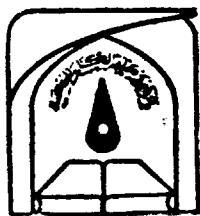


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۱۳۷۲ / ۱۳ / ۸

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تماس: مدارک



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

موضوع:

اندازه‌گیری و مقایسه غلظت سیکلوسپورین A
(ساندیمون) و ساندیمون نئورال در خون بیماران
پیوند کلیوی به روش HPLC

نگارش:

فهیمة خیردوش

استاد راهنما:

دکتر عبدالامیر علامه

دیماه: ۱۳۷۴

۴۳۲۴

تقدیم به :

**تمام بیماران کلیوی که روزهای سخت بیماری را با توکل به
خداوند یگانه و با امید به بهبود، صبورانه تحمل می‌کنند.**

و

مادر عزیز و فداکارم

چکیده:

سیکلوسپورین یک داروی ایمنوساپرسیو (immunosuppressive) است که از طریق مهار فعالیت T- سلها عمل می‌کند این دارو برای جلوگیری از رد پیوند اعضا تجویز می‌گردد. سیکلوسپورین دارای یک دامنهٔ درمانی باریک و اثرات سمی بالقوه‌ایی است که این اثرات عمدتاً وابسته به غلظت این دارو می‌باشند. فارماکوکینتیک این دارو در یک بیمار و یا در بین بیماران مختلف متفاوت است و داروهایی که همراه آن مصرف می‌شوند، روی غلظت خونی این دارو اثر می‌گذارند. جذب محلول خوراکی سیکلوسپورین بستگی به جریان طبیعی صفرا و ترشح آن در ابتدای روده دارد و در کلستازیز مقدار جذب سیکلوسپورین کاهش می‌یابد. فقر جذب محلول خوراکی سیکلوسپورین معمولی با استفاده از فورمولاسیون جدید خوراکی که خصوصیات جذب را اصلاح می‌کند، برطرف می‌گردد و با مونیتور (monitor) سیکلوسپورین می‌توان درمان انتخابی را ارزشیابی کرد. غلظت سیکلوسپورین را می‌توان در خون و با استفاده از رادیوایمنواسی (radioimmunoassay) و یا HPLC (high performance liquid chromatography) اندازه‌گیری نمود. در این تحقیق ما AUC (Area under the concentration - time curve) محلول خوراکی میکروامولسیون سیکلوسپورین (Sandimmun Neoral) را با سیکلوسپورین معمولی (Sandimmun) در ۱۰ بیمار پیوند کلیوی اندازه‌گیری و مقایسه نمودیم. نتایج آزمایش نشان داده است که برخلاف سیکلوسپورین معمولی سطح خونی این دارو در بیماران مختلف، معمولاً ثابت است. اگر چه مقدار نئورال دریافتی در بیماران ۲۰٪ کمتر از دوز سیکلوسپورین معمولی است اما میانگین AUC برای نئورال و سیکلوسپورین به ترتیب $h^{-1} \text{ng ml}^{-1}$ ۳۳۲۸ و ۳۲۹۱ می‌باشد، که نشان دهنده جذب بیشتر نئورال است.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

- ۱-۱ - سیکلوسپورین A ۱
- ۲-۱ - مروری بر مطالعات انجام شده ۲
- ۳-۱ - فارماکوکینتیک ۴
- ۱-۳-۱ - جذب و اثر فاکتورهای مختلف در جذب سیکلوسپورین A ۵
- ۲-۳-۱ - توزیع و اثر فاکتورهای مختلف بر توزیع سیکلوسپورین A ۶
- ۳-۳-۱ - دفع و اثر فاکتورهای مختلف بر دفع سیکلوسپورین A ۸
- ۴-۱ - مکانیسم اثر سیکلوسپورین ۹
- ۵-۱ - تداخل دارویی ۱۰
- ۶-۱ - عوارض مصرف سیکلوسپورین A ۱۲
- ۷-۱ - متابولیتهای سیکلوسپورین A ۱۴
- ۸-۱ - ایمنوساپرسیوها ۱۶
- ۹-۱ - ساندریمون نتورال ۱۸

