Archive of SID

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره یازدهم، شمارهٔ ۲، خرداد – تیر ۱۳۸۸، صفحه ۱۵-۷

مقاله تحقیقی

تاثیر اریترومایسین بر عبور روده ای سیکلوسپورین

پروین ذاکری میلانی[۱]، ساناز دامنی[۲]، زیبا اسلامبولچیلار[۳]، مریم مهتری[۲]، هادی ولیزاده*[۴]

۱- استادیار گروه فارماسیوتیکس مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۲- داروساز عمومی
۳- دستیار گروه فارماسیوتیکس دانشگاه علوم پزشکی داروسازی تبریز
۴- دانشیار گروه فارماسیوتیکس دانشکده داروسازی و عضو مرکز تحقیقات ریزفناوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۷/۴/۲۳، اصلاح: ۸۷/۶/۲۷، پذیرش: ۸۷/۱۱/۳۰

خلاصه

سابقه و هدف: در صورت مصرف همزمان سیکلوسپورین و اریترومایسین احتمال بروز سمیت کلیوی وجود دارد که میتواند ناشی از تداخل در سطح جذب و یا متابولیسم باشد. این مطالعه به منظور بررسی تاثیر اریترومایسین در جذب روده ای سیکلوسپورین و پایداری دارو در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، همچنین جذب سطحی آن به سرنگ و لوله های پلاستیکی انجام شد تا مکانیسم این تداخل مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روشها: در این مطالعه از ۳۲ رت نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۰۰ گرم استفاده شده است. رت ها به چها گروه تست و چهار گروه کنترل (مجموعا ۸ گروه) تقسیم شدند. پس از بیهوش نمودن حیوان محلول سیکلوسپورین با غلظت های ۲۰ و ۱۵ و ۱۰ و ۵ میکرومولار در حضور (در چهار گروه تست) یا عدم حضور (در چهار گروه کنترل) اریترومایسین ۱۵۰ میکرومولار با سرعت ۰/۲ میلی لیتر در دقیقه از روده کانوله شده عبور داده شد و نمونه گیری تا ۹۰ دقیقه انجام گردید. نهایتا غلظت داروی باقیمانده در روده اندازه گیری شد و مقادیر نفوذپذیری های روده ای برای غلظتهای مختلف دارو در شرایط مختلف مورد آزمایش، محاسبه گردید. برای تعیین مقدار دارو در کلیه نمونه ها از روش کروماتوگرافی فاز معکوس استفاده گردید.

یافته ها: میانگین تعداد نفوذپذیری مؤثر سیکلوسپورین از ($\times 10^{-6}$) ۳۳/۴-۲۲/۱ سانتیمتر بر ثانیه در گروه کنترل به ($\times 10^{-6}$) ۵۳/۴- ۳۷/۲ سانتیمتر بر ثانیه در گروه تست افزایش یافته است که این اختلاف معنی دار بوده است ($p<0/05$). این دارو در شرایط آزمایش از پایداری خوبی برخوردار بود و در پایان طول دوره آزمایش حداکثر ۵-۴٪ از غلظت اولیه دارو کاسته شده است. لیکن مقدار قابل توجهی از دارو، جذب سرنگ و لوله‌ها می شود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که سیکلوسپورین دارای محلولیت کم و نفوذپذیری بالا می باشد و بخشی از تداخل اریترومایسین با سیکلوسپورین در سطح جذب صورت میگیرد.

واژه های کلیدی: *ترانسپورت، اریترومایسین، پرفیوژن، پمپ برگشتی، سیکلوسپورین*

مقدمه

راه مصرف خوراکی داروها به دلیل سادگی و راحتی، روش انتخابی برای مصرف بسیاری از گروههای داروئی می باشد. در مصرف خوراکی داروها پدیده جذب مطرح می‌گردد که طی آن مولکول دارو از یک یا چندین غشای بیولوژیکی قبل از رسیدن به جریان خون عبور می نماید. بدست آوردن تخمین قابل اعتماد از فراهمی زیستی داروهای خوراکی در انسان، عرصه رقابتی قوی در صنعت داروسازی برای توسعه داروهای جدید ایجاد نموده است. سیکلوسپورین (CsA) یک پپتید حلقوی هیدروفوبیک و خنثی است که از ۱۱ اسید آمینه تشکیل شده است و به منظور جلوگیری از رد پیوند قلب، کلیه و کبد به طور گسترده ای استفاده می شود (۲و۱). این دارو همچنین در درمان بیماریهای اتو ایمیون مانند آرتریت روماتویید و پسوریازیس به کار می رود. از آنجاییکه سیکلوسپورین ضریب توزیع اکتانول- آب بالایی دارد، جذب آن از دستگاه گوارشی ناکامل و متغیر می باشد. چندین فاکتور به عنوان عوامل احتمالی دخیل در فراهمی زیستی کم و متغیر سیکلوسپورین پیشنهاد شده اند که شامل نفوذپذیری پایین از غشای گوارشی، انحلال ضعیف، متابولیسم گسترده در کبد و روده به وسیله سیتوکروم P-450 3A4، efflux یا برگشت دارو به لومن روده توسط P- گلیکوپروتئین و اثر غذاها و داروهای مصرف شده می باشند (۶-۳). زمانی که بیمار پیوند عضو شده دچار عفونت باکتریایی شود، آنتی بیوتیکهای ماکرولیدی در ترکیب با سیکلوسپورین به کار می روند. ماکرولیدها اثر مهاری و القایی بر سیستم آنزیمی کبدی داشته و در نتیجه باعث ایجاد تداخل دارویی با سایر داروها می شوند (۷). چندین مورد گزارش بالینی مبنی بر افزایش سطوح پلاسمایی سیکلوسپورین در

* مسئول مقاله:
آدرس: تبریز، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
e-mail: valizadeh@tbzmed.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

