

تاثیر اریترومايسين بر عبور روده ای سیکلوسپورين

پروين ذاکري ميلانی^۱، ساناز دامنی^۲، زيبا اسلامبولچيلار^۳، مريم مهتری^۴، هادی وليزاده^{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 سیکلوسپورين و اریترومايسين احتمال بروز سمیت کلیوی وجود دارد که میتواند ناشی از تداخل در سطح جذب و یا متابولیسم باشد. این مطالعه به منظور بررسی تاثیر اریترومايسين در جذب روده ای سیکلوسپورين 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 ۲۰۰-۳۰۰ گرم استفاده شده است. رت ها به چهار گروه تست و چهار گروه کنترل (مجموعاً ۸ گروه) تقسیم شدند. پس از بیهوش نمودن حیوان محلول سیکلوسپورين با غلظت های ۲۰ و ۱۵ و ۱۰ و ۵ میکرومولار در حضور (در چهار گروه تست) یا عدم حضور (در چهار گروه کنترل) اریترومايسين ۱۵۰ میکرومولار با سرعت ۰/۲ میلی لیتر در دقیقه از روده کانونله شده عبور داده شد و نمونه گیری تا ۹۰ دقیقه انجام گردید. نهایتاً 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 سیکلوسپورين 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 لوله ها می شود.

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

واژه های کلیدی: ترانسپورت، اریترومايسين، پرفیوژن، پمپ برگشتی، سیکلوسپورين

مقدمه

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 سیکلوسپورين پیشنهاد شده اند که شامل نفوذپذیری پایین از غشای گوارشی، انحلال ضعیف، متابولیسم گسترده در کبد و روده به وسیله سیتوکروم efflux, P-450 3A4 یا برگشت دارو به لومن روده توسط P- گلیکوپروتئین و اثر غذاها و داروهای مصرف شده می باشند (۳-۶). زمانی که بیمار پیوند عضو شده دچار عفونت باکتریایی شود، آنتی بیوتیکهای ماکرولیدی در ترکیب با سیکلوسپورين به کار می روند. ماکرولیدها اثر مهاري 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 سیکلوسپورين در

راه مصرف خوراکی داروها به دلیل سادگی و راحتی، روش انتخابی برای مصرف بسیاری از گروههای دارویی می باشد. در مصرف خوراکی داروها پدیده جذب مطرح می گردد 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. سیکلوسپورين (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 (۱و۲). این دارو همچنین در درمان بیماریهای اتو ایمنی مانند آرتریت روماتوئید و پسوریازیس به کار می رود. از آنجاییکه سیکلوسپورين ضریب

* مسئول مقاله:

(Germany) بودند.

دستگاههای بکار رفته:

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

تهیه بافر ایزوتونیک و محلول پرفیوژن: برای تهیه بافر فسفات با $pH=7/2$ 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 سالیان 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 اریتروماکسین 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 $37^{\circ}C$) محلولی از دارو با غلظت ۱۵ میکرومولار در سالیان بافر فسفاته تهیه شد و به مدت بیش از دو ساعت (بیشتر از طول دوره آزمایش) در دمای $37^{\circ}C$ 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 (۱۲ و ۱۱). بی‌هوشی حیوان توسط تزریق داخل صفاقی سدیم پنتوباریتال انجام شد و سگمندی بطول تقریباً ۱۰ سانتیمتر از قسمت ابتدایی ژژنوم کانوله گردید. سپس محلول دارو با غلظتهای ۲۰، ۱۵، ۱۰ و ۵ میکرومولار، در حضور یا عدم حضور

طی استفاده همزمان با اریتروماکسین 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 احتمالاً ناشی از افزایش احتمالی محلولیت داروی کم محلول سیکلوسپورین در حضور اریتروماکسین می باشد. در برخی موارد نیز، مکانیسم ایجاد تداخل بصورت مهار متابولیسم سیکلوسپورین توسط اریتروماکسین گزارش شده است، احتمالاً اریتروماکسین باعث افزایش جذب سیکلوسپورین نیز می گردد (۹ و ۸). با وجود اینکه گزارشی در مورد اثرات مهارى P-glycoprotein (P-gp) بر نفوذپذیری روده ای وجود دارد، لیکن گزارشی نیز مبنی بر دخالت محدود این گلیکوپروتئین بر عبور روده ای سیکلوسپورین وجود دارد (۱۰). علاوه 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 بر روی سیستم های *in situ* صورت گرفته است.