فصل دوم: مونیتور سیکلوسپورین A

- ۱-۲ - روشهای عملی مونیتور کردن سیکلوسپورین A ۲۴
- ۲-۲ - انتخاب نمونه و شرایط آن در مونیتور کردن سیکلوسپورین A ۲۹

۳-۲ - روشهای اندازه‌گیری سیکلوسپورین A ۳۱

۱-۳-۲ - روشهای ایمنواسی ۳۱

۲-۳-۲ - روش HPLC ۳۲

فصل سوم: نمونه‌گیری و انجام آزمایش

۱-۳ - گروههای مورد مطالعه ۴۳

۲-۳ - روشهای HPLC مورد استفاده برای اندازه‌گیری سیکلوسپورین ۴۳

۱-۲-۳ - مواد شیمیایی و وسایل لازم ۴۵

۲-۲-۳ - تهیه محلولها و استانداردها ۴۵

۳-۲-۳ - مراحل آماده‌سازی نمونه‌های خونی ۴۷

۳-۲-۴ - شرایط آنالیز با HPLC ۴۸

فصل چهارم: نتایج آزمایش

۱-۴ - مقایسه کروماتوگرامهای HPLC مربوط به حلال، محلولهای استاندارد سیکلوسپورین و

نمونه‌های استاندارد خون ۵۰

۲-۴ - منحنی کالیبراسیون سیکلوسپورین A ۶۱

۳-۴ - دقت روش آزمایش ۶۳

۴-۴ - محاسبه غلظت سیکلوسپورین A در نمونه‌های خونی مورد آزمایش ۶۳

۵-۴ - محاسبه AUC ۶۴

۶-۴ - نتایج تستهای آماری ۷۱

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

۱-۵ - بحث و بررسی ۷۴

۲-۵ - پیشنهادات ۸۱

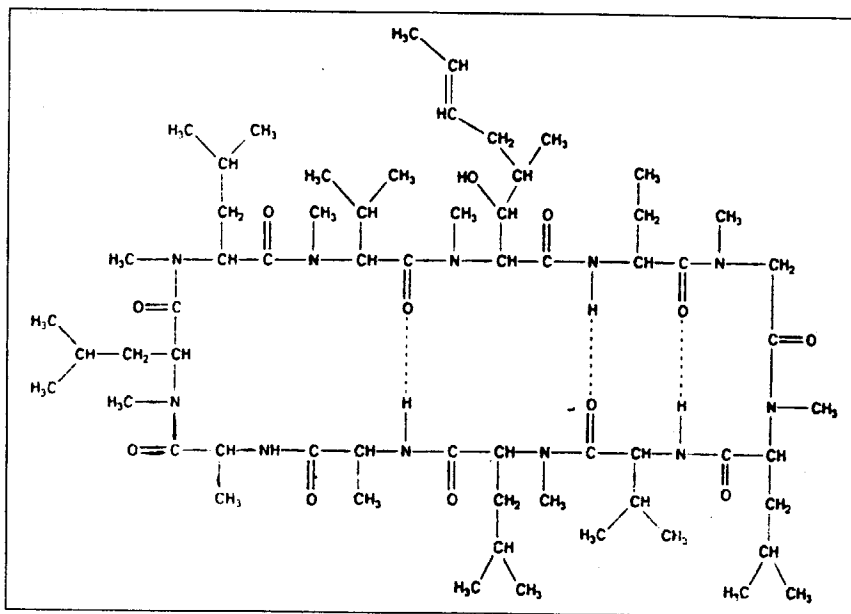
۸۳.....	مراجع
۱۰۱.....	ضمائم
۱۱۰.....	چکیده انگلیسی