طی استفاده همزمان با اریترومایسین گزارش شده است که منجر به افزایش بروز عوارض جانبی عمده دارو (نفروتوکسیسیته و هپاتوتوکسیسیته) می گردد. اما مکانیزم چنین افزایش جذبی ناشناخته بوده و احتمالا" ناشی از افزایش احتمالی محلولیت داروی کم محلول سیکلوسپورین در حضور اریترومایسین می باشد. در برخی موارد نیز، مکانیسم ایجاد تداخل بصورت مهار متابولیسم سیکلوسپورین توسط اریترومایسین گزارش شده است، احتمالا" اریترومایسین باعث افزایش جذب سیکلوسپورین نیز می گردد (۸و۹). با وجود اینکه گزارشاتی در مورد اثرات مهاری P-glycoprotein (P-gp) بر نفوذپذیری روده ای وجود دارد، لیکن گزارشاتی نیز مبنی بر دخالت محدود این گلیکوپروتئین بر عبور روده ای سیکلوسپورین وجود دارد (۱۰). بعلاوه بیشتر این آزمایشات با روش سگمنت های ایزوله شده روده ای (Ussing-type chamber) یا تک لایه های سلولهای Caco-2 انجام گرفته اند و آزمایشات اندکی برروی سیستم های in situ صورت گرفته است.

از آنجاییکه خصوصیات فیزیکو شیمیایی مولکولهای دارویی برای پیش‌بینی جذب و فراهمی زیستی آنها کافی نیست، بنابراین لازم است عملاً میزان نفوذپذیری داروها در موجود زنده تعیین گردد. از طرفی دیگر تعیین میزان نفوذپذیری مواد در شرایط In vivo (درون تن) در انسان با مشکلات اخلاقی همراه است و به همین علت نمی‌توان به صورت معمول در انجام آزمایشات تعیین نفوذپذیری برای ساخت داروهای جدید از انسان بهره برد. لذا لازم است نفوذپذیری داروها در مدلهای غیر انسانی بررسی گردد. بدین منظور در این مطالعه از مدل موش صحرایی و روش پرفیوژن روده باریک به روش یکبار عبور (Single-pass) از چندین غلظت دارو استفاده شده است تا نفوذپذیری روده‌ای سیکلوسپورین که یک داروی مهار کننده قوی سیستم ایمنی با اندیس درمانی باریک است ارزیابی و تعیین گردد. مطالعات قبلی انجام شده در زمینه تداخل سیکلوسپورین- ماکرولیدها فقط بالینی بوده و هیچگونه مطالعه کنترل شده ای در حیوانات آزمایشگاهی به صورت *درون تن* و یا in situ انجام نشده است و بنابراین هنوز ایده ای قطعی در خصوص نوع تداخل این دو دارو که آیا در سطح جذب یا در سطح متابولیسم می باشد، وجود ندارد. از این رو در مطالعه حاضر به منظور نفوذپذیری روده ای سیکلوسپورین در حضور و عدم حضور اریترومایسین انجام گردید تا بتوان بدینوسیله به میزان نقش مهاری P-gp و پدیده efflux در جذب دارو پی برد. بعلاوه میزان پایداری دارو در شرایط آزمایش و نیز میزان جذب آن در سرنگ و لوله های رابط نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد بکار رفته و مشخصات شرکت دارویی:

فنل رد (Roche, Switzerland)، St. Louis, Mo, U.S.A)، اریترومایسین (Sigma (Elder Pharmaceutical LTD, India)، سدیم فسفات مونوبازیک NaH_2PO_4 (Merck, Germany)، سدیم فسفات دی بازیک Na_2HPO_4 (Merck, Germany)، استونیتریل (Merck, Germany)، متانول (Merck, Germany)، اورتوفسفریک اسید (Merck, Germany)، سدیم کلراید (Merck, Germany)، دی اتیل اتر (Merck, Germany)، سدیم پنتوباربیتال (Merck, Germany) بودند.

دستگاههای بکار رفته:

دستگاه HPLC (شامل کنترل کننده سیستم (Shimadzu , Japan) SCL- 10A، دتکتور (U.V-VIS) SPD-10A (Shimadzu , Japan)، پمپ (LC-10AD(Shimadzu , Japan)، سونیکاتور (Liarre , Italy)، سرنگ همیلتون (Hamilton , Bonaduz, Switzerland)، پمپ انفوزیون سرنگ دار (SP-500, Japan)، هیتر (Thermo Mantle , Netherland)، همزن مغناطیسی (Velp, Italy).

تهیه بافر ایزوتونیک و محلول پرفیوژن: برای تهیه بافر فسفات با pH=۷/۲، به میزان ۱۰۰۰ میلی لیتر، مقدار ۵/۷۷ گرم فسفات دی بازیک سدیم آنهیدر و ۴/۰۸۵ گرم فسفات مونوبازیک سدیم دی هیدراته و ۷ گرم سدیم کلراید وزن شد و در بالن ۱۰۰۰ میلی لیتری با آب مقطر به حجم رسانیده شدند. سپس به وسیله pH متر، pH آن روی ۷/۲ تنظیم گردید. محلول حاصله که سالین بافر فسفاته (PBS) نام دارد، یک بافر ایزوتونیک است و به عنوان محلول حامل دارو به کار گرفته شد. برای آماده سازی محلول پرفیوژن نیز ابتدا محلول سیکلوسپورین ۲۰ میکرومولار در PBS تهیه، سپس رقتهای ۱۵ و ۱۰ و ۵ میکرومولار از آن تهیه شد. محلول تست نیز، به همین صورت تهیه و سپس اریترومایسین با غلظت ۱۵۰ میکرومولار به هر کدام اضافه گردید. بعنوان مارکر غیر قابل جذب نیز، محلول فنل رد ۲۵۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. از آنجاییکه مولکولهای آب بطور دائم در جدار روده نقل و انتقال دارند، و غلظت واقعی دارو در روده متاثر از میزان این ورود و خروج خواهد بود. استفاده از یک مولکول غیر قابل جذب (نظیر فنل رد) این امکان را فراهم می کند تا با استفاده از تغییرات غلظت آن در طی عبور از سگمنت، که نشاندهنده میزان نقل و انتقالات آب می باشد، غلظت های واقعی دارو در محلول خروجی را محاسبه نمود (۱۱).

