

## بررسی پلی مورفیسم rs4253778 مربوط به ژن گیرنده فعال کننده تکثیر پراکسیزوم الفا در گیرندگان پیوند کلیه تحت درمان با راپامایسین در استان آذربایجان غربی (ایران)

هانیه رستمی باراندوز<sup>۱</sup>، رضا محمدزاده<sup>۲</sup>، مرتضی باقری<sup>۳\*</sup>

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۰۱/۲۱

### چکیده

**پیش زمینه و هدف:** راپامایسین (سیرولیموس) جزء داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی و مهارکننده مسیر mTOR است. سیرو لیموس در پیشگیری از رد پیوند کلیه در گیرندگان پیوند کلیه مؤثر است. سیرولیموس نه تنها دارو مهار کننده هدف راپامایسین است بلکه به عنوان یک سوپسترا برای زیر خانواده های آنزیم های سیتوکروم P450 و برای پمپ های خروجی چند دارویی محسوب می شود. نتایج مطالعات اخیر نشان داده است گیرنده های فعال کننده تکثیر پروکسیزومی به عنوان گروهی از گیرنده های هسته ای، اثرات سلولی متعددی دارند و پلی مورفیسم های ژنتیکی آن ها در ارتباط با سایر ژن ها در ایجاد پاسخ های سیستم ایمنی انسان نقش مهمی دارند. هدف از انجام این مطالعه تعیین پلی مورفیسم rs4253778 ژن گیرنده فعال کننده تکثیر پراکسیزوم (PPAR $\alpha$ ) در گیرندگان پیوند کلیه تحت درمان با راپامایسین و افراد کنترل سالم در استان آذربایجان غربی (ایران) و مقایسه آن ها با یکدیگر بود.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه مورد-شاهدی، ۴۰ نفر بیمار گیرنده پیوند کلیه و تحت درمان با راپامایسین به میزان یک میلی گرم (به عنوان گروه بیمار) و ۶۳ نفر در گروه کنترل سالم (به عنوان گروه کنترل) ارزیابی شدند. نمونه گیری از افراد در درمانگاه پیوند کلیه بیمارستان امام خمینی (ره) شهرستان ارومیه تحت نظر پزشک فوق تخصص کلیه انجام گرفت. برای استخراج DNA ژنومی از روش نمک اشباع استفاده شد. محصولات PCR بعد از برش انزیمی با آنزیم TaqI آنالیز شدند. با شمارش مستقیم آلل ها و ژنوتیپ های مشاهده شده و نیز تعداد کل نمونه ها داده به دست می آید. سپس با استفاده از برنامه اکسل با طراحی تست کای دو و یا تست فیشر در جدول ۲×۲ آنالیز نتایج و داده ها انجام شد. اختلاف سطح معنی داری دو گروه معادل ۰/۰۵ قلمداد گردید.

**یافته ها:** فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت PPAR $\alpha$  rs4253778 G/G و ژنوتیپ هتروزیگوت PPAR $\alpha$  rs4253778 G/C مشاهده شده در گروه کنترل سالم مطالعه حاضر به ترتیب برابر با (۶۲/۴۹ درصد) و (۳۶/۵۱ درصد) بود. در گروه کنترل سالم ژنوتیپ هموزیگوت PPAR $\alpha$  rs4253778 C/C مشاهده نشد. فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت G/G، ژنوتیپ هتروزیگوت G/C و ژنوتیپ هموزیگوت C/C در بیماران PPAR $\alpha$  rs4253778 در گروه بیمار به ترتیب برابر با (۷۲/۵ درصد)، (۲۲/۵ درصد) و (۵ درصد) بود. مقایسه فراوانی های مورد نظر در دو گروه نشان داد از لحاظ آماری اختلاف معنی داری وجود ندارد ( $P > 0/05$ ). در این مطالعه فراوانی آلل های G و C در PPAR $\alpha$  rs4253778 در گروه بیماران به ترتیب برابر با ۰/۸۴ و ۰/۱۶؛ و در کنترل سالم به ترتیب برابر با ۰/۸۱ و ۰/۱۹ بود.

**بحث و نتیجه گیری:** در مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم PPAR $\alpha$  rs4253778 G>C و مصرف غلظت پایین راپامایسین به میزان یک میلی گرم وجود نداشت. مطالعات بیشتر با تعداد نمونه بیشتر توصیه می شود.

**کلیدواژه ها:** پیوند کلیه، پلی مورفیسم PPAR $\alpha$  rs4253778 G>C، راپامایسین (سیرولیموس)

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره اول، ص ۲۹-۱۹، فروردین ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: استان آذربایجان غربی، ارومیه، پژوهشکده پزشکی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، تلفن: ۰۴۴۳۳۴۸۶۱۶۵

Email: mortezabagheri@umsu.ac.ir

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی گرایش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

<sup>۲</sup> استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار بیولوژی مولکولی و ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پزشکی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

## مقدمه

پیوند کلیه قرار دادن کلیه سالم از اهداکننده زنده یا فوت کرده در بدن شخصی است که کلیه‌هایش به‌درستی کار نمی‌کنند. بیماری کلیوی end-stage یا مرحله نهایی زمانی اتفاق می‌افتد که کلیه‌ها حدود ۹۰ درصد از عملکرد طبیعی خود را از دست می‌دهند. علل شایع بیماری کلیوی مرحله نهایی شامل فشارخون بالای مزمن کنترل نشده، دیابت و زخم‌های احتمالی در فیلترهای ریز کلیه‌ها، و بیماری کلیه پلی-کیستیک و سایر موارد است. افراد مبتلا به بیماری کلیوی مرحله نهایی برای زنده ماندن نیاز به دفع ضایعات از جریان خون خود از طریق دستگاه دیالیز یا پیوند کلیه دارند که دارای هزینه‌ی بالا است. از آنجایی که تعداد افرادی که به مرحله انتهایی بیماری کلیه مبتلا می‌شوند، رو به افزایش است، بهترین روش درمانی برای این بیماران انجام پیوند کلیه است، این درمان باعث بهبود کیفیت زندگی بیماران می‌شود (۱). بهبود مستمر در بقای پیوند منجر به پذیرش گسترده پیوند کلیه به‌عنوان درمان ارجح برای اکثر بیماران مبتلا به بیماری کلیوی در مرحله نهایی شده است (۲). مراقبت طولانی‌مدت از این بیماران اغلب دور از مراکز پیوند ارائه می‌شود. عوارض پیوند و مدیریت مداخله‌ای آن‌ها شامل عوارض اورولوژیک و عروقی است که برخی از آن‌ها عبارتند از: تنگی شریان کلیوی و سپاهرگ کلیوی. سونوگرافی می‌تواند به دقت بسیاری از موارد را به تصویر بکشد و مشخص کند. دریافت پیوند کلیه میزان بقا را در بیماران پیوند کلیه افزایش می‌دهد (۳). هنگامی که کلیه جدید به بدن شخص پیوند زده می‌شود، سیستم ایمنی بدن، بافت جدید واردشده به بدن را به‌عنوان یک تهدید برای بدن شناخته و به ارگان تازه‌وارد حمله می‌کند. برای سالم ماندن ارگان پیوند زده‌شده، پزشکان با استفاده از داروهای مختلف سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، سبب جلوگیری از پس زدن کلیه جدید می‌شوند و درواقع سیستم ایمنی بدن فرد را گمراه می‌کنند که در نهایت باعث می‌شود تا ارگان جدید را پذیرفته و به آن حمله نکند (۳). معمولاً هر بیماری که تحت جراحی پیوند اعضا قرار می‌گیرد، باید مادام‌العمر داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی بدن مصرف کند، چون سیستم ایمنی بدن ممکن است عضو پیوند شده را به‌عنوان یک جسم خارجی تشخیص دهد و در نتیجه به آن حمله می‌کند و منجر به بروز آسیب‌های شدید و حتی رد پیوند شود. این داروها به اندام پیوند داده‌شده اجازه می‌دهند تا سالم باقی بماند. دارو یا دارویی که برای بیمار تجویز می‌شود به علت مصرف بر اساس پیوند اعضا، اختلال خود ایمنی یا سایر علل بستگی دارد. دو نوع داروی سرکوب‌کننده سیستم ایمنی وجود دارد داروهای القایی و داروهای نگه‌دارنده (۴،۸). هدف درمان القایی جلوگیری از رد حاد در طول دوره اولیه پس از پیوند با ایجاد درجه بالایی از سرکوب سیستم ایمنی در زمان

