

تأثير الكيتوزان بشكل منفرد وبالمشاركة مع الحمض الهيالوروني في التهاب المفاصل الروماتويدي (الريثاني) المحرض عند حيوانات التجربة

د. نزار عيسى¹

¹ أستاذ مساعد- قسم علم الحياة الحيوانية-كلية العلوم- جامعة دمشق - سورية

الملخص

يعتبر الالم وتخرب المفصل نتيجة الاصابة بالتهاب المفاصل الرثياني (RA) من التحديات الاساسية في المعالجة السريرية. صاحب العلاج النظامي لالتهاب المفاصل الرثياني العديد من الاتار الجانبية. يمكن ان تخفف المعالجة التقليدية بالحمض الهيالوروني (HA) من المرض، ولكنها مقيدة بصعوبة الحفاظ على فعالية العلاج على المدى الطويل. هدفت هذه الدراسة لإيجاد أدوية جديدة ومشاركات دوائية فعالة في علاج التهاب المفاصل الرثياني المحرض عند الحيوانات من خلال استعمال الكيتوزان بشكل منفرد وبالمشاركة مع الحمض الهيالوروني. حققت الارانب بمحل الكيتوزان (حمض الخل) وكيتوزان في البريتوان او في المفصل وبالمشاركة بين الكيتوزان وHA في المفصل أو البريتوان بعد احداث المرض. تم تقييم ثخانة المفصل ومرونته ووزن الارانب خلال ثلاثة أسابيع بعد تحريض المرض. أظهرت النتائج تأثير الكيتوزان بشكل منفرد أو بالمشاركة مع HA في علاج RA. كانت المعالجة بالمشاركة بين الكيتوزان وHA في المفصل أكثر فعالية مقارنة مع العلاجات الاخرى. يعزى ذلك الى البنية الكيميائية والخصائص الترميمية للمفصل،

التي يتمتع بها بالأساس كل من الكيتوزان وHA.



حقوق النشر: جامعة دمشق -سورية،
يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب

الترخيص

CC BY-NC-SA 04

الكلمات المفتاحية: الكيتوزان، الحمض الهيالوروني، التهاب المفاصل الرثياني، شفاء المفصل،
المعالجة.

Effect of chitosan alone and in combination with hyaluronic acid in an induced rheumatoid arthritis on experimental animals

Dr. Nizar Issa¹

¹Assistant prof- Department of animal biology–faculty of Science–Damascus University-Syria.

Abstract

Pain and joint destruction caused by Rheumatoid Arthritis (RA) is a major challenge in clinical treatment. Systemic treatment of rheumatoid arthritis has been accompanied with several side effects. Traditional treatment with hyaluronic acid (HA) can relieve the disease, but limited by the difficulty of long-term maintenance of efficacy. This study aimed to find new medicines and effective medicines combinations for the treatment of RA, which was induced in animals using chitosan alone and in combination with hyaluronic acid. Rabbits were injected diluent of chitosan (acetic acid) and chitosan in peritoneum or in joint and in combination between chitosan and hyaluronic acid in peritoneum or in joint. after disease induction. Results showed the effect of chitosan alone or in combination with hyaluronic acid in treatment of Rheumatoid Arthritis. The treatment by combination between chitosan and hyaluronic acid in joint was more effective compared with other treatments. This may be attributed to the chemical structure and innate joint healing properties of chitosan and HA.

Keywords: Chitosan, Hyaluronic acid, Rheumatoid Arthritis, Joint healing, treatment.



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

1- المقدمة Introduction:

التهاب المفاصل الرثياني (Arthritis Rheumatoid) RA هو مرض مناعي ذاتي التهابي مزمن، يحدث نتيجة فقدان التحمل المناعي للمستضدات الطبيعية (Schwalfenberg, 2012). يتصف RA بالتهاب الغشاء الزليلي المبطن للمفاصل والذي ينجم عنه لاحقا تخريب غير عكوس للغضروف وانسجة العظم (Li et al., 2021). يصيب حوالي 1% من مجمل سكان أوروبا والولايات المتحدة الأمريكية وحوالي 0,5% في مناطق جغرافية أخرى (Nogueira et al., 2016). تعد النساء أكثر عرضة للإصابة من الرجال بمعدل تقريبي 3:1 (Cross et al., 2014). على الرغم من أن السببية المرضية غير معروفة بشكل واضح، يمكن أن يعزى ظهور هذا المرض وأعراضه السريرية إلى عوامل وراثية و عوامل بيئية، الممرض *Mycobacteria*، التدخين، بالإضافة لبعض انواع الطعام (Meyer et al., 2017). تبقى الفيزيولوجيا المرضية لمرض RA غير واضحة، لكن من المؤكد بان التأثيرات التي تصيب بين عدد من الخلايا المؤثرة (على سبيل المثال البالعات والخلايا اللمفاوية التائية والخلايا الزليلية) والستروكينات الالتهابية مثل الإنترلوكين 1 (IL1) والإنترلوكين 6 (IL6) والعامل المنخر للورم (TNFα)، تساهم جميعا في مختلف التفاعلات التبادلية لهذا المرض (Smolen et al., 2007; Aletaha; and Smolen, 2018). نقيد مضادات الالتهاب غير الستيروئيدية Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs (NSAIDS) في السيطرة على الألم والالتهاب وهناك نوع آخر من الأدوية دعت بالأدوية المضادة للريثة المخففة للمرض. Disease Modifying Anti Rheumatic (DMARDs) والستيروئيدات القشرية التي يجب أن يكون استخدامها ضئيلا ولفترة قصيرة، واخيرا ظهرت الأدوية البيولوجية والعلاج الجيني (Wang et al., 2018; Gorantla et al., 2020). لكن تعاني الطرق العلاجية المطبقة حاليا في علاج RA من الفعالية المحدودة لهذه الادوية وضرورة استخدامها لفترة طويلة، ومن حدوث انتكاسات للمرضى. يضاف الى ذلك، الآثار الجانبية السيئة لبعضها وخصوصا الستيروئيدات القشرية (Buttgereit, 2020).