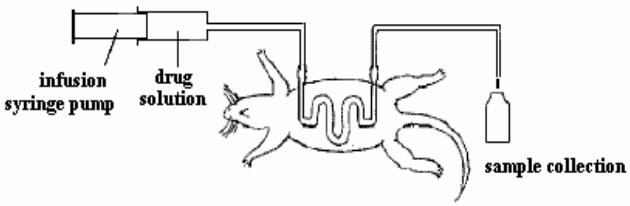
بررسی پایداری سیکلوسپورین و جذب آن در سرنگ و لوله‌ها: برای بررسی پایداری سیکلوسپورین در شرایط آزمایش (دمای ۳۷°C) محلولی از دارو با غلظت ۱۵میکرومولار در سالین بافر فسفاته تهیه شد و به مدت بیش از دو ساعت (بیشتر از طول دوره آزمایش) در دمای ۳۷°C نگهداری گردید. سپس در فواصل زمانی مشخص از محلول فوق نمونه برداری گردید و بعد از جایگزینی مقادیر نمونه برداشته شده، با تعیین مقدار داروی باقیمانده در محلول پایداری دارو ارزیابی گردید. جهت بررسی پدیده جذب سطحی ابتدا محلول دارویی با غلظت ۱۵ میکرومولار به وسیله پمپ انفوزیون از سرنگ و لوله‌ها عبور داده شد. این کار به مدت ۲ ساعت و با سرعت اینفیوژن ۰/۲ میلی لیتر در دقیقه (سرعت جریان به کار رفته در طول مطالعه) انجام گرفت. هر ۱۰ دقیقه نمونه برداری از محلول خروجی انجام شد و مقدار دارو و فنل رد در نمونه های خروجی از لوله به روش HPLC تعیین و با محلول اولیه مقایسه گردید.

جراحی حیوان: برای انجام آزمایش از رت‌های نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ۳۰۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. تعداد ۳۲ رت در ۸ گروه مجزا (چهار گروه تست و چهار گروه کنترل) مورد آزمایش قرار گرفت. آزمایشات پرفیوژن بر روی حیوان گرسنه و بیهوش طبق روش گزارش شده در مطالعات قبلی انجام گرفت (۱۲و۱۱). بیهوشی حیوان توسط ترزیق داخل صفاقی سدیم پنتوباربیتال انجام شد و سگمنتی بطول تقریبا" ۱۰ سانتیمتر از قسمت ابتدایی ژژنوم کانوله گردید. سپس محلول دارو با غلظتهای ۲۰، ۱۵، ۱۰ و ۵ میکرومولار، در حضور یا عدم حضور

www.SID.ir

Archive of SID

اریترومایسین ۱۵۰ میکرومولار با سرعت ۰/۲ میلی لیتر در دقیقه از روده کانوله شده عبور داده شد و نمونه گیری تا ۹۰ دقیقه انجام گردید (شکل ۱). در انتها از محلول دارویی موجود در بالن و محلول دارویی موجود در سرنگ نمونه گرفته شد، تا میزان جذب دارو در سرنگ نیز مشخص شود. حجم نمونه‌ها هر بار حدود ۲ میلی لیتر بود. به علت حساسیت سیکلوسپورین به نور و تخریب آن تمام ظروف شیشه ای مورد استفاده در آزمایش از قبیل بالن، سرنگ، لوله ها و میکروتیوبها با فویل آلومینیومی پوشانده شدند. پس از اتمام آزمایش طول دقیق قسمت کانوله شده اندازه‌گیری شد و سپس حیوان با تزریق کلرور پتاسیم اشباع در قلبش کشته شد. نمونه‌ها در دمای ۲۰°C- تا زمان آنالیز نگهداری شدند. در تمام مراحل کار با حیوان از اصول کتاب راهنمای مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی که توسط کنسول کانادایی به چاپ رسیده است، تبعیت شد (۱۳).



شکل ۱. شمای آزمایش پرفیوژن روده باریک در رت

آنالیز HPLC برای سیکلوسپورین: برای آنالیز دارو از روش HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) استفاده گردید (۱۴). در این سیستم که از روش استاندارد خارجی استفاده شد، نوع ستون (گارد سر خود) Shimpak 5µm VP-ODS C_2 (250 ×4.6 mm) و فاز متحرک مخلوطی از استونیتریل، متانول، آب به نسبت های حجمی ۵۵٪، ۵٪، ۴۰٪ می باشد. سرعت جریان فاز متحرک ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه، طول موج مورد استفاده ۲۱۰ نانومتر، حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر و دمای ستون۷۰ درجه سانتیگراد بود. در چنین شرایطی زمان بازداری سیکلوسپورین برابر ۵/۴ دقیقه می باشد. برای رسم منحنی کالیبراسیون سیکلوسپورین از غلظتهای مختلف آن در محدوده ۴۰-۳ میکرومولار استفاده گردید. سپس منحنی مربوطه با استفاده از غلظت نمونه ها و سطح زیر منحنی پیکهای بدست آمده در HPLC ترسیم گردید.