پیوند است. درمان القایی اغلب برای بهینه‌سازی نتایج ضروری در نظر گرفته می‌شود، به‌ویژه در بیمارانی که در معرض خطر بالای پیامدهای کوتاه‌مدت هستند (۵). در دهه گذشته، در دسترس بودن درمان‌های نگه‌دارنده سرکوب‌کننده سیستم ایمنی برای استفاده در پیوند کلیه محدود باقی مانده است. بیماران و پزشکان بر داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی تکیه کرده‌اند که به مقدار قابل توجهی به نظارت درمانی نیاز دارند و با انواعی از عوارض جانبی مرتبط هستند. این داروها هم بر کیفیت زندگی و هم بر عملکرد آلوگرافت تأثیر می‌گذارد (۶). درمان سرکوب‌کننده پاسخ‌های سیستم ایمنی نگه‌دارنده تقریباً برای همه گیرندگان پیوند کلیه انجام می‌شود تا از رد حاد و از دست دادن الوگرافت کلیه جلوگیری شود (۷). داروهای نگه‌دارنده به چهار دست طبقه‌بندی می‌شوند که عبارتند از مهارکننده‌های کلسینورین، مهارکننده‌های mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) آستروئیدها و عوامل ضد پروتئین (۴،۸). هدف مکانیسمی راپامایسین (سیرولیموس) (mTOR) یک سرین ترئونین کیناز است که نقش مهمی در رشد سلولی، تکثیر، متابولیسم و بقا دارد. افزایش فعال شدن مسیر mTOR در بیماران و مدل‌های حیوانی رد پیوند کلیه، بیماران کلیه پلی‌کیستیک جسمی غالب، نفروپاتی دیابتی و کارسئوم سلول‌های کلیوی مشاهده می‌شود. عواملی که mTOR را مهار می‌کنند مانند سیرولیموس و اورولیموس در رژیم‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی برای جلوگیری از رد الوگرافت کلیوی گنجانده می‌شوند (۹). mTOR یک پروتئین کیناز ۲۸۹ کیلو دالتونی است که در انسان توسط ژن mTOR کدگذاری می‌شود و با چندین پروتئین تعامل می‌کند تا دو کمپلکس حفظ‌شده تکاملی mTORC1 و mTORC2 را در میان یوکاریوت‌ها تشکیل دهد (۹). سیرولیموس به‌عنوان یک مهارکننده آلوستریک mTORC1 عمل می‌کند که همراه با FKBP12 با دامنه FRB mTORC1 برهمکنش می‌کند و برخی از عملکردهای این مجموعه را مسدود می‌کند. داده‌ها نشان می‌دهد که سیرولیموس عمدتاً با جلوگیری از ارتباط و فسفوریلاسیون سوبستراها در کمپلکس کیناز، فعالیت mTORC1 را مختل می‌کند. با این حال، همه اهداف پایین دست mTORC1 به‌طور یکسان توسط راپامایسین مهار نمی‌شوند. علاوه بر این سیرولیموس با mTORC2 برهمکنش ندارد، برخی مطالعات نشان داده‌اند که این مولکول قادر است به‌طور غیرمستقیم کمپلکس mTORC2 را به روشی وابسته به دوز، زمان و نوع سلول تغییر دهد، احتمالاً با جلوگیری از برهمکنش مولکول‌های mTOR با پروتئین مشارکتی خاص mTORC2 Rictor این کار انجام می‌گیرد (۱۰). سیرولیموس به‌عنوان داروهای سرکوب‌کننده ایمنی ضد تکثیر استفاده می‌شود و کاربردهای بالینی زیادی دارویی مختلف دارد

گیرنده‌های هسته‌ای، اثرات سلولی متعددی دارند و پلی‌مورفیسیم‌های ژنتیکی آن‌ها در ارتباط با سایر ژن‌ها در ایجاد پاسخ‌های سیستم ایمنی انسان نقش مهمی دارند (۱۶، ۱۷). در این مطالعه، پلی‌مورفیسیم rs4253778 G>C در اینترون ۷ ژن گیرنده فعال‌کننده تکثیر پراکسیزوم الفا در گیرندگان پیوند کلیه تحت درمان با راپامایسین و افراد کنترل سالم در استان آذربایجان غربی (ایران) تعیین گردید و توزیع آلل‌ها و ژنوتایپ‌ها در گروه‌های موردنظر با یکدیگر مقایسه شد.

### مواد و روش کار

این مطالعه از نوع مورد شاهدهی بود که بعد از اخذ مجوز از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ارومیه انجام شد. بیماران به‌صورت ساده و آسان و داوطلبانه در این طرح مشارکت نمودند. بیماران گیرنده پیوند کلیه و تحت درمان با راپامایسین به میزان یک میلی‌گرم با نظر پزشک معالج به این مطالعه معرفی شدند. نمونه‌گیری در بیمارستان امام خمینی (ره) شهرستان ارومیه توسط پرستار بخش درمانگاه پیوند کلیه انجام گرفت. نمونه‌گیری از ۴۰ نفر بیمار گیرنده پیوند کلیه تحت درمان با راپامایسین با نظر پزشک فوق تخصص بیماری‌های کلیه بزرگسالان انجام شد. از کلیه افراد شرکت‌کننده در طرح فرم رضایت‌نامه کتبی آگاهانه اخذ شد. بیماران پیوند کلیه مصرف‌کننده دوز بالای راپامایسین و همچنین بیماران کلیوی که پیوند کلیه انجام نداده بودند از این مطالعه خارج شدند. پس از نمونه‌گیری، نمونه خون در لوله‌های فالتکون ۱۵ میلی‌لیتری که حاوی ۵۰۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد EDTA نیم مولار بودند ریخته شد. در مرحله بعدی نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا روز استخراج DNA فریز شدند. دریافت نمونه از افراد کنترل سالم که به تعداد ۶۳ نفر بودند از مراجعین به سایر بخش‌ها که سالم بودند و توسط پزشک متخصص تأیید شدند، صورت گرفت.