الحمض الهيلوروني (Hyaluronic Acid) (HA) عبارة عن متماثر طبيعي غير متفرع، ينتمي إلى مجموعة السكار المتغايرة والحاوية على الجلوكوز أمينوغليكان (GAGs)، يعد من المكونات الأساسية للمطرس خارج الخلوي (ECM) (Fallacara et al., 2018). يتألف من تكرار كبير من وحدات ثنائية السكر D-glucuronic acid و N-acetyl-D glucosamine. يرتبط هذين السكرين مع بعضهما بالرابطة الغليكوزيدية β-1-4 ليشكل وحدة ثنائية السكر، بينما ترتبط الوحدات ثنائية السكر بالرابطة الغليكوزيدية β-1-3 لتشكل سلسلة خطية (Bukhari et al., 2018). يؤدي HA دورا مهما في تسهيل حركة المفاصل وذلك نتيجة لخاصيته في امتصاص كمية كبيرة من الماء فيشكل مادة هلامية تعمل كمادة زلقة تسهل حركة المفاصل ووسادة لتحمل الضغط المطبق عليها (Karbownik et al., 2013). ما يؤكد أهمية هذا الحمض في عمل المفاصل ومرونتها، هو الارتباط الوثيق بين HA وأمراض التهاب المفاصل حيث يلاحظ تغيرات في كميته ووزنه الجزيئي خلال RA، بحيث ان كمية HA تزداد ولكن الوزن الجزيئي له يتناقص، وذلك بسبب تناقص درجة البهاء pH وازدياد كمية الجذور الحرة الاوكسجينية (ROS)، مما يؤدي الى فقدان ثخانة ولزوجة HA (De Souza et al., 2019). ويعد كما باقي مكونات المطرس خارج الخلوي له دورا مهما في نمو الخلايا وتمايزها وانقسامها الخيطي وهجرتها (Gupta et al., 2019)، حيث يؤثر HA على الخلايا من خلال عمله كإشارة ترتبط مع المستقبلات الالتصاقية السطحية له مثل CD44, RHAMM، حيث يتم التعبير عنها بكثرة على سطوح البالعات المفعلة عند مرضى التهاب الرثياني والتي تتوسط طرق نقل الإشارة في الالتهاب. بفضل مقدرة HA على الارتباط مع مستقبلاته السطحية وبخاصة مع CD44، اختير HA كجزيئة هدف من أجل تطوير علاجات جديدة من أجل RA (Yu et al., 2019). أثناء البحث عن علاجات جديدة لمرض RA، طور Zhou وزملاؤه (2018) نظام ايتاء لنواء ال (Prednisolone (P)، والذي يتكون من حبيبات نانوية دسمة صلبة Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) مغلفة ب (HA-SLN/PD) HA والذي أبدى مقدرة كبيرة في علاج RA حيث يبقى لفترة طويلة في الدم ويتراكم بشكل انتقائي في الانسجة الملتهبة (Zhou et al., 2018). انطلقا من هذا المبدأ طور Gouveia وزملاؤه (2018) ليبوزومات حساسة لpH والمعدلة بواسطة HA كنظام ايتاء لنواء Prednisolone Disodium

Phosphate (PDP) حيث أظهرت الدراسات الخلوية بان هذا النظام كان فعالا في تثبيط البالعات عن طريق الارتباط مع مستقبلات CD44 وفي زيادة تحرير الدواء في مكان الإصابة نتيجة لاستجابة الليبوزومات لتغيرات pH (Gouveia et al., 2018). في نفس السياق، طور Pandey وفريقه (2021) حبيبات نانوية من Hydroxyapatite المعدل من HA والمحمل بدواء Methotrexate (MTX) و Teriflunomide (TEF) والذي أثبت فعاليته في منع تفاقم المرض وحرص على اعادة التجديد المفصلي (Pandey et al., 2021). بناء على ما سبق، يمكن اعتبار الـ HA مكون مفتاح في معالجة الأمراض الالتهابية ومنها RA. من هنا تأتي أهمية دراسة HA في هذا البحث كعلاج محتمل لـ RA المحرض عند حيوانات التجربة.

يعد الكيتوزان (Chitosan) من المتماثرات (Polymers) الطبيعية واسعة الانتشار، وهو عديدٌ سُكَّاريدٌ خطي موجب الشحنة، مكون من وحدات D-غلوكونامين (وحدة منزوعة الاستيل) و N-استيل دي غلوكونامين (N-acetyl-D-glucosamine) (وحدة تحوي استيل) والمرتبطة مع بعضها البعض بروابط β -(1-4) (Dutta et al., 2006). في الواقع، يتمتع الكيتوزان بالعديد من الخصائص كالتدرك والتوافق الحيوي والسمية المنخفضة والفعالية الحيوية والفعالية المضادة للالتهاب والليكتيريا (Yaghoubi et al., 2015; Fuster et al., 2020). بالإضافة الى ذلك، وجود المجموعات الأمينية والهيدروكسيلية في الكيتوزان تجعله من الجزيئات المرشحة كمادة حيوية قابلة للاستعمال في التثام الجروح وتفعيل الخلايا الشبيهة بمصورات الليف وتوليد السيتوكينات وكقاطع للنزف ومضاد تخثر وعامل مساعد للقاحات.. الخ (Shi et al., 2015; Liu et al., 2018; Morin et al., 2019). علاوة على ذلك، يعرف الكيتوزان بقدرته على تثبيط تحطم الغضاريف والتهابات الغشاء الزليلي بفضل احتوائه على جزء كبير من مركب الغلوكوزامين (Comblain et al., 2017). أن ازدياد تأثير عوامل الخطر البيئية على الإصابة بالمسبب RA وخصوصا في البلدان النامية، دفعنا الى البحث عن علاجات جديدة طبيعية ذات اثار جانبية منخفضة وتساهم في نفس الوقت في التقليل من الأعراض السريرية للمرض وتحسن من نمط حياة المرضى.

2. مواد البحث وطرائقه Materials and Methods

1.1. المواد

تم في هذه الدراسة استعمال كل من الكيتوزان (419419-50G) عالي الوزن الجزيئي وبدرجة نزع أسئلة ($DD \geq 90\%$) و HA (5374-1G) من شركة Sigma وعامل فروند الناقص Incomplete Freund's adjuvant (IFA) من شركة (Sigma) وهيدروكسيد الصوديوم (480741) من شركة CARLO ERBA وحمض الخل الثلجي من شركة Merk ودي ايتيل ايتير محلي الصنع من أجل التخدير. كل المواد الكيميائية المستخدمة ذات درجة عالية من النقاوة.

2.2. تحضير الجزيئات المدروسة

حضر محلول الكيتوزان بحل 3 غ من الكيتوزان في 100 مل من محلول حمض الخل الثلجي (2%). تعدل درجة الباهاء pH بهيدروكسيد الصوديوم حتى تصبح 6,2. بينما حضر محلول من HA بحل 70 ملغ منه في 5 مل من دائرة الفوسفات (PBS) حتى تمام الاتحلال. بالنهاية، حضر محلول المشاركة بين الكيتوزان و HA وذلك بمزج 28 مل من محلول الكيتوزان المحضر مسبقا مع 2 مل من محلول HA المحضر مسبقا بحيث يحتوي كل 1 مل من محلول المشاركة على 0,028 غ من الكيتوزان و 0,0009 غ من HA.

3.3. الحيوانات المختارة

أجريت جميع التجارب على 25 أرنباً ذكراً يتراوح وزنها من 2,5-3 كغ، والتي تم شراؤها من مركز البحوث العلمية الزراعية السوري. وضعت الأرانب ضمن أقفاص مخصصة وبشروط حرارة ورطوبة الغرفة. قدم الغذاء المتوازن للأرانب بشكل يومي، حيث ترك لها حرية الوصول الى العلف الطبيعي والماء وتركت لمدة اسبوعين للتكيف مع الوضع الجديد قبل اجراء الاختبارات عليها. أجريت جميع التجارب والاختبارات في مركز الدراسات الباثية والبيولوجية لطفيليات اللشمانية (جامعة دمشق).

4.2. احداث التهاب المفاصل التجريبي

تمنع الحيوانات المراد حقنها من الطعام في اليوم السابق لعملية الحقن ويتم تخدير الحيوانات باستعمال دي ايتيل ايتير، حيث توضع قطنة مبللة بكمية مناسبة من الايتير ويترك الارنب تحت المراقبة حتى الدخول في مرحلة التخدير العميق.