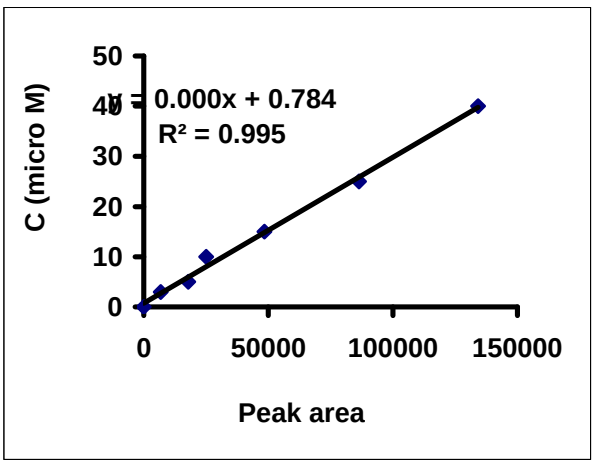
آنالیز HPLC برای نشانگر فنل رد (۱۵): برای آنالیز فنل رد در نمونه های مورد آزمایش نیز از ستون Shimpak VP-ODS C_{18} (250×4.6 mm) و گارد C_{18} (4.6× 50 mm) استفاده شد. فاز متحرک بکار رفته مخلوطی از ۵۵٪ متانول در محلول پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۰/۰۵ مولار است که با اورتوفسفریک اسید به pH حدود ۲/۶ رسیده باشد. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، طول موج مورد استفاده ۴۳۰ نانومتر و حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر می باشد. تحت چنین شرایطی زمان بازداری برابر ۳ دقیقه برای فنل رد می باشد.

محاسبه نفوذپذیری موثر: بعد از اندازه‌گیری غلظت دارو در محلول خروجی (C_{out})، این غلظت ابتدا نسبت به تغییرات غلظت فنل رد تصحیح شد. از آنجاییکه فنل رد در روده جذب ندارد، بنابراین تغییرات غلظت آن به طور غیرمستقیم نشان دهنده میزان ورود یا خروج مولکول آب می‌باشد. به این ترتیب غلظت تصحیح شده (C_{cor}) غلظتی از دارو در محلول خروجی است که میزان نقل و انتقال ملکول‌های آب در آن لحاظ شده است. با توجه به اینکه مدل جریان خطی (Laminar Flow) مناسبترین مدل در مورد حیوانات آزمایشگاهی می باشد، از فرمول $P_{eff} = -Q_{in} \, Ln(C_{out}/C_{in})/2\pi rl$ برای محاسبه نفوذپذیری موثر استفاده می‌شود (۱۷و۱۶): در این فرمول C_{out} , C_{in} غلظت دارو در محلول ورودی و خروجی، Q_{in} سرعت جریان محلول دارویی در روده (۰/۲ میلی لیتر بر دقیقه)، $2\pi rl$ سطح تماس روده با محلول می‌باشد که r شعاع روده رت (۰/۱۸ سانتی متر) و l طول قسمت ایزوله شده (تقریباً ۱۰ سانتی متر) می‌باشد. بعد از انجام محاسبات، مقادیر نفوذپذیری با استفاده از t-test (α=0.05) در فاصله اطمینان ۹۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته ها

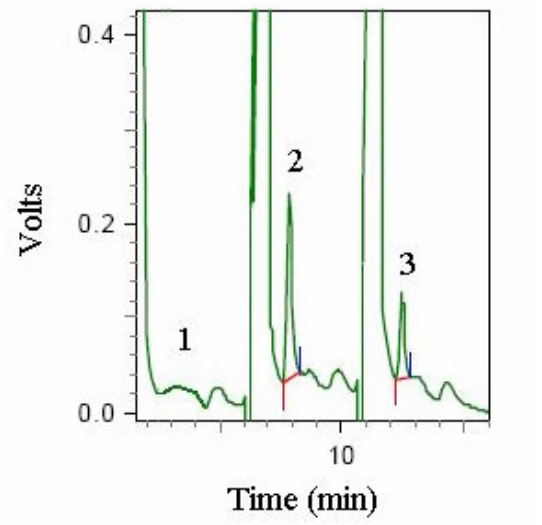
منحنی کالیبراسیون سیکلوسپورین که با استفاده از سطح زیر منحنی پیکهای بدست آمده از غلظتهای مختلف سیکلوسپورین در HPLC ترسیم گردید، در نمودار ۱ نشان داده شد. نمودار ۲ نیز یک نمونه پیک سیکلوسپورین حاصل از سیستم HPLC بکار رفته را نشان می دهد. میانگین ضرایب نفوذپذیری مؤثر روده ای بدست آمده برای سیکلوسپورین در روده رت برای دو گروه تست و کنترل نشان می دهد که نفوذپذیری روده ای سیکلوسپورین از (۱۰$^{-۶}$×) ۳۳/۴-۲۲/۱ سانتیمتر بر ثانیه در گروه کنترل به (۱۰$^{-۶}$×) ۵۳/۴- ۳۷/۲ سانتیمتر بر ثانیه در گروه تست افزایش یافته است (نمودار شماره ۳). که این اختلاف معنی دار می باشد ($p<0/05$) (جدول شماره ۱).

کروماتوگرام حاصل از آنالیز سیکلوسپورین در نمونه های حاصل از سرنگ و لوله های سیلیکونیزه شده و غیر سیلیکونیزه نشانگر وجود پدیده جذب سطحی دارو به لوازم پلاستیکی مورد استفاده در آزمایشات تعیین نفوذپذیری می باشد (نمودار ۴). ارتفاع پیک حاصل از نمونه زمان صفر دقیقه بیانگر غلظت اولیه سیکلوسپورین در سرنگ و لوله های مورد آزمایش می باشد. نتیجه حاصل از بررسی پایداری سیکلوسپورین در دمای ۳۷°C در محلول پرفیوژن مورد استفاده نیز در نمودار ۵ نشان داده شده است. این آزمایش در مدت زمانی بیشتر از ۲ ساعت ادامه یافته و داده های حاصله برای هر فاصله زمانی نشاندهنده میانگین سه بار نمونه برداری و آنالیز می باشد.