### استخراج DNA:

در این طرح جهت استخراج DNA از روش نمک اشباع ۶ مولار استفاده شد. که در ابتدا نمونه‌ها را از فریزر خارج کردیم و اجازه دادیم نمونه‌های یخ‌زده در دمای محیط (آزمایشگاه) ذوب شود. سپس بعد از ذوب شدن نمونه‌ها، آن‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ نمودیم. پس از پایان سانتریفیوژ سه لایه در لوله فالتکون قابل مشاهده بود ۱- لایه پلاسما که در بالای لوله دیده می‌شود، ۲- لایه مربوط به گلبول‌های سفید خون و ۳- لایه مربوط به گلبول‌های قرمز خون. در مرحله بعد، محلول رویی را دور ریختیم به‌طوری‌که حدود ۲ میلی‌لیتر از رسوب ته لوله باقی ماند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به رسوب حاصل از مرحله قبل افزودیم و کاملاً لوله را تکان دادیم به‌طوری‌که رسوبی در ته لوله باقی نماند.

(۱۱). سیرولیموس یک ترکیب ماکرولیدی حاصل از *Streptomyces hygroscopicus* است (۱۲). سیرو لیموس برای کاهش سطح واکنش‌های ایمنی که در بدن رخ می‌دهند، استفاده می‌شوند که دارای خاصیت تضعیف‌کننده ایمنی قوی است. و از آن در پیشگیری از رد پیوند کلیه و در رژیم‌های دارویی در مورد بیماری‌های خود ایمنی استفاده می‌شود. جهت پیشگیری از رد پیوند کلیه این دارو با سیکلوسپورین و کورتیکواستروئیدها بعد از پیوند تجویز می‌گردد (۱۲). سیرو لیموس که دارو مهارکننده هدف راپامایسین است همانند مهارکننده‌های کلسینورین مانند تاکرولیموس و سیکلوسپورین یک سوبسترا برای زیر خانواده‌های آنزیم‌های سیتوکروم P450 (CYP3A) و برای پمپ‌های خروجی چند دارویی محسوب می‌شود (۱۳). گیرنده فعال‌کننده تکثیر پراکسیزوم الفا Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) مستقیماً رونویسی CYP3A4 را تنظیم می‌کند. مکانیسم مولکولی تنظیم CYP3A4 توسط-PPAR $\alpha$  به این صورت است که فعال‌سازی رونویسی مستقیم پروموتور CYP3A4 از طریق حداقل سه ناحیه کاربردی (PBRI-II-III) متصل شونده به PPAR- $\alpha$  که در حدود ۱۲ کیلوبایتی بالا دست ژن CYP3A4 قرار دارد، انجام می‌شود. علاوه بر این، اثر PPAR- $\alpha$  بر روی بیان ژن CYP3A4 توسط مسیر Wnt/  $\beta$ -catenin تعدیل می‌شود. PPAR- $\alpha$  همچنین CYP2C8 را مستقیماً از طریق اتصال عناصر خاص در پروموتور CYP2C8 تنظیم می‌کند. همین‌طور پلی‌مورفیسیم‌های PPAR- $\alpha$  تأثیر متوسطی بر CYP2C8 کبیدی دارند که این تنوع بین فردی در پاسخ به بسترهای مختلف دارویی CYP2C8 کمک می‌کند (۱۴). گیرنده فعال‌کننده تکثیر پروکسیزوم الفا اعضای دسته‌ای از عوامل رونویسی فعال‌شده در متابولیسم چربی، هموستاز بافت و التهاب هستند و در کبد، ماهیچه اسکلتی، قلب و کلیه بیان می‌شوند و در تنظیم چربی و متابولیسم بدن دخالت دارند (۱۵). PPAR- $\alpha$  در سلول‌های درگیر در پاسخ ایمنی از جمله مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها تولید می‌شوند. PPAR $\alpha$  تطبیق پاسخ به روزه‌داری یعنی هموستاز لیپیدی و متابولیسم اسیدآمینه‌های کبیدی در طول روزه‌داری را تنظیم می‌کند و فرایندهای بیولوژیکی را با تغییر بیان صدها ژن تنظیم می‌کند (۱۶). گیرنده فعال‌کننده تکثیر پروکسیزوم الفا (PPAR $\alpha$ ) متعلق به خانواده گیرنده‌های هسته‌ای تنظیم‌شده با لیگاند (PPARs) است. این گیرنده‌ها پس از هتروداایمریزاسیون با گیرنده رتینوئید X (RXR) در پروموتور ژن‌های هدف به عناصر پاسخ (PPREs) PPAR متصل می‌شوند و به‌عنوان یک فاکتور رونویسی قوی عمل می‌کنند (۱۷). نتایج مطالعات اخیر نشان داده است گیرنده‌های فعال‌کننده تکثیر پروکسیزومی به‌عنوان گروهی از