تم احداث التهاب المفاصل التجريبي وفقا لطريقة Zewail وزملاؤه (2019) مع بعض التعديلات، وذلك بحقن 1 مل من سواغ IFA وبعد ذلك 1 مل من مستعمرة متوسطة الكثافة للمتقطرات اللانموزجية (*Atypicalmycobacteria*) (من مخابر وزارة الصحة السورية) باستعمال محقنة طبية سعة 1 مل وقياس 24 تحت الجلد في أسفل أخمص القدم اليمنى الخلفية للأرناب بمعدل حقنة واحدة ولمرة واحدة فقط. تدعى هذه الطريقة باسم (adjuvant induced arthritis (AIA أي تحريض RA بعامل مساعد. تم الانتظار لمدة 3 اسابيع حتى تظهر الإصابة بشكل واضح في المفصل. تم تحديد حجم القدم الخلفية اليمنى لكل أرناب باستخدام الفرنية (Bendele, 2001). تم حقن جميع الأرناب الداخلة في التجربة وفقا لهذا البروتوكول.

وزعت الارانب على خمس مجموعات كالتالي:

- المجموعة الأولى (المجموعة الشاهدة) وتضم 5 أرناب روماتويدية مرضية تم حقنها بمحل الكيتوزان بعد 3 أسابيع من الاخماج بمعدل جرعة يومية تعادل 5 مل من محلول حمض الخل الثلجي 2% و pH= 6,2 ولمدة ثلاثة أيام متتالية (15 مل).

- المجموعة الثانية وتضم 5 أرناب روماتويدية مرضية وتحقن بالكيتوزان فقط في البريتوان بعد 3 أسابيع من الاخماج بمعدل جرعة يومية تعادل 0,15 غ/الارنب (5 مل من محلول الكيتوزان المحضر مسبقا) ولمدة ثلاثة أيام متتالية حيث بلغت جرعة الكيتوزان الكلية في البريتوان 0,45 غ/الارنب.

- المجموعة الثالثة وتضم 5 أرناب روماتويدية مرضية وتحقن بالكيتوزان فقط في المفصل بعد 3 أسابيع من الاخماج بمعدل جرعة يومية تعادل 0,03 غ/الارنب (1 مل من محلول الكيتوزان المحضر مسبقا) ولمدة ثلاثة أيام متتالية حيث بلغت جرعة الكيتوزان الكلية في المفصل 0,09 غ/الارنب.

- المجموعة الرابعة وتضم 5 أرناب روماتويدية مرضية وتحقن بمحلول المشاركة الحاوي على الكيتوزان و HA معا في البريتوان بعد 3 أسابيع من الاخماج بمعدل جرعة يومية تعادل 0,14 غ/الارنب من الكيتوزان و 0,005 غ/الارنب من HA (5 مل من محلول المشاركة المحضر مسبقا) ولمدة ثلاثة أيام متتالية حيث بلغت الجرعة الكلية لكل من الكيتوزان و HA في البريتوان 0,42 غ/الارنب و 0,015 غ/الارنب على التوالي.

- المجموعة الخامسة وتضم 5 أرناب روماتويدية مرضية وتحقن بمحلول المشاركة الحاوي على الكيتوزان و HA معا في المفصل بعد 3 أسابيع من الاخماج بمعدل جرعة يومية تعادل 0,084 غ/الارنب من الكيتوزان و 0,003 غ/الارنب من HA (3 مل من محلول المشاركة المحضر مسبقا) وولمدة ثلاثة أيام متتالية حيث بلغت الجرعة الكلية لكل من الكيتوزان و HA في المفصل 0,25 غ/الارنب و 0,009 غ/الارنب على التوالي.

تم تقييم تطور الإصابة ب RA في المفصل من خلال قياس ثخانة مفصل القدم قبل حقن المتقطرات وبعد الحقن بشكل أسبوعي ولمدة ثلاثة اسابيع متتالية باستخدام الفرنية (الفرجار)، وبعد حقن العلاجات المحتملة وبشكل أسبوعي أيضا ولمدة ثلاثة اسابيع والتي تعكس بدورها الاثر العلاجي للجزيئات المدروسة تجاه RA. تم تقييم الاختلافات في حجم المفصل وأوزان الأرناب ومرونة المفصل وذلك وفق الدرجات التالية: اللينة الطبيعية (درجة 0)، القساوة الخفيفة (درجة 1)، القساوة المتوسطة (درجة 2)، القساوة الشديدة (درجة 3) (Pietrosimon et al., 2015).

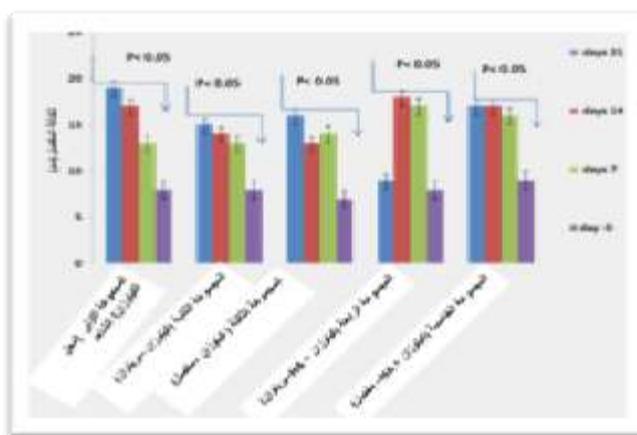
5.2. التحليل الاحصائي

تم التعبير عن جميع المعطيات في هذه الدراسة بالمتوسط الحسابي \pm الخطأ المعياري. كما تم اجراء الحسابات الاحصائية باستخدام برنامج SPSS الاصدار 22 وعند مستوى ثقة 95%. أجري اختبار تحليل التباين ثنائي الجانب Two-way ANOVA لدراسة دلالة الفروق الإحصائية بين المجموعات، متبوعا باختبار Tukey (النتائج ذات الدلالة الاحصائية عند $P < 0.05$).

3. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.3. تقييم تطور الإصابة السريري ب RA

يوجد العديد من نماذج الحيوانات الشائعة لإحداث RA. تتضمن النماذج التي أثبتت فعالية في أحداث RA في الحيوانات كل من الالتهاب الرثياني المحرض بالكولاجين الثاني، collagen type II induced arthritis، والالتهاب الرثياني المحرض بعامل مساعد (Choudhary *et al.*) antigen-induced arthritis (AIA) و adjuvant induced arthritis (AIA) المحرض بالمستضد (Choudhary *et al.*) 2018. في هذه الدراسة أحدث تحريض RA وفقا لأنموذج AIA باستعمال IFA والمكون من عامل استحلاب وزيت معدني ومن المتفطرات (Mycobacteria) (Zewail *et al.*, 2019; Kamel *et al.* 2016; Choudhary *et al.*, 2018). تتميز طريقة AIA بسرعة أحداث المرض وتطور اعراضه مثل التهاب مفصلي متعدد وحدوث اضطرابات مناعية في كامل الجسم وتضخم المفصل وتخريب الغضاريف لاحقا (Choudhary *et al.*, 2018)، ويستخدم هذا الأنموذج بشكل واسع في الاختبارات ما قبل السريرية للعوامل المضادة لالتهاب المفاصل والتي تكون تحت التقييم السريري أو ما قبل السريري أو حتى المستخدمة حاليا في علاج هذا المرض. في الواقع يعتبر هذا الأنموذج اقرب طريقة تجريبية مشابهة لالتهاب المفاصل الرثياني عند البشر. يوضح الشكل 1 متوسط ثخانة مفصل قدم الأرنب لمجموعات التجربة المختلفة والتي تم قياسها قبل حقن المتفطرات وبعد الحقن خلال ثلاثة أسابيع متتالية. كشفت النتائج بأن جميع الأرنب في كل المجموعات قد تطورت عندها الإصابة، حيث ازدادت سماكة مفصل القدم وظهور تقرحات في أماكن الحقن بالتتالي على مدى 21 يوم من أحداث الإصابة، وهذا يؤكد على تطور الافة لدى جميع الأرنب المدروسة.



