Embryology, Chadi.Soukkarieh@damascusuniversity.edu.sy.
- ^{3.} Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, intrinsic median physiology, Jerjes.deeb@damascusuniversity.edu.sy.

Abstract:

The current research aims to study the role of antibodies neutralizing the peptide LEAP2 (Anti-LEAP2) in analgesia and in WISTAR rats and its relationship with ghrelin, and identifying some aspects of the internal mechanisms that mediate this role.

The results of our study show that pristane-induced rheumatoid arthritis leads to a significant increase in LEAP2 peptide concentration, and a decrease in Ghrelin concentration and pain threshold. It also demonstrated the ability of the peptide LEAP2 to inhibit the Ghrelin receptor and inhibit the Ghrelin pathway in analgesia and enhancing appetite. As well as the ability of Anti-LEAP2 to raise the initial pain threshold by binding to the active site of the LEAP2 peptide and nullifying its effect on the pain threshold and enhancing appetite. Which can be built upon in developing effective analgesic medications without the side effects caused by other analgesic medications.

Key words: Ghrelin, Anti-LEAP2, Analgesia, Pristane, Wistar Rats.

أولاً - المقدمة:

على الرغم من أن الوساطة البيولوجية للغريلين (هرمون الجوع) في تسكين الألم قد درست بعناية، وعلى الرغم من أن العديد من الدراسات قد أشارت إلى أن الغريلين ربما يؤدي إلى تسكين الألم عبر توسط المستقبلات μ الأفيونية [1]، أو عبر الارتباط بمستقبل مُفرزات هرمون النمو من النمط Growth Hormone Secretagogue $\alpha 1$ (GHS-R1a) Receptor type-1a (مستقبل الغريلين)، في عصبونات النواة المقوسة الوطائية الحاوية على طليعة القشرين الميلانيني الأفيوني-Pro-opiomelanocortin (POMC)، وهي الطليعة التي يشتق منها بيتا إندورفين الذي يعتبر المفتاح الرئيسي في تسكين الألم [2]. إلا أن تنظيم عمل الغريلين غير مفهوم جيداً، وفي ضوء ذلك اكتشف سابقاً الببتيد المضاد للميكروبات المعبر عنه في الكبد Liver-Enriched Antimicrobial Peptide 2 (LEAP-2)، على أنه ببتيد مضاد للميكروبات فقط [3]، لكن تم التعرف عليه مؤخراً بأنه حاصراً داخلياً لمستقبل الغريلين [4] وهو من المستقبلات المقترنة بالبروتين [5] Protein G-Coupled Receptor G (GPCR)، يتم التحكم في نشاطه بواسطة اثنتين من الربائط الداخلية المتعكسة في تأثيرها عليه وهما: الغريلين (المحفز) وLEAP-2 (المنبث) [4]. يعزز الغريلين الشهية عبر تحفيز المستقبل (GHSR1a) الموجود على العصبونات الحاوية على البروتين المرتبط بالأغواتي AGOUTI-RELATED PROTEIN والببتيد العصبي NEUROPEPTIT Y (NPY/AgRP) في النواة المقوسة الوطائية ARCUATE PITUITARY NUCLEUS (ARC) [6]، وعلى الخلايا الموجهة الجسدية النخامية SOMATOTROPHS المفرزة لهرمون النمو [7]. بالمقابل تبين بدايةً بأنه حاصراً داخلياً غير تنافسي ENDOGENOUS NONCOMPETITIVE ANTAGONIST للمستقبل (GHS-R1a) فمن المحتمل أنه يعدل وظائف المستقبل من خلال ارتباطه

بالمقر المتفارع ALLOSTERIC SITE [9] هو بمثابة موقع آخر يرتبط به LEAP2 مؤدياً إلى تغير في بنية الموقع الفعال ACTIVE SITE، وهذا يتعارض مع دراسة حديثة بينت أن البيبتيد LEAP2 يعمل كحاصر داخلي تنافسي للغريلين ENDOGENOUS COMPETITIVE ANTAGONIST وشادة عكسية INVERSE AGONIST لنشاط المستقبل GHS-R1a التأسيسي (9) ONSTITUTIVE GHS-R1a ACTIVIT، وبغض النظر عن آلية البيبتيد LEAP2 في حجب عمل المستقبل (GHS-R1a)، فإن جميع الدراسات السابقة تؤكد على قدرة البيبتيد LEAP-2 على كبح تأثيرات الغريلين على طلب الطعام والإفراز الهرموني. ولقد تم ملاحظة أن تركيز LEAP2 البلاسمي يزداد مع طلب الطعام والبدانة (توازن الطاقة الإيجابي)، بينما يتناقص عند الصيام وفقدان الوزن (توازن الطاقة السلبي) وقد أظهر تثبيط نشاط الغريلين آثاراً مفيدةً في التجارب ما قبل السريرية، مما يلقي الضوء على إمكانية البيبتيد LEAP-2 في معالجة البدانة [10]. كما يعتبر LEAP2 البيبتيد الثاني (بعد LEAP1 المسؤول عن استتباب الحديد [11]) المعزول سابقاً من دم البشر والمعبر عنه في الكبد والمعروف بدوره في الاستجابة المناعية الفطرية [3]. حيث يتألف الشكل الناضج للبيبتيد LEAP2 من 40 حمض أميني مشتقة من طليعة البيبتيد LEAP2 بدءاً من الحمض الأميني رقم 38 حتى الحمض الأميني رقم 77، وتتطابق الأحماض الأمينية للشكل الناضج عند القوارض وعند الإنسان، وقد برز مؤخراً وبشكلٍ مثيرٍ للاهتمام ارتباط البيبتيد LEAP2 في مستقبل الغريلين وبشكلٍ خاص الشدفة N منه [10]، وحجب وظائف الغريلين المتمثلة بتحفيز الشهية وتحرير هرمون النمو [12] وزيادة مستوى سكر الدم [4] بالتالي من المفترض أن يكون للبيبتيد LEAP2 دوراً في تثبيط دور الغريلين في تسكين الألم داخل الكائن الحي، كما أن الدراسات الفيزيولوجية الكهربائية باستخدام تقانة PATCH CLAMP أظهرت أن البيبتيد LEAP2 يقوم بفرط

استقطاب يحد من تنشيط عصبونات الحاوية على الببتيد العصبي المحفز للشهية (NPY) في النواة المقوسة الوطائية (ARC)، بينما تطبيق الغريلين لوحده يؤدي إلى نزع استقطاب في تلك العصبونات محفزاً تحرير الببتيد العصبي المحفز للشهية (NPY) [13]. إلى جانب ذلك أدى حقن الببتيد LEAP2 في بطينات الدماغ عند الجرذان إلى كبح وظائف الغريلين في مستوى الجهاز العصبي المركزي مثل التعبير عن جين (FOX) FORKHEAD BOX المنظمة لعوامل النسخ الضرورية لوظائف المتعضية في نوى الوطاء، وتحفيز الشهية أما الحقن الوريدي للغريلين في الفئران المجموعة أدى إلى خفض مستويات LEAP2 البلاسمي وكذلك التعبير عن mRNA LEAP2 في الكبد [14]. بمعنى آخر نجد أن الغريلين والببتيد LEAP2 ينظمان وظيفتهما من خلال أليتين هما: آلية الإشارات المتبادلة بين المعدة والكبد، وألية التنشيط المباشر للمستقبل (GHS-R1a) بواسطة LEAP2. وهكذا فإن شادة LEAP2 تمثل هدفاً علاجياً محتملاً للبدانة ومرض السكري بقدرتها على كبح وظائف الغريلين، أما حقن الأجسام المضادة المعدلة للببتيد LEAP2 (Anti-LEAP2) يؤدي إلى تحفيز أفعال الغريلين في الجسم الحي مثل تعزيز تحرر هرمون النمو وتعزيز الشهية [4] بالتالي يمكن أن تكون هذه الأجسام المضادة هدفاً علاجياً محتملاً لفقدان الشهية ANOREXIA والدفن السرطاني CACHEXIA CANCER وتسكين الألم على اعتبار وجود العديد من الدلائل التي تشير إلى دور الغريلين في تسكين الألم [1]، وتعزيز هذا الدور بحقن (Anti-LEAP2).

يتم إنتاج LEAP2 مركزياً في منطقة ما تحت المهاد والغدة النخامية، ومحيطياً من الكبد بشكل رئيس [15]، والأمعاء الدقيقة والمعدة والكليتين بشكل ثانوي [16] ليقوم بوظائفه الرئيسية في تنظيم الشهية وإفراز هرمون النمو (GH). كما يمكن تحريض إنتاجه تجريبياً بأليات مختلفة مثل تطبيق الاستئصال الرأسي للمعدة VERTICAL SLEEVE

(VSG) GASTROSTOMY على الفئران (9) أو عبر تحريض التهاب مفاصل روماتيدي في النماذج الحيوانية، حيث هنالك نمط آخر من التهاب المفاصل يدعى بالتهاب المفاصل المحرض بالبريستان PRISTANE-INDUCED ARTHRITIS (PIA) [17]. والبريستان عبارة عن ألكان مشبع يتألف من 19 ذرة كربون ويسمى بـ 2,6,10-TRIMETHYLPENTADECANE يحرض التهاب مفاصل مزمن عند الجرذان عند حقنه بشكل نقي [18].