فصل اول

مقدمه

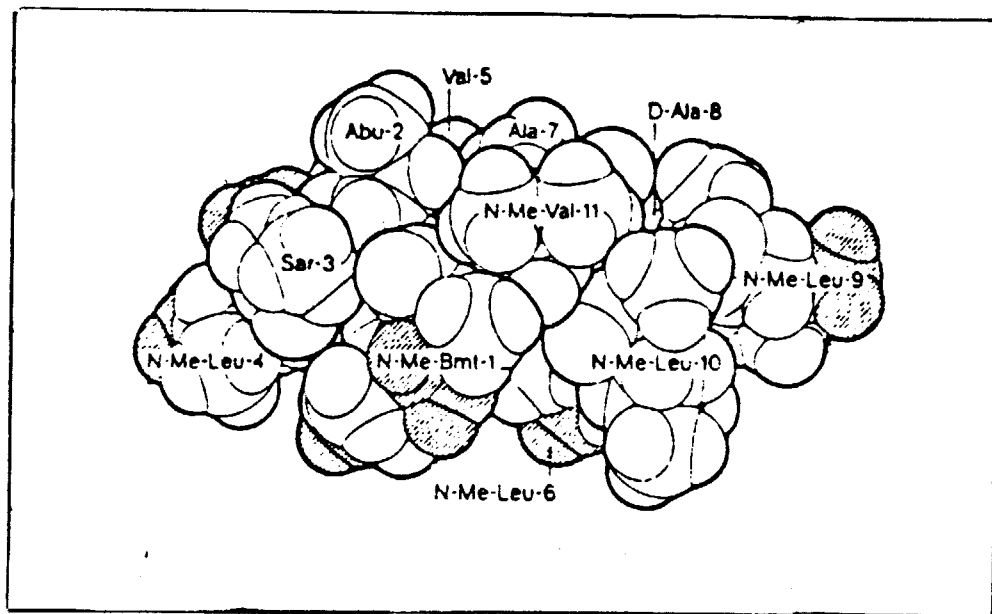
۱-۱ سیکلوسپورین A:

سیکلوسپورین A (CSA) یک داروی تضعیف‌کننده سیستم ایمنی (immunosuppressive) است که از نوعی قارچ به نام *Tolypocladium inflatum* استخراج می‌شود [۶۲]. سیکلوسپورین شامل ۱۱ اسید آمینه است و یک ساختمان حلقوی را تشکیل می‌دهد. تمام این اسید آمینه‌ها غیر از اسید آمینه شماره ۱ آلانین هستند. در ساختمان سیکلوسپورین بر روی موقعیت‌های ۴، ۶، ۹ و ۱۰ اسید آمینه N - متیل لوسین قرار دارد، والین در موقعیت ۵، آلانین در موقعیت ۷، D - آلانین در موقعیت ۸، α - آمینو بوتیریک اسید در موقعیت ۲، سارکولین در موقعیت ۳ و N متیل والین در موقعیت ۱۱ قرار دارند. تمام این اسید آمینه‌ها به جز D - آلانین و سارکولین از نوع L می‌باشند. سیکلوسپورین به خاطر داشتن پیوند هیدروژنی از نظر ساختمان پایدار است [۲۳].



شکل ۱-۱ (الف): فرمول ساختمانی سیکلوسپورین A

این دارو توسط شرکت ساندوز ساخته می‌شود و نام تجارتي آن Sandimmun است [۱۰۳].
 سیکلوسپورین دارای یک دامنهٔ درماني محدود می‌باشد و کینتیک دارویی
 (pharmacokinetic) آن در بیماران مختلف متفاوت است.