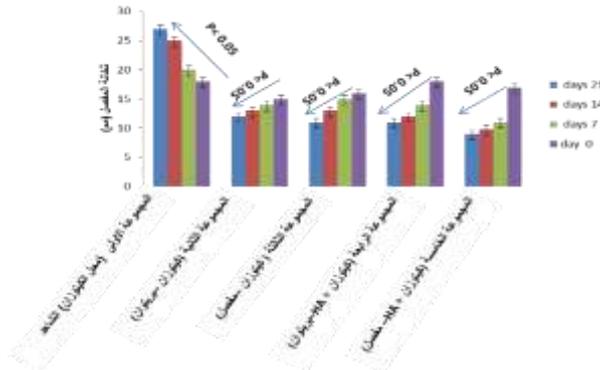
الشكل(1): متوسط قياس ثخانة مفصل قدم الأرنب في الأيام 0 (قبل الأخماج) و 7 و 14 و 21

بعد الأخماج لمجموعات التجربة المختلفة.

بينت نتائج اختبار تحليل التباين ثنائي الجانب ANOVA أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد فروق ذات دلالة احصائية في قيم الثخانة بتأثير الزمن بين المجموعات (تأكيد حدوث الإصابة ب RA بنفس السوية عند جميع الأرنب). علاوة على ذلك، تم حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين ثخانة مفصل القدم (مم) والزمن بين مجموعات التجربة لتأكيد حدوث الإصابة، فقد وجد أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05، أي انه عند مستوى الثقة 95% يوجد علاقة ارتباط خطية ايجابية بين الزمن وثخانة مفصل قدم الأرنب عند جميع أرنب مجموعات التجربة (تأكيد حدوث الإصابة في جميع المجموعات). تبين أيضا نتيجة المقارنة الثنائية بين المجموعات وفقا لاختبار Tukey أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05 بالنسبة لجميع المقارنات الثنائية بين المجموعات، مما يؤكد عدم وجود فروق معنوية بين المجموعات بتأثير الزمن. في

خلاصة النتائج تبين ان الانموذج المتبع في هذه الدراسة لأحداث RA وفقا لطريقة الألتهاب الريثاني المحرض بعامل مساعد Adjuvant Induced Arthritis (AIA) يعتبر طريقة جيدة ومثالية لتحريض الإصابة RA عند حيوانات التجربة.

2.3. اختبار تأثير الكيتوزان منفردا وبالمشاركة مع HA على تطور الإصابة السريري RA تمت دراسة تأثير الكيتوزان بشكل منفرد وبالمشاركة مع الHA على تطور الإصابة السريري RA من خلال اخماج عدد من الارانب (25 أرنب موزعة على خمس مجموعات n=5) بالمتقطرات اللانموجية (Atypicalmycobacteria) والانتظار ثلاثة أسابيع ريثما تتطور الإصابة. بعد ذلك عولجت المجموعة الاولى (الشاهد) بمحل الكيتوزان والمجموعة الثانية والثالثة بالكيتوزان بشكل منفرد حقنا بالبريتوان أو بالمفصل على التوالي، بينما عولجت المجموعة الرابعة والخامسة بالمشاركة بين الكيتوزان والHA حقنا في البريتوان أو المفصل على التوالي. تم تقييم تطور الإصابة من خلال قياس ثخانة قدم الارانب (حجم القدم) ومرونة مفصل القدم وتغيرات وزن الارانب. يشير الشكل 2 الى أن المعالجة بالكيتوزان منفردا أو بالمشاركة مع HA حقنا بالبريتوان او بالمفصل أدت الى تراجع الإصابة (نقصان ثخانة مفصل قدم الأرنب) عند جميع الارانب في المجموعات، باستثناء المجموعة الشاهدة المعالجة بمحل الكيتوزان (محلول حمض الخل 2% pH=6.2) التي لم يسفر عن تراجع الإصابة بل استمرت بالتطور. أوضحت النتائج أيضا بأن المجموعة التي تم علاجها بالمشاركة بين الكيتوزان و HA حقنا بالمفصل (الجرعة الكلية لكل من الكيتوزان و HA 0,25 غ/الارنب و 0,009 غ/الارنب على التوالي) كانت الاقل ثخانة بمفصل القدم مقارنة مع بقية المجموعات. بينت نتائج اختبار تحليل التباين ثنائي الجانب ANOVA لدراسة دلالة الفروق في متوسط ثخانة مفصل قدم الأرنب بين المجموعات الخمس المدروسة بتأثير الزمن، أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة من القيمة 0,05، أي أنه عند مستوى ثقة 95% توجد فروق ذات دلالة احصائية في قيم متوسطات ثخانة مفصل قدم الأرنب بين المجموعات بتأثير الزمن (الشكل 2).



الشكل(2): متوسط قياس ثخانة مفصل قدم الأرنب. لمجموعات التجربة المختلفة بعد المعالجة بمحل الكيتوزان (محلول حمض الخل 2%) (الشاهد) و بالكيتوزان حقنا في البريتوان بجرعة كلية (0,45 غ/ الأرنب) و حقنا في المفصل بجرعة كلية (0,09 غ/ الأرنب) وبالمشاركة (كيتوزان+ HA) حقنا في البريتوان (الجرعة الكلية لكل من الكيتوزان و HA 0,42 غ/الارنب و 0,015 غ/الارنب على التوالي) وحقنا في المفصل (الجرعة الكلية لكل من الكيتوزان و HA 0,25 غ/الارنب و 0,009 غ/الارنب على التوالي) في الأيام 0 (قبل المعالجة) و 7 و 14 و 21 بعد المعالجة.