از آنجاییکه خصوصیات فیزیکی 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 اریتروماکسین انجام گردید تا بتوان بدینوسیله به میزان نقش مهارى P-gp و پدیده *efflux* در جذب دارو پی برد. علاوه 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:

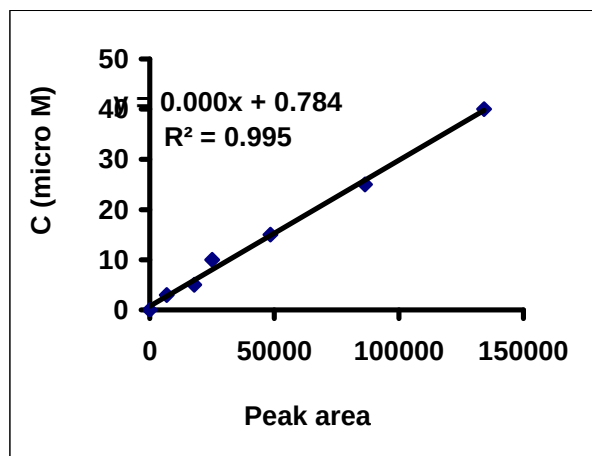
(Roche, Switzerland)، فنل رد (St. Louis, Mo, U.S.A) (Sigma)، اریتروماکسین (Elder Pharmaceutical LTD, India)، سدیم فسفات مونوبازیک NaH_2PO_4 (Merck, Germany)، سدیم فسفات دی بازیک Na_2HPO_4 (Merck, Germany)، استونیتریل (Merck, Germany)، متانول (Merck, Germany)، اورتوفسفریک اسید (Merck, Germany)، سدیم کلراید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

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 $P_{eff} = -Q_{in} \ln(C_{out}/C_{in})/2\pi r l$ برای محاسبه نفوذپذیری موثر استفاده می‌شود (۱۶ و ۱۷): 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)، $2\pi r l$ 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 ($\alpha=0.05$) در فاصله اطمینان ۹۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند.

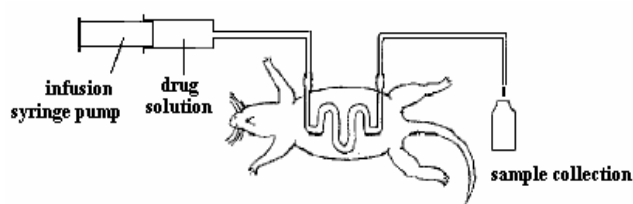
یافته ها

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 $37/2 \times 10^{-6}$ سانتیمتر بر ثانیه در گروه کنترل به $53/4 \times 10^{-6}$ (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 37°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.



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 اندازه گیری شد و سپس حیوان با تزریق کلور پتاسیم اشیاع در قلبش کشته شد. نمونه‌ها در دمای 20°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

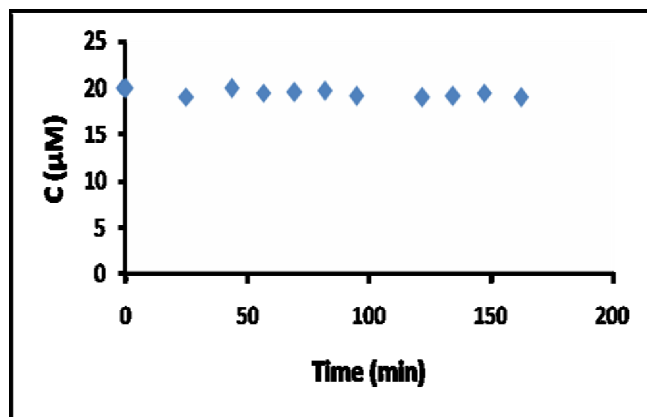
آنالیز HPLC برای سیکلوسپورین: برای آنالیز دارو از روش HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) استفاده گردید (۱۴). در این سیستم که از روش استاندارد خارجی استفاده شد، نوع ستون (گارد سر خود) Shimpak 5μm VP-ODS (250 × 4.6 mm) و فاز متحرک مخلوطی از استونیتریل، متانول، آب به نسبت های حجمی ۵۵٪، ۴۰٪، ۵٪ می باشد. سرعت جریان فاز متحرک ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه، طول موج مورد استفاده ۲۱۰ نانومتر، حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر و دمای ستون ۷۰ 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 ۳-۴۰ 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 (250 × 4.6 mm)، C_{18} 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 اورتوفسفیک اسید به pH حدود ۲/۶ رسیده باشد. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی لیتر 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 اندازه گیری 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

نمودار ۱. منحنی کالیبراسیون سيكلوسپورين در روش HPLC بکار رفته

سیکلوسپورین در سرنگ و لوله‌های غیر اشباع و اشباع.