شکل ۱-۱ (ب): آرایش فضایی سیکلوسپورین A

۲-۱- مروری بر مطالعات انجام شده:

در سال ۱۹۷۰ توسط محققین شرکت ساندوز روی قارچ *TolyPodadium inflatum* بررسیهایی انجام شد [۱۰۰]. در سال ۱۹۷۲ این محققین پی بردند که استخراج ناخالص این قارچ خاصیت مهارکنندگی سیستم ایمنی را دارد. در سال ۱۹۷۶ مدلهای مختلفی مورد بررسی قرار گرفت و اثرات ایمنوساپرسیو ویژه این ترکیب تأیید [۸] و سپس سیکلوسپورین به عنوان یک داروی ایمنوساپرسیو شناخته شد [۵۷].

ارتباط خوبی بین غلظت کم سیکلوسپورین و رد پیوند از یک طرف و از طرف دیگر بین غلظتهای بالای آن و ایجاد عوارض سمی وجود دارد [۲۶، ۴۷، ۴۹، ۵۰، ۵۶، ۹۰، ۹۴]. اختلاف بین غلظت سیکلوسپورین درمانی و غلظتی که اثرات سمی دارد، کاملاً روشن نیست و نشان داده شده است که همپوشانی زیادی بین این دو غلظت وجود دارد [۵۶، ۱۱۴]. در بعضی از بیماران، حتی غلظتهای پایینتر از غلظت درمانی سیکلوسپورین A، ممکن است ایجاد مسمومیت کند ولی در بعضی دیگر غلظتهای بالا تحمل می شود و فعالیت سیستم ایمنی را به اندازه کافی مهار می کند.

مونیتور در طول مدت تجویز دارو برای ارزیابی درمان با سیکلوسپورین لازم است. مهمترین روش برای مونیتور سیکلوسپورین در طی درمان، اندازه گیری غلظت مینیمم سیکلوسپورین (C_{min}) ۱۲ یا ۲۴ ساعت بعد از مصرف دارو و درست قبل از دریافت دوز بعدی می باشد [۴۷، ۴۸، ۴۹، ۵۰، ۵۶، ۹۴، ۱۰۰، ۱۰۳، ۱۱۴].

معمولاً اندازه گیری C_{min} سیکلوسپورین هر دو روز یکبار بعد از شروع مصرف دارو تا وقتی که بیمار از نظر شرایط بالینی و غلظت دارو به وضعیت ثابتی برسد، انجام می شود، سپس مونیتور غلظت سیکلوسپورین تدریجاً تا یکبار در ماه کاهش می یابد. (معمولاً تا وقتی که بیمار دارو را مصرف می کند مونیتور آن ادامه دارد).

اخیراً بعضی از مراکز در فواصل مصرف دارو علاوه بر مقدار C_{min} بررسیهای

فارماکوکینتیک هم انجام می دهند [۲،۴۴،۵۹].

تصور می شود که این تکنیک در مورد رد پیوند و یا عوارض سمی بعدی در بیماران پیوند

کلیوی اطلاعات بیشتری را در اختیار قرار می دهد [۲،۴۴،۵۲].

بعضی از محققین پیشنهاد می کنند که سیکلوفیلین (گیرنده سیکلوسپورین) متصل به

سیکلوسپورین می تواند برای مونیتور در جریان درمان مفید باشد [۳۵].

سیکلوفیلین دارای وزن ملکولی کمی است و یک پروتئین اتصالی برای سیکلوسپورین

است که تصور می شود، گیرنده سلول مسؤل برای ایمنوساپرسیو می باشد [۲۴،۳۳،۷۲،۹۱].

اگرچه تمام مشتقات ایمنوساپرسیو سیکلوسپورین به سیکلوفیلین متصل می شوند ولی

همه آنها از نظر خاصیت تضعیف کنندگی سیستم ایمنی فعال نمی باشند.

در مونیتور درمانی سیکلوسپورین استفاده از بعضی سنجشهای بیولوژیکی برای بررسی

فعالیت ایمنوساپرسیو (مونیتور فارماکودینامیک) همراه با اندازه گیری C_{min} (مونیتور

فارماکوکینتیک) رواج بیشتری یافته است [۲۸،۳۰،۱۰۰،۱۰۳].