ثانياً - أهمية وأهداف البحث:

1-2 أهمية البحث:

بالنظر إلى نتائج الدراسات السابقة التي أثبتت قدرة LEAP2 على تثبيط سلوك تناول الغذاء المُحرض بواسطة هرمون الغريلين في الفئران، نتيجة ارتباطه بالمستقبل (GHS-R1a)، مما يكشف فعالية دوائية PHARMACOLOGICAL ACTIVITY لم تكن متوقعة للبيبتيد LEAP2 في التحكم في الاستجابة للغريلين في الظروف العادية والمرضية [13]، وبالنظر للدور الهام للغريلين في تسكين الألم، وبما أنه لا تتوفر أية معطيات عن الدور المحتمل للبيبتيد LEAP2 في تسكين الألم وعلى اعتبار أن البيبتيد LEAP2 يعمل كحاصر لمستقبل مفرزات هرمون النمو (GHS-R1a) (مستقبل الغريلين)، فإنه لا بد أن يكون للبيبتيد LEAP2 دوراً تثبيطياً لقدرة الغريلين على تسكين الألم، ولهذا أهمية نظرية كبيرة في التعرف على جوانب جديدة في منظومات التسكين وتطبيقاتها المباشرة في المجال الطبي السريري.

2-1 أهداف البحث:

أولاً: تحريض إنتاج البيبتيد LEAP2 عبر إحداث التهاب مفاصل روماتيدي ومعرفة تأثيره على عتبة الشعور بالألم.

ثانياً: حقن البيبتيد LEAP2 والأجسام المضادة المعدلة Anti-LEAP2 خارجياً ومعرفة تأثيرها على عتبة الشعور بالألم.

ثالثاً: مقارنة نتائج حقن المورفين بشكل منفصل أو مشترك مع نتائج حقن الأجسام المضادة المحيدة للبيبتيد.

ثالثاً-مواد البحث وطرائقه:

أجريت الدراسة على 104 جرذاً من نوع Wistar بوزن من 180-200 غراماً في بداية التجربة، حيث أخضعت بدايةً جميع الجرذان إلى البيئية المخبرية نفسها من حيث تناوب الضوء والظلام (12 ساعة ضوء، 12 ساعة ظلام) ومن حيث وجود فائض حر من الغذاء والماء.

وبعد خمسة أيام من وجود الجرذان في غرفة المختبر، حيث كانت تخضع يومياً إلى قياس عتبة الشعور بالألم بهدف الاعتياد، تم تقسيمها إلى عشرة مجموعات يضم كل منها ثمانية جرذان بحسب مقتضيات التجربة كما هو موضح في الجدول رقم [1].

4-1: تحريض التهاب المفاصل بالبريستان:

توضع الفئران المخدرة على جانبها البطني، ويوجه الذيل بشكل مستقيم نحو الخلف، يبلل فراء الذيل بـ 70% إيثانول على طول الخط المتوسط للذيل، ويتم حلق الفراء مكان الحقن، ومن ثم يتم إدخال إبرة الحقن مع توجيه فتحتها نحو الأعلى ليتم حقن من (100-150) ميكرو ليتر من البريستان (المصنع في شركة

MYBIOSOURCE الأمريكية) تحت الجلد. يوضع الإبهام فوق منطقة الحقن لتسحب الإبرة ببطء لتجنب التسريب. توزن الجرذان يومياً وتفحص كفوف الجرذان بصرياً بشكل يومي حتى ظهور علامة المرض (بعد 9-14 يوم من الحقن) المتمثلة بظهور وزمات واحمرار وانتفاخ في نهايات الأصابع (خصوصاً المخالب الخلفية) بالإضافة إلى تغير في الدلات الكيميائية الحيوية في الدم والمرتبطة بتشخيص التهاب المفاصل [19].

4-2: قياس عتبة الشعور بالألم:

تم قياس عتبة الشعور بالألم لدى الجرذان من خلال قياس الزمن الكامن لسحب الذيل باستعمال جهاز مقياس الزمن الكامن لسحب الذيل Tail Flick Latency نموذج 812 شركة (HSE). يغمر الذيل بمياه درجة حرارتها 52 م° ولمسافة 7سم من ذروته، ويسجل الزمن الكامن لنفضة الذيل بواسطة مؤقت الجهاز. ويحافظ على درجة حرارة المياه بواسطة منظم حراري من شركة (PHYWE) مغمور في حوض مائي بمقياس 14×16×42 سم، إذ يغمر الذيل إلى العمق نفسه الذي يصله مقياس الحرارة [20]. وتكرر عملية القياس الواحدة ثلاث مرات للجرذ الواحد بفواصل زمنية مقدارها دقيقة واحدة، وتعرض النتائج كمتوسط حسابي \pm الانحراف المعياري. ويستخدم لكل جرذ منشفة جافة نظيفة خاصة به يلف بها الحيوان قبل عملية القياس مع بقاء الذيل حراً.

4-3: المعايير الكيميائية الحيوية:

تم سحب عينة الدم من قلب الجرذ بمجرد ظهور أعراض التهاب المفاصل المحدث بالبريستان، ومن ثم تم وضع عينة الدم في أنبوب يحوي الهيبارين كمضاد تخثر وتم فصل المصورة بالتثقيب، وقد أجريت معايرة LEAP2 والغريلين والبروتين الارتكاسي التفاعلي CRP والعامل الروماتيدي RF في المصورة بواسطة جهاز مقياس المطياف الضوئي spectrophotometer والمقايسة المناعية الأنزيمية الشطائرية Sandwich Enzyme Immunoassay (ELISA).

4-4: الحقن في تجويف البريتوان:

حقنت الجرذان بالبيبتيد LEAP2 والغريلين و (Anti-LEAP2) وحاصر مستقبل الغريلين (GHS-R1 α) (DLS) والمورفين في تجويف البريتوان (بهدف معرفة تأثيرها على عتبة الشعور بالألم) جرعات مقدارها (0.1, 0.02, 0.02, 0.2) ملغ/كغ، على التوالي من إنتاج شركة (MYBIOSOURCE) الأميركية. بينما كان الفاصل

الزمني بين الحقن في تجويف البريتوان للمادة الأولى والثانية بمقدار خمسة دقائق على

التوالي. وحددت الفروق المعنوية بين المجموعات بواسطة اختبار one way anova

تبعاً لمقتضيات البحث، واستخدمت p-value كمعيار للدلالة الإحصائية

وذلك عبر البرنامج الإحصائي SPSS.

جدول (1): مجموعات الدراسات وظروفها التجريبية.

العدد	المجموعة
8	الأولى (شاهدة)، معايرة LEAP2 والغريلين وقياس الزمن الكامن لنفضة الذيل وحساب وزن الجسم.
8	الثانية (المحقونة بالبريستان) المرحلة الأولى: إحداث التهاب المفاصل بالبريستان ومعايرة الببتيد LEAP2 والغريلين وقياس الزمن الكامن لنفضة الذيل. المرحلة الثانية: حقن Anti-LEAP2 (0.02mg/kg)، وقياس الزمن الكامن لنفضة الذيل.
8	الثالثة حقن الببتيد LEAP2 (0.2mg/kg) في تجويف البريتوان ومعرفة تأثيره على الزمن الكامن لنفضة الذيل (ثا) وعلى وزن الجسم.
8	الرابعة حقن الغريلين في تجويف البريتوان وقياس الزمن الكامن لنفضة الذيل (ثا).
8	الخامسة حقن Anti-LEAP2 (0.02mg/kg) في تجويف البريتوان وقياس الزمن الكامن لنفضة الذيل (ثا).
8	السادسة الحقن المتزامن للببتيد LEAP2 (0.2mg/kg) والغريلين (0.02mg/kg) في تجويف البريتوان وقياس الزمن الكامن لنفضة الذيل (ثا).
8	السابعة الحقن المتزامن للببتيد LEAP2 (0.2mg/kg) و Anti-LEAP2 (0.02mg/kg) في تجويف البريتوان. ومعرفة تأثيرها على الزمن الكامن لنفضة الذيل (ثا) وعلى وزن الجسم.
8	الثامنة الحقن المتزامن ل Anti-LEAP2 (0.02mg/kg) والغريلين (0.02mg/kg) في تجويف البريتوان وقياس الزمن الكامن لنفضة الذيل (ثا).
8	التاسعة الثانية حقن حاصر مستقبل (GHS-R1α) (5mg/kg) (مستقبل الغريلين) DLS في تجويف البريتوان وقياس الزمن الكامن لنفضة الذيل (ثا).
8	العاشرة الحقن المتزامن لحاصر مستقبل (GHS-R1α) (5mg/kg) (مستقبل الغريلين) DLS+الببتيد LEAP2(0.2mg/kg) معاً وقياس الزمن الكامن لنفضة الذيل (ثا).

رابعاً-النتائج:

المحور الأول: مقارنة نتائج تحفيز البيبتيد LEAP2 داخلي المنشأ مع نتائج حقن

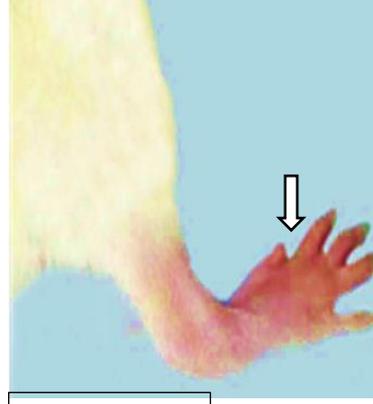
البيبتيد LEAP2.