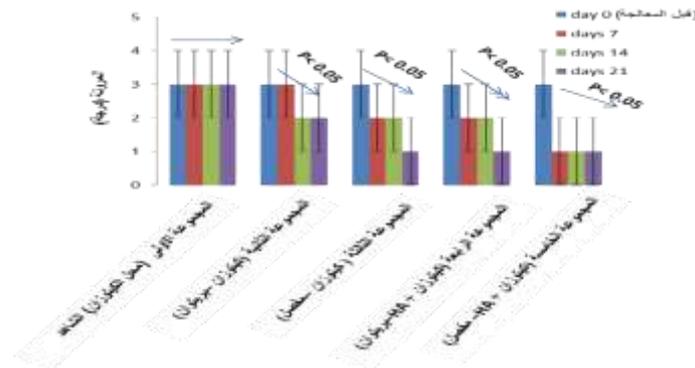
ولمعرفة أي من المتوسطات يختلف عن الآخر تم اجراء المقارنة الثنائية وفق اختبار Tukey، حيث تبين ان قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05 عند المقارنة في قيم متوسطات ثخانة مفصل القدم (مم) عند الأرنب بين المجموعة الشاهدة الاولى (محل الكيتوزان وكل من المجموعة الثانية (المعالجة بالكيتوزان حقنا بالبريتوان بجرعة كلية 0,45 غ/ الأرنب) والمجموعة الثالثة (المعالجة بالكيتوزان حقنا بالمفصل بجرعة كلية 0,09 غ/ الأرنب) والمجموعة الرابعة (المعالجة بالمشاركة بين الكيتوزان و HA حقنا بالبريتوان بجرعة كلية لكل من الكيتوزان و HA 0,42 غ/الارنب و 0,015 غ/الارنب على التوالي) والمجموعة الخامسة (المعالجة بالمشاركة بين الكيتوزان و HA حقنا بالمفصل بجرعة كلية لكل من الكيتوزان و HA 0,25 غ/الارنب و 0,009 غ/الارنب على التوالي)، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ثنائية دالة احصائيا في متوسط ثخانة قدم مفصل الأرنب بين المجموعة

الشاهدة (محل الكيتوزان) وباقي المجموعات المذكورة أعلاه، وهذا يؤكد على فعالية الكيتوزان سواء منفردا أو بالمشاركة مع HA في علاج RA المحدث عند حيوانات التجربة. أيضا توجد فروق ثنائية ذات دلالة احصائية في متوسط ثخانة مفصل القدم بين المجموعة الخامسة وباقي المجموعات، مما يدل على فعالية العلاج بالمشاركة بين الكيتوزان وHA حقنا بالمفصل مقارنة مع باقي العلاجات المطبقة. لدراسة طبيعة العلاقة بين مدة تطبيق العلاج (أيام) وقيم متوسطات ثخانة مفصل قدم الارانب (مم)، تم حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون، حيث تبين ان قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى ثقة 95%، يوجد ارتباط خطي سلبي بين ثخانة المفصل والزمن (تراجع ثخانة المفصل مع الزمن) بعد المعالجة بالكيتوزان منفردا أو بالمشاركة مع HA في جميع المجموعات ما عدا مجموعة الشاهد المعالجة بمحل الكيتوزان. كشف حساب النسبة المئوية لثخانة مفصل القدم عن تراجع الاصابة عند جميع الارانب في جميع المجموعات بنسب متفاوتة باستثناء مجموعة الشاهد (محل الكيتوزان) (جدول 1). وهذا يؤكد مرة أخرى على فعالية الكيتوزان منفردا أو بالمشاركة مع HA كعلاج محتمل لRA.

الجدول (1): النسبة المئوية لتراجع الاصابة RA بعد المعالجة بالكيتوزان منفردا أو بالمشاركة مع HA حقنا بالمفصل او بالبريتوان.

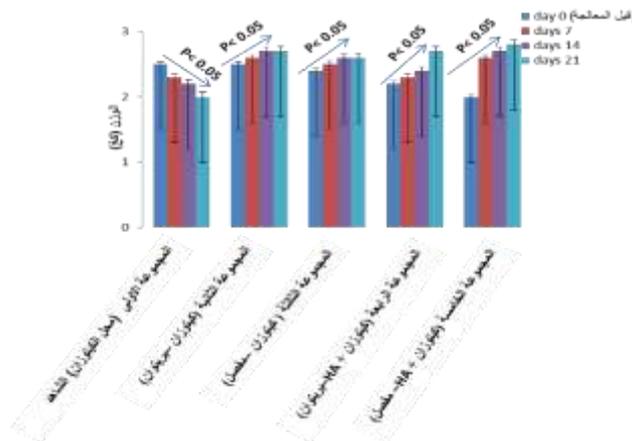
المجموعة	نسبة تراجع الاصابة بعد (أسبوع) %	نسبة تراجع الاصابة بعد (أسبوع) %	نسبة تراجع الاصابة بعد (أسبوع) %
كيتوزان (بريتوان)	7± 1	13± 0.7	20± 0.9
كيتوزان (مفصل)	7± 0.8	19± 0.6	31± 0.8
كيتوزان + HA (بريتوان)	22± 0.5	33± 0.7	39± 0.7
كيتوزان + HA (مفصل)	35± 1	42± 1.2	47± 0.6

قيست مرونة مفصل قدم الارانب قبل المعالجة وبعدها وصنفت ضمن أربع درجات: الليونة الطبيعية (درجة 0)، القساوة الخفيفة (درجة 1)، القساوة المتوسطة (درجة 2)، القساوة الشديدة (درجة 3) (Pietrosimon et al., 2015). يشير الشكل 3 الى أن المعالجة بالكيتوزان منفردا أو بالمشاركة مع HA حقنا بالبريتوان او بالمفصل أدت الى تحسن مرونة مفصل القدم عند جميع المجموعات باستثناء مجموعة الشاهد (المعالجة بمحل الكيتوزان)، التي لم تتراجع عندها الاصابة، حيث بقيت حركة المفصل من الدرجة 3 (قساوة شديدة) طوال مدة التجربة (21 يوم). كشفت النتائج أيضا بأن المجموعة التي تم علاجها بالمشاركة بين الكيتوزان وHA (الجرعة الكلية لكل من الكيتوزان وHA 0,25 غ/الارنب و0,009 غ/الارنب على التوالي) حقنا بالمفصل، بالمقارنة مع بقية المجموعات قد تراجعت عندها حدة الاصابة وبشكل ملحوظ، أي تحسنت مرونة المفصل وتحولت من القساوة الشديدة (درجة 3) الى القساوة الخفيفة (درجة 1) بدءا من الأسبوع الأول، مما يؤكد فعالية العلاج بالمشاركة بين الكيتوزان وHA حقنا بالمفصل مقارنة مع العلاج بالمشاركة بين الكيتوزان وHA حقنا بالبريتوان أو مع الكيتوزان منفردا سواء ان كان محقونا في المفصل أو البريتوان. احصائيا، وجد فروق ثنائية دالة احصائيا في متوسط درجات مرونة المفصل بين المجموعة الشاهدة (محل الكيتوزان) وباقي المجموعات المذكورة أعلاه ($P < 0.05$)، وهذا يؤكد على فعالية الكيتوزان سواء منفردا أو بالمشاركة مع HA في علاج RA المحدث عند حيوانات التجربة. كما توجد فروق ثنائية ذات دلالة احصائية في متوسط درجة مرونة مفصل القدم بين المجموعة الخامسة وباقي المجموعات ($P < 0.05$)، مما يدل على فعالية العلاج بالمشاركة بين الكيتوزان وHA حقنا بالمفصل مقارنة مع باقي العلاجات المطبقة. كذلك، يوجد ارتباط خطي سلبي بين درجة مرونة المفصل والزمن (تراجع درجة مرونة المفصل من القساوة الشديدة الى المتوسطة والخفيفة مع الزمن) بعد المعالجة بالكيتوزان منفردا أو بالمشاركة مع HA في جميع المجموعات ما عدا مجموعة الشاهد المعالجة بمحل الكيتوزان التي بقيت فيها درجة مرونة المفصل شديدة القساوة ($P < 0.05$).