این مرحله را سه بار تکرار نمودیم. در این مرحله رسوبات حاوی لایه سفید از سلول‌ها در ته لوله‌ها قابل مشاهده شدند. به مقدار ۴ میلی‌لیتر بافر TES توسط سمپلر ۱۰۰۰ میکرو لیتر با سر سمپلر آبی‌رنگ به رسوبات حاصل از مرحله قبل افزوده و خوب به هم زدیم تا محلول یکتواختی به دست آید. سپس ۲۵۰ میکرو لیتر SDS 10% به وسیله سمپلر به محلول اضافه نمودیم و سپس ۱۰۰ میکرو لیتر آنزیم پروتئیناز K که در فریزر نگهداری می‌شد به محلول افزودیم. در مرحله بعدی نمونه‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم. در روز دوم استخراج، نمونه‌ها را از بن ماری برداشته و سپس در حدود ۱۸۰۰ میکرو لیتر نمک اشباع ۶ مولار به لوله‌های حاوی نمونه‌ها افزودیم. و سپس در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم. بعد از اتمام سانتریفیوژ یک سوم محلول رویی را به لوله‌آزمایش جدید استریل ریختیم و هم حجم محلول به آن الکل ایزو پروپانول افزودیم و در بن ماری با کاغذ پارافیلیم بستیم. بعد از تکان دادن لوله‌آزمایش کلاف DNA در لوله ظاهر شد. سپس با سمپلر کلاف DNA را به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال دادیم و به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm در دستگاه میکروفیوژ، سانتریفیوژ نمودیم تا کلاف به ته میکروتیوب انتقال پیدا کند. در مرحله بعدی به منظور شستشو به میکروتیوب حاوی کلاف DNA، ۱۰۰۰ میکرو لیتر الکل اتیلیک ۹۶ درصد اضافه نمودیم و در میکروفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ انجام دادیم. در مرحله بعدی تمام محلول رویی میکروتیوب را بیرون ریختیم تا فقط کلاف در ته میکروتیوب باقی بماند و سپس میکروتیوب را بر روی دستگاه هیتر قرار دادیم تا به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد نمونه خشک شود. در این مرحله ۵۰ میکرو لیتر بافر TE به میکروتیوب حاوی کلاف DNA اضافه نمودیم مجدداً بر روی هیتر قرار دادیم تا نمونه درون بافر حل شود. غلظت و کیفیت نمونه‌های DNA توسط دستگاه اسپکتوفوتومتری ارزیابی و تأیید شد. سپس نمونه‌ها را در فریزر در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمودیم.

#### مراحل PCR:

این مرحله را سه بار تکرار نمودیم و به این پرایمر ۱۷۹ میکرو لیتر آب تزریقی اضافه نمودیم که بعد از اضافه کردن این حجم از آب تزریقی غلظتان به ۱۰۰ پیکومول رسید. که توالی‌های پرایمرهای رفت و برگشت به ترتیب 3'-acaatcactccttaaatatggtgg-5' و 3'-aagtagggacagacagaccagta-2' بود. برای استفاده از پرایمرها غلظت آن‌ها را به میزان ۱۰ پیکومول رقیق نمودیم.

#### PCR:

برای تهیه مسترمیکس PCR در یک میکروتیوب ۱/۵ میکرو لیتری DNAasefree و RNAasefree، ۸۵۰ میکرو لیتر آب تزریقی توسط سمپلر اضافه نمودیم سپس ۱۰۰ میکرو لیتر PCR Buffer 10x به میکروتیوب اضافه کردیم و در مرحله بعد ۲۰ میکرو لیتر 10 mM dNTP و ۳۰ میکرو لیتر 50 mM Mg Cl<sub>2</sub> به میکروتیوب اضافه کردیم. برای هر نمونه، در میکروتیوب PCR، ۲۰ میکرو لیتر مسترمیکس توسط سمپلر اضافه کردیم سپس ۰/۲ میکرو لیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲ میکرو لیتر از پرایمری که در مراحل قبلی آماده کرده بودیم (۱ میکرو لیتر از پرایمر رفت و ۱ میکرو لیتر پرایمر برگشت) اضافه نمودیم و در مرحله آخر از نمونه DNA ی مورد مطالعه ۲ میکرو لیتر به میکروتیوب اضافه کرده و درب میکروتیوب را بستیم. این مراحل را برای تمام نمونه‌ها انجام دادیم. حجم کل نمونه در میکروتیوب ۲۴ میکرو لیتر شد. برنامه اجرای PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ سیکل شامل دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، هیبرید شدن پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد و طولی شدن به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

#### برش انزیمی:

برای این کار از آنزیم TaqI و بافر TaqI استفاده کردیم. به این صورت که به ازای هر نمونه، ۱۶ میکرو لیتر آب تزریقی، ۶ میکرو لیتر بافر Taq I و نیم میکرو لیتر از آنزیم TaqI را اضافه کردیم. برای بهینه‌سازی برش انزیمی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نمونه‌ها را در بن ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمودیم. بعد از گذشت ۲ ساعت نمونه‌ها را از بن ماری خارج نموده و الکتروفورز کردیم.

#### الکتروفورز:

برای این مرحله از ژل آگارز ۱/۵ درصد و بافر TBE ۰/۵ درصد استفاده کردیم که بعد از بسته شدن ژل آگارز ۸ میکرو لیتر از هر نمونه را در درون چاهک‌ها ریختیم و در نهایت مارکر را اضافه کردیم. و به مدت ۳۰ دقیقه و با ولتاژ ۱۴۰ ولت نمونه‌ها را الکتروفورز نمودیم بعد از اتمام زمان الکتروفورز ژل حاوی نمونه‌های ران شده را بر روی دستگاه ژل داک قرار داده و به آنالیز نمونه‌ها پرداختیم.

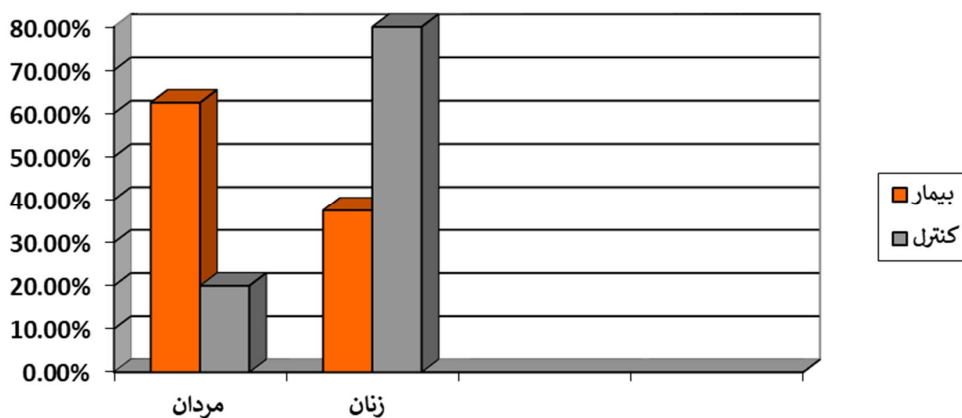
## آنالیز آماری:

با شمارش مستقیم آله‌ها و ژنوتایپ‌های مشاهده‌شده و نیز تعداد کل نمونه‌ها داده به دست می‌آید. سپس با استفاده از برنامه اکسل با طراحی تست کای دو و یا تست فیشر (Fisher's exact test) در جدول  $2 \times 2$  آنالیز نتایج و داده‌ها انجام شد. اختلاف سطح معنی‌داری دو گروه معادل  $0/05$  قلمداد گردید.