1. نتائج المعاملة بالبريستان:

أظهرت النتائج إصابة معظم الجردان بالتهاب المفاصل الروماتيدي بعد-15 (8يوم من حقن البريستان (تم استبعاد الجردان التي لم تبدي إصابة) والتي سجل لديها، ارتفاع في تركيز البروتين الارتكاسي التفاعلي CRP ($P \leq 0.05$)، والعامل الروماتيدي RF ($P \leq 0.05$)، وكريات الدم البيضاء WBC ($P \leq 0.001$)، مقارنةً مع المجموعة الشاهدة الشكل (2). وقد ترافق التهاب المفاصل الروماتيدي بظهور أعراض سريرية متمثلة في احمرار وتورم وألم في الكفوف الخلفية وبدرجة أقل في الكفوف الأمامية وفي بعض المفاصل السنية السلامية ومفصل الكاحل الشكل (1)، بالإضافة إلى فقدان الشهية وانخفاض الوزن .

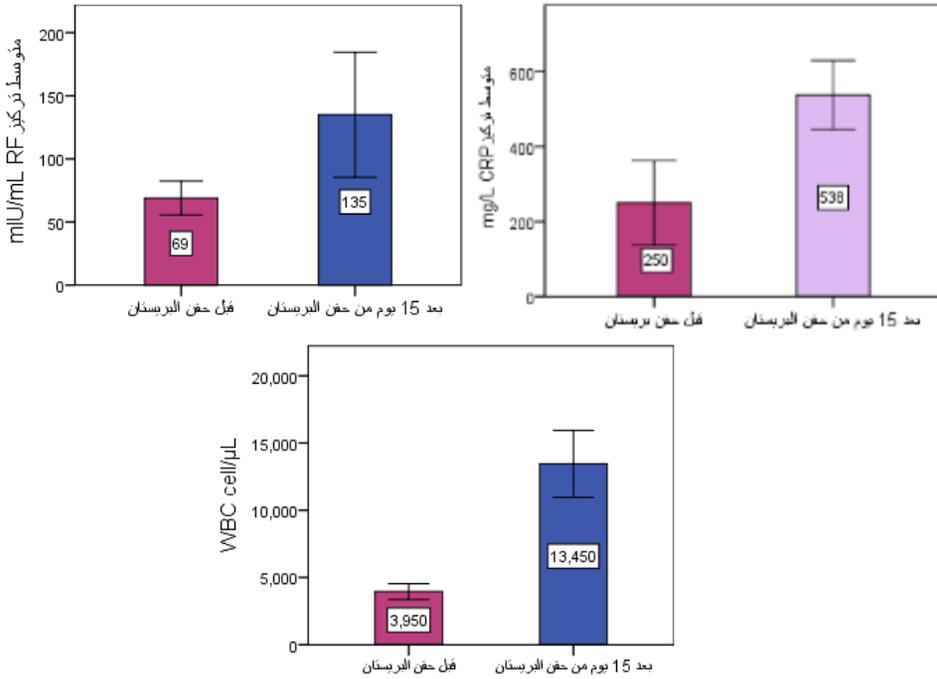


قبل حقن



بعد المعاملة

الشكل (1) صورة توضح كفوف اليدين الخلفية قبل بعد خمسة عشر يوم من حقن

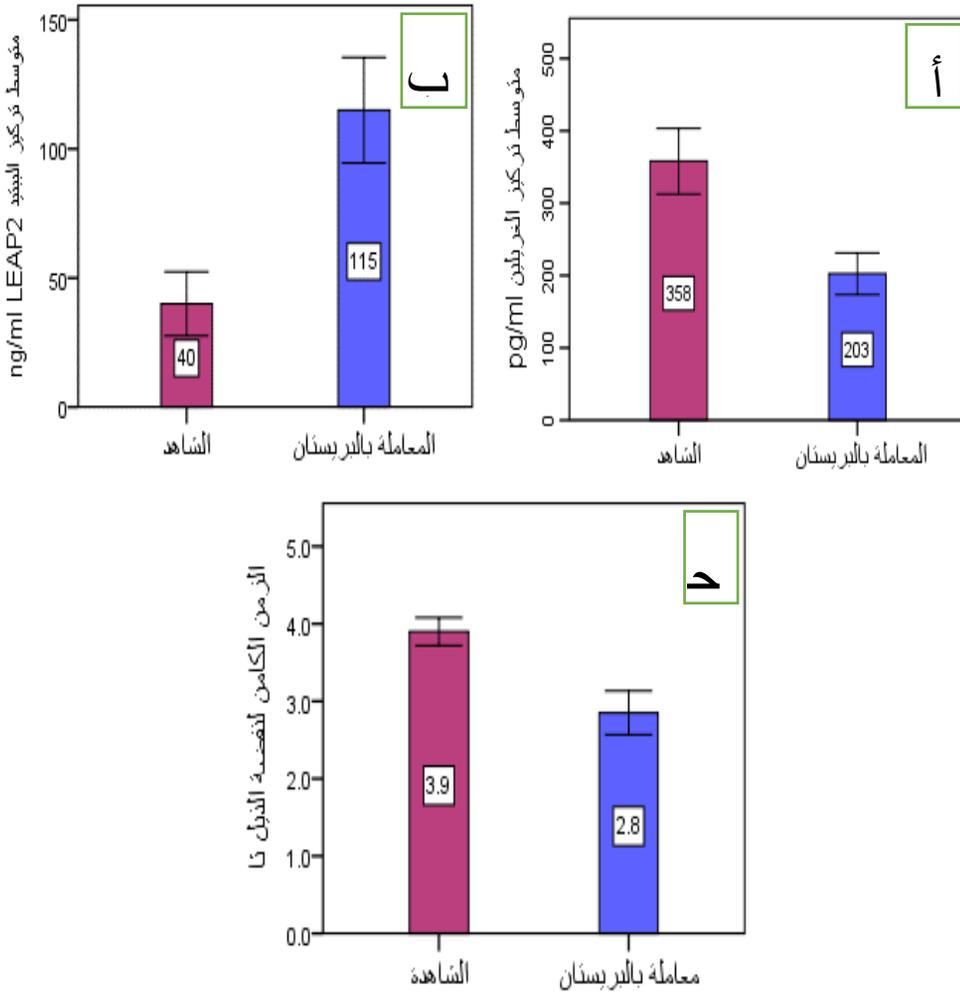


الشكل (2) مخطط بياني لمتوسط تركيز CRP و RF وعدد كريات الدم البيضاء WBC لدى الجرذان المعاملة بالبريستات لمدة 15 يوم مقارنةً بالشاهدة.

2. نتائج معايرة الغريلين والببتيد LEAP2، وقياس الزمن الكامن لنفوضة الذيل بعد إحداث التهاب المفاصل الروماتيدي.

أدى إحداث التهاب المفاصل الروماتيدي المحرض بالبريستات (لدى جرذان المجموعة الثانية) إلى ارتفاع في متوسط تركيز الببتيد LEAP2 بنسبة ($P \leq 0.01$) 187%، وإلى انخفاض تركيز الغريلين بنسبة 75% ($P \leq 0.05$)، وانخفاض عتبة الشعور بالألم البدئية بنسبة 28.2% ($P \leq 0.05$) (الشكل(3).

دور الأجسام المضادة المُعدلة للبيتيد LEAP2 في تسكين الألم لدى جردان Wistar



الشكل (3) مخطط بياني لمتوسط تركيز الغريلين (أ) والبيتيد LEAP2 (ب) والزمن الكامن لنفصة الذيل (ج) لدى الجردان المعاملة بالبريبستان لمدة 15 يوم مقارنةً بالمجموعة الشاهدة.

3. نتائج الحقن المشترك للبيبتيد LEAP2 والأجسام المضادة المعدلة للبيبتيد LEAP2 على عتبة الشعور بالألم.

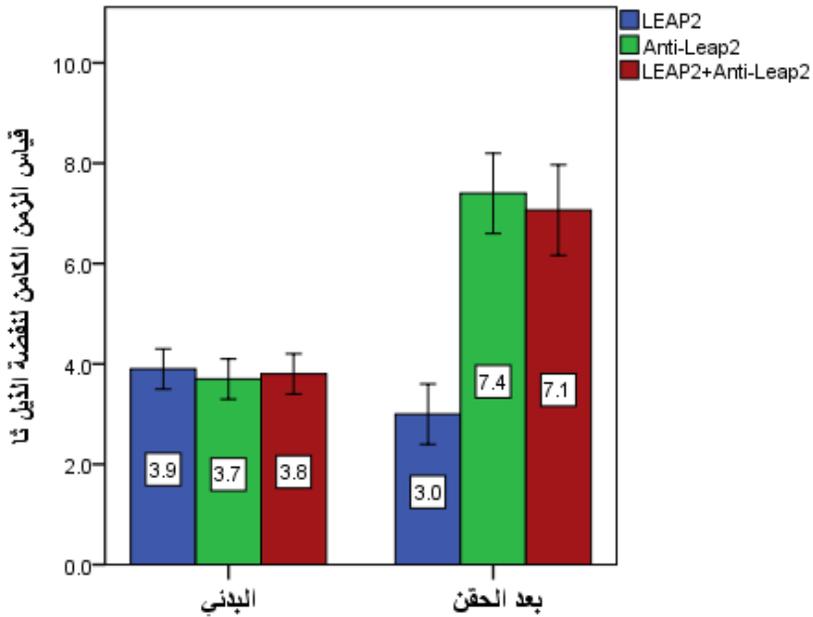
بهدف اختبار قدرة Anti-LEAP2 على إلغاء تأثير البيبتيد LEAP2، وبهدف معرفة التأثير المشترك للبيبتيد LEAP2 و Anti-LEAP2 على عتبة الشعور بالألم، تم الحقن المتزامن للجرذان بكل من البيبتيد LEAP2 و Anti-LEAP2 (المجموعة السابعة).