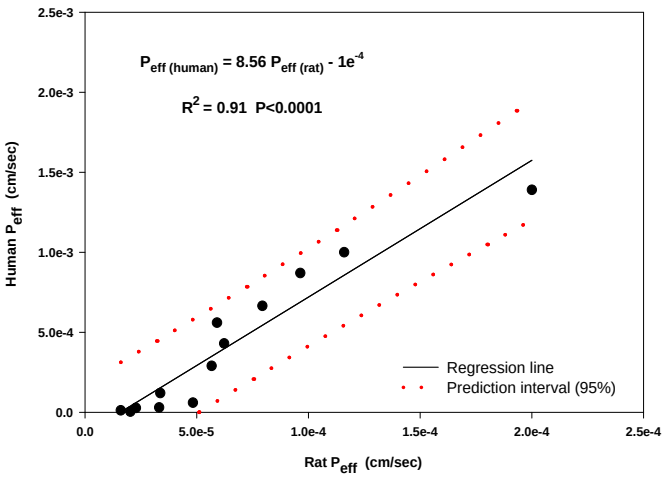


نمودار ۱. منحنی کالیبراسیون سیکلوسپورین در روش HPLC بکار رفته

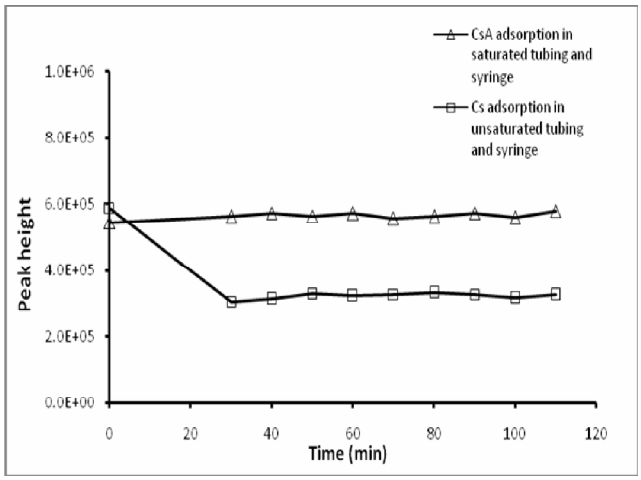
www.SID.ir



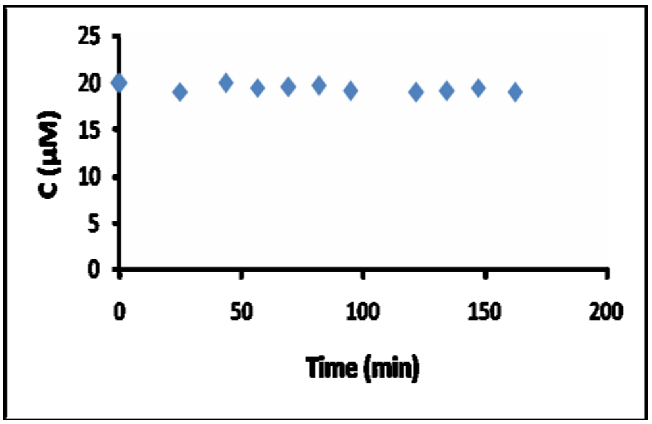
نمودار ۲. یک نمونه کروماتوگرام سیکلوسپورین در محلول پرفیوژن. پیک ۱ نمونه بلانک فاقد دارو، پیک ۲ نشاندهنده پیک دارو در محلول پرفیوژن ورودی و پیک ۳ نشاندهنده پیک دارو در محلول خروجی از روده می باشد.



نمودار ۳. نمودار همبستگی مقادیر نفوذپذیری داروها در روده رت بامقادیر نفوذپذیری در روده انسان



نمودار ۴. نمودار مربوط به آزمایش جذب سطحی سیکلوسپورین در سرنگ و لوله‌های غیر اشباع و اشباع.



نمودار ۵. نمودار پایداری سیکلوسپورین در طول مدت آزمایش در دمای ۳۷°C در محلول پرفیوژن

جدول شماره ۱. میانگین ضرایب نفوذپذیری روده‌ای سیکلوسپورین در غلظت های مختلف و در حضور و عدم حضور اریترومایسین

غلظت (μM)	گروه	میانگین نفوذپذیری مؤثر (* ۱۰$^{+۶}$ cm/sec) (± SD)	P-value
۲۰	کنترل	۲۷/۳±۲۸/۲	۰/۰۱۱۰
	تست	۴۴/۱±۸/۴	
۱۵	کنترل	۳۱/۲±۲۳/۷	۰/۰۳۱
	تست	۳۷/۲±۲۱/۲	
۱۰	کنترل	۳۳/۴±۱۲/۹	۰/۰۲۶
	تست	۵۳/۴±۱۲/۹	
۵	کنترل	۲۲/۱±۳۰/۷	۰/۰۴۶
	تست	۳۹/۶±۱۰/۴	

جدول شماره ۲. مقادیر نسبت مهارپمپ **efflux** روده ای سیکلوسپورین توسط اریترومایسین در غلظت‌های مختلف به کار برده شده دارو

غلظت سیکلوسپورین (μM)	نسبت مهار **efflux** روده‌ای
۲۰	۰/۳۸
۱۵	۰/۱۶
۱۰	۰/۳۷
۵	۰/۴۴