## یافته‌ها

نتایج این مطالعه در جدول شماره یک و نمودارهای ۱ و ۲ گردآوری شده است. فراوانی مردان مشارکت‌کننده در این طرح در

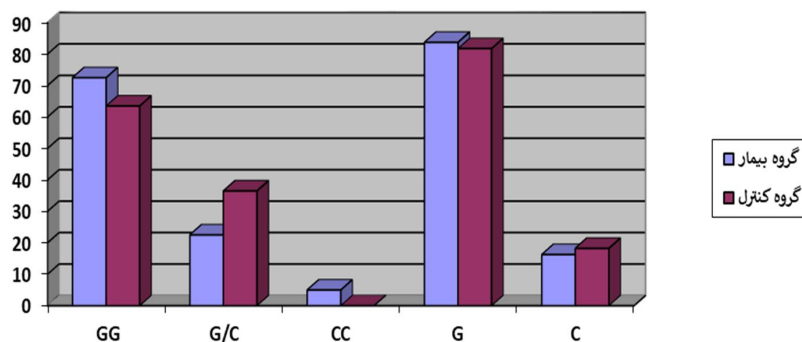
گروه بیمار (۶۲/۵ درصد) و ۲۵ و زنان مشارکت‌کننده (۳۷/۵ درصد) ۱۵ بود. میانگین سن مردان در این گروه  $49/5 \pm 11/92$  و میانگین سن زنان در گروه بیمار  $41/87 \pm 6/95$  محاسبه گردید. فراوانی مردان مشارکت‌کننده (۲۰ درصد) و ۱۳ و زنان مشارکت‌کننده در گروه کنترل (۸۰ درصد) ۵۲ بودند. در آخر ۲ نمونه از مراحل آزمایش خارج شدند. و همچنین میانگین سن مردان  $11/82 \pm 57/30$  و میانگین سن زنان  $22/23 \pm 56/11$  در گروه کنترل سالم محاسبه گردید. شاخص توده بدنی در مردان  $24/23 \pm 4/03$  و در زنان  $31/32 \pm 5/4$  در گروه کنترل بود.



نمودار (۱): مقایسه درصد فراوانی زنان و مردان مشارکت‌کننده در دو گروه کنترل و بیمار

برای تعیین انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در نمونه‌های کنترل از آزمون کای دو ( $X^2$ ) استفاده شد. بر اساس این آزمون، میزان مربع کای دو در گروه کنترل سالم برابر با  $3/14$  کمتر از  $3/84$  و  $0/05 > P = 0/2$  با درجه آزادی ۲ درصد محاسبه شد که این نشان‌دهنده‌ی این است که جمعیت کنترل سالم در تعادل هاردی-واینبرگ است. یافته‌های این مطالعه نشان دادند درصد فراوانی‌های مورد انتظار برای ژنوتایپ هموزیگوت G/G معادل  $42/1$  درصد، برای ژنوتایپ هتروزیگوت G/C معادل  $18/8$  درصد و برای ژنوتایپ هموزیگوت C/C معادل  $2/1$  درصد در گروه کنترل است. با توجه به این‌که بین فراوانی ژنوتایپ‌های مشاهده‌شده و فراوانی‌های مورد انتظار ژنوتایپ‌های مطالعه شده در گروه کنترل از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری یافت نشد، آله‌ها و ژنوتایپ‌های موردنظر در گروه کنترل در تعادل هاردی-واینبرگ بودند (آزمون کای دو ( $X^2$ ) برابر با  $3/14$  کمتر از  $3/84$  بود و  $0/05 > P = 0/2$  با درجه آزادی ۲). فراوانی ژنوتایپ هموزیگوت G/G و ژنوتایپ هتروزیگوت G/C مشاهده‌شده در گروه کنترل سالم مطالعه حاضر به ترتیب برابر با  $0/05$  و  $0/23$  را نشان می‌دهد.

گروه کنترل سالم ژنوتایپ هموزیگوت C/C مشاهده نشد. فراوانی ژنوتایپ هموزیگوت G/G، ژنوتایپ هتروزیگوت G/C و ژنوتایپ هموزیگوت C/C در گروه بیمار به ترتیب برابر با  $29/5$ ،  $22/5$  درصد) و  $9$  (۵ درصد) بود. مقایسه فراوانی‌های موردنظر در دو گروه نشان داد از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (نمودار شماره ۲). در این مطالعه فراوانی آله‌های G و C در گروه بیماران به ترتیب برابر با  $0/84$  و  $0/16$ ؛ و در کنترل سالم به ترتیب برابر با  $0/81$  و  $0/19$  است. فراوانی ژنوتایپ هموزیگوت G/G و ژنوتایپ هتروزیگوت G/C مشاهده‌شده در گروه کنترل سالم مطالعه حاضر به ترتیب برابر با  $0/63$  و  $0/37$  بود و همچنین در این مطالعه در گروه کنترل سالم فراوانی ژنوتایپ هموزیگوت C/C معادل صفر بود. فراوانی ژنوتایپ هموزیگوت G/G، ژنوتایپ هتروزیگوت G/C و ژنوتایپ هموزیگوت C/C در گروه بیمار به ترتیب برابر با  $0/73$ ،  $0/23$  و  $0/05$  بود. شکل شماره ۱ تصویر ژل ژنوتایپ‌های موردنظر را نشان می‌دهد.

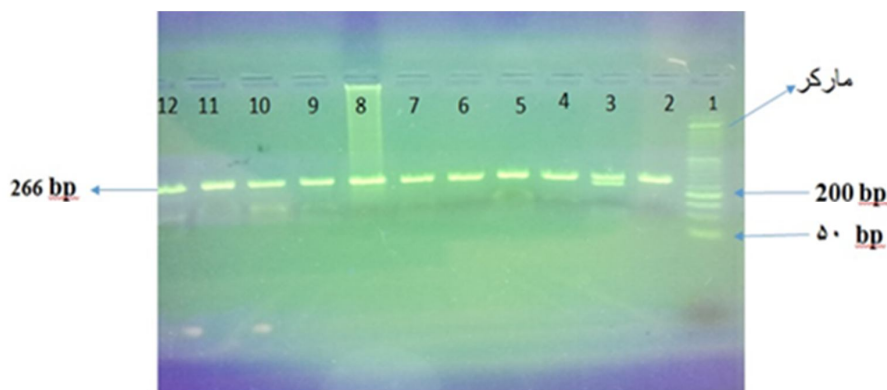


نمودار (۲): مقایسه درصد فراوانی ژنوتایپ‌های GG، G/C و CC در دو گروه بیمار و کنترل

جدول (۱): فراوانی (درصد فراوانی) ژنوتایپ‌های هموزیگوت G/G، هتروزیگوت G/C و هموزیگوت C/C و آلل‌های G و C در گروه‌های

مورد مطالعه (گروه بیمار و گروه کنترل) و مقایسه آن‌ها با یکدیگر

ژنوتایپ	گروه بیمار (%)	گروه کنترل (%)	نسبت شانس و فاصله اطمینان	آزمون کای دو	مقدار P
G/G	۲۹ (۷۲/۵)	۴۰ (۶۳/۴۹)	۱/۵۱۶ (۰/۶۴-۳/۵۹۳)	۰/۸۹	۰/۳۴
G/C	۹ (۲۲/۵)	۲۳ (۳۶/۵۱)	۰/۵۰۵ (۰/۲۰۵-۱/۲۴۵)	۲/۲۴	۰/۱۳
C/C	۲ (۵)	۰ (۰)	-	۳/۲۱	۰/۰۷
G	۶۷ (۸۳/۷۵)	۱۰۳ (۸۱/۷۵)	۱/۱۵۱ (۰/۵۴۶-۲/۴۲۸)	۰/۱۳	۰/۷۱
C	۱۳ (۱۶/۲۵)	۲۳ (۱۸/۲۵)	۰/۸۶۹ (۰/۴۱۲-۱/۸۳۳)	۰/۱۳	۰/۷۱