۳-۱- فارماکوکینتیک

سیکلوسپورین معمولاً به صورت خوراکی، چه به صورت محلول و چه به صورت

کپسولهای نرم ژلاتینی مصرف می شود. این دو فورمولاسیون از نظر بیواکی والانت

(bioequivalent) با یکدیگر برابر می باشند و می توان آنها را جایگزین یکدیگر نمود [۸۱]. از

اندازه گیری غلظت دره (trough) سیکلوسپورین برای تنظیم دوز براساس وزن بدن استفاده

می شود. غلظت تراف در یک بیمار و همچنین در میان بیماران مختلف یکسان نیست. آنچه که

سبب اختلاف در غلظت تراف می شود مربوط به تفاوت فارماکوکینتیک یعنی تفاوت در جذب، توزیع، متابولیسم و دفع سیکلوسپورین در بیماران می باشد [۱۰۰].

از آنجایی که این مفاهیم برای درک فارماکوکینتیک سیکلوسپورین ضروری است مختصراً تعریف خواهند شد و سپس به فاکتورهایی که در طی دوره درمان ممکن است بر آنها تأثیر گذارند اشاره می گردد.

۱-۳-۱- جذب (Absorbtion)

جذب سیکلوسپورین در دستگاه گوارش کامل نیست، ۸۹-۲٪ از داروی مصرفی جذب می شود [۴۴]. همچنین ویژگی فردی سبب تفاوت در فراهمی زیستی (bioavailability) سیکلوسپورین می شود. میانگین فراهمی زیستی این دارو در دریافت کنندگان مختلف پیوند عضو ۳۰٪ می باشد. غلظت خونی و باپلاسمایی معمولاً ۸ تا ۱ ساعت بعد از مصرف خوراکی سیکلوسپورین به حداکثر مقدار (Peak) خود می رسد اگرچه ممکن است در مواقعی با تأخیر اتفاق افتد [۴۰].

شرایط مختلفی روی جذب سیکلوسپورین اثر دارند که از جمله به موارد زیر اشاره می شود. **کمبود صفرا:** برای جذب روده ای مواد محلول در چربی، صفرا نقش اساسی دارد از آنجا که سیکلوسپورین یک ترکیب لیپوفیل است هر فاکتوری که سبب کمبود صفرا شود می تواند مانع جذب سیکلوسپورین گردد اما در بیمارانی که افزایش جریان صفرا دارند ممکن است غلظت سیکلوسپورین ۲ تا ۶ برابر افزایش یابد [۶۸، ۱۰۳].

وضعیت دستگاه گوارش: اگر دستگاه گوارش خوب کار نکند جذب سیکلوسپورین خوراکی کاهش می یابد مثلاً در بیمارانی که به دلایل مختلف اسهال دارند جذب کاهش می یابد معمولاً در این مواقع سیکلوسپورین به طور داخل وریدی تجویز می شود همچنین معده خالی روی جذب سیکلوسپورین اثر دارد و سبب کاهش جذب آن از روده می شود [۹۴، ۱۰۳].

زمان: فراهمی زیستی سیکلوسپورین بعد از پیوند عضو با گذشت زمان

افزایش می‌یابد. در دریافت کنندگان کلیه فراهمی زیستی در خلال ماه اول بعد از پیوند کلیه ۵۰٪ و حدود سه ماه بعد از پیوند تا ۵ برابر افزایش می‌یابد و این درحالی است که کلیرانس دارو تغییر نکرده است. مکانیسم این افزایش گرچه شناخته نشده است، ولی احتمالاً به افزایش جذب سیکلوسپورین در دستگاه گوارش مربوط می‌شود [۹۴].

غذا: در مورد اثر غذا در جذب سیکلوسپورین نظرات متفاوت است. کسانی که معتقدند جذب سیکلوسپورین هنگامی که با غذا مصرف می‌شود، افزایش می‌یابد، علت این افزایش را تحریک جریان صفرا در پاسخ به جذب دهانی غذا با توجه به خاصیت لیپوفیلی بالای آن می‌دانند. کلاً از مطالعات استنباط می‌شود که غذای سبک اثری روی جذب سیکلوسپورین ندارد در حالی که یک غذای چرب جذب آن را افزایش می‌دهد [۶۸، ۸۹، ۹۴].

معمولاً سیکلوسپورین همراه شیر، شیرکاکائو و یا آب میوه خورده می‌شود [۸۱]. نتایج یک آزمایش نشان داده است که آشامیدن آب گریپ فروت همراه این دارو در مقایسه با آب پرتقال و یا آب سیب افزایش فراهمی زیستی آن می‌شود. مکانیسم این اثر کاملاً معلوم نیست ولی فلاونوئیدهای (Flavonoids) موجود در آب گریپ فروت ممکن است سیستم آنزیمی P450 را مهار کند این همان آنزیمی است که به طور وسیعی سیکلوسپورین را متابولیزه می‌کند. این مسأله می‌تواند در مورد مصرف کمتر سیکلوسپورین که داروی گرانبهایی است حائز اهمیت باشد [۱۲۴].

۱-۳-۲ - توزیع (Distribution)

سیکلوسپورین به طور گسترده‌ای در سراسر بدن توزیع می‌شود بالاترین غلظت (ده برابر بیشتر از خون) در بافت چربی و کبد یافت می‌شود. در ارگانهایی مانند طحال، گره‌های لنفاوی، مغز استخوان و بافت چربی ارگانهایی مانند کبد، پانکراس، غده آدرنال، تیروئید، غدد بزاقی، ششها و پوست غلظت سیکلوسپورین بیشتر از غلظت آن در خون است غلظت سیکلوسپورین

در ماهیچه تقریباً برابر خون و در مغز کمتر از خون می باشد این دارو از سد خونی مغزی عبور نمی کند ولی از جفت عبور می کند و در مایع آمنیوتیک و خون نوزاد به خوبی شیر مادر قابل اندازه گیری می باشد [۲۷،۶۸].

فاکتورهای مختلفی روی توزیع سیکلوسپورین اثر دارد که در زیر به چند مورد اشاره می شود:

پروتئین های اتصال سیکلوسپورین در پلاسما: چون سیکلوسپورین به لیوپروتئین ها متصل می شود، تغییر در لیوپروتئین ها می تواند سبب تغییر در کینتیک آن شود. بنابراین معالجه با سیکلوسپورین وابسته به افزایش کلسترول، کلسترول LDL و آپولیپروتئین B می باشد [۶]. مثلاً در بیماران با هیپرلیپوپروتئین ایمای نوع V ممکن است غلظت سیکلوسپورین در سرم بدون هیچگونه علائم مسمومیت، بالا باشد [۶۸].

هماتوکریت: ارتباط معکوسی بین هماتوکریت و مقدار سیکلوسپورین پلاسما وجود دارد آنالیزها نشان می دهند که وقتی هماتوکریت ۱۰٪ افزایش داشته باشد مقدار سیکلوسپورین در پلاسما ۱۲-۱۴٪ کاهش می یابد [۹۶].

دمای بدن: در سیستم invitro نشان داده شده که توزیع سیکلوسپورین بین سلولهای خون و پلاسما وابستگی زیادی به درجه حرارت دارد. طوری که اگر پلاسما در 37°C جدا شود غلظت سیکلوسپورین آن ۱۵٪ از پلاسمایی که در دمای 36°C جدا شده باشد، بیشتر است بنابراین تب می تواند سبب تغییر در توزیع سیکلوسپورین شود [۱۴،۶۸].

جنس: نتایج آزمایش با روشهای غیر ویژه نشان می دهد که توزیع سیکلوسپورین در دریافت کنندگان پیوند کلیه وابسته به جنس است در حالی که استفاده از تکنیک ویژه HPLC چنین تفاوتی را در دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان نشان نمی دهد [۱۹،۲۹].