أظهرت النتائج انخفاضاً في عتبة الشعور بالألم البدئية بعد حقن البيبتيد LEAP2 (المجموعة الثالثة) بنسبة 23% - ($P \leq 0.05$)، في حين أدى الحقن المنفرد ل Anti-LEAP2 (المجموعة الخامسة) إلى ارتفاع عتبة الشعور بالألم البدئية بمقدار 100% ($P \leq 0.05$)، أما الحقن المتزامن للجرذان في التجويف البريتوان (البيبتيد LEAP2 مع Anti-LEAP2) (المجموعة السابعة) قد أدى إلى ارتفاع عتبة الشعور بالألم البدئية بمقدار 86% ($P \leq 0.05$)، الجدول (2) الشكل (4). وبشكلٍ آخر نجد أن مقدار تسكين الألم قد انخفض بنسبة 14% لدى الجرذان المحقونة بالتزامن (البيبتيد LEAP2 مع Anti-LEAP2) (المجموعة السابعة)، مقارنةً مع الجرذان المحقونة LEAP2 (المجموعة الخامسة) الجدول (2) الشكل (4). بالمقابل انخفض مقدار تسكين الألم بنسبة 109% لدى الجرذان المحقونة بالتزامن (البيبتيد LEAP2 مع Anti-LEAP2) (المجموعة السابعة)، بالمقارنة مع الجرذان المحقونة بالبيبتيد LEAP2 (المجموعة الثالثة) مما يؤكد قدرة Anti-LEAP2 على إلغاء تأثير البيبتيد LEAP2 على عتبة الشعور بالألم.

دور الأجسام المضادة المعدلة للبيبتيد LEAP2 في تسكين الألم لدى جرذان Wistar

جدول (2): متوسط الزمن الكامن لنفوضة الذيل \pm الانحراف المعياري، وقيم p-value عند القياس البدئي وبعد الحقن للمجموعات التجريبية التي تضم الجرذان المحقونة بـ LEAP2 والجرذان المحقونة بـ Anti-LEAP2 والجرذان المحقونة بالتزامن LEAP2 + Anti-LEAP2 مقارنة مع العتبات الشاهدة.

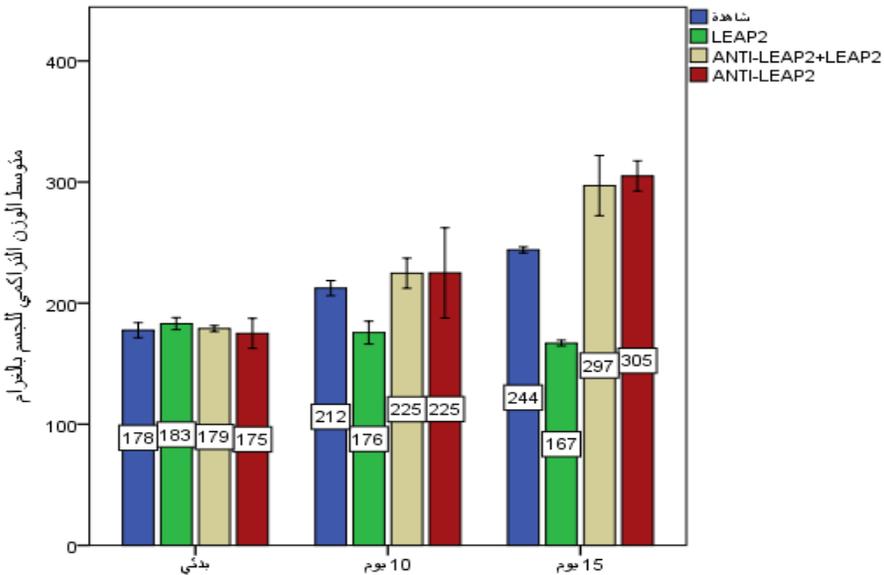
المعدلة المحقونة	القياس البدئي	القياس بعد الحقن	قد	p-value بدئي/بعد الحقن	p-value للقيم بعد الحقن
LEAP2	3.9	3	-23%	($P \leq 0.05$)	Anti-LEAP2/LEAP2+Anti-LEAP2
Anti-LEAP2	3.7	7.4	100%	($P \leq 0.05$)	($P \leq 0.001$)
LEAP2+anti-LEAP2	3.8	7.1	86%	($P \leq 0.05$)	($P \leq 0.07$)



الشكل (4) مخطط بياني لمتوسط الزمن الكامن لنفوضة الذيل \pm الانحراف المعياري لدى الجرذان المحقونة بالبيبتيد LEAP2 والجرذان المحقونة بـ Anti-LEAP2 والجرذان المحقونة بـ LEAP2+Anti-LEAP2 مقارنة مع العتبات الشاهدة.

ومما يدعم قدرة Anti- LEAP2 على إلغاء تفعيل الببتيد LEAP2 (المجموعة الثالثة) هو أن نتائج الحقن المتزامن (الببتيد LEAP2 مع Anti-LEAP2) (المجموعة السابعة) على وزن الجسم بعد 15 يوم، قد عاكست انخفاض الوزن الناتج عن حقن الببتيد LEAP2 والمقدر 31.5% (المجموعة الثالثة)، لا وبل تجاوزت قيم متوسطات وزن الجسم لدى الجرذان الشاهدة بقيم مُعتد بها إحصائياً وبنسبة 21.7% ($P \leq 0.05$) الشكل (5).

في حين أن نتائج الحقن المتزامن (الببتيد LEAP2 مع Anti-LEAP2) (المجموعة السابعة) على وزن الجسم بعد 15 يوم قد انخفضت قليلاً وبنسبة لا تتعدى 2.6% مقارنةً مع الجرذان المحقونة بـ Anti-LEAP2، وهذا يشير إلى أن Anti-LEAP2 أدى إلى حجب تأثير الببتيد LEAP2 على وزن الجسم سواء أكان داخلي أم خارجي الحقن.



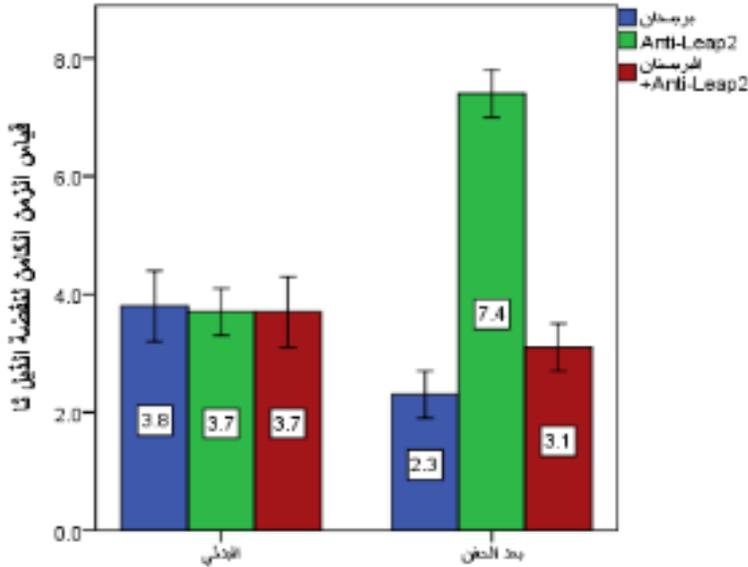
الشكل (5) مخطط بياني لمتوسط وزن الجسم \pm الانحراف المعياري لدى الجرذان الشاهدة والجرذان المحقونة بالببتيد LEAP2 والمحقونة Anti-LEAP2 مقارنةً مع المجموعة المحقونة بشكل متزامن ANTI-LEAP2+LEAP2.

4. نتائج حقن Anti-LEAP2 (لدى الجرذان المحرض لديها التهاب المفاصل الروماتيدي بالبريستان):

أظهرت النتائج انخفاضاً في عتبة الشعور بالألم البدئية بعد المعاملة بالبريستان (المجموعة الثانية) بمقدار 60% ($P \leq 0.05$)، في حين أدى الحقن المتزامن (البريستان مع Anti-LEAP2) (المجموعة الثانية) إلى انخفاض عتبة الشعور بالألم البدئية بمقدار 17% ($P \leq 0.05$)، أما الحقن المنفرد لـ Anti-LEAP2 لدى جرذان المجموعة الخامسة، فقد أدى إلى ارتفاع عتبة الشعور بالألم البدئية بمقدار 100% ($P \leq 0.05$). حيث تراجعت الحساسية الألمية بمقدار 43% لدى الجرذان المحقونة بالتزامن (البريستان مع Anti-LEAP2) (المجموعة الثانية)، مقارنةً مع الجرذان المحقونة بالبريستان فقط (المجموعة الثانية). ودون أن تصل للعتبة البدئية الجدول (3) الشكل (6). يمكن لهذه النتائج أن تشير إلى أن التهاب المفاصل الروماتيدي المحرض بالبريستان يحفز الحساسية الألمية بآليات أخرى، إلى جانب تحفيزه الحساسية الألمية بتأثير البيبتيد LEAP2.