الشكل (3): متوسط درجات مرونة مفصل قدم الأرانب في الأيام (قبل الأحماج) و 7 و 14 و 21 بعد الأحماج لمجموعات التجربة المختلفة.

يلاحظ في الشكل 4 ادناه أن المعالجة بالكيتوزان منفرداً أو بالمشاركة مع HA حقناً بالبريتون أو بالمفصل أدت إلى تحسن وزن الارانب عند جميع المجموعات باستثناء مجموعة الشاهد (المعالجة بمحل الكيتوزان)، التي لم يزداد عندها الوزن، بل على العكس تراجع الوزن طوال مدة التجربة (21 يوم). كشفت النتائج أيضاً بأن المجموعة التي تم علاجها بالمشاركة بين الكيتوزان و HA حقناً بالمفصل (الجرعة الكلية لكل من الكيتوزان و HA 0,25 غ/الارنب و 0,009 غ/الارنب على التوالي)، بالمقارنة مع بقية المجموعات قد ازداد فيها وزن الارانب وبشكل ملحوظ بدءاً من الأسبوع الأول، مما يدل على تحسن صحة الأرانب و يؤكد فعالية العلاج بالمشاركة بين الكيتوزان و HA حقناً بالمفصل مقارنة مع العلاج بالمشاركة بين الكيتوزان و HA حقناً بالبريتون أو مع الكيتوزان منفرداً سواء ان كان محقوناً في المفصل أو البريتون. وجد فروق ثنائية دالة احصائياً في متوسط وزن الارانب بين المجموعة الشاهدة (محل الكيتوزان) وباقي المجموعات المذكورة أعلاه ($P < 0.05$)، وهذا يؤكد على فعالية الكيتوزان سواء منفرداً أو بالمشاركة مع HA في علاج RA المحدث عند حيوانات التجربة. كذلك، يوجد ارتباط خطي ايجابي بين وزن الارانب والزمن (ازدياد وزن الارانب مع الزمن) بعد المعالجة بالكيتوزان منفرداً أو بالمشاركة مع HA في جميع المجموعات ما عدا مجموعة الشاهد المعالجة بمحل الكيتوزان التي تناقص فيها الوزن ($P < 0.05$).



الشكل (4): متوسط تغير وزن الأرانب (كغ) في الأيام 0 (قبل الأحماج) و 7 و 14 و 21 بعد الأحماج لمجموعات التجربة المختلفة.

في خلاصة النتائج تبين أن استخدام الكيتوزان منفرداً أو بالمشاركة مع HA حقناً في المفصل أو في البريتون قد ساهم في تراجع الاصابة RA المحدث عند حيوانات التجربة، حيث أظهرت قياسات ثخانة القدم ومرونة المفصل ووزن الارانب تراجعاً واضحاً في حدة الاصابة وتحسن ملحوظ بصحة الارانب. تظهر نتائج هذه الدراسة امكانية استخدام الكيتوزان بشكل منفرد وبالمشاركة مع HA في سياق المركبات المستخدمة في علاج RA.

يهدف العلاج الطبي بشكل خاص لمرضى التهاب المفاصل الرثياني (RA) الى التقليل من الالم واليبوسة في المفاصل ولاحقا الى تحسين حالة المفصل والتخفيف من الالتهاب. وجد بأن التأزر بين الادوية كان فعالا في علاج RA (Wang *et al.*, 2018). يعتبر الكيتوزان من المتمثرات الطبيعية موجب الشحنة ومتوافق حيويًا وغير سام وغير مثير للمناعة، ويملك بالأساس العديد من الخصائص العلاجية للمفصل، مما يسمح باستخدامه في المجالات الطبية والصيدلانية والتجميلية وإعادة تجديد الانسجة (Ben-Shalom *et al.*, 2009) ايضا، يملك الكيتوزان بعض الوظائف المناعية، حيث يمكنه تثبيط السيتوكينينات الالتهابية الاولية ويحفز تكاثر الخلايا الغضروفية (Friedman *et al.*, 2013) في الواقع يبقى استعمال الكيتوزان حاليا بشكل محقون محدودا، كون الكيتوزان يمكن أن يسبب تجدد الكريات البيضاء ويحدث نتيجة ذلك ردود فعل التهابية ومناعية غير مرغوب فيها (Kosaka *et al.*, 1996) حديثا، وجد بأن الجل المحضر من الكيتوزان وHA يؤخر تطور الاصابة بالتهاب العظم الرثياني Osteoarthritis (OA) عند أنموذج حيوانات التجربة (Pachornik *et al.*, 2013). علاوة على ذلك، اكدت الدراسات في المختبر بأن الكيتوزان يحسن من التعبير عن مكونات المطرس الغضروفي ويمنع افراز الوسائط الالتهابية والمهدمة (Lahiji *et al.*, 2000; Oprenyesz *et al.*, 2015) واطهر مقدرة في تزليق (Lubrication) المفصل عند الانسان عندما تم حقنه في المفصل (Chen *et al.*, 2000). يلعب HA دورا في استعادة مرونة السائل الزليلي وكذلك يحافظ على سلامة الغضاريف وينظم التهاب المفصل ويخفف من الالم (Moreland *et al.*, 2003)، ولكن لا يمكن لتأثير HA ان يستمر وذلك بسبب تحطمه السريع وتأثيره المفرد. أثبتت الدراسة الحالية بان استخدام الكيتوزان بشكل منفرد او بالمشاركة مع HA وذلك بالحقن سواء بالمفصل أو البريتوان ادى الى تراجع الاصابة في انموذج RA المحدث عند حيوانات التجربة، وقد تفوق حقن الكيتوزان منفردا او بالمشاركة مع HA على مجموعة الشاهد والمحقونة بمحل الكيتوزان (محلول حمض الخل 2% - pH=6.2). ومن جهة أخرى، سبب حقن الكيتوزان منفردا في المفصل تراجعا ملحوظا في سماكة مفصل القدم بمقدار 31% وتحسنت المرونة بمقدار درجتين من القساوة الشديدة (درجة 3) الى القساوة الخفيفة (درجة 1) وزيادة في الوزن بعد ثلاثة أسابيع من المعالجة، مقارنة مع حقن الكيتوزان في البريتوان، حيث تراجعت سماكة القدم بمقدار 20% فقط وتحسنت مرونة المفصل بمقدار درجة واحدة من القساوة الشديدة الى القساوة المتوسطة وزيادة طفيفة بالوزن خلال نفس فترة العلاج. وبشكل مهم وملحوظ للغاية، لوحظ في المجموعة المعالجة بالمشاركة بين الكيتوزان وHA بشكل محقون بالمفصل تراجعا واضحا في سماكة مفصل القدم بمقدار 47% بعد 3 أسابيع من المعالجة وتحسنت المرونة بمقدار درجتين من القساوة الشديدة (درجة 3) الى القساوة الخفيفة (درجة 1) وزيادة في الوزن بدءا من الاسبوع الأول للمعالجة، مقارنة مع المجموعة المعالجة بحقن الكيتوزان بالمشاركة مع HA في البريتوان، حيث تراجعت سماكة القدم بمقدار 39% بعد 3 أسابيع من المعالجة وتحسنت المرونة بمقدار درجتين من القساوة الشديدة (درجة 3) الى القساوة الخفيفة (درجة 1) وزيادة في الوزن بدءا من الاسبوع الثاني للمعالجة. بالنتيجة، تعتبر فعالية العلاج بالمشاركة بين الكيتوزان وHA في المفصل أفضل مقارنة مع العلاج بالمشاركة بينهما في البريتوان، وكذلك كان حقن الكيتوزان منفردا بالمفصل أكثر فعالية في علاج RA مقارنة مع حقنه في البريتوان. تتضمن الية التأثير المحتملة التصاق كل من الكيتوزان وHA على الغضروف مباشرة أو تحفيز خلايا الغضروف على الانقسام والتكاثر (Lu *et al.*, 1999). من الممكن ان يلعب الكيتوزان دورا علاجيا مهما في RA كونه يحتوي في تركيبه الكيميائي على الغلكوز أمين والذي يعرف بدوره المثبط للالتهاب ويحفز تخليق السكريات البروتينية ويحفز تكاثر الخلايا الغضروفية ويثبط اصطناع انزيمات التحلل البروتيني التي تشارك في تحطيم السائل الغضروفي وتسبب في موت الخلايا الغضروفية (Block *et al.*, 2010)، وهذا في الواقع ما يفسر دور الكيتوزان العلاجي في هذه الدراسة. يمكن عزو الاثر العلاجي HA الى احتوائه على مركبات Glycosaminoglycans (GAGs) والتي تعتبر من المكونات الاساسية للغضروف وتعمل كسائل مزلق في الغشاء الزليلي للمفصل وهذا ما يوضح الاثر العلاجي HA. بالنظر الى ما سبق، يمكن القول بأن التأثير التازري بين الكيتوزان وHA كان له دورا جليا في تناقص ثخانة المفصل وتحسن مرونته وازدياد وزن الارانب وتراجع الاصابة RA المحدث عند حيوانات التجربة بشكل عام. توافقت نتائج استعمال الكيتوزان وHA في علاج RA المحدث عند حيوانات التجربة في هذه الدراسة مع العديد من