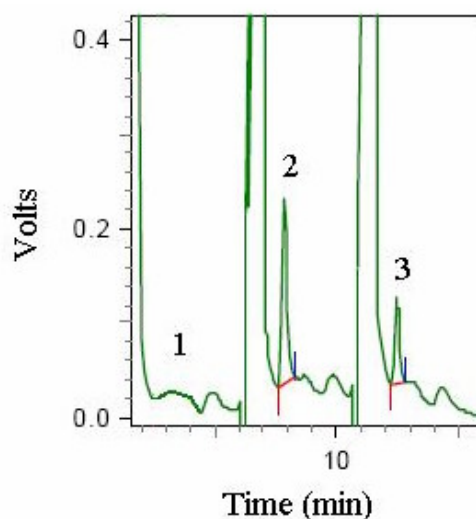
نمودار ۵. نمودار پایداری سیکلوسپورین در طول مدت آزمایش در دمای ۳۷°C در محلول پرفیوژن

جدول شماره ۱. میانگین ضرایب نفوذپذیری روده‌ای سیکلوسپورین در غلظت‌های مختلف و در حضور و عدم حضور اریترومیسین

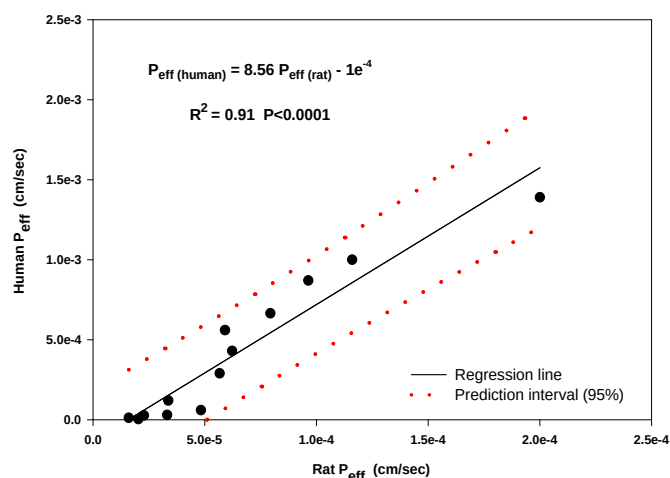
غلظت (μM)	گروه	میانگین نفوذپذیری موثر (* ۱۰ ^{+۶} cm/sec) (± SD)	P-value
۲۰	کنترل	۲۷/۳±۲۸/۲	۰/۰۱۱۰
	تست	۴۴/۱±۸/۴	
۱۵	کنترل	۳۱/۲±۲۳/۷	۰/۰۳۱
	تست	۳۷/۲±۲۱/۲	
۱۰	کنترل	۳۳/۴±۱۲/۹	۰/۰۲۶
	تست	۵۳/۴±۱۲/۹	
۵	کنترل	۲۲/۱±۳۰/۷	۰/۰۴۶
	تست	۳۹/۶±۱۰/۴	

جدول شماره ۲. مقادیر نسبت مهار پمپ efflux روده‌ای سیکلوسپورین توسط اریترومیسین در غلظت‌های مختلف به کار برده شده دارو

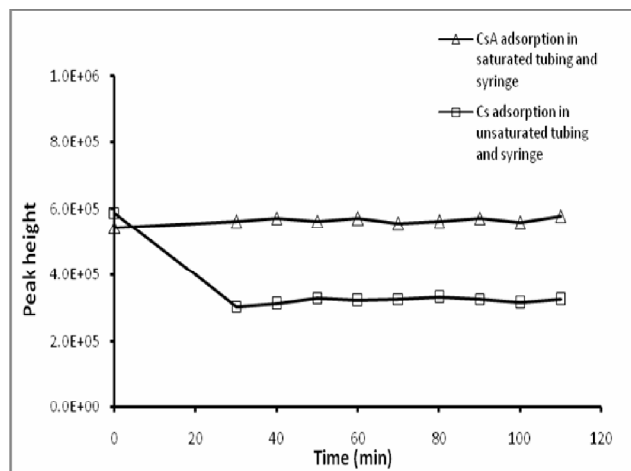
نسبت مهار efflux روده‌ای	غلظت سیکلوسپورین (μM)
۰/۳۸	۲۰
۰/۱۶	۱۵
۰/۳۷	۱۰
۰/۴۴	۵



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.