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی نفوذپذیری سیکلوسپورین در حضور و عدم حضور اریترومایسین بصورت ضرایب نفوذپذیری روده ای محاسبه شده نشان داد که نفوذپذیری روده‌ای سیکلوسپورین A در هر چهار غلظت در حضور اریترومایسین

www.SID.ir

Archive of SID

افـزایش قابـل تـوجهی یافتـه اسـت($p< ۰/۰۵$). اخـتلاف قابـل تـوجهی در نفوذپذیریهای حاصل شده از چهار غلظت به کار برده از سیکلوسپورین A مشاهده نشد، که نشان دهنده عدم وابستگی نفوذپذیری سیکلوسپورین A به غلظت است. از این رو نتیجه‌گیری می‌شود که حداقل بخشی از تداخلات بالینی مـشاهده شـده مابین اریترومایسین و سیکلوسپورین A بـستگی بـه واکنـشهای اینـدو در سـطح جذب دارد. بنابراین پـیش‌بینـی شـده اسـت کـه اریترومایـسین سیـستم آنزیمـی سیتوکروم $P_{۴۵۰}$ کبدی را مهار می‌کند که در نهایـت منجـر بـه مهـار متابولیـسم سیکلوسپورین و بالا رفتن سطح سرمی آن در بیماران می‌شود. این مطالعه نـشان داد که جذب سیکلوسپورین در حضور اریترومایسین افـزایش یافتـه و ایـن بـدین معنی است که عملکرد پدیده ایفلاکس توسط P-gp در سلولهای روده‌ای توسط اریترومایسین محدود شده و بنابراین نفوذپـذیری سیکلوسـپورین افـزایش یافتـه است. چنین یافته ای با مکانیسمهای پیشنهاد شده بـرای تـداخل اریترومایـسین-سیکلوسپورین هم سو می باشد (۹و۸). اگر ایـده مهـار متابولیـسم سیکلوسـپورین توسط اریترومایسین صحیح باشد، انتظار می رود که چنین تداخلی بعد از مـصرف وریدی دارو نیز مشاهده گردد، در حالیکه در مطالعه بالینی روی افراد بیمـاری کـه به مدت ۱۲-۶ ماه سیکلوسپورین دریافـت کـرده بودنـد و قبـل از آن نیـز داروی تـضعیف کننـده سیـستم ایمنـی (سیکلوسـپورین) را در حـضور و عـدم حـضور اریترومایسین از طریق وریدی و خوراکی دریافت کـرده بودنـد، نـشان داد کـه در حضور اریترومایسین افزایش زیادی در غلظت ماکزیمم و سطح زیر منحنی غلظت پلاسمایی در برابـر زمـان سیکلوسـپورین از راه خـوارکی (امـا نـه از راه وریـدی) مشاهده می گردد و پس از تجویز سیکلوسپورین از راه وریدی، اریترومایسین، تنها سبب کاهش کم ولی قابل توجه در کلیرانس سیکلوسپورین مـی گـردد. بنـابراین اریترومایسین بیشتر سبب افزایش جذب سیکلوسپورین می شود تا مهار متابولیسم آن (۹و۸).

مطالعه ای که بر روی کینین انجام شد نشان داد که نسبت غلظت آن در مغز موش به پلاسمای موش های مورد آزمایش بعد از مصرف وریـدی داروهـایی نظیر وراپامیل، اریترومایسین و مفلوکین به ترتیب ۱/۸، ۱/۹، و ۲/۵ برابر افـزایش می یابد، در همان تحقیق متابولیسم کینین نیز تحت تاثیر قـرار گرفتـه و کـاهش یافته بود (۱۸).

در مطالعه ای دیگر کـه تـاثیر آمفوتریـسین B بـر روی سـطح غلظـت پلاسمایی سیکلوسپورین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که بهره دهی درمانی سیکلوسپورین در صورت مصرف همزمان با آمفوتریسین ب کـاهش می یابد (۱۹). بنظر می رسـد علـت ایـن امـر افـزیش P-gp و متعاقبـا" پدیـده ایفلاکس در دئودنوم و نیـز افـزایش پدیـده عبـور اول کبـدی توسـط سـیتوکروم P3A4 باشد. یافته های این مطالعه که بصورت کنترل شـده صـرفا" از دیـدگاه جذب تداخل سیکلوسپورین و اریترومایسین انجام شده است، در جهت تایید نتـایج مطالعات ذکر شده بوده و نقش مهاری P-gp را در جذب روده ای سیکلوسپورین به اثبات رساند. در ارزیابی انجام شده، برای بررسی میزان کمـی نقـش P-gp در جذب روده ای سیکلوسپورین و به عبارتی بررسی نسبت مهـار ایفلاکـس روده‌ای (Efflux Inhibition Ratio) دارو، نسبت نفوذپـذیری دارو در حالـت مهـار پمـپ ایفلاکـس روده ای (P_{p-gp}) و نیـز نفـوذپـذیری دارو بـه روش غیـر فعـال (PPD) محاسبه شد. (P_{p-gp}) با کم کردن $P_{eff,\ control}$ از $P_{eff,\ inh}$ بـه دسـت می آید، درحالیکه PPD مساوی همان $P_{eff,\ inh}$ می باشد. بنابراین EIR توسط $EIR = 1- (P_{eff,control} / P_{eff,inh})$ محاسبه شد (۲۰):