الدراسات التي درست استعمال كل من الكيتوزان و HA بشكل منفرد او على شكل هجين من كليهما في علاج RA، حيث تبين أن استعمال هجين من الكيتوزان و HA يمنع تحطم الغضروف ويحسن من مرونته عند الارانب المحدث لديها (Zewail, RA, 2017; Yu et al., 2019; Comblain et al., 2021). من الممكن ان يقوم HA بالتقليل من الالتهاب عندما يتدرك الكيتوزان وهذا ما يفسر ازدياد وزن الارانب وتحسن مرونة المفصل وتراجع سماكة القدم عند الارانب في هذه الدراسة. يلعب الاثر العلاجي لكل من الكيتوزان و HA في تخفيف الالم في مفصل القدم وهذا ما أثبتته ازدياد وزن الارانب عند حقن كل من الكيتوزان و HA بالمشاركة في مفصل القدم بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة.

5.5 الاستنتاجات والتوصيات

- تم في هذه الدراسة تسجيل نتائج الفعالية العلاجية للكيتوزان بشكل منفرد وبالمشاركة مع الحمض الهياوريني في علاج التهاب المفاصل الرتياني المحرض لدى حيوانات التجربة بطريقة (AIA)، حيث ادى هذا النموذج من العلاج الى تراجع الاصابة RA وحسن من وظيفة المفصل عند حيوانات التجربة.
- يمكن عزو هذا التأثير العلاجي لكل من الكيتوزان و HA الى تركيبهما الكيميائي الذي يشابه الى حد كبير جدا مكونات المفصل وكونهما يملكان بالأساس خصائص مضادة للالتهاب ومرممة للمفصل.
- في هذه الدراسة، جسد علاج RA بالمشاركة بين الكيتوزان و HA بداية الفعل العلاجي المرتقب وتشكيل منعطف هام في علاج التهاب المفاصل الرتياني بتكلفة واثار جانبية أقل.
- ضمن حدود نتائج هذه الدراسة نوصي بإجراء دراسة لاحقة لبحث الاستجابة المناعية عند الحيوانات المحرض لديها RA والمعالجة بالجزينات المدروسة من خلال معايرة السيتوكينات المناعية مثل IL-12 و IL-4 والانتريفيرون الفا (TNF- α)، وكذلك دراسة الاستجابة الالتهابية للعلاج من خلال حساب سرعة تنقل الدم.

6. المراجع

- [1]. Aletaha, D., and Smolen, J. S. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. (2018). Jama320 (13),

- 1360–1372. doi:10.1001/jama13103.
- [2]. Bendele, A.M, Animal models of rheumatoid arthritis. *J. Musculoskels Neuron Interact*; 1(4): 377-385 (2001).
- [3]. Ben-Shalom, N., Nevo, Z. Patchornik, A., and Robin-son, D. “Novel injectable chitosan mixtures forming hydrogels Patent number 20090004276. 2011. USA. (2009).
- [4]. Block JA, Oegema TR, Sandy JD, Plaas A. The effects of oral glucosamine on joint health: is a change in research approach needed? *Osteoarthritis* .(2010).
- [5]. Bukhari, S.N.A.; Roswandi, N.L.; Waqas, M.; Habib, H.; Hussain, F.; Khan, S.; Sohail, M.; Ramli, N.A.; Thu, H.E.; Hussain, Z. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* (2018).,120, 1682–1695. [CrossRef] [PubMed].
- [6]. Buttgerreit, F. Views on Glucocorticoid Therapy in Rheumatology: the Age of Convergence. *Nat. Rev. Rheumatol.* (2020).16 (4), 239–246. doi:10.1038/s41584-020-0370-z.
- [7]. Chen, A. M, Hou, C. et al., “Clinical study of chitosan for Pre-vention of Knee Adhesion. *Academic Journal of Second Military Medical University.* (2000). no. 2.
- [8]. Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* (2018). 40(3), 193–200.
- [9]. Comblain F, Rocasalbas G, Gauthier S, Henrotin Y. Chitosan: apromising polymer for cartilage repair and viscosupplementation. *Biomed Mater Eng.* (2017). ;28:S209–15.
- [10]. Cross, M., Smith, E., Hoy, D., Carmona, L., Wolfe, F., Vos, T., et al. The Global burden of Rheumatoid Arthritis: Estimates from the Global burden of Disease 2010 Study .*Ann. Rheum. Dis.* (2014). 73 (7), 1316–1322. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204627.
- [11]. De Souza, A.B.; Chaud, M.V.; Santana, M.H.A. Hyaluronic acid behavior in oral administration and perspectives for nanotechnology-based formulations: A review. *Carbohydr. Polym.* (2019). 222, 115001. [CrossRef].
- [12]. Dutta, P. K.; Tripath, S.; Mehrotra, G. K. & Dutta, J. Perspectives for chitosan –based antimicrobial film in food application. *Food Chem,* (2009). 114:1173-1182.
- [13]. Fallacara, A.; Baldini, E.; Manfredini, S.; Vertuani, S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers.* (2018).,10, 701. [CrossRef] [PubMed].
- [14]. Friedman A J, Phan J, Schairer DO et al.. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens. (2013). *JID*133(5), 1231–1239.
- [15]. Fuster, M. G, Montalbán , G. Carissimi , B. Lima , G. E. Feresin , M. Cano , J. J. Giner-Casares , J. J. López-Cascales , R. D. Enriz and G. Villora. Antibacterial Effect of Chitosan–Gold Nanoparticles and Computational Modeling of the Interaction between Chitosan and a Lipid Bilayer Model, (2020). 25. November, MDPI. <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/12/2340>.
- [16]. Gorantla S, Singhvi G, Rapalli VK et al.. Targeted drug-delivery systems in the treatment of rheumatoid arthritis: recent advancement and clinical status. *Ther. Deliv.* (2020). 11(4), 269–284
- [17]. Gouveia, V.M.; Lopes-de-Araújo, J.; Lima, S.A.C.; Nunes, C.; Reis, S. Hyaluronic acid-conjugated pH-sensitive liposomes for targeted delivery of prednisolone on rheumatoid arthritis therapy. *Nanomedicine.* (2018). 13, 1037–1049. [CrossRef].
- [18]. Gupta, R.C.; Lall, R.; Srivastava, A.; Sinha, A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Front. Vet. Sci.,* (2019). 6, 192. [CrossRef].
- [19]. Kamel R, Salama AH, Mahmoud A.A. Development and optimization of self-assembling nanosystem for intra-articular delivery of indomethacin. *Int. J. Pharm.* (2016). 515(1–2), 657–668.
- [20]. Karbownik, M.S.; Nowak, J.Z. Hyaluronan: Towards novel anti-cancer therapeutics. *Pharmacol. Rep.* (2013). 65, 1056–1074. [CrossRef].
- [21]. Kosaka, T., Kaneko, Y, Nakada, Y, Matsuura, M. and Tanaka, S. Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress, ”*Journal of Veterinary Medical Science,* (1996). vol. 58, no. 10, pp. 963–967.
- [22]. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res.* (2000).;51:586–95.
- [23]. Li S, Su J, Cai W and Liu J. Nanomaterials Manipulate Macrophages for Rheumatoid Arthritis Treatment. *Front. Pharmacol.* (2021). 12:699245.
- [24]. Liu H, Wang C, Li C, Qin Y, Wang Z, Yang F, et al. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Adv.* (2018).;8:7533–49.