جدول (3) متوسط الزمن الكامن لنفوضة الذيل \pm الانحراف المعياري، وقيم p-value عند القياس البدئي وبعد الحقن للمجموعات التجريبية التي تضم الجرذان المعاملة بالبريستان والجرذان المحقونة بـ Anti-LEAP2 والجرذان المحقونة بالتزامن Anti-LEAP2 + بريستان مقارنةً مع العتبات الشاهدة. وقيم p-value

p-value للقيم بعد الحقن		p-value بدئي/بعد الحقن	الفرق بين القياسين %	القياس بعد الحقن	القياس البدئي	المادة المحقونة
+Anti- LEAP2/البريستان	/Anti-LEAP2 البريستان +Anti-LEAP2	($P \leq 0.05$)	-60%	2.3	3.8	البريستان
($P \leq 0.05$)	($P \leq 0.05$)	($P \leq 0.05$)	100%	7.4	3.7	Anti-LEAP2
		($P \leq 0.05$)	-17%	3.1	3.7	البريستان +Anti-LEAP2



الشكل (6) مخطط بياني لمتوسط الزمن الكامن لنفضة الذيل لدى الجرذان المعاملة بالبريستان والجرذان المحقونة بـ anti-LEAP2 والجرذان المحقونة anti-LEAP2 + بريستان مقارنة مع العتبات الشاهدة.

5. نتائج تأثير حقن الغريلين والبيبتيد LEAP2 و Anti-LEAP2 بشكل منفصل على عتبة الشعور بالألم.

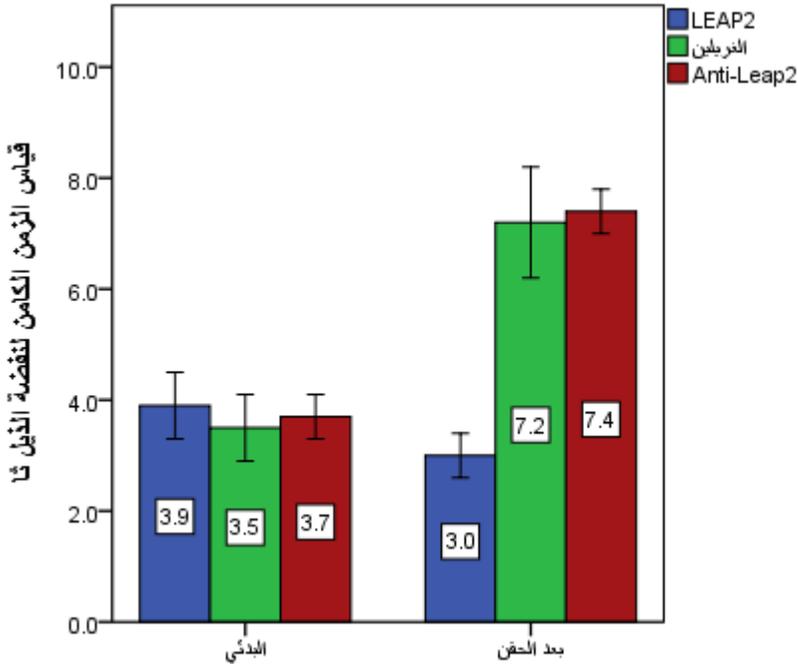
بهدف تعزيز النتائج التي بينت أن تحريض البيبتيد LEAP2 داخلي المنشأ يترافق بارتفاع الحساسية الألمية، وبهدف معرفة مدى مشاركة الغريلين والبيبتيد LEAP2 و Anti-LEAP2 في التأثير على عتبة الشعور بالألم، تم حقن الجرذان بالبيبتيد LEAP2 (المجموعة الثالثة) والغريلين (المجموعة الرابعة) و Anti-Leap2 (المجموعة الخامسة) في تجويف البريتوان وبشكلٍ منفصل.

أظهرت النتائج أن حقن الجرذان بالبيبتيد LEAP2 يترافق بانخفاض عتبة الشعور بالألم البدئية بنسبة $(P \leq 0.05)$ -23%، بينما ارتفعت عتبة الشعور بالألم البدئية بنسبة $(P \leq 0.001)$ 105% لدى الجرذان المحقونة بالغريلين، وبنسبة 100% $(P \leq 0.05)$ لدى الجرذان المحقونة Anti-LEAP2 الجدول (4) الشكل (7).

وبمقارنة النتائج السابقة لم نجد أي فرق ملحوظ بين مقدار تسكين الألم بعد حقن الغريلين (المجموعة الرابعة)، وبين مقدار تسكين الألم بعد حقن Anti-LEAP2 (المجموعة الخامسة). وعلى النقيض من ذلك لوحظ تراجع واضح في مقدار تسكين الألم، حتى وصل إلى تحريض للحساسية الألمية بعد حقن البيتيد LEAP2 (المجموعة الثالثة) مقارنةً مع الجرذان المحقونة غريلين أو المحقونة Anti-LEAP2 الجدول (4) الشكل (7).

جدول (4): متوسط الزمن الكامن لنفضة الذي \pm الانحراف المعياري، وقيم p-value لدى الجرذان المحقونة بالبيتيد LEAP2 والجرذان المحقونة بالجريلين والجرذان المحقونة Anti-LEAP2 مقارنةً مع العتبات الشاهدة.

p-value للقيم بعد الحقن		p-value بدئي/بعد الحقن	الفرق بين القياسين %	القياس بعد الحقن	القياس البدئي	المادة المحقونة
Anti- LEAP2/ الجريلين	LEAP2/anti -LEAP2	($P \leq 0.05$)	-23%	3	3.9	LEAP2
		($P \leq 0.001$)	105%	7.2	3.5	الجريلين
($P \leq 0.08$)	($P \leq 0.001$)	($P \leq 0.05$)	100%	7.4	3.7	Anti- LEAP2



الشكل (7) مخطط بياني لمتوسط الزمن الكامن لنفظة الذيل \pm الانحراف المعياري لدى الجرذان المحقونة بالببتيد LEAP2 والجرذان المحقونة بالغريلين والجرذان المحقونة بـ Anti-LEAP2 مقارنةً مع العتبات الشاهدة.

المحور الثاني: تحري بعض السبل التي تسلكها Anti-LEAP2 وكذلك الببتيد LEAP2 في التأثير على عتبة الشعور بالألم.

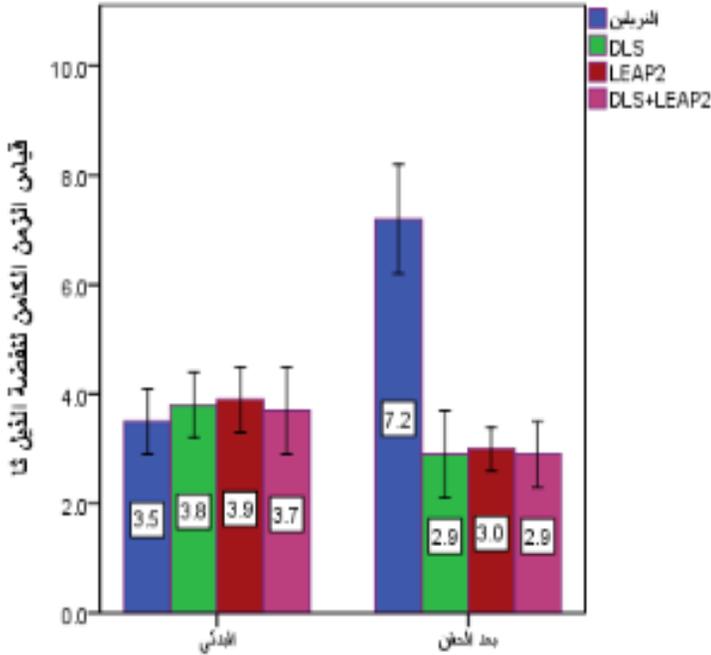
1. تحري سبيل مستقبل (GHS-R1 α) (مستقبل الغريلين) في تسكين الألم المحرض بحقن Anti-LEAP2.

بهدف معرفة مدى توسط مستقبل مفرزات هرمون النم (GHS-R1 α) في السبيل الذي تسلكه Anti-LEAP2 في تسكين الألم، تم الحقن المتزامن للجرذان بحاصر مستقبل مفرزات هرمون النمو (GHS-R1 α) (مستقبل الغريلين)(DLS) والببتيد LEAP2 معاً (المجموعة العاشرة).

لوحظ وجود انخفاض معنوي في عتبة الشعور بالألم البدئية بعد الحقن المتزامن السابق بمقدار 21% - ($P \leq 0.05$)، وبشكلٍ مماثلٍ تقريباً وجدنا انخفاضاً في عتبة الشعور بالألم البدئية بعد حقن الحاصر DLS (المجموعة التاسعة) أو البيتيد LEAP2 (المجموعة الثالثة) بمقدار 23% - ($P \leq 0.05$).
بالمقابل ارتفعت عتبة الشعور بالألم البدئية بعد حقن الغريلين بمقدار 105% ($P \leq 0.001$) (المجموعة الرابعة). هذا يشير إلى تداخل مستقبلات الغريلين (-GHS R1a) في آلية تسكين الألم المحرصة بحقن Anti-LEAP2. كما أظهرت النتائج السابقة وجود فارق ملحوظ في تغير عتبة الشعور بالألم البدئية عند مقارنة الجرذان المحقونة DLS أو LEAP2 أو DLS+LEAP2 مع الجرذان المحقونة بالغريلين، الجدول (5) الشكل (8).