با فرض مهار کامل P-pg توسط اریترومایسین، مهـار ایفلاکـسی روده ای برای سیکلوسپورین۰/۴۴-۰/۱۶٪ به دست آمد و نشان داده شد کـه۴۴-۱۶٪ انتقال غیر فعال سیکلوسپورین توسط P-gp مهار می گـردد (۲۰). بـا توجـه بـه نفوذپذیریهای به دست آمده از سیکلوسـپورین در مـدل رت و نیـز بـا اسـتفاده از معادله ای که ارتباط بین نفوذپذیری روده ای انسان و رت که را نـشان مـی دهـد (نمودار ۳) (۲۱)، پیش‌بینی می‌شود که ضریب نفوذپذیری برای سیکلوسـپورین در روده انـسان بیـشتر از $۱۰^{-۳}$ سـانتی متـر بـر ثانیـه باشـد. جـذب بـالا و متفـاوت سیکلوسپورین در انسان می‌تواند مرتبط بـا محلولیـت کـم شـکل دارویـی باشـد. همانگونه که میدانیم بعضی از داروها می‌توانند در سطح ظروف (اعم از شیـشه‌ای پلاستیکی) و لوله‌های رابط جذب شوند. این پدیده مـی‌توانـد بـه صـورت جـذب سطحی (ادسوربشن) یا به صورت رسوخ دارو (ابسوربشن) انجام گیرد. عواملی کـه در میزان ابسوربشن و ادسوربشن داروها در ظروف دخالت دارند عبارتند از غلظـت دارو در محلول که هر چه غلظت کمتر باشد، درصد جذب بیشتر است زیرا مراکـز جذب در سطح ظرف محدود است و pH محلول کـه در pH ایزوالکتریـک دارو، میزان جذب به حداکثر می‌رسد (۲۲). از عوامل مؤثر دیگـر مـی‌تـوان بـه سـرعت انفوزیون اشاره کرد. با افزایش سـرعت انفوزیـون مقـدار جـذب سـطحی کـاهش می‌یابد زیرا تماس دارو با جدار و ظرف کم می‌شود (۲۳).

در تحقیقات انجام شده برای بررسی پدیده جذب سـطحی ابتـدا محلـول دارویی با غلظت ۱۵ میکرومولار به وسیله پمپ انفوزیون از سرنگ و لوله‌ها عبـور داده شد. این کار به مدت ۲ ساعت و با سرعت اینفیوژن ۰/۲ میلی لیتر در دقیقـه انجام گرفت. نتایج آزمایش حاکی از جذب قابل توجه دارو در سرنگ و لوله‌ها بوده است (نمودار ۴). ولی در مورد مارکر فنل رد جذب خاصی مشاهده نگردید. در این نمودارها نمونه زمان صفر دقیقه در حقیقت مربوط به غلظت دارو در نمونه استوک و ارتفاع پیکهای نمونه های بعدی نشان دهنده غلظت دارو در نمونه‌هایی است که هر ۱۰ دقیقه از محلول خروجی از لوله ها گرفته شده است. مقایسه ارتفـاع پیـک نمونه اول با نمونه های بعدی در سرنگ و لوله هـای غیراشـباع (منحنـی پـایین نمودار ۴) نشان می‌دهد که مقدار قابل توجهی از دارو، جذب سرنگ و لوله‌ها شده است. برای رفع این مشکل دو راه حل پیشنهاد و به کار گرفته شد. ابتدا از داخـل سرنگ و لوله‌ها سیلیکون مایع عبور داده شد. سیلیکون می‌تواند با ایجاد یک لایه نازک روی جدار داخلی از تماس مستقیم محلول دارویـی بـا مـاده پـی وی سـی جلوگیری کند. سپس برای اطمینان بیشتر سرنگ و لوله های سیلیکونیزه به مدت ۲۴ ساعت در محلول دارویی قرار داده شد تا محلهای جذب احتمالی کاملاً اشـباع گردد. بعد از این مرحله آزمایش جذب مجدداً انجام گرفت.

نتایج آزمایشات سری دوم نشان داد که تدابیر انجام شـده موفقیـت آمیـز بوده و میزان جذب را به حد صفر کاهش داده است. در تحقیق حاضـر بـه منظـور کاهش جذب سطحی دارو در لوله ها و سـرنگ ،آنهـا را بـه مـدت ۲۴ سـاعت در محلول دارویی قرار دادیم تا محلهای جذب احتمالی کـاملاً اشـباع شـده و میـزان جذب به حداقل برسد. در مورد مارکر فنل رد تفاوت معنی داری بین نتایج حاصـل از سرنگ و لوله های اشباع و غیر اشباع وجود نداشـت و جـذب خاصـی مـشاهده نگردید. همانطور که در نمودار ۵ مشاهده میـشود ایـن دارو در دمـای آزمـایش از پایداری خوبی برخوردار بـوده و در پایـان طـول دوره آزمـایش حـداکثر ۵-۴ ٪ از غلظت اولیه دارو کاسته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

از این رو نتیجه‌گیری می‌شود که حداقل بخشی از تداخلات بالینی مشاهده شده مابین اریترومایسین و سیکلوسپورین A بستگی به واکنشهای ایندو در سطح جذب دارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از شرکت داروسازی زهراوی که در فراهم نمودن برخی مواد لازم برای تحقیق همکاری نموده اند، کمال قدردانی می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Erythromycin on the Intestinal Transport of Cyclosporine

P. Zakeri Milani (PhD) [1], S. Damani (Pharm D) [2], Z. Islambulchilar (PhD) [3], M. Mehtari (Pharm D) [2], H. Valizadeh (PhD) [4*]

1. Assistant Professor of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2. Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Resident of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4. Associate Professor of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: July 13th 2008, Revised: Sep 17th 2008, Accepted: Feb 18th 2009.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Co-administration of cyclosporine and erythromycin can cause nephrotoxicity which could be a result of interaction in absorption and/or metabolism level. The purpose of this work was to investigate the interaction of erythromycin and cyclosporine in absorption level to evaluate the effect of erythromycin on cyclosporine absorption quantitatively. The stability of drug at 37°C and its adsorption to plastic syringe and tubes were also investigated.

