Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Monday January 1st 2018

مقاله پژوهشی

بررسی پلی مورفیسم ژن های CYP3A5، MDR1 و ارتباط آن با غلظت خونی سیکلوسپورین در مراحل اولیه بعد از پیوند کلیه در بیماران شیراز

نگار آذرپیرا[۱]، سید علی ملک حسینی[۲]، سعید بهزادی[۳]

چکیده

پیش زمینه و هدف: سیکلوسپورین یک داروی سرکوب کننده سیستم ایمنی با محدوده درمانی بسیار باریک با تفاوت‌های فارماکوکینتیک زیاد در میان افراد است. این ماده سوبسترای سیتوکروم p-450 و گلیکوپروتئین p می باشد که توسط دو ژن CYP3A5 و MDR1 کد می شوند. برخی مناطق پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در این دو ژن با بیان کم پروتئین در بدن همراه است در این مطالعه با بررسی SNP مناطق خاصی از این دو ژن اثر آن بر تغییرات فارماکوکینتیک سیکلوسپورین مورد بررسی قرار می گیرد.

مواد و روش کار: تعیین ژنوتیپ CYP3A5 و MDR به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز – هضم آنزیمی (PCR-RFLP) در ۸۸ بیمار پیوند کلیه که داروی سیکلوسپورین دریافت نموده اند انجام شد. سطح خونی دارو به روش رادیوایمونواسی (RIA) اندازه گیری شد. نسبت دوز معادل بر اساس وزن بیماران (ng/ml /mg/kg/d) در روزهای ۱ و ۳ و یک هفته و ۱ ماه بعد از پیوند اندازه گیری شد.

یافته ها: نوع جهش نیافته MDR (3435 cc) در ۱۷ بیمار (۱۹%) نوع هتروزیگوت (CT) در ۴۵ بیمار (۵۱%) و نوع هموزیگوت (TT) در ۲۶ بیمار (۳۰%) مشخص شد. در روزهای اول بعد از پیوند ارتباط میان نسبت دوز / غلظت و پلی مورفیسم MDR دیده شد. (33.3+15.24 در گروه CT نسبت به 44.1+28.4 در گروه TT، P=0.016). این نسبت در هفته اول و ماه اول بعد از پیوند ملاحظه شد. در این مطالعه همه بیماران ژنوتیپ CYP3A5 3/3 را نشان می دهند، از این رو تفاوتی از نظر دوز را جهت این ژن خاص نمی توان در نظر گرفت.

بحث و نتیجه نهایی: پلی مورفیسم MDR1 (3435CC) با فارماکوکینتیک سیکلوسپورین در روزهای اول بعد از پیوند ارتباط دارد. بررسی فارماکوژنتیک جهت تعیین دوز اولیه دارو برای هر فرد و جلوگیری از عوارض جانبی حایز اهمیت می باشد. به نظر می رسد که با توجه به ژنوتیپ CYP3A5 در جمعیت مورد مطالعه و این‌که بیماران ایرانی دوز کمتری از سیکلوسپورین را نسبت به سایر جمعیت ها مصرف می‌کنند شاید به علت عدم متابولیزم صحیح دارو در بدن زودتر دچار عوارض دارویی می‌شود. سیکلوسپورین داروی مهار کننده ایمنی است که به طور وسیعی بعد از پیوند کلیه مورد استفاده قرار می گیرد. این دارو سطح خونی بسیار کمی دارد و خصوصیات فارماکوکینتیک آن در میان افراد بسیار متغیر است (۲،۱).