- Bendele, A.M. Animal models of rheumatoid arthritis.. *J Musculoskels Neuron Interact*;1(4):377-385.
- [25].Lu, J., Prudhommeaux, F., Meunier, A. Sedel, L., and Guillemain, G. "Effects of chitosan on rat knee cartilages." *Bioma-terials*, (1999). vol. 20, no. 20, pp. 1937–1944.
- [26].Meyer, A., Sandler, D. P., Beane Freeman, L. E., Hofmann, J. N., & Parks, C. G. Pesticide exposure and risk of rheumatoid arthritis among licensed male pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ Health Perspect.*; (2017). 125:1–7. <https://doi.org/10.1289/EHP1013>.
- [27].Moreland L.W. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hyalans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther.* (2003).;5:54–67.
- [28].Morin-Crini N., Lichtfouse E., Torri G., Crini G. *Fundamentals and Applications of Chitosan. Sustainable Agriculture Reviews*, (2019). vol 35. Springer, Cham. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-16538-3_2.
- [29].Nogueira E, Gomes AC, Preto A, et al. Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy. *Nanomedicine.* (2016). 12:1113–1126.
- [30].Oprenyeszk F, Sanchez C, Dubuc JE, Maquet V, Henrist C, Compe`re P, et al. Chitosan enriched three-dimensional matrix reduces inflammatory and catabolic mediators production by human chondrocytes. *PLoS One.* (2015) ;10:e0128362.
- [31].Pandey, S.; Rai, N.; Mahtab, A.; Mittal, D.; Ahmad, F.J.; Sandal, N.; Neupane, Y.R.; Verma, A.K.; Talegaonkar, S. Hyaluronate-functionalized hydroxyapatite nanoparticles laden with methotrexate and teriflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis. *Int. J. Biol. Macromol.* (2021).,171, 502–513. [CrossRef].
- [32].Patchornik S, Ram E, Ben Shalom N, Nevo Z, Robinson D. Chitosan-hyaluronate hybrid gel intraarticular injection delays osteoarthritis progression and reduces pain in a rat meniscectomy model as compared to saline and hyaluronate treatment. *Adv Orthop.* (2012). 979152.
- [33].Pietrosimone, K.M., Jin, M., Poston, B., Liu, P. Collagen-Induced Arthritis: A model for Murine Autoimmune Arthritis. *Bio Protoc.* (2015).;5 (20):e1626 <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1626>.
- [34].Schwalfenberg, G. K. Solar radiation and vitamin D: Mitigating environmental factors in autoimmune disease. *J Environ Public Health.* (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/619381>.
- [35].Shi, X. Fang, Q. Ding, M. Wu, J. Ye, F. Lv, Z., et al. Microspheres of carboxymethyl chitosan, sodium alginate and collagen for a novel hemostatic in vitro study. *Journal of biomaterials applications.* (2015). [PubMed] [Google Scholar].
- [36].Smolen, J. S., Aletaha, D., Koeller, M., Weisman, M. H., and Emery, P. New Therapies for Treatment of Rheumatoid Arthritis. *The Lancet.* (2007). 370 (9602),1861.
- [37].Wang Q, Sun X.. Recent advances in nanomedicines for the treatment of rheumatoid arthritis. *Biomater. Sci.* (2017). 5 (8), 1407–1420 .
- [38].Wang, K., Zhang, D., Liu, Y., Wang, X., Zhao, J., Sun, T., Pathak, J. L. Traditional Chinese medicine formula Bi-Qi capsule alleviates rheumatoid arthritis- induced inflammation, synovial hyperplasia, and cartilage destruction in rats. *Arthritis Res. Ther.* (2018).;1–12. <http://doi: 10.1186/s13075-018-1547-6>.
- [39].Yaghoubi, A., Ghojzadeh, M., Abolhasani, S., Alikhah, H., & Khaki-Khatibi, F. Correlation of Serum Levels of Vitronectin, Malondialdehyde and Hs-CRP With Disease Severity in Coronary Artery Disease. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*, (2015). 7 : 113–117. <https://doi.org/10.15171/jcvtr.2015.24>.
- [40].Yu, C.; Li, X.; Hou, Y.; Meng, X.; Wang, D.; Liu, J.; Sun, F.; Li, Y. Hyaluronic Acid Coated Acid-Sensitive Nanoparticles for Targeted Therapy of Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *Molecules*, (2019). 24, 146. [CrossRef].
- [41].Zewail, M. Folic acid decorated chitosan-coated solid lipid nanoparticles for the oral treatment of rheumatoid arthritis. *Ther. Deliv.* (2021). 12 (4), 297–310.
- [42].Zewail M, Nafee N, Helmy MW et al. Coated nanostructured lipid carriers targeting the joints – an effective and safe approach for the management of rheumatoid arthritis. *Int. J. Pharm.* (2019). 567, 118447.
- [43].Zhou, M.; Hou, J.; Zhong, Z.; Hao, N.; Lin, Y.; Li, C. Targeted delivery of hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy. *Drug Deliv.* (2018). 25, 716–722. [CrossRef].