الجدول (5) متوسط الزمن الكامن لنفزة الذيل \pm الانحراف المعياري، وقيم p-value لدى الجرذان المحقونة بالغريلين والجرذان المحقونة بـ DLS والجرذان المحقونة بالبيتيد LEAP2 والجرذان المحقونة بالتزامن DLS+LEAP2 مقارنةً مع العتبات الشاهدة، وقيم p-value.

المادة المحقونة	القياس البدئي	القياس بعد الحقن	الفرق بين القياسين %	p-value بدئي/بعد الحقن	p-value للقيم بعد الحقن
الغريلين	3.5	7.2	105%	($P \leq 0.001$)	DLS/ الغريلين ($P \leq 0.001$)
DLS	3.8	2.9	-23%	($P \leq 0.05$)	DLS/DL S+LEAP 2 ($P = 0.15$)
LEAP2	3.9	3	-23%	($P \leq 0.05$)	LEAP2/ DLS+LE AP2 ($P \leq 0.09$)
DLS+LEAP2	3.7	2.9	-21%	($P \leq 0.05$)	



الشكل (8) متوسط الزمن الكامن لتفصية الذيل \pm الانحراف المعياري لدى الجرذان المحقونة بالغريلين والجرذان المحقونة بـ DLS والجرذان المحقونة بالببتيد LEAP2 والجرذان المحقونة بالتزامن DLS+LEAP2 مقارنة مع العتبات الشاهدة.

2. تحري سبيل الغريلين في إثارة الحساسية الألمية المحرزة بحقن الببتيد LEAP2.

بهدف معرفة مدى توسط الغريلين السبيل الذي يسلكه الببتيد LEAP2 في إثارة الحساسية الألمية. تم الحقن المتزامن للجرذان بالغريلين والببتيد LEAP2 (المجموعة السادسة).

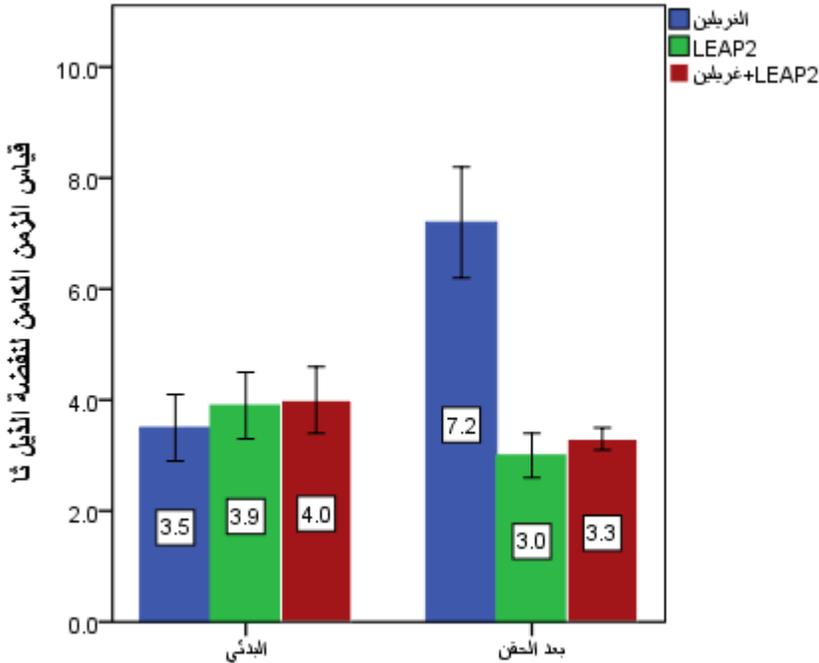
حيث لوحظ وجود انخفاض معنوي في عتبة الشعور بالألم البدئية بعد الحقن المتزامن السابق 17% - ($P \leq 0.05$)، ويمثل ذلك لوحظ وجود انخفاض معنوي في عتبة الشعور بالألم البدئية بعد حقن الببتيد LEAP2 ونسبة 23% - ($P \leq 0.05$).

بالمقابل ارتفعت عتبة الشعور بالألم البدئية بعد حقن الغريلين بمقدار 105% ($P \leq 0.001$) (المجموعة الرابعة) الجدول (6) الشكل (9).

دور الأجسام المضادة المعدلة للبيبتيد LEAP2 في تسكين الألم لدى جرذان Wistar

جدول (6) متوسط الزمن الكامن لنفوضة الذيل \pm الانحراف المعياري، وقيم p-value لدى الجرذان المحقونة بالغريلين والجرذان المحقونة بالبيبتيد LEAP2 والجرذان المحقونة بالتزامن بالغريلين + البيبتيد LEAP2 مقارنةً مع العتبات الشاهدة.

المادة المحقونة	القياس البدئي	القياس بعد الحقن	الفرق بين القياسين %	p-value بدئي/بعد الحقن	p-value للقيم بعد الحقن
الغريلين	3.5	7.2	105%	(P≤0.001)	(P≤0.001) LEAP2/الغريلين
LEAP2	3.9	3	-23%	(P≤0.05)	(P≤0.001) LEAP2+الغريلين/غريلين
غريلين + LEAP2	4	3.3	-17%	(P≤0.05)	(P=0.18) LEAP2+الغريلين / LEAP2



الشكل (9) مخطط بياني لمتوسط الزمن الكامن لنفوضة الذيل \pm الانحراف المعياري لدى الجرذان المحقونة بالغريلين والجرذان المحقونة بالبيبتيد LEAP2 والجرذان المحقونة بالتزامن بالغريلين + البيبتيد LEAP2 مقارنةً مع العتبات الشاهدة.

3. تحري سبيل الغريلين في تسكين الألم المحرض بحقن Anti-LEAP2.

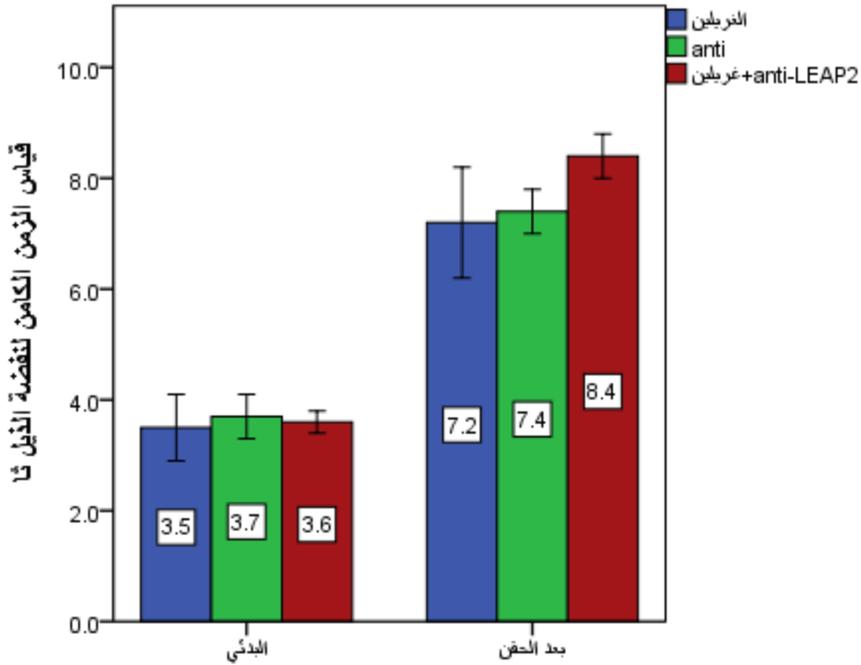
بهدف معرفة مدى توسط الغريلين السبيل الذي تسلكه Anti-LEAP2 في تسكين الألم. تم الحقن المتزامن للجرذان بالغريلين و Anti-LEAP2 (المجموعة السابعة).

حيث لوحظ وجود ارتفاع معنوي في عتبة الشعور بالألم البدئية بعد الحقن المتزامن السابق وبنسبة %133 ($P \leq 0.05$) (المجموعة السابعة)، ويمثل ذلك أيضاً لوحظ وجود ارتفاع معنوي في عتبة الشعور بالألم البدئية بعد حقن Anti-LEAP2 وبنسبة %100 ($P \leq 0.05$) (المجموعة الخامسة).

بالمقابل ارتفعت عتبة الشعور بالألم البدئية بعد حقن الغريلين بمقدار %105 ($P \leq 0.001$) (المجموعة الرابعة) جدول (7) الشكل [10].

جدول (7) متوسط الزمن الكامن لنفضة الذيل \pm الانحراف المعياري، وقيم p-value لدى الجرذان المحقونة بالغريلين والجرذان المحقونة Anti-LEAP2 والجرذان المحقونة بالتزامن بالغريلين + Anti-LEAP2 مقارنةً مع العتبات الشاهدة.

المادة المحقونة	القياس البدئي	القياس بعد الحقن	الفرق بين القياسين %	p-value بدئي/بعد الحقن	p-value للقيم بعد الحقن
الغريلين	3.5	7.2	105%	($P \leq 0.001$)	($P = 0.19$)
Anti-LEAP2	3.7	7.4	100%	($P \leq 0.05$)	
غريلين + Anti-LEAP2	3.6	8.4	133%	($P \leq 0.05$)	($P \leq 0.05$)



الشكل (10) مخطط بياني لمتوسط الزمن الكامن لنفضة الذيل \pm الانحراف المعياري لدى الجردان المحقونة بالغريلين والجرذان المحقونة Anti-LEAP2 والجرذان المحقونة بالتزامن بالغريلين + Anti-LEAP2 مقارنةً مع العتبات الشاهدة.