بامقادیر نفوذپذیری در روده انسان



نمودار ۴. نمودار مربوط به آزمایش جذب سطحی

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی نفوذپذیری سيكلوسپورين در حضور و عدم حضور اريترومايسين بصورت ضرایب نفوذپذیری روده ای محاسبه شده نشان داد که نفوذپذیری روده ای سيكلوسپورين A در هر چهار غلظت در حضور اريترومايسين افزایش قابل توجهی یافته است ($p < 0.05$). اختلاف قابل توجهی در نفوذپذیریهای حاصل شده از چهار غلظت به کار برده از سيكلوسپورين A مشاهده نشد، که نشان دهنده عدم وابستگی نفوذپذیری سيكلوسپورين A به غلظت است. از این رو نتیجه گیری می شود که حداقل بخشی از تداخلات بالینی مشاهده شده مابين اريترومايسين و سيكلوسپورين A بستگی به واکنشهای ایندو در سطح جذب دارد. بنابراین پیش بینی شده است که اريترومايسين سیستم آنزیمی سيتوکروم P₄₅₀ کبدی را مهار می کند که در نهایت منجر به مهار متابولیسم سيكلوسپورين و بالا رفتن سطح سرمی آن در بیماران می شود. این مطالعه نشان داد که جذب سيكلوسپورين در حضور اريترومايسين افزایش یافته و این بدین معنی است که عملکرد پدیده ایفلاکس توسط P-gp در سلولهای روده ای توسط اريترومايسين محدود شده و بنابراین نفوذپذیری سيكلوسپورين افزایش یافته است. چنین یافته ای با مکانیسمهای پیشنهاد شده برای تداخل اريترومايسين-سيكلوسپورين هم سو می باشد (۸۹). اگر ایده مهار متابولیسم سيكلوسپورين توسط اريترومايسين صحیح باشد، انتظار می رود که چنین تداخلی بعد از مصرف وریدی دارو نیز مشاهده گردد، در حالیکه در مطالعه بالینی روی افراد بیماری که به مدت ۱۲-۶ ماه سيكلوسپورين دریافت کرده بودند و قبل از آن نیز داروی تضعیف کننده سیستم ایمنی (سيكلوسپورين) را در حضور و عدم حضور اريترومايسين از طریق وریدی و خوراکی دریافت کرده بودند، نشان داد که در حضور اريترومايسين افزایش زیادی در غلظت ماکزیمم و سطح زیر منحنی غلظت پلاسمایی در برابر زمان سيكلوسپورين از راه خوراکی (اما نه از راه وریدی) مشاهده می گردد و پس از تجویز سيكلوسپورين از راه وریدی، اريترومايسين، تنها سبب کاهش کم ولی قابل توجه در کلیرانس سيكلوسپورين می گردد. بنابراین اريترومايسين بیشتر سبب افزایش جذب سيكلوسپورين می شود تا مهار متابولیسم آن (۸۹).

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 وریدی داروهای نظیر وراپامیل، اريترومايسين و فلوکین به ترتیب ۱/۸، ۱/۹، و ۲/۵ برابر افزایش می یابد، در همان تحقیق متابولیسم کینین نیز تحت تاثیر قرار گرفته و کاهش یافته بود (۱۸).

در مطالعه ای دیگر که تاثیر آمفوتریسین B بر روی سطح غلظت پلاسمایی سيكلوسپورين مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که بهره دهی درمانی سيكلوسپورين در صورت مصرف همزمان با آمفوتریسین B کاهش می یابد (۱۹). بنظر می رسد علت این امر افزایش P-gp و متعاقباً پدیده ایفلاکس در دئودنوم و نیز افزایش پدیده عبور اول کبدی توسط سيتوکروم P3A4 باشد. یافته های این مطالعه که بصورت کنترل شده صرفاً از دیدگاه جذب تداخل سيكلوسپورين و اريترومايسين انجام شده است، در جهت تایید نتایج مطالعات ذکر شده بوده و نقش مهاری P-gp را در جذب روده ای سيكلوسپورين به اثبات رساند. در ارزیابی انجام شده، برای بررسی میزان کمی نقش P-gp در