METHODS: 32 Wistar rats weighting between 200-300 g were used in the present study. They were divided into 4 test groups and 4 control groups. A jejunal segment of anaesthetized rat was cannulated and perfused by concentrations of 20, 15, 10 and 5 micromolar of drug in the presence and absence of 150 micromolar erythromycin by flow rate of 0.2 ml/min. Samples were obtained up to 90 min. Drug concentrations were assayed in different time points. The drug effective permeability values were calculated for its different concentrations in different experiments. A reverse-phase HPLC method was used for analysis of all samples.

FINDINGS: The cyclosporine effective permeability values were increased from 22.1-33.4 ($^{\times}10^{-6}$) cm/sec in control group to 37.2-53.4 ($^{\times}10^{-6}$) cm/sec in test group that this difference was significant ($p<0.05$). Moreover cyclosporine was stable and only 4-5% loss of drug was observed at the end of experiment. However there was a significant adsorption of drug to syringe and tubing.

CONCLUSION: Based on obtained results cyclosporine is a low solubility and high permeability drug. At least some part of clinical interaction between cyclosporine and erythromycin is due to interaction in absorption level.

KEY WORDS: *Transport, Erythromycin, Perfusion, Efflux pump, Cyclosporine.*

[*]**Corresponding Author;**
Address: Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. 51664
E-mail: valizadeh@tbzmed.ac.ir

www.SID.ir

References

1. Proulx P. Structure- function relationships in intestinal brush border membranes. Biochim Biophys Acta 1991; 1071(3): 255-71.
2. Chiu Y, Higaki K, Neudeck BL, Barnett JL, Welage LS, Amidon GL. Human jejunal permeability of cyclosporine A: Influence of surfactants on P-gp efflux in Caco-2 cells. Pharm Res 2003; 20(5): 749-56.
3. Arimori K, Nakano M. Drug exsorption from blood into the gastrointestinal tract. Pharm Res 1998; 15(3): 371-6.
4. Hunter J, Hirst BH. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. Advanced Drug Delivery Reviews 1997; 25(2): 129-57.
5. Terao T, Hisanaga E, Sai Y, Tamai I, Tsuil A. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-gp functioning as an absorption barrier. J Pharm Pharmacol 1996; 48: 1083-9.
6. Wacher VJ, Silverman JA, Zhang Y, Benet LZ. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. J Pharm Sci 1998; 87(11): 1322-30.
7. Ohba M, Ohnishi N, Komada F, Iwakawa S, Okumura K. Effect of clarithromycin on the bioavailability of cyclosporin in rats. Biol Pharm Bull 1996, 19(5): 733-7.
8. Gupta SK, Bakran A, Johnson RW, Rowland M. Cyclosporin-erythromycin interaction in renal transplant patients. Br J Clin Pharmacol 1989; 27(4): 475-81.
9. Hughes CM, Swanton JG, Collier PS. Cyclosporin A and erythromycin: a study of a drug interaction in the in situ perfused rat liver model. Biopharm Drug Dispos 1993, 14(7): 615-25.
10. Lee YJ, Chung SJ, Shim CK. Limited role of P-glycoprotein in the intestinal absorption of cyclosporin A. Biol Pharm Bull 2005; 28(4): 760-3.
11. Valizadeh H, Zakeri Milani P, Islambulchilar Z, Tajerzadeh H. A simple and rapid high-performance liquid chromatography method for determining furosemide, hydrochlorothiazide, and phenol red: applicability to intestinal permeability studies. J AOAC Int 2006; 89(1): 88-93.
12. Zakeri Milani P, Barzegar Jalali M, Tajerzadeh H, Azarmi Y, Valizadeh H. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. J Pharm Biomed Anal 2005; 39(3-4): 624-30.
13. Ernest D, Alfert ED, Brenda M, Cross BM, Mcwilliam AAE. CCAC, Guide to the care and use of experimental animals, Vol 1, Canadian Council on Animal Care 1993; pp: 1-150.
14. Zakeri Milani P, Valizadeh H, Islambolchilar Z, Damani S, Mehtari M. Investigation of the intestinal permeability of ciclosporin using the in situ technique in rats and the relevance of P-glycoprotein. Arzneimforschdrugres 2008; 58(4): 188-92.
15. Swenson ES, Milisen WB, Curatolo W. Intestinal permeability enhancement: efficacy, acute local toxicity, and reversibility. Pharm Res 1994, 11(8): 1132-42.
16. Komiya I, Park JY, Kamani A, Ho NFH, Higuchi WI. Quantitative mechanistic studies in simultaneous fluid flow and intestinal absorption using steroids as model solutes. Int J Pharm 1980, 4: 249-62.
17. Levitt MD, Kneip JM, Levitt DG. Use of laminar flow and unstirred layer models to predict intestinal absorption in the rat. J Clin Invest 1988; 81(5): 1365-9.
18. Pussard E, Merzouk M, Barennes H. Increased uptake of quinine into the brain by inhibition of P-glycoprotein. Eur J Pharm Sci 2007, 32(2): 123-7.
19. Ishizaki J, Ito S, Jin M, Shimada T, et al. Mechanism of decrease of oral bioavailability of cyclosporin A during immunotherapy upon coadministration of amphotericin B. Biopharm Drug Dispos 2008, 29(4): 195-203.

www.SID.ir

Archive of SID

20. Varma MV, Kapoor N, Sarkar M, Panchagnula R. Simultaneous determination of digoxin and permeability markers in rat in situ intestinal perfusion samples by RP-HPLC. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004, 813(1-2): 347-52.
21. Zakeri Milani P, Valizadeh H, Tajerzadeh H, et al. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat. J Pharm Pharm Sci 2007; 10(3): 368-79.
22. Sefton MV, Antonacci GM. Adsorption isotherms of insulin on various materials. Diabetes 1984; 33(7): 374-80.
23. Ling J, Hu M, Hagerup T, Campbell RK. Lispro insulin: adsorption and stability in selected intravenous devices. Diabetes Educ 1999; 25(2): 237-45.

www.SID.ir