خامساً-المناقشة:

تؤكد نتائج الدراسة الحالية الخاصة بتقييم التغيرات الدالة على حدوث التهاب المفاصل الروماتيدي، إثر المعاملة بالبريستان (وتهدف المعاملة بالبريستان إلى تحريض البيتيد LEAP2 وإيضاح دور الأجسام المضادة المُعدلة للبيتيد LEAP2 في تسكين الألم) بأن تركيز البروتين الارتكاسي التفاعلي CRP والعامل الروماتيدي RF وعدد كريات الدم البيضاء WBC قد ارتفع بشكل ملحوظ لدى المجموعة المعاملة بالبريستان مقارنةً مع الشاهدة الشكل (2)، ويتفق ذلك مع الدراسات التي تبين أن معاملة الجردان بالبريستان تؤدي إلى تحريض التهاب مفاصل روماتيدي [19].

وفي ذات السياق وجدنا أن التهاب المفاصل الروماتيدي المحرض بالبريستان أدى إلى ارتفاع ملحوظ في تركيز الببتيد LEAP2 بنسبة %187 مع انخفاض في تركيز الغريلين بنسبة %57 وعتبة الشعور بالألم البدئية بنسبة %30.2 مقارنةً مع المجموعة الشاهدة. يتفق ذلك مع الدراسات التي تبين أنه قد يستخدم مستقبلاً الببتيد LEAP2 كمؤشر لحدوث التهاب المفاصل الروماتيدي لدى البشر، حيث ارتفع تركيز الببتيد LEAP2 بشكل ملحوظ لدى المرضى المصابين بالتهاب المفاصل الروماتيدي، وكذلك بعد الإصابات الالتهابية المحرصة بالميكروبات، أو نتيجة رد فعل مناعي [21].

بهدف التأكد من أن انخفاض عتبة الشعور بالألم على صلة بارتفاع تركيز الببتيد LEAP2، تم حقن الجرذان المعاملة بالبريستان Anti-LEAP2 حيث سجل ارتفاع عتبة الشعور بالألم البدئية بشكل جزئي وبنسبة %43 مقارنةً مع الجرذان المعاملة بالبريستان فقط، دون أن يصل هذا الارتفاع إلى مقدار عتبة الشعور بالألم البدئية (الشاهدة) الشكل (6)، بناءً عليه ربما تكون زيادة الحساسية الألمية المرتبطة بمعاملة الجرذان بالبريستان على صلة بببتيدات عصبية بعيدة عن الببتيد LEAP2 مثل الهيستامين والبروستاغلاندين والمادة p والغوماتات [22] على العموم يحتاج ذلك إلى مزيد من الأبحاث لمعرفة السبل التي يحفزها البريستان في إثارة الحساسية الألمية، وليس من المستبعد أن يكون هناك تداخل في سبل إثارة الحساسية الألمية بين الببتيدات العصبية السابقة وبين الببتيد LEAP2.

أما عن انخفاض تركيز الغريلين بعد المعاملة بالبريستان فإنه ربما تكون هناك إشارات متبادلة بين المعدة والكبد، حيث تحفيز الببتيد LEAP2 من الكبد يؤدي إلى تثبيط إفراز غريلين المعدة [4] وعليه لابد من مزيد من الأبحاث لكشف تلك العلاقة. وعلاوةً على ذلك نجد أن النتائج السابقة اقتصر على كشف بعض السبل المؤثرة في

تغير تركيز البيتيد LEAP2 دون أن توضح الآلية التي يسلكها البيتيد LEAP2 في تغير عتبة الشعور بالألم، ولمعرفة هذه الآلية لابد من توضيح أن البيتيد LEAP2 يعمل كحاصر للمستقبل (GHS-R1a) (مستقبل الغريلين) [4]، حيث لم يلاحظ وجود أي فروق معنوية في عتبة الشعور بالألم لدى جرذان المحقونة بالتزامن DLS مع البيتيد LEAP2 (المجموعة العاشرة) مقارنةً مع الجرذان المحقونة DLS فقط (المجموعة التاسعة) الشكل (8). مما يشير إلى تداخل مستقبل (GHS-R1a) (مستقبل الغريلين) في آلية تسكين الألم المحرصة بحقن Anti-LEAP2، وبما أن المستقبلات الأخيرة تتوسط دور الغريلين في تسكين الألم [1]، فإنه ربما يكون للبيتيد LEAP2 دور في زيادة الحساسية الألمية، ول Anti-LEAP2 دور في تسكين الألم، على اعتبار أن دراستنا الحالية قد أشارت إلى قدرة Anti-LEAP2 على الحد من تأثير البيتيد LEAP2 الحاصر لمستقبل (GHS-R1a) (مستقبل الغريلين)، حيث أدى الحقن المديد (لمدة 14 يوم) المتزامن ل Anti-LEAP2 مع البيتيد LEAP2 (المجموعة السابعة) إلى ارتفاع في وزن الجسم بنسبة 53.2%، بالمقارنة مع نتائج حقن البيتيد LEAP2 لوحده (المجموعة الثالثة)، وتجاوز هذا الارتفاع قيم متوسطات وزن الجسم لدى الجرذان الشاهدة ونسبة 21.7% الشكل (5). ويفسر هذا الارتفاع في متوسطات وزن الجسم عن القيم الشاهدة بقدرة Anti-LEAP2 على حجب تأثير البيتيد LEAP2 الداخلي أو المحقون خارجياً في خفض وزن الجسم، مما يعزز تأثير الغريلين الداخلي في زيادة وزن الجسم (4).

أضافة إلى ذلك أظهرت نتائج دراستنا ارتفاع عتبة الشعور بالألم البدئية بنسبة

100% بعد حقن Anti-LEAP2، وذلك عبر تثبيط الحجب الذي يمارسه البيتيد

LEAP2 على مستقبل (GHS-R1a) (مستقبل الغريلين)، مما يؤكد قدرة البيتيد

LEAP2 على تثبيط مستقبل الغريلين وكبح مسار الغريلين في تسكين الألم الشكل [9]،

كما أشارت دراستنا الحالية إلى أن حقن الغريلين خارجياً أدى إلى ارتفاع عتبة الشعور

بالألم بنسبة 105% الشكل (7)، مما يدل على دور حاسم للغريلين و Anti-LEAP2 في تسكين الألم، وهذا يتفق مع الدراسات التي أشارت إلى أن حقن الغريلين داخل البطينات الدماغية أو في تجويف البريتوان أعطى أثراً مسكناً للألم وكابحاً للشهية تم إحصاره بشكل نوعي بواسطة الحاصر الانتقائي لمستقبل هرمون الغريلين (DLS). كما افترض في هذه الدراسة أن الآلية التي يمارس من خلالها الغريلين تأثيره المسكن للألم قد تكون أفيونية الواسطة وذلك لأن حقن النالكوسون، الحاصر للمستقبلات الأفيونية، عاكس بشكل كبير التأثير المسكن للألم المُحرَّض بواسطة الغريلين [1].

ومن الجدير بالذكر الإشارة إلى أن حقن الببتيد LEAP2 أدى إلى إثارة الحساسية الألمية بنسبة 23% الشكل (7) وهي أقل من النسبة 28.2% الناتجة عن إثارة الحساسية الألمية بفعل الببتيد LEAP2 المحرض داخلياً بالبريستان الشكل (6)، بالتالي ربما يرتبط ذلك بتغير مقدار تركيز الببتيد LEAP2 في الدم أو بتغير درجة حجب الببتيد LEAP2 لمستقبل الغريلين في حال كان الببتيد LEAP2 محقوناً خارجياً أو محرضاً بالبريستان، وهذا ما يتطلب المزيد من الأبحاث على المستوى الجزيئي. وعلى العموم يعزز الببتيد LEAP2 المحقون خارجياً أو المحرض بالبريستان الحساسية الألمية بشكل ملحوظ، وتتفق نتائج هذه الدراسة مع الدراسات التي تشير إلى أن حقن الببتيد LEAP2 يؤدي إلى حجب وظائف الغريلين، حيث أدى حقن الببتيد LEAP2 في بطينات الدماغ أو البريتوان عند الجرذان إلى كبح وظائف الغريلين المركزي، المتمثلة في تحفيز الشهية [4] وربما أيضاً تسكين الألم على اعتبار وجود دور حاسم للغريلين في تسكين الألم [1].

كما أظهرت نتائج دراستنا بأن الحقن المشترك للببتيد LEAP2 و Anti- (المجموعة السابعة)، قد أدى إلى ارتفاع معنوي في عتبة الشعور بالألم البدئية

بمقدار 86% بالمقابل ارتفعت عتبة الشعور بالألم البدئية بعد حقن Anti-LEAP2 بمفرده بمقدار 100% (المجموعة الخامسة)، دون فارق ملحوظ عن ارتفاع عتبة الشعور بالألم البدئية للمجموعة السابقة.