شکل (۱): آنالیز ژنوتایپ‌های هموزیگوت نرمال و هتروزیگوت پلی مورفیسم ژن PPAR $\alpha$  بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. لاین‌های ۱ نشان‌دهنده مارکر، لاین‌های ۱۲، ۱۱، ۱۰، ۹، ۸، ۷، ۶، ۵، ۴، ۳ ژنوتایپ هموزیگوت نرمال G/G و لاین ۳ نشان‌دهنده ژنوتایپ هتروزیگوت G/C ژن PPAR $\alpha$  است.

### بحث و نتیجه‌گیری

پیوند کلیه بهترین روش درمانی جایگزین کلیه از نظر پیش‌آگهی و کیفیت زندگی برای بیماران مرحله نهایی بیماری کلیوی (ESRD) است (۱۸). سرکوب سیستم ایمنی را می‌توان با تخلیه لنفوسیتی، منحرف کردن تراکم و ترافیک لنفوسیتی‌ها یا مسدود

کردن مسیرهای پاسخ لنفوسیتی به دست آورد. داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی سه اثر دارند: اثر درمانی (سرکوب‌کننده پس از پیوند)، پیامدهای نامطلوب نقص ایمنی (عفونت یا سرطان) و سمیت غیر ایمنی برای سایر بافت‌ها. سمیت غیر ایمنی منجر به مشخصه عفونت‌ها و سرطان‌ها مانند بیماری

سیکلواسپورین یک سوپسترا برای زیر خانواده‌های آنزیم‌های سیتوکروم (CYP3A)P450 و برای پمپ‌های خروجی چند دارویی محسوب می‌شود. سیرو لیموس لیگاندی برای P - گلیکوپروتئین (P-GP) یک انتقال‌دهنده جریان که توسط ژن ABCB1 رمزگذاری می‌شود، است. P-GP سیرو لیموس را از داخل سلول به حوزه خارج سلول انتقال می‌دهد. بیان و تولید ABCB1 و تأثیرگذاری بر فارماکوکینتیک سیرو لیموس مربوط به پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی است (۱۳). Lolita و همکاران در سال ۲۰۲۰ مطالعه‌ای باهدف بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی cyp3a4 با غلظت‌های پایین سیرو لیموس با استفاده از رگرسیون لجستیک مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند که، یافته‌های این مطالعه نشان‌دهنده ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم (Ch7: 99361466 C>T, rs2242480) CYP3A4 با غلظت پایین سیرو لیموس در گیرندگان پیوند کلیه بود و هیچ ارتباط معنی‌داری بین عوامل بالینی مانند سن، دوره پیگیری، بروز تأخیر در عملکرد پیوند، پروتکل سرکوب سیستم ایمنی و جنسیت با غلظت پایین سیرو لیموس وجود نداشت (۲۳). Liu و همکاران در سال ۲۰۲۱ مطالعه‌ای باهدف بررسی ارتباط بین SNP های متعدد cyp3a5 rs4646453 و cyp3a5 rs15524 و سیرو لیموس از نظر غلظت پایین در مراحل اولیه پس از پیوند کلیه انجام دادند. که در این بررسی ۶۹ گیرنده پیوند کلیه مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه این مطالعه تأیید کرد که هر دو cyp3a5rs4646453 و cyp3a5rs15524 تأثیر خاصی بر غلظت سیرو لیموس داشتند (۲۴).

Woillard و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای باهدف بررسی تأثیر ژن‌ها و پلی‌مورفیسم \*28 POR, CYP3A4\*22 و PARA(rs4253728) بر غلظت پایین سیرو لیموس در گیرندگان پیوند کلیه انجام دادند. در این مطالعه ۱۱۳ بیمار پیوند کلیه شرکت کردند که در آن‌ها دارو مهارکننده کلسینورین به سیرو لیموس تغییر داده شده بود. به‌طور کلی نتیجه این مطالعه نشان داد که این پلی‌مورفیسم‌ها تأثیر قابل توجهی بر فارماکوکینتیک سیرو لیموس و بروز عوارض جانبی سیرو لیموس در دریافت‌کنندگان پیوند کلیه ندارد (۲۵).

### نتیجه‌گیری

گزارش‌های حاکی از مطالعه‌ای که صورت گرفته بود نشان داد که پلی‌مورفیسم ژن PPAR $\alpha$  rs4253728 بر کاهش مصرف سیرو لیموس (غلظت پایین دارو) تأثیری نداشت (۲۵). بنابراین ما در این مطالعه به بررسی پلی‌مورفیسم ژن PPAR $\alpha$  rs 4253778 (Intron 7) که با پلی‌مورفیسم PPAR $\alpha$  rs4253728 مرتبط