اطلاع از تفاوت های بین فردی فارماکوکینتیک این دارو جهت استفاده بالینی بهتر از آن حایز اهمیت است. در این مطالعه پلی مورفیسم ژنهای MDR و CYP3A5 که در جذب، توزیع و متابولیسم این دارو نقش دارند مورد بررسی قرار گرفته است. CYP3A5 یکی از ایزوآنزیم های CYP3A می باشد که به صورت هتروژن در جمعیت های مختلف بیان می شود و مسؤول قسمت عمده ای از این آنزیم در کبد و روده است. پلی مورفیسم نوکلئوتیدی (SNP) در ناحیه A>G 6896 با میزان تولید پروتئین و فعالیت آنزیمی آن ارتباط دارد (۵-۳) جهش G>A در ناحیه اینترون ۳ منجر به ایجاد پروتئین ناپایدار و غیر فعال می‌شود که به آن اصطلاحاً CYP3A5*3 و به نوع جهش نیافته آن CYP3A5*1 گفته می شود (۷-۳). سیکلوسپورین همچنین سوبسترای گلیکوپروتئین P نیز می باشد. این پروتئین محصول ژن مقاوم دارویی (MDR1) می باشد (۸) این گلیکو پروتئین به صورت یک پمپ وابسته به انرژی مسؤول خروج مواد از داخل سلول به خارج سلول می باشد و در سطح سلول های اپیتلیوم روده، مجاری صفراوی، سد خونی مغزی و سلول های توبول ابتدای کلیه بیان می شود (۹). یکی از نواحی پلی مورفیسم نوکلنوتیدی (SNP) در این ژن (MDR) به صورت تغییر C به T در ناحیه 3435 در اگزون شماره ۲۶ ژن می باشدکه توارث آلل TT با سطح بسیار پایین این گلیکوپروتئین همراه است (۱۰-۸). در این مطالعه ارتباط بین ژنوتیپ های مختلف CYP3A5 و MDR و ارتباط آنها با غلظت دارو در روزهای ۱ و ۳ و ۷ و ۳۰ بعد از پیوند کلیه مورد بررسی قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: سیکلوسپورین - پیوند کلیه، CPY 3A5، MDR، پلی مورفیسم

ضمیمه مجله پزشکی ارومیه، سال نوزدهم، شماره دوم، ص ۲۸-۲۵، بهار ۱۳۸۷

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات پیوند اعضاء، بیمارستان نمازی شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز تلفن: ۰۷۱۱-۶۲۷۶۲۱۱ فاکس: ۰۷۱۱-۶۲۷۶۲۱۱

E-mail: negarazapira@yahoo.com

[۱] استادیار پاتولوژی مرکز تحقیقات پیوند اعضاء بیمارستان نمازی شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز (نویسنده مسئول)

[۲] استاد جراحی بخش پیوند اعضاء بیمارستان نمازی شیراز

[۳] دانشیار داخلی بیماریهای کلیوی بخش پیوند اعضاء بیمارستان نمازی شیراز

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Monday January 1st 2018

مواد و روش کار

۸۸ بیمار پیوند کلیه (۵۶ مرد و ۳۲ زن) که در بیمارستان نمازی شیراز، بخش پیوند اعضاء، تحت عمل جراحی پیوند کلیه قرار گرفته بودند، انتخاب شدند. میانگین سنی این بیماران (۹۲±۱۸/۱۶) ۳۶ سال می باشد میانگین وزن بدن این بیماران ۵۷/۳۱±۱۴ کیلوگرم می باشد.

تمامی بیماران درمان ترکیبی سیکلوسپورین و استروئید به همراه داروی سومی مانند آزاتیوپرین یا مایکو فنولات دریافت کرده اند. دوز شروع سیکلوسپورین ۵-۳ میلی گرم/ کیلوگرم / روز می باشد و میزان آن بر اساس سطح خونی سیکلوسپورین (به صورت C0) تغییر خواهد کرد. وزن بیمار - دوزسیکلوسپورین و سطح خونی دارو در روزهای ۱، ۳، یک هفته و ۱ ماه بعد از پیوند به صورت مرتب اندازه گیری شد. دوز سیکلوسپورین (mg/kg/d) و سطح معادل شده دوز (ng/mL/mg/Kg/d) جهت هر روز محاسبه شد بیماران دارویی که تداخل با سیکلوسپورین را داشته باشد دریافت نکرده بودند.

رد پیوند از نظر بالینی ثبت و تعدادی از آنها توسط بیوپسی و به کمک روش Banff اثبات شد (۱۱).

این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز مورد بررسی قرار گرفته و از کلیه بیماران رضایت نامه اخلاقی جهت شرکت در مطالعه اخذ شده است.

اندازه گیری سطح سیکلوسپورین بر روی خون کامل محتوی ضد انعقاد EDTA راس ساعت ۸ صبح قبل از مصرف دوز صبحگاهی دارو انجام شد. اندازه گیری به روش رادیوایمونواسی (RIA) و به کمک کیت از کمپانی Dias Orin آمریکا انجام گرفته است.