الشكل (4) مما يؤكد قدرة Anti-LEAP2 على الارتباط في الموقع الفعال للبيبتيد LEAP2، وإبطال تأثيره داخل المتعضية وما ينتج عن ذلك من تعزيز وظائف الغريلين المتمثلة في زيادة الشهية وتسكين الألم [23،24،1]، على العموم يؤدي ذلك إلى تعاطم دور Anti-LEAP2 في تسكين الألم عبر قدرتها على تعزيز عمل الغريلين، وفي ذات السياق أيضاً لم نجد أي فرق ملحوظ بين مقدار تسكين الألم بعد حقن الغريلين (المجموعة الرابعة)، وبين مقدار تسكين الألم بعد حقن Anti-LEAP2 (المجموعة الخامسة). ويمكننا الاستنتاج بأن درجة تسكين الألم للغريلين المحقون خارجياً تساوي تقريباً درجة تسكين الألم المحرض للغريلين الداخلي المُقيد أو المحجوب بالبيبتيد LEAP2، وعلى النقيض من ذلك لوحظ تراجع واضح في مقدار تسكين الألم، وفرط في الحساسية الألمية بعد حقن البيبتيد LEAP2 (المجموعة الثالثة) مقارنةً مع الجرذان المحقونة غريلين أو المحقونة Anti-LEAP2. الشكل (7).

بالمقابل أدى الحقن المشترك للجرذان بـ Anti-LEAP2 مع الغريلين (المجموعة السابعة) إلى ارتفاع معنوي في عتبة الشعور بالألم البدئية بنسبة 133%، بينما اقتصر ارتفاع عتبة الشعور بالألم البدئية بعد حقن الغريلين على نسبة 105% فقط (المجموعة الرابعة)، وبعد حقن Anti-LEAP2 على نسبة 100% (المجموعة الخامسة) الشكل (10)، ومن المرجح أن يُعزى الارتفاع الواضح في عتبة الشعور بالألم البدئية بعد الحقن المشترك السابق إلى الزيادة في فاعلية الغريلين الناتجة عن تآزر الغريلين المحقون خارجياً مع الغريلين الداخلي المحرر من تثبيط البيبتيد LEAP2 بعد حقن Anti-LEAP2، ويتفق ذلك مع الدراسة التي أشارت إلى أن الحقن الوريدي

للغريلين في الفئران المجموعة أدى إلى خفض مستويات الببتيد LEAP2 البلاسمي وكذلك التعبير عن mRNA LEAP2 في الكبد وما ينتج عن ذلك من تسكين ألم [25]. وتزداد أهمية الحقن المشترك السابق إذا ثبت بأنه يحد من الآثار الجانبية للأفيونات الخارجية وهذا ما يتطلب المزيد من الأبحاث لكشف المسارات داخل الخلية المتعلقة بحساسية المستقبلات لربائطها، والمرتبطة بتفعيل مراكز داخل الدماغ الحوفي واللوزة الدماغية مسؤولة عن سلوك الإدمان [26].

خامساً-الاستنتاجات:

- 1- إن التهاب المفاصل الروماتيدي المحرض بالبريستاتان لدى جرذان wistar يؤدي إلى ارتفاع ملحوظ في تركيز الببتيد LEAP2، وانخفاض في تركيز الغريلين وعتبة الشعور بالألم.
- 2- قدرة الببتيد LEAP2 على تثبيط مستقبل الغريلين وكبح مسار الغريلين في تسكين الألم وتعزيز الشهية.
- 3- قدرة Anti-LEAP2 على رفع عتبة الشعور بالألم البدئية من خلال الارتباط بالموقع الفعال للببتيد LEAP2 وإبطال تأثيره على عتبة الشعور بالألم وتعزيز الشهية.

سادساً-التوصيات:

دراسة موسعة ومعقدة لتأثير رباط مستقبل الغريلين خارجية وداخلية المنشأ على كل من تسكين الألم والشهية ووزن الجسم، لما تنتطوي عليه من أهمية نظرية وتطبيقية في التعرف على آليات تحكم منظومة الغريلين بتسكين الألم والشهية وتطبيقاتها المباشرة في المجال الطبي السريري بعيداً عن الآثار الجانبية التي تسببها أدوية تسكين الألم الأخرى.

سابعاً-المراجع:

- 1- Wei, J., et al., In vivo characterization of the effects of ghrelin on the modulation of acute pain at the supraspinal level in mice. *Peptides*, 2013. 43: p. 76-82
- 2- Pirzadeh, S., Sajedianfard, J., Aloisi, A. M., & Ashrafi, M. (2019). Effects of intracerebroventricular and intra-arcuate nucleus injection of ghrelin on pain behavioral responses and met-enkephalin and β -endorphin concentrations in the periaqueductal gray area in rats. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2475.
- 3- Krause, A., et al., LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits Antimicrobial activity. *FEBS Lett*, 2000. 480(2-3): p. 147-50.
- 4- Ge, X., et al.,(2018). LEAP2 Is an Endogenous Antagonist of the Ghrelin Receptor. *Cell Metab.*, 27(2): p. 450-469.
- 5- Furness, S. G. B. Ringuet, M. T., Furness, J. B., &(2022). G protein-coupled receptor interactions and modification of signalling involving the ghrelin receptor, GHSR1a. *Journal of neuroendocrinology*, 34(9), e13077.
<https://doi.org/10.1111/jne.13077>**Cop**

.nbib

- 6- Sohn J. W. (2015). Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB reports*, 363 48(4), 229–233.
<https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.4.272>
- 7- Khatib, N., Gaidhane, S., Gaidhane, A. M., Khatib, M., Simkhada, P., Gode, D., & Zahiruddin, Q. S. (2014). Ghrelin: ghrelin as a regulatory Peptide in growth hormone secretion. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 8(8), MC13–MC17.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9863.4767>
- 8- Christopoulos, A., Changeux, J.-P., Catterall, W.A., Fabbro, D., Burris, T.P., Cidlowski, J.A., Olsen, R.W., Peters, J.A., Neubig, R.R., Pin, J.-et al.(2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC. Multisite pharmacology: recommendations for the nomenclature of receptor allosterism and allosteric ligands.
- 9- M'Kadmi C, Cabral A, Barrile F, Giribaldi J, Cantel S, Damian M, et al. NTerminal Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 2 (LEAP2) Region Exhibits Inverse Agonist Activity Toward the Ghrelin Receptor. *J Med Chem* (2019) 62:965–73. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01644 8.

- 10- Wang J, Li H, Shao X, Nie W, Liu Y, Xu Z, et al. Identifying the Binding Mechanism of LEAP2 to Receptor GHSR1a. FEBS J (2019) 286:1332–45. doi: 10.1111/febs.14763
- 11- Krause, A., et al., Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. Protein Sci, 2003. 12(1): p. 143–52.
- 12- Gortan, G. (2018). Ghrelin forms in the modulation of energy balance and metabolism. Eat Weight Disord., 40 (50): p. 110–130.
- 13- Mani, B.K., et al., LEAP2 changes with body mass and food intake in humans and mice. J Clin Invest, 2019. 129(9): p. 3909–3923.
- 14- Islam, M.N., et al., .Liver-expressed antimicrobial peptide 2 antagonizes the effect of ghrelin in rodents. J Endocrinol, 2020. 244(1): p. 13–23.
- 15- Liu, F., et al., Molecular cloning and expression analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in grass carp. Vet Immunol Immunopathol, 2010. 133(2–4): p. 133–43.
- 16- Casterlow, S., et al., An antimicrobial peptide is downregulated in the small intestine of Eimeria maxima-infected chickens. Poult Sci, 2011. 90(6): p. 1212–9

- 17- Hoffmann, MH., et al. The rheumatoid arthritis-associated autoantigen hnRNP-A2 (RA33) is a major stimulator of autoimmunity in rats with pristane-induced arthritis. *J Immunol.* 2007; 179: 7568-7576. PMID: 18025202
- 18- Kuroda, Y., et al., Distinctive patterns of autoimmune response induced by different types of mineral oil. *Toxicol Sci.* 2004; 78: 222-228. doi: 10.1093/toxsci/kfh063 PMID: 14718649
- 19- Tuncel, J., Haag, S., Hoffmann, M. H., Yau, A. C., Hultqvist, M., Olofsson, P., ... & Holmdahl, R. (2016). Animal models of rheumatoid arthritis (I): pristane-induced arthritis in the rat. *PLoS One*, 11(5), e0155936.
- 20- Fernlessy, M. R., & Lee, J. R. (1975). The assessment of and the problems involved in the experimental evaluation of narcotic analgesics. *Methods in narcotics research*, 76-79.
- 21- Francisco, V., Tovar, S., Conde, J., Pino, J., Mera, A., Lago, F & Gualillo, O. (2020). Levels of the novel endogenous antagonist of ghrelin receptor, liver-enriched antimicrobial peptide-2, in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrients*, 12(4), 1006.
- 22- Elson, C. J., Thompson, S. J., Westacott, C. I., & Bhoola, K. D. (1992). Update Mediators of Joint Swelling and

Damage in Rheumatoid Arthritis and Pristane Induced Arthritis. *Autoimmunity*, 13(4), 327–331

- 23– Khatib, M. N., Khatib, M., Gaidhane, S., Gaidhane, A., & Zahiruddin, Q. S. (2014). Ghrelin for regulating appetite and energy balance: A systematic review. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 4(3), 101–5.
- 24– Cummings, D. E. (2006). Ghrelin and the short–and long–term regulation of appetite and body weight. *Physiology & behavior*, 89(1), 71–84
- 25– Islam, M. N., Mita, Y., Maruyama, K., Tanida, R., Zhang, W., Sakoda, H., & Nakazato, M. (2020). Liver–expressed antimicrobial peptide 2 antagonizes the effect of ghrelin in rodents. *Journal of Endocrinology*, 244(1), 13–23.