

Role of rs4149056 Polymorphism of SLCO1B1 Gene in Myopathy Caused by Atorvastatin in Cardiovascular Patients in West of Mazandaran Province

Mehrasa Ghanbari¹,
Saeed Abrotan²,
Ebrahim Vosoughi¹,
Patrick Honarchian Masihi¹,
MohammadReza Katoozi³,
Nematollah Ahangar⁴

¹Doctor of Pharmacy, Student Research Committee, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

²Assistant Professor, Department of Cardiology, Rouhani Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

³General Practitioner, Student Research Committee, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

⁴Associate Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

(Received October 12, 2020 ; Accepted may 18, 2021)

Abstract

Background and purpose: Statins are among the most widely used drugs in treatment of cardiovascular diseases. Reducing the side effects of these drugs is of great importance in preventing treatment failure. The aim of this study was to investigate the role of rs4149056 polymorphism in statin-induced myopathy in patients with cardiovascular diseases in West of Mazandaran province, Iran.

Materials and methods: A descriptive cross-sectional study was carried out in 161 patients taking atorvastatin who attended Cardiovascular Clinic in Ramsar Imam Sajjad Hospital and Tonekabon Shahid Rajaei Hospital, 2017-2018. All patients were given atorvastatin at 40 mg daily for 8 weeks and all lipid markers and CPK enzyme levels as a measure of myopathy were measured. Then, the patients received atorvastatin at 20 mg for 4 weeks and all lipid markers were measured again. PCR-ARMS method was used to determine the distribution of rs4149056 polymorphism.

Results: According to findings, reducing the dose of atorvastatin caused significant differences in total cholesterol and LDL levels ($P < 0.05$), but the mean of these changes was not significant between different genotypes ($P > 0.05$). Drug dose change caused significant differences in levels of triglycerides in patients with TC genotype and HDL in patients with CC genotype ($P < 0.05$). Moreover, in patients with CC genotype, the percentage of those with high levels of CPK was two times higher than patients with normal CPK.

Conclusion: Current study could be of help in predicting the incidence of myopathy in patients receiving statins and preventing the side effects of these drugs.

Keywords: statins, atorvastatin, myopathy, *SLCO1B1* gene, polymorphism

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (197): 24-34 (Persian).

* Corresponding Author: Nematollah Ahangar - School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
(E-mail: dr.n.ahangar@gmail.com)

نقش پلی مورفیسم rs4149056 ژن *SLCO1B1* در آسیب عضلانی ناشی از آتورواستاتین در بیماران قلبی عروقی ساکن غرب استان مازندران

مهر آسا قنبری¹
سعید ابروتن²
ابراهیم وثوقی¹
پاتریک هنرچیان مسیحی¹
محمد رضا کاتوزی³
نعمت اله آهنگر⁴

چکیده

سابقه و هدف: استاتین ها یکی از پر مصرف ترین داروهای قلبی -عروقی هستند. کاهش عوارض جانبی این داروها در جلوگیری از شکست درمان اهمیت زیادی دارد. هدف از این مطالعه، بررسی پلی مورفیسم rs4149056 ژن *SLCO1B1* در بیماران مصرف کننده آتورواستاتین و ارتباط آن با وقوع میوپاتی در بیماران قلبی -عروقی ساکن غرب استان مازندران می باشد. **مواد و روش ها:** نوع مطالعه توصیفی -مقطعی و جمعیت مورد مطالعه شامل 161 بیمار مصرف کننده آتورواستاتین بود، که در سال 1396 و 1397 به درمانگاه قلب و عروق بیمارستان امام سجاد (ع) رامسر و بیمارستان شهید رجایی تنکابن مراجعه کردند. کلیه بیماران آتورواستاتین با دوز 40 میلی گرم روزانه به مدت 8 هفته دریافت کردند و تمامی مارک های لیپیدی بیماران و نیز سطح آنزیم کراتین فسفو کیناز (CPK) به عنوان معیاری از میوپاتی پس از طی دوره درمانی اندازه گیری شد. بعد از 8 هفته، بیماران داروی آتورواستاتین را با دوز 20 میلی گرم دریافت کردند و مجدداً تمامی مارک های فوق اندازه گیری شد. در بررسی تعیین پراکندگی پلی مورفیسم rs4149056 ژن *SLCO1B1* از روش ARMS-PCR استفاده شد.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد که کاهش دوز داروی آتورواستاتین توانست در میزان کلسترول تام و LDL تفاوت معنی داری ایجاد کند ($P < 0/05$)، اما میانگین این تغییرات در بین ژنوتیپ های مختلف معنی دار نبوده است ($P > 0/05$). درخصوص تری گلیسرید، در بیماران با ژنوتیپ TC و در خصوص HDL در بیماران با ژنوتیپ CC، تغییر دوز دارو سبب ایجاد تفاوت های معنی دار شد ($P < 0/05$). علاوه بر این، در بیماران دارای ژنوتیپ CC، درصد بیماران با CPK بالا، 2 برابر بیماران با CPK نرمال بود.