لنفوپرولیفراتیو پس از پیوند که بیشتر با شدت سرکوب سیستم ایمنی مرتبط هستند می‌شود (۱۹). داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی، مورد استفاده در پیوند بیماران، شاخص درمانی باریکی دارند، به‌عنوان مثال تفاوت کمی بین اثربخشی و دوز سمی آن‌ها وجود دارد. بنابراین، اندازه‌گیری از سطح خون برای برخی از این داروها از اهمیت خاصی برخوردار است (۲۰). تأثیر پلی‌مورفیسم‌های ژنی در مولکول‌های تنظیم‌کننده ایمنی کلیوی بر سیر بالینی پس از پیوند به حوزه فعال تبدیل شده است. مشاهداتی نشان می‌دهند که تنوع ژنتیکی مؤثر بر بقای پیوند فراتر از مولکول‌های MHC است. دستیابی به تعادل بین خطرات و مزایای سرکوب ایمنی و درعین حال اجتناب از سرکوب بیش‌از حد یا کمتر از ایمنی بیمار بسیار مهم است. با این حال، فردی کردن درمان سرکوب‌کننده ایمنی بر اساس خطرات ایمنی، مانند تیترا آنتی‌بادی واکنش پائل، سازگاری HLA، سابقه پیوند قلبی یا قومیت دشوار است. پیشرفت‌های اخیر در فن‌های مولکولی منجر به توصیف تعداد فزاینده‌ای از پلی‌مورفیسم‌های ژنی، پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی و هم مناطق ریز ماهوارهای شده است. با اینکه عواقب عملکردی بسیاری از چندشکلی‌ها مشخص است با این حال، آن‌ها ممکن است به‌طور بالقوه منجر به تغییر بیان مولکولی، سیگنال دهی، تولید، اتصال یا فعالیت شوند. این پیشرفت‌ها به ما این فرصت را می‌دهند تا نقش پلی‌مورفیسم ژن را در مولکول‌های تنظیم‌کننده ایمنی کلیدی مانند سیتوکین‌ها، کموکاین‌ها و گیرنده‌های آن‌ها، مولکول‌های ارائه‌کننده آنتی‌ژن و تحریک‌کننده و مولکول‌های چسبندگی بر روی خطر نسبی رد پیوند برای یک فرد معین بررسی کنیم (۲۱). سیرو لیموس یکی از داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در بیماران پیوند کلیه است. که دوز معمولی در این بیماران ۲ تا ۵ میلی‌گرم در روز است و سطح بهینه نگهداریان ۵ تا ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر است. دوز های مورد نیاز سیرو لیموس ممکن است از بیماری به بیمار دیگر متفاوت باشد و این تنوع در بین فارماکوکینتیک بیماران است و طبق مطالعات انجام‌شده تقریباً هیچ مطالعه‌ای در ایران در این زمینه صورت نگرفته است (۲۲). در اکثر مراکز پیوند کلیه در ایران سیرو لیموس معمولاً به‌عنوان خط اول درمان در نظر گرفته نمی‌شود و در ابتدا یک مهارکننده کلسینورین تجویز می‌شود. در مطالعه‌ای که صورت گرفته بود نتایج نشان داده بودند که میانگین دوز سیرو لیموس برای حفظ سطح درمانی از ۵ تا ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر ۱/۲±۰/۴۴ میلی‌گرم در روز بود. همچنین در این مطالعه نشان داده شده بود که دوز داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در بیماران پیوند کلیه ایرانی ممکن است از کشورهای غربی کمتر باشد (۲۲). سیرو لیموس که داروی مهارکننده هدف راپامایسین است همانند مهارکننده‌های کلسینورین مانند تاکرولیموس و

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از استاد گرامی پروفسور خانم دکتر خدیجه مخدومی دانشیار بیماری‌های کلیه (بالغین) بیمارستان امام خمینی (ره) دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به علت معرفی بیماران تقدیر و تشکر می‌گردد و نیز تمامی همکاران پژوهشگر پزشکی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و همکاران دانشگاه مراغه که ما را در اجرای این طرح یاری نمودند نهایت سپاسگزاری و قدردانی را داریم.

### حمایت مالی

ندارد.

### ملاحظات اخلاقی

برای اجرای این طرح مجوزهای لازم از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ارومیه اخذ شد (شماره نامه مجوز: ۱۴۰۱/۱۰/۱۲ مورخ ۰۶/۱۴۰۱/۴/۱۸۶۱۶۰ و کد اخلاق IR.UMSU.REC.1398.429).

است، پرداختیم. در پژوهش ما ۴۰ گیرنده پیوند کلیه که تحت درمان با دارو سیرو لیموس با غلظت پایین (۱ میلی‌گرم در روز) بودند و همچنین ۶۳ نفر از گروه کنترل سالم شرکت نمودند که تجزیه و تحلیل و محاسبات آماری نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم PPAR $\alpha$  rs 4253778 G>C و مصرف غلظت پایین سیرو لیموس وجود ندارد. مطالعه دقیق میانگین سطوح سرمی دارو راپامایسین (سیرو لیموس) در بیماران مورد نظر و نیز بررسی واریانت‌های مختلف ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در متابولیسم سیرو لیموس و ارزیابی ارتباط آن‌ها با میانگین دوز مصرفی این دارو و همچنین مقایسه دقیق دوز مصرفی سیرو لیموس در کشور ایران در مقایسه با جمعیت‌های دیگر پیشنهاد می‌شود.

### تعارض در منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منفعی ندارد.

### References:

- Garcia GG, Harden P, Chapman J. The global role of kidney transplantation. *J Nephropathol* 2012;1(2):69-76. <https://doi.org/10.5812/nephropathol.7448>
- Syed A, Akbar, S, Zafar H, Jafri Marco A, Amendola, Beatrice L, Madrazo, Riad Salem, MBA Kostaki G, Bis. Complications of Renal Transplantation. *Radiographics* 2005;25(5):1335-56. <https://doi.org/10.1148/rg.255045133>
- Pavkov ME, Harding JL, Burrows NR. Trends in hospitalizations for acute kidney injury-United States, 2000-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018;67(10):289-93. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6710a2>
- Kirchhof J, Petrakova L, Brinkhoff A, Benson S, Schmidt J, Unteroberdörster M, et al. Learned immunosuppressive placebo responses in renal transplant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115(16):4223-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720548115>
- Hill P, Cross NB, Barnett ANR, Palmer SC, Webster AC. Polyclonal and monoclonal antibodies for induction therapy in kidney transplant recipients. *Cochrane Database SystRev* 2017;1(1):CD004759. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004759.pub2>
- Martin ST, Tichy EM, Gabardi S. Belatacept: a novel biologic for maintenance immunosuppression after renal transplantation. *Pharmacotherapy* 2011;31(4):394-407. <https://doi.org/10.1592/phco.31.4.394>
- Hardinger K, Brennan DC. *Kidney transplantation in adults: Maintenance immunosuppressive therapy*. UpToDate Waltham, MA, USA; 2020.
- Gonzales HM, McGillicuddy JW, Rohan V, Chandler JL, Nadig SN, Dubay DA, et al. A comprehensive review of the impact of tacrolimus inpatient variability on clinical outcomes in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2020;20(8):1969-83. <https://doi.org/10.1111/ajt.16002>
- Ma MK, Yung S, Chan TM. mTOR inhibition and kidney diseases. *Transplantation* 2018;102(2s Suppl 1):s32-s40. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001729>
- Li D, Zhu H, Luo X, Ge W. PXR haplotype clusters will affect the pharmacokinetics of ciclosporin in Chinese renal transplant recipients. *J Pharm*