جذب روده ای سيكلوسپورين و به عبارتی بررسی نسبت مهار ایفلاکس روده ای (Efflux Inhibition Ratio) دارو، نسبت نفوذپذیری دارو در حالت مهار پمپ ایفلاکس روده ای (P_{p-gp}) و نیز نفوذپذیری دارو به روش غیر فعال (PPD) محاسبه شد. با کم کردن P_{eff, control} از P_{eff, inh} به دست 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-gp توسط اريترومايسين، مهار ایفلاکسی روده ای برای سيكلوسپورين ۰/۴۴-۰/۱۶٪ به دست آمد و نشان داده شد که ۴۴-۱۶٪ انتقال غیر فعال سيكلوسپورين توسط P-gp مهار می گردد (۲۰). با توجه به نفوذپذیریهای به دست آمده از سيكلوسپورين در مدل رت و نیز با استفاده از معادله ای که ارتباط بین نفوذپذیری روده ای انسان و رت که را نشان می دهد (نمودار ۳) (۲۱)، پیش بینی می شود که ضریب نفوذپذیری برای سيكلوسپورين در روده انسان بیشتر از 10^{-3} سانتی متر بر ثانیه باشد. جذب بالا و متفاوت سيكلوسپورين در انسان می تواند مرتبط با محلولیت کم شکل دارویی باشد. همانگونه که میدانیم بعضی از داروها می توانند در سطح ظروف (اعم از شیشه ای پلاستیکی) و لوله های رابط جذب شوند. این پدیده می تواند به صورت جذب سطحی (ادسوربشن) یا به صورت رسوخ دارو (ایسوربشن) انجام گیرد. عواملی که در میزان ایسوربشن و ادسوربشن داروها در ظروف دخالت دارند عبارتند از غلظت دارو در محلول که هر چه غلظت کمتر باشد، درصد جذب بیشتر است زیرا مراکز جذب در سطح ظرف محدود است و pH محلول که در pH ایزوالکتریک دارو، میزان جذب به حداکثر می رسد (۲۲). از عوامل مؤثر دیگر می توان به سرعت انفوزیون اشاره کرد. با افزایش سرعت انفوزیون مقدار جذب سطحی کاهش می یابد زیرا تماس دارو با جدار و ظرف کم می شود (۲۳).

در تحقیقات انجام شده برای بررسی پدیده جذب سطحی ابتدا محلول دارویی با غلظت ۱۵ میکرومولار به وسیله پمپ انفوزیون از سرنگ و لوله ها عبور داده شد. این کار به مدت ۲ ساعت و با سرعت اینفیوژن ۰/۲ میلی لیتر در دقیقه انجام گرفت. نتایج آزمایش حاکی از جذب قابل توجه دارو در سرنگ و لوله ها 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 نمونه هایی است که هر ۱۰ دقیقه از محلول خروجی از لوله ها گرفته شده است. مقایسه ارتفاع پیک نمونه اول با نمونه های بعدی در سرنگ و لوله های غیراشباع (منحنی پایین نمودار ۴) نشان می دهد که مقدار قابل توجهی از دارو، جذب سرنگ و لوله ها شده است. برای رفع این مشکل دو راه حل پیشنهاد و به کار گرفته شد. ابتدا از داخل سرنگ و لوله ها سیلیکون مایع عبور داده شد. سیلیکون می تواند با ایجاد یک لایه نازک روی جدار داخلی از تماس مستقیم محلول دارویی با ماده پی وی سی 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 اشباع گردد. بعد از این مرحله آزمایش جذب مجدداً انجام گرفت.

نتایج آزمایشات سری دوم نشان داد که تدابیر انجام شده موفقیت آمیز بوده و میزان جذب را به حد صفر کاهش داده است. در تحقیق حاضر به منظور کاهش جذب سطحی دارو در لوله ها و سرنگ، آنها را به مدت ۲۴ ساعت در محلول دارویی قرار دادیم تا محلهای جذب احتمالی کاملاً اشباع شده و میزان

مشاهده شده مابین اریتروماپسین 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.

جذب به حداقل برسد. در مورد مارکر فنل رد تفاوت معنی داری بین نتایج حاصل از سرنگ و لوله های اشیاع و غیر اشیاع وجود نداشت و جذب خاصی مشاهده نگردید. همانطور که در نمودار ۵ مشاهده میشود این دارو در دمای آزمایش از پایداری خوبی برخوردار بوده و در پایان طول دوره آزمایش حداکثر ۴-۵٪ از غلظت اولیه دارو کاسته شد.

از این رو نتیجه گیری می شود که حداقل بخشی از تداخلات بالینی

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

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, Tsui 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. Wachter 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, Islambulchilar 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.

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.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.