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر می تواند در پیش بینی بروز میوپاتی در بیماران دریافت کننده استاتین ها و جلوگیری از عوارض ناشی از آن ها نقش داشته باشد.

واژه های کلیدی: استاتین ها، آتورواستاتین، میوپاتی، ژن *SLCO1B1*، پلی مورفیسم rs4149056

مقدمه

بیماری های قلبی - عروقی شایع ترین علت مرگ و کشور، یک مرگ به علت بیماری های قلبی - عروقی است (1). داروهای مهارکننده آنزیم HMG-CoA Reductase

E-mail: n.ahangar@gums.ac.ir

مؤلف مسئول: نعمت اله آهنگر - رشت: دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی

1. دکترای داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، پردیس رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

2. استادیار، گروه قلب و عروق، بیمارستان روحانی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

3. پزشک عمومی، کمیته تحقیقات دانشجویی، پردیس رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

4. دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: 1399/7/21 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/7/28 تاریخ تصویب: 1400/2/28

(استاتین‌ها) به‌طور وسیع در کاهش لیپید سرم، پیشگیری و درمان هایپرلیپیدمی و بیماری‌های عروق کرونر مورد استفاده قرار می‌گیرند (2). با وجود این که استاتین‌ها باعث کاهش قابل توجهی در خطر مرگ و میر بیماری‌های قلبی - عروقی می‌شوند، به‌دلیل داشتن عوارضی بر سیستم عضلانی - اسکلتی در بیماران با ریسک بالا کم‌تر استفاده می‌شوند (3). به دنبال استفاده وسیع استاتین‌ها در کاهش لیپید خون، در افراد مختلف پاسخ‌های مختلفی مشاهده شده است (2) به طوری که در یک مطالعه فقط 18 درصد از بیماران به LDL-cholesterol هدف دست یافتند (4). عوارض عضلانی استاتین‌ها در یک طیف وسیع می‌تواند از یک درد عضلانی ساده تا رابدومیولیز باشد. به گونه‌ای که عواقب کشنده ناشی از رابدومیولیز استاتین‌ها باعث قطع استفاده از سرئوواستاتین (*cerivastatin*) در سال 2001 گردید (5). به دلیل اثرگذاری این علائم بر زندگی بیماران که می‌تواند باعث کاهش دوز مصرفی و همچنین محروم ماندن آن‌ها از اثر حیات‌بخش این داروها شود، توجه به میوپاتی ناشی از استاتین‌ها اهمیت می‌یابد (6). این داروها از راه خوراکی مصرف شده و رسیدن آن به بافت هدف (کبد) بوسیله انتقال دهنده‌های روده‌ای و کبدی تسهیل می‌گردد (7). قوی‌ترین شواهدی که در حال حاضر برای توجه پاتوفیزیولوژی عدم پاسخ به درمان و ایجاد میوپاتی ناشی از استاتین‌ها وجود دارد، مربوط به پلی‌مورفیسیم ژن *SLCO1B1* یا همان پروتئین انتقال‌دهنده solute carrier organic anion transporter 1B1 (*SLCO1B1*) یا همان پروتئین انتقال‌دهنده anion-transporting polypeptide (*OATP1B1*) می‌باشد (8-10). چندین مطالعه نشان داده‌اند که *OATP1B1* به مقدار بسیار زیادی در سطح بازولترال (سینوزوئیدال) غشای سلول‌های کبدی بروز می‌کند (11، 12). *OATP1B1* به عنوان انتقال‌دهنده تعدادی از سوبستراهای درون‌زاد و برون‌زاد از جمله اسیدهای صفراوی، هورمون‌های تیروئیدی و متوترکسات (13) شناخته می‌شود و همچنین در انتقال بسیاری از استاتین‌ها از استاتین‌ها از جمله

آتورواستاتین (*atorvastatin*) (14)، سرئوواستاتین (*cerivastatin*) (15)، پراواستاتین (*pravastatin*) (11) و روزوواستاتین (*rosuvastatin*) (16) نقش دارد. در یک مطالعه فارماکوژنتیک که به منظور بررسی اثربخشی استاتین‌ها با روش STRENGTH¹ انجام گرفت، مشاهده شد که خطر وقوع میوپاتی در مصرف‌کنندگان سیم‌واