بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه الزهرا

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی

عنوان

بررسی فارماکوژنتیک (ژن *CYP2C19*) و فارماکوکینتیک داروی کلوپیدوگرل در بیماران آترواسکلروتیک

اساتید راهنما

سر کار خانم دکتر پریناز قدم

سرکار خانم دکتر سیما صدرای

ارائه دهنده

مریم دهقانی کفترک

شهریور ۱۳۹۰

کلیه دستاوردهای این تحقیق متعلق به دانشگاه الزهرا می باشد.

تقدیم به

قطب عالم امکان

حضرت مهدی صاحب العصر و الزمان

با سپاس از اساتید بزرگوارم-سرکار خانم دکتر قدم و استاد بزرگوار دکتر صدرای- که از خرمن علمشان بهره‌ها اندوختم.

چکیده:

کلوپیدوگرل اکنون یکی از داروهای اصلی در درمان بیماران مبتلا به سندروم کرونری حاد می‌باشد. علی‌رغم موفقیت بالای این دارو، وجود مقاومت ژنتیکی برخی بیماران نسبت به کلوپیدوگرل ، به معضلی در درمان این بیماری مبدل گردیده است. مطالعات نشان داده‌اند که عوامل مختلف درونی مانند پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در آنزیم‌های سیتوکروم کبدی، مسیرهای جایگزین برای رهاسازی ADP و عوامل بیرونی مانند برهم‌کنش‌های دارو-دارو و دوز نامناسب تجویز شده در مقاومت به کلوپیدوگرل دخیلند . بررسی‌های زیادی که در جمعیت‌های مختلف صورت پذیرفته است ،حاکی از آن است که یکی از عوامل مهم مقاومت ژنتیکی به داروی کلوپیدوگرل وجود پلی‌مورفیسم *CYP2C19*2* می‌باشد. پیامد کلینیکی نامطلوب این مساله، افزایش چند برابری در نرخ حوادث راجعه ایسکمیک می‌باشد. با توجه به اهمیت این مساله و از آنجایی که تا کنون چنین تحقیقی در بیماران ایرانی صورت نگرفته است، در این تحقیق رابطه بین فارماکوکینتیک و فارماکوژنتیک کلوپیدوگرل بررسی شده است. بدین منظور، پلی‌مورفیسم ژن *CYP2C19*2* و رابطه آن با فارماکو کینتیک کلوپیدوگرل مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا میزان این پلی‌مورفیسم در ۷۰ بیمار مبتلا به سکته قلبی، با روش RFLP-based PCR برآورد گردید و میزان متابولیت فعال دارو در پلاسمای بیماران نیز با کمک روش HPLC اندازه-گیری شد. از میان ۷۰ بیمار، ۵۰ بیمار دارای ژنوتیپ *CYP2C19*1*1* و ۱۷ بیمار نیز دارای ژنوتیپ *CYP2C19*1*2* و سه نفر نیز دارای ژنوتیپ *CYP2C19*2*2* می‌باشند. که در گروه *CYP2C19*1*2* ، میزان غلظت پلاسمایی کلوپیدوگرل، به طور محسوسی پائین‌تر از گروه با ژنوتیپ *CYP2C19*1*1* می‌باشد. در مورد *CYP2C19*2*2* به دلیل کم بودن تعداد بیماران، قضاوتی صورت نگرفت.

مقدمه..... ۱
۱-۱- ساختار دیواره اندوتلیوم رگ..... ۲
۱-۲- ساختار پلاکت‌ها..... ۲
۱-۲-۱-گیرنده‌های پلاکتی..... ۲
۱-۲-۱-۱-Lucin Rich Repeat Family..... ۳
۱-۲-۱-۲- Immunoglubolin Receptors ۳
۱-۲-۱-۳-Integrins Receptor ۴
۱-۲-۱-۴- Seven Transmembrane Receptors ۷
۱-۲-۱-۴-۱- ADP Receptors ۷
۱-۲-۱-۴-۲- Thrombin Receptors ۹
۱-۳- فرآیند تجمع پلاکتی..... ۱۰
۱-۳-۱- مرحله آغاز..... ۱۰
۱-۳-۱-مرحله گسترش..... ۱۲
۱-۳-۳- مرحله تثبیت:حوادث مرتبط با تماس و تسهیل کننده تماس..... ۱۷
۱-۴- داروهای ضد پلاکتی..... ۱۸
۱ -۴-۱- طبقه‌بندی داروهای ضد پلاکتی..... ۱۸
۱-۵- داروی کلوپیدوگرل..... ۱۹
۱-۵-۱-فارماکودینامیک کلوپیدوگرل..... ۲۰

۱-۵-۲-فارماکوکینتیک کلوپیدوگرل..... ۲۱
۱-۵-۳-پاسخ به کلوپیدوگرل..... ۲۲
۱-۵-۳-۱- حساسیت به کلوپیدوگرل..... ۲۳
۱-۵-۳-۲- مقاومت به کلوپیدوگرل..... ۲۳
۱-۵-۳-۳- اثر عوامل مختلف در پاسخ به کلوپیدوگرل..... ۲۴
۱-۶- هدف از تحقیق..... ۲۸
۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌های خون بیماران..... ۳۰
۲-۲- استخراج DNA با محلول DNG-Plus ۳۱
۲-۳- آیتم دستگاه‌ها..... ۳۲
۲-۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۳۳
۲-۵-RFLP-Based PCR ۳۴
۲-۶- الکتروفورز با ژل آگاروز..... ۳۷
۲-۶-۱- انجام الکتروفورز بر روی ژل آگاروز..... ۳۸
۲-۶-۲- رنگ‌آمیزی و مشاهده ژل آگاروز..... ۳۸
۲-۷- الکتروفورز با ژل پلی‌آکریل‌آمید..... ۳۹
۲-۷-۱- طرز تهیه ژل پلی‌آکریل‌آمید..... ۳۹
۲-۸- HPLC کروماتوگرافی مایع با فشار بالا..... ۴۲
۲-۸-۱- نحوه کار با دستگاه HPLC..... ۴۲
۲-۸-۲- وسایل و مواد لازم برای انجام HPLC ۴۶

۲-۸-۳- روش HPLC برای تعیین غلظت نمونه‌های پلاسمایی..... ۴۶

۲-۸-۴- روش استخراج دارو از نمونه‌های پلاسمایی..... ۴۷

فصل سوم: نتایج..... ۴۸

۳-۱- نتایج استخراج DNA از نمونه‌های خونی بیماران..... ۴۹

۳-۲- نتایج PCR ژن *CYP2C19* ۵۰

۳-۳- نتایج حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم محدودالاثر *SmaI* ۵۱

۳-۴- نتایج حاصل از HPLC ۵۳

فصل چهارم: بحث..... ۵۸

پیشنهادات..... ۶۴

مراجع ۶۵

ضمیمه..... ۷۴

فهرست اشکال.....صفحه

شکل ۱-۱: کمپلکس گیرنده GPIb-V-IX ۳

شکل ۱-۲: ساختار گیرنده کلاژنی GPVI ۴

شکل ۱-۳: ساختار اینتگرین $\alpha_2\beta_1$ ۶

شکل ۱-۴: ساختار اینتگرین $\alpha IIb\beta_3$..... ۷

شکل ۱-۵: گیرنده‌های پیورنرژیک پلاکتی..... ۸

شکل۱-۶: گیرنده PAR و مکانیسم عمل آن..... ۱۰

شکل ۱-۷: مسیر تولید ترومبوکسان..... ۱۲

شکل ۱-۸: مسیر پیام رسانی کلی با GPCR ۱۳

شکل ۱-۹: مسیر پیام‌رسانی از طریق رسپتور P2Y12 ..... ۱۶

شکل ۱-۱۰ : ساختار کلوپیدوگرل هیدروژن بی سولفات..... ۱۹

شکل ۱-۱۱: متابولیتهای مختلف کلوپیدوگرل..... ۲۲

شکل ۲-۱: قطعات حاصل از هضم آنزیمی *CYP2C19*2*..... ۳۵

شکل ۳-۱: واکنش PCR قطعه ۱۶۹ جفت بازی ژن..... ۵۰

شکل ۳-۲: توالی قطعه دارای SNP مورد نظر در ژن *CYP2C19*..... ۵۱

شکل۳-۳: نتایج حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل پلی آکریل‌آمید..... ۵۲

شکل ۳-۴: نتایج حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز ۳٪..... ۵۲

فهرست جداول.....صفحه

جدول ۲-۳: آیتم دستگاه‌ها.....۳۲

جدول ۲-۲: غلظت و نوع مواد موجود در واکنش زنجیره-ای پلیمراز.....۳۳

جدول ۲-۳ : اجزاء و مقادیر واکنش RFLP based PCR ۳۶

جدول ۲-۴: مشخصات آنزیم *Sma I* ۳۶

جدول ۲-۵: نوع و میزان مواد مورد استفاده برای تهیه بافرTBE (10x).....۳۷

جدول ۲-۶ : حجم مواد لازم برای تهیه ۱۰۰ ml محلول ژل پلی آکریل آمید با غلظت های مختلف..... ۴۲

جدول ۳-۱: نمونه‌ای از مشخصات DNA استخراج شده بیماران با دستگاه نانودراپ.....۴۹

جدول ۳-۲: مشخصات بیماران.....۵۵

جدول ۴-۱: مطالعات انجام شده بر روی اثر واریانت‌های سیتوکروم ۴۵۰ کبدی در مقاومت به کلوپیدوگرل.....۶۰

جدول ۴-۲: تحلیل داده‌ها با کمک متد T-test با واریانس نابرابر.....۶۳

فهرست نمودارها.....صفحه

نمودار ۳-۱:نمودار کالیبراسیون مایی.....۵۳

نمودار ۳-۲: نمودار حاصل از کالیبراسیون پلاسمایی کلوپیدوگرل.....۵۴

نمودار ۴-۱: گروه یک مربوط به ژنوتیپ *CYP2C19*1*1* و گروه دو مربوط به پلی مورفیسم *CYP2C19*1*2* می‌باشد.....۶۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱) ساختار دیواره اندوتلیوم رگ

دیواره رگ با پوشش داخلی اندوتلیوم آن، برای نگهداری از سیستم گردش خون ضروری است. علاوه بر کلاژن و فاکتور بافتی موجود در ماتریکس زیراندوتلیومی، که سبب تسهیل ادامه سیستم جریان خون بسته می-شوند، گیرنده‌های دیگری نیز وجود دارند که نقش مهمی را در فعال‌سازی پلاکت‌ها و تجمع آنها ایفا می‌کنند (Furie et al 2008). از جمله این گیرنده‌ها می‌توان به فاکتور ون- ویلبراند (von-Willebrand factor یا vWF) اشاره کرد که لیگاند عمده برای اتصال یکی از کمپلکس‌های اصلی گلیکوپروتئینی موجود بر سطح پلاکت‌ها (گلیکوپروتئین Ib/V/IX) بوده و گفته می‌شود به همراه فیبرینوژن و فیبرونکتین یکی از عوامل اصلی فعال‌سازی و تجمع پلاکت‌هاست (Jackson 2003, Furie et al 2008).

۱-۲) ساختار پلاکت‌ها

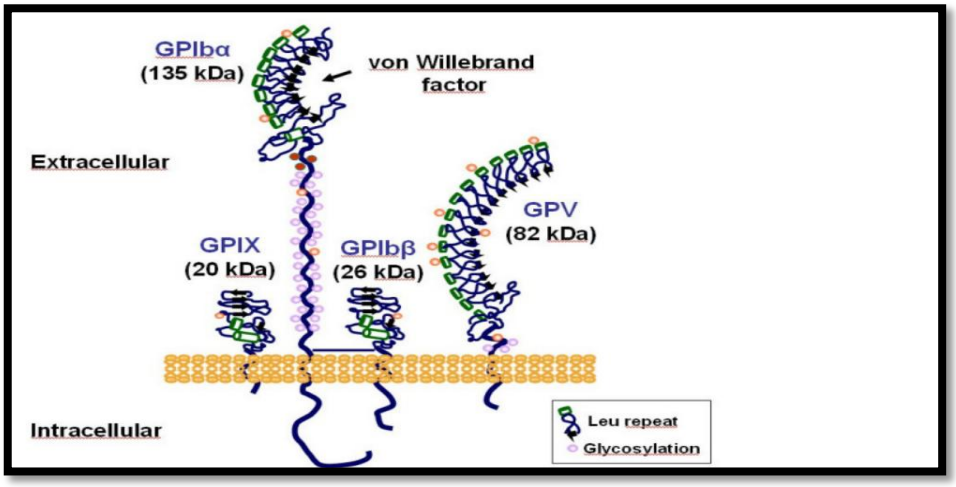
پلاکت‌ها به وسیله مگاکاریوسیت‌ها به عنوان سلول‌های بدون هسته اما حاوی mRNA مگاکاریوسیتی تولید می‌شوند. آنها هم چنین حاوی ماشین سلولی لازم برای ترجمه و تولید پروتئین‌های لازم می‌باشند. پلاکت‌ها بعد از ترک مغز استخوان در درون خون برای مدت ۱۰ روز به گردش درآمده و عملکرد اصلی‌شان، جلوگیری از خونریزی بعد از ترومای بافتی و آسیب رگی است (Davi et al 2007). ناحیه اندامکی در پلاکت‌ها وجود ندارد اما غالبا حاوی گرانول‌های ذخیره‌ای چون آدنوزین دی فسفات، سروتونین، کلسیم، اجسام متراکم، پراکسی‌زوم‌ها و لیزوزوم‌ها می‌باشند (Bhatt 2008) .

۱-۲-۱) گیرنده‌های پلاکتی

گیرنده‌های پلاکتی، بین پلاکت‌ها و محیط اطراف آنها، ارتباط برقرار کرده و در واکنش‌پذیری پلاکت‌ها نقش اساسی ایفا می‌کنند. پلاکت‌ها دارای انواع مختلف و متعددی از گیرنده‌ها می‌باشند که بر اساس ساختار، طبقه‌بندی می‌شوند. در اینجا به بررسی ساختار گیرنده‌های مرتبط با فرایند تجمع پلاکتی می‌پردازیم.

۱-۱-۲-۱ Leucine-Rich Repeat (LRR) Family

از مهم‌ترین این گیرنده‌ها می‌توان به کمپلکس GPIb-V-IX اشاره کرد که به مقدار بسیار زیادی بر روی سطح پلاکت‌ها بیان می‌شود (شکل ۱-۱). تمامی این گلیکوپروتئین‌ها به فرا خانواده پروتئین‌های تکرار غنی از لوسین تعلق دارند. GPIbα با وزن مولکولی ۱۳۵ کیلودالتون زیرواحد عملکردی عمده کمپلکس گیرنده می‌باشد و با یک پیوند دی سولفیدی به زیر واحد بتا متصل است. GPV و GPIX هر کدام به ترتیب با وزن ۸۸ و ۲۲ کیلو دالتون به صورت غیر کووالان به همدیگر مرتبطند. عملکرد اصلی کمپلکس GPIb-V-IX به دام انداختن پلاکت‌ها در محل زخم و کاهش سرعت آنها برای برقراری برهم‌کنش با دیگر گیرنده‌هاست (Varga-Szabo et al 2008).

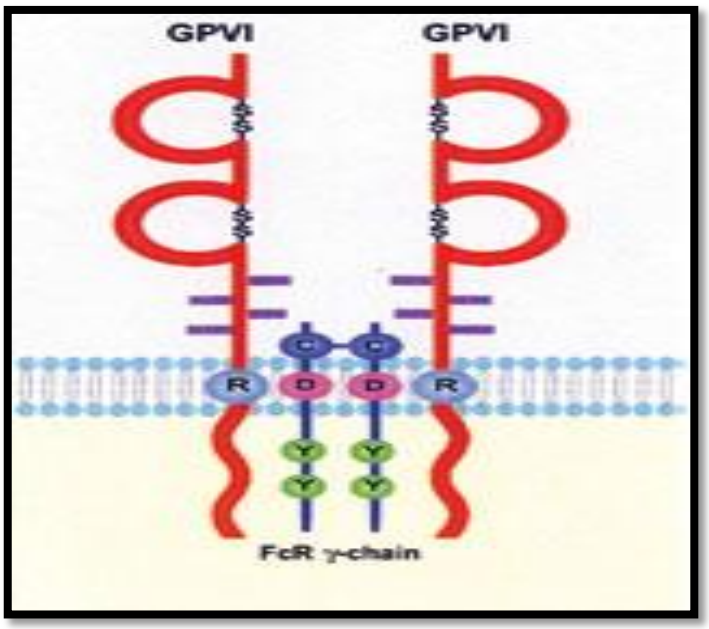


شکل ۱-۱: کمپلکس گیرنده GPIb-V-IX (Lanza 2006).

۱-۱-۲-۲ Immunoglobulin Superfamily

از دیگر گیرنده‌های موجود بر سطح پلاکت‌ها می‌توان به گیرنده‌هایی با ساختار فرا خانواده ایمونوگلوبین اشاره کرد. این دسته از گیرنده‌ها، دارای انواع مختلفی هستند که از مهم‌ترین آنها گیرنده‌های کلاژنی GPVI می‌باشد، که به همراه اینتگرین $\alpha_2\beta_1$ مهم‌ترین گیرنده پلاکتی برای کلاژن می‌باشد . GPVI یک گیرنده بین غشایی ۶۲ کیلو دالتونی است که به طور عمده بر روی پلاکت‌ها و مگاکاریوسیت‌ها بیان می‌شود

(شکل ۱-۲). این گیرنده دارای دو دمین خارج سلولی شبه ایمونوگلبولینی است که به وسیله دو پیوند دی سولفیدی به هم مرتبط شده‌اند. یک ساقه موسین مانند، یک ناحیه بین غشایی و یک دم کوتاه سیتوپلاسمی نیز داراست. این دم دارای یک ناحیه غنی از پرولین می‌باشد که به طور انتخابی به دمین SH_3 خانواده تیروزین کینازها متصل شده و در طی یک سلسله انتقال پیام شرکت کرده که نتیجه آن فعالیت شدید اینتگرین‌ها و رهاسازی حدواسط‌های ذخیره شده می‌باشد که نقش مهمی را در القای ترومبوز ایفا می‌نماید. اکنون به طور عمده پذیرفته شده است که این گیرنده، در فعال‌سازی پلاکت‌ها و تجمع آنها بر روی کلاژن نقش اساسی دارد.



شکل ۱-۲: ساختار گیرنده کلاژنی GPVI (Jung et al 2008).

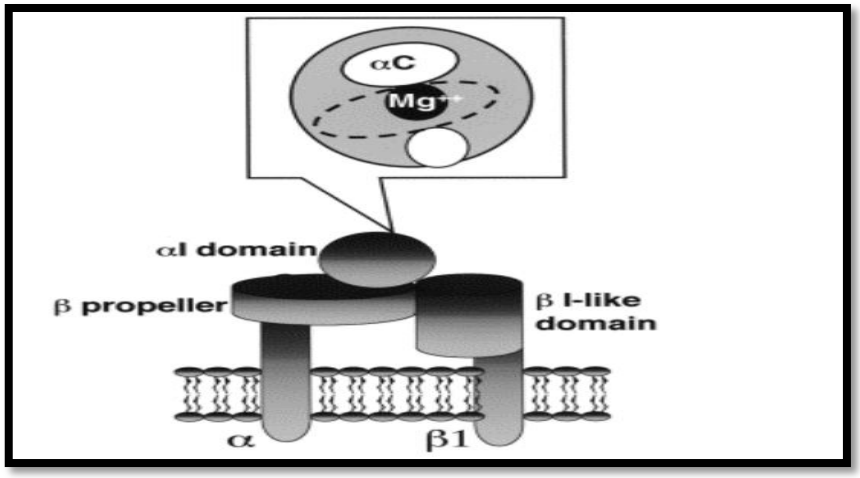
Integrins receptor (۳-۱-۲-۱

دسته مهم بعدی از گیرنده‌های موجود بر سطح پلاکت‌ها اینتگرین‌ها هستند که بر هم‌کنشهای ماتریکس خارج سلولی و سلول- سلول را کنترل می‌نمایند. به طور کلی، اینتگرین‌ها به سه خانواده β_1, β_2 و β_3 طبقه‌بندی می-شوند که شش نوع اینتگرین $\alpha2\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha L\beta2$, $\alpha IIb\beta3$, $\alpha v\beta3$ را شامل می‌شوند.

تصور می‌شود که اینتگرین‌ها در وضعیت تمایل پایین بر روی سطح پلاکت‌ها وجود دارند و به دنبال فعال‌سازی پلاکت‌ها به وضعیت تمایل بالا تبدیل می‌شوند. از این فرآیند تحت عنوان انتقال پیام داخل به خارج (

Inside-out) نام برده می‌شود. از طرف دیگر، اینتگرین‌های متصل شده با لیگاند موجب آغاز فرآیندهای مختلف سلولی می‌شوند که از آن تحت عنوان پیام رسانی خارج به داخل (Outside-in) نام برده می‌شود. پلاکت‌ها سه نوع مختلف از اینتگرین β_1 را تولید می‌کنند که شامل: $\alpha_2\beta_1$ که گیرنده کلاژن می‌باشد، $\alpha_5\beta_1$ که گیرنده فیبرونکتین می‌باشد و $\alpha_6\beta_1$ که گیرنده لامینین می‌باشد.

اینتگرین $\alpha_2\beta_1$ به انواع کلاژن‌های نوع I, II, III, IV متصل شده و در میان بقیه اینتگرین‌ها نقش مهمی را در چسبندگی سلولی ایفا می‌کند. این اینتگرین برای فرآیند چسبندگی پلاکت‌ها نقش مهم اما غیرضروری ایفا می‌کند. این گیرنده دارای یک قسمت تقریبا کوتاه خارج سلولی، یک دمین تراغشایی و یک دمین خارج سلولی است (شکل ۱-۳). دمین خارج سلولی یک ساختار شبه پروانه‌ای را تشکیل داده و در میان دومین و سومین توالی‌های تکراری در انتهای N- دمین اتصالی αI وجود دارد. هم چنین یک مکان اتصال فلز نیز وجود دارد که محل قرارگیری فلز منیزیم بوده و جهت شناسایی ریشه گلوتامات در مولکول کلاژن لازم است (Heino 2000).

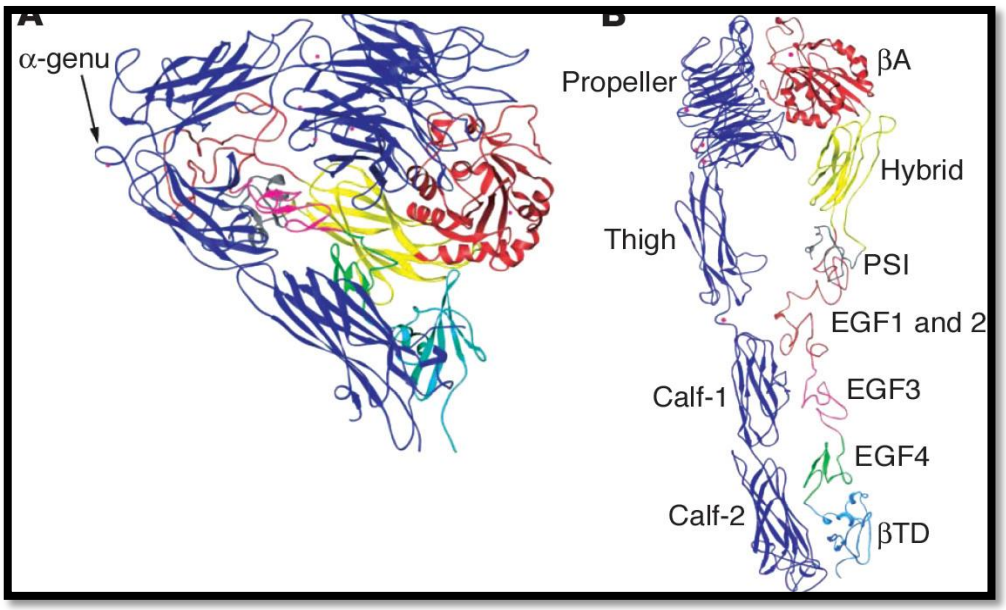


شکل ۱-۳: ساختار اینتگرین $\alpha_2\beta_1$ (Heino 2000)

همان طور که گفته شد بسیاری از اینتگرین‌ها در وضعیت تمایل پایین قرار دارند و برای فعال‌سازی به تغییر ساختاری نیاز دارند تا به طور کارایی به لیگاند خود متصل شوند. لذا پیشنهاد شده که این اینتگرین نیازمند یک تغییر کنفورماسیونی القاء شده با آگونیست از طریق پیام رسانی داخل به خارج (Inside-out) می-باشد. نکته قابل توجه این است که این اینتگرین تنها در چسبیدن محکم پلاکت ایفای نقش می‌کند و در فعال-سازی پلاکت‌ها نقش چندانی ندارد.

اینتگرین مهم دیگر $\alpha IIb\beta_3$ می‌باشد که از اعضای خانواده β_3 است که منحصراً بر روی پلاکت‌ها بیان می‌گردد. تمایل این اینتگرین برای لیگاندهای خود که عموماً فیبرونکتین، فیبرینوژن و فاکتور ون-ویلبراند است، بالا بوده و اتصال آن به لیگاندهای خود سبب اتصال،چسبندگی و گسترش پلاکت‌ها بر روی سطح ماتریکس خارج سلولی در محل زخم یا محل تشکیل ترومبوز می‌شود. این اینتگرین هترودیمر از یک جفت زیرواحد αIIb و β3 تشکیل شده است (شکل ۱-۴). دمین سر مولکول از یک بشکه بتا هفت پره‌ای تشکیل شده است. بخش خارج سلولی زیرواحد آلفا حاوی دو دمین calf1 و calf2 است، در حالی که زیرواحد بتا حاوی دمین‌های β-tail، EGF-like و SPI می‌باشد. این دمین‌ها یک ساقه L-مانند را تشکیل می‌دهند که دارای یک ناحیه گردن و یک ناحیه تنه می‌باشد. این اینتگرین به چندین لیگاند که هر کدام حاوی آسپارتات-گلیسین-آرژینین می‌باشند چون ویترونکتین، فیبرونکتین، فاکتور ون- ویلبراند، فیبرین و ترومبواسپوندین متصل می‌شود. با این

اتصال،αIIβ3 فرآیندهایی هم چون گسترش و انقباض لخته را از طریق پیام‌رسانی خارج به داخل (outside-in) القا می‌نماید (Varga-Szabo et al 2008).



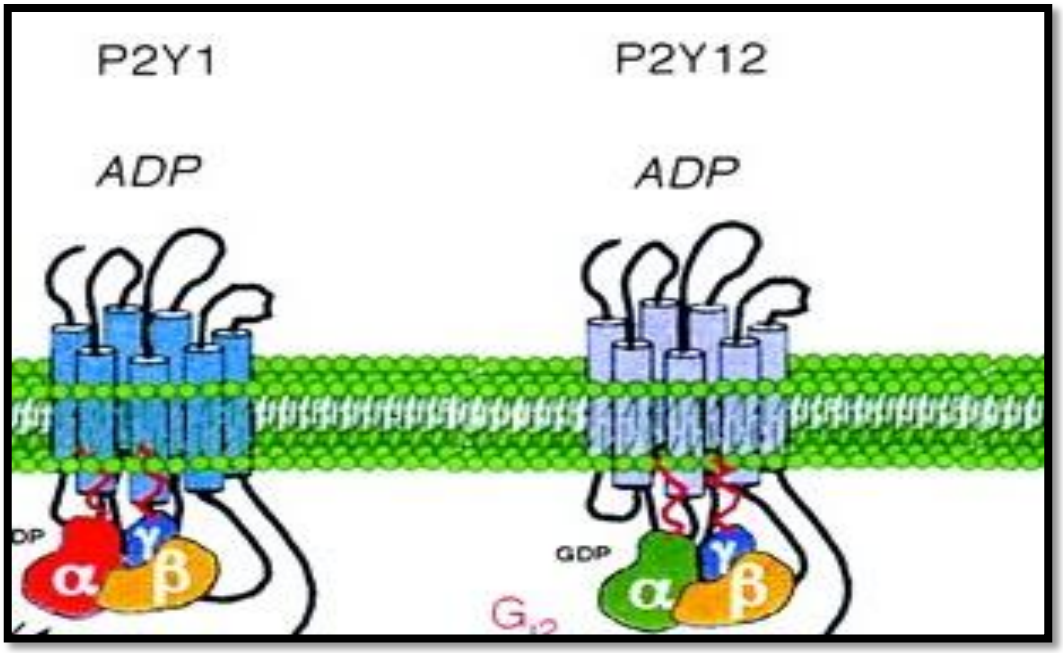
شکل ۱-۴: ساختار اینتگرین $\alpha IIb\beta_3$ (Benett 2005)

Seven transmembrane receptors (۴-۱-۲-۱

ADP receptors (۱-۴-۱-۲-۱

گیرنده‌های پیورنرژیک یک دسته از گیرنده‌های پورین‌ها هستند که ATP یا ADP را به آدنوزین ترجیح می‌دهند. ابتدا آنها را P2-purinoreceptor می‌خواندند، اما بعداً دریافتند که برخی از این گیرنده‌ها به وسیله هر دو نوع نوکلئوتیدهای پورین و پیریمیدین فعال می‌شوند (شکل ۱-۵).

طبقه‌بندی حاضر برای این گیرنده‌ها بر پایه ساختار مولکولی و مکانیسم پیام‌رسانی آنهاست. در این شیوه، خانواده‌های گیرنده‌های یونوتروپیک (کانال‌های یونی لیگاند-دروازه یا Ligand-gated channel) و متابوتروپیک (گیرنده‌های وابسته به G-پروتئین یا G-protein coupled receptor) به عنوان گیرنده‌های P2X و P2Y در نظر گرفته می‌شوند. در حدود ۴۰ سال قبل ADP به عنوان واسطه موثر بر روی تجمع پلاکتی در نظر گرفته شد و در حدود ۱۰ سال قبل شواهد متعدد این نظریه را قطعی کرد.



شکل ۱-۵: گیرنده‌های پیورنرژیک پلاکتی (Brass 2003).

ADP تجمع پلاکتی را با تحریک فعال‌سازی دو گیرنده وابسته به G –پروتئین یعنی P_2Y_1 و P_2Y_{12} آغاز می‌کند. مشخص شده است که نوکلئوتیدهای آدنین از طریق سه گیرنده مجزای P_2 بر روی پلاکت‌ها عمل می‌کنند:

دو تا از آنها که گیرنده‌های آدنوزین دی فسفات جفت شده با G –پروتئین هستند (P_2Y_1 و P_2Y_{12}) و دیگری P_2X_1 نیز که متعلق به گیرنده‌های کاتیونی لیگاند- دروازه می‌باشد و به وسیله ATP فعال می‌شود. گیرنده P_2Y_1 تجمع پلاکتی را آغاز می‌کند اما برای فرآیند کامل در پاسخ به ADP کافی نیست. در این میان نقش اصلی بر عهده گیرنده P_2Y_{12} می‌باشد که مسئول تجمع کامل در پاسخ به ADP می‌باشد. این گیرنده که هدف مولکولی داروهای ضدترومبوز مثل کلوپیدوگرل می‌باشد، مسئول بیشترین تأثیر ADP بر روی پلاکت در زمانی است که با عواملی هم چون ترومبین و کلاژن تحریک می‌شود (Zhan et al 2007). گیرنده P_2X_1 نیز در تغییر شکل پلاکتی و فعال سازی آن به وسیله کلاژن تحت شرایط جریان خون عمل می‌کند. از آنجایی که نقش مرکزی در تشکیل و تثبیت لخته بر عهده گیرنده P_2Y_{12} می‌باشد، این گیرنده مورد توجه تحقیقات متعددی قرار گرفته است و ساختار آن به دقت بررسی شده است. این گیرنده‌ها پروتئین‌های تراغشایی هستند