- Pharmacol 2020;72(2):271-8.  
<https://doi.org/10.1111/jphp.13206>
- 11 .Nguyen LS, Vautier M, Allenbach Y, Zahr N, Benveniste O, Funck-Brentano C, et al. Sirolimus and mTOR inhibitors: a review of side effects and specific management in solid organ transplantation. *Drug Saf* 2019;42(7):813-25. <https://doi.org/10.1007/s40264-019-00810-9>
  - 12 .Morath C, Arns W, Schweger V, et al. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22suppl(8): viii61-viii65.  
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfm652>
  - 13 .Cattaneo D, Baldelli S, Perico N. Pharmacogenetics of immunosuppressants: progress, pitfalls and promises. *Am J Transplant* 2008;8(7):1374-83.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02263.x>
  - 14 .Thomas M, Winter S, Klumpp B, Turpeinen M, Klein K, Schwab M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR $\alpha$ , directly regulates transcription of cytochrome P450 CYP2C8. *Front Pharmacol* 2015;6:261.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00261>
  - 15 .Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000;405(6785):421-4.  
<https://doi.org/10.1038/35013000>
  - 16 .Maculewicz E, Mastalerz A, Maciejewska-Skrendo A, Cięszczyk P, Cywińska A, Borecka A, et al. Association between peroxisome proliferator-activated receptor-alpha,-delta and-gamma gene (PPARA, PPARD, PPARG) polymorphisms and overweight parameters in physically active men. *Biol Sport* 2021;38(4):767-76  
<https://doi.org/10.5114/biolSport.2022.109957>
  - 17 .Wójtowicz S, Strosznajder AK, Jeżyna M, Strosznajder JB. The novel role of PPAR alpha in the brain: promising target in therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neurochem Res* 2020;45(5):972-88  
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-02993-5>
  - 18 .Schoon P, Myoungsuk K, Ji Eun K, Kwangsoo K, Minsu P, Yong Chul K, Kwon Wook J, Yon Su K, Hajeong L. Characteristics of Kidney Transplantation recipients over time in South Korea. *Korean J Intern Med* 2020;35(6):1457-67.  
<https://doi.org/10.3904/kjim.2019.292>
  - 19 .Philip F. Halloran, M.D. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMra033540>
  - 20 .Christians U, Strom T, Zhang YL, et al. Active drug transport of immunosuppressant: new insights for pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Ther Drug Monit* 2006Feb;28(1):39-44.  
<https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000183385.27394.e7>
  - 21 .Enver A, Barbara M. Gene polymorphisms and transplantation. *Curr Opin Immunol* 2001;13(5):572-6. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00261-2)
  - 22 .Golsa Gh, Shahrzad Sh, Ziba F, Shahla Sh, Morteza M. TRANSPLANTATION Sirolimus Dose Requirement in Kidney Transplant Recipients in Iran Iran *J Kidney Dis* 2020;14(6):510-6.
  - 23 .Lolita L, Zheng M, Zhang X, Han Z, Tao J, Fei S, et al. The genetic polymorphism of CYP3A4 rs2242480 is associated with sirolimus trough concentrations among adult renal transplant recipients. *Curr Drug Metab* 2020;21(13):1052-9.  
<https://doi.org/10.2174/1389200221999201027203401>
  - 24 .Liu J, Feng D, Kan X, Zheng M, Zhang X, Wang Z, et al. Polymorphisms in the CYP3A5 gene significantly affect the pharmacokinetics of sirolimus after kidney transplantation. *Pharmacogenomics* 2021;22(14):903-12.  
<https://doi.org/10.2217/pgs-2021-0083>
  - 25 .Woillard J-B, Kamar N, Coste S, Rostaing L, Marquet P, Picard N. Effect of CYP3A4\* 22, POR\* 28, and PPARA rs4253728 on sirolimus in vitro metabolism and trough concentrations in kidney

transplant recipients. Clin Chem 2013;59(12):1761-9. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.204990>

26 .Eynon N, Ruiz JR, Meckel Y, Moran M, Lucia AMitochondrial biogenesis related endurance

genotype score and sports performance in athletes. Mitochondrion 2011;11(1):64-9. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.07.004>

## STUDY OF RS4253778 POLYMORPHISM RELATED TO PEROXISOME PROLIFERATOR ALPHA RECEPTOR GENE IN RAPAMYCIN-TREATED KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS IN WEST AZARBAIJAN PROVINCE (IRAN)

Haniyeh Rostami Barandouz<sup>1</sup>, Reza Mohammadzadeh<sup>2</sup>, Morteza Bagheri<sup>3\*</sup>

Received: 04 March, 2024; Accepted: 09 April, 2024

### Abstract

**Background & Aims:** Rapamycin (sirolimus) is one of the immunosuppressive drugs that has a strong immunosuppressive effect and one of the factors that inhibits mTOR. The drug rapamycin is used in the prevention of kidney transplant rejection in kidney transplant recipients. Sirolimus is not only an inhibitor of the target of rapamycin, but also a substrate for cytochrome P450 enzyme subfamilies and for multidrug efflux pumps. The results of recent studies have shown that peroxisomal proliferation activating receptors, as a group of nuclear receptors, have multiple cellular effects and their genetic polymorphisms in connection with other genes play an important role in creating human immune system responses. The aim of this study was to determine the peroxisome proliferator alpha gene polymorphism in kidney transplant recipients treated with rapamycin and healthy controls in West Azerbaijan province (Iran) and compare them with each other.

**Materials & Methods:** In this case-control study, 40 kidney transplant recipients treated with rapamycin one mg (as case group) and 63 healthy controls as control group were evaluated. Samplings were done in the kidney transplant clinic of Imam Khomeini Hospital (Urmia) under the supervision of a kidney specialist. The salting out method was used to genomic DNA isolation. PCR products were analyzed after enzymatic cleavage with Taq<sup>®</sup> enzyme. Data were obtained by direct counting of observed alleles and genotypes as well as the total number of samples. Then chi-square test or Fisher's exact test was used to analyze the results in the 2x2 table. The significant difference between the two groups was considered equal to 0.05.

**Results:** The frequency of homozygous G/G PPAR $\alpha$  rs4253778 genotype and heterozygous G/C PPAR $\alpha$  rs4253778 genotype observed in the healthy control group of the present study was 40 (63.49%) and 23 (36.51%) respectively. The homozygous C/C PPAR $\alpha$  rs4253778 genotype was not observed in the healthy control group. The frequency of homozygous genotype G/G, heterozygous genotype G/C and homozygous genotype C/C in PPAR  $\alpha$  rs4253778 Biomarker in the patient group was 29 (72.5%), 9 (22.5%) and 2 (5%) respectively. Comparison of the desired frequencies in the two groups showed that there is no statistically significant difference ( $P > 0.05$ ). The frequency of G and C alleles in the patient group is 0.84 and 0.16, respectively; and in healthy control it is equal to 0.81 and 0.19 respectively.

**Conclusion.** In the present study, we concluded that there was no significant relationship between PPAR $\alpha$  rs4253778 G>C polymorphism and the use of low concentration of rapamycin. Further study with more samples related to the topic is recommended.

**Keywords:** Kidney Transplantation, PPAR alpha rs4253778 G>C Polymorphism, Rapamycin (Sirolimus)

**Address:** Cellular and Molecular Research Center, Cellular and Molecular Medicine Research Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

**Tel:** +984433486165

**Email:** mortezabagheri@umsu.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2024: 35(1): 29 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

<sup>1</sup> MSc in Molecular Cell Biology, Genetics, Department of Biology, Maragheh University, Maragheh, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, Maragheh University, Maragheh, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor of Molecular Biology and Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Cellular and Molecular Medicine Research Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)