DNA بیماران به کمک کیت تجارتی از شرکت سیناژن استخراج و در 200c- نگهداری شد. جهت ژنوتیپ کردن از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز - هضم آنزیمی (PCR-RFLP) استفاده گردید. طراحی پرایمرها و برنامه PCR ژن MDR براساس روش Ame yaw و همکاران (۱۳،۱۲) و جهت ژن CYP3A5 از روش Tsuchiya و همکاران (۱۴) انجام شد. محصولات شکسته شده توسط آنزیم روی ژل آگاروز 2.5% ران شده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نتایج ثبت شدند.

بررسی آماری

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند. آنالیز آماری به کمک برنامه نرم افزاری Spss11.5 انجام شده است. تفاوت بین گروه ها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) انجام شد و تفاوت P کمتر از o.o5 (P<o.o5) به عنوان معنی دار تلقی شد.

نتایج

خصوصیات دموگرافیک بیماران مورد مطالعه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. هیچ ارتباط معنی داری بین وزن و سن دیده نشد. در میان ۸۸ بیمار پیوند کلیه، ژنوتیپ جهش نیافته MDR-1 به صورت (3435cc) در ۱۷ بیمار (۱۹٪)، ژنوتیپ هتروزیگوت (3435CT) در ۴۵ بیمار (۵۱٪) و ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته (3435TT) در ۲۶ بیمار (۳۰٪) ملاحظه شد. (جدول شماره ۲) در روزهای اول بعد از پیوند (روز۱-۳) بیماران دوز مشابه سیکلوسپورین را دریافت کرده اند و میانگین دوز معادل شده بر اساس وزن بیماران در میان سه گروه تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد. ارتباط میان غلظت / دوز و SNP در اگزون ۲۶ در بین دو گروه ملاحظه شده است.

[33.3±15.24 in CT V6 44.1±28.4 (µg.mg/L/kg) in TT P=o.o 19]

این نسبت به صورت معنی داری در بیمارانی که هموزیگوت برای جهش باشند (3435TT) بالاتر می باشد. (جدول شماره ۲)

در این سه گروه میزان دوز سیکلوسپورین در روز ۷ افزایش می‌یابد تا سطح درمانی سیکلوسپورین (Co) در حد 180µg/L باقی می‌ماند. بعد از یک هفته این سطح خونی تامین شده و تفاوتی در دوز بیماران سه گروه دیده نمی شود. یک ماه بعد از پیوند نیز دوز سیکلوسپورین و نسبت غلظت / دوز دارو تغییر قابل توجهی را در سه گروه نشان نمی دهد.

جهت بررسی رد حاد پیوند در این بیماران نمونه برداری از کلیه به عمل آمده است که در ۲ بیمار با ژنوتیپ جهش نیافته و در ۲ بیمار با ژنوتیپ TT به اثبات رسیده است که از نظر آماری معنی‌دار نمی باشد. کلیه بیماران مورد مطالعه ژنوتیپ CYP3A5 3x/3x را نشان می‌دهند که جهت اطمینان در نتایج حاصل تعدادی نمونه تعیین ژنوتیپ گردیده اند.

Table 1: Characteristic of renal –transplant Recipients Population According to MDR1 3435 genotype

MDR1 3435 genotype	CC	TT	CT
n (%))	17(19.3)	26 (29.5)	45 (51.1)
Mean age (years ± SD)	30.94 ± 9.3	35.27 ± 12.07	40.13 ± 4.23
Sex (F/M)	10 / 7	9 / 17	13 / 32
Mean weight (Kg ± SD)	58.59 ± 14.41	57.31 ± 14.06	56.51 ± 13.03

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Monday January 1st 2018

Table2: Comparison of Cyclosporine Level and Their MDR1 3435 Genotypes in 88 Renal Transplant Recipients

	MDR1 3435 CC	MDR1 3435 TT	MDR1 3435 CT
CsA 24 h dose/body weight(mg/kg) Day 1-3 Day 7 Day 30	4.25 + 1.3 5.09 + 1.1 5.03 + 1.4	4.46 + 1.2 5.15 + 1.16 5.19 + 1.3	4.55 + 0.91 4.66 + 1.11 4.5 + 1.19
Mean CsA C2 level (µg /L) Day 1-3 Day 1-3 Day 1-3	111.24 + 59.4 156.35 + 46.8 173.6 + 55.9	172.15 + 97.7 190.15 + 71.28 215.85 + 92.6	149.58 + 70 189.89 + 78.1 203.09 + 85.5
C0 level /24 h dose / body weight (µg × mg /L/ kg) Day 1-3 Day 1-3 Day 1-3	26.57 + 12.62 33.07 + 15.88 32.66 + 10.69	44.14 + 28.48 39.13 + 18.80 45.23 + 24.20	33.30 + 15.24 33.30 + 15.24 44.53 + 23.40

بحث و نتیجه گیری

سیکلوسپورین، سوبسترای گلیکوپروتئینP می‌باشد که به صورت گسترده ای جهت پیشگیری از رد پیوند در بیماران پیوند کلیه مورد استفاده قرار می گیرد. این دارو تفاوت‌های بین فردی گسترده ای را از نظر فارماکوکنیتیک نشان می‌دهد.

شیوع سه ژنوتیپ (%26 TT, %45 CT, %19CC) در این مطالعه با مشابه آن در جمعیت سفید پوست متفاوت است (%18 TT,%48 CT, %34CC) و (۱۵،۱۴) در این مطالعه نشان داده شدکه در ماه اول، میزان دوز مورد نیاز دارو جهت تامین سطح خونی 800µg/L در سه گروه تفاوت معنی داری ندارد سطح خونی هدف در روز هفتم بعد از پیوند حاصل می‌شود که بعد از آن تا فاصله روز ۳۰ هیچ تغییری در دوز دارو دیده نمی شود.

مطالعه ما نشان داد که نسبت غلظت به دوز دارو در روزهای ۳-۱ بعد از پیوند بیمارانی که هموزیگوت ژن MDR هستند بالاتر است.

در مجموع به نظر می‌رسد که پلی مورفیسم ژن MDR در روزهای اول بعد از پیوند اهمیت دارد. چون بیماران 3435TT در ابتدا دوز کمتری از دارو را جهت رسیدن به سطح خونی هدف نیاز دارند، از این رو جهت کاهش عوارض دارویی و نتیجه بهتر از درمان دارویی انجام ژنوتیپ MDR جهت بیماران توصیه می شود.

در این مطالعه هیچ ارتباطی میان دوز سیکلوسپورین و پلی-مورفیسم cyP3A5 دیده نشد چون همه بیماران ژنوتیپ cyP3AS3X/3X را داشتند، به نظر می‌رسد که یکی از عللی که بیماران ایرانی دوز کمتری از سیکلوسپورین را مصرف می‌کنند و حتی با دوزهای پایین هم دچار علایم مسمومیت دارویی می‌شوند تا حدی مربوط به نحوه وراثت CYP3A باشد چون انواع جهش یافته قادر به متابولیسم صحیح دارو نمی‌باشند.

References:

1. Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Hurault De Ligny B, Le Meur Y, Touchard G, et al. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. Clin Pharmacol Ther 2004; 75: 422-33.
2. Zhao Y, Song M, Guan D, Bi S, Meng J, Li Q, et al. Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. Transplant Proc 2005; 37: 178-81.
3. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. J Biol Chem 1993; 268: 6077–80.
4. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lin Y, Lamba J, Assem M, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. Nat Genet 2001; 27: 383-91.
5. Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. Pharmacogenetics 2001; 11: 773-9.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Monday January 1st 2018

6. Kronbach T, Fischer V, Meyer UA. Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. Clin Pharmacol Ther 1988; 43: 630–5
7. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Guttesman MM, Pastan I, Willingham MC, et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 7735–8.
8. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastal I, Gottesman MM, et al. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999; 39: 361–98.
9. Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Joham A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 28: 3473- 8
10. Seron D, Moreso F, Bover J, Condam E, Gil-Vernet S, Canas C, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. J Kidney Int 1997; 51:310-6.
11. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, et al: MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation is significantly influenced by ethnicity. Pharmacogen J 2001; 11:217-221.
12. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K, et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. Transplant J 2004; 78: 1182-87
13. Bernal ML, Sinues B, Fanlo A, Mayayo E. Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population. Ther Drug Monit 2003; 25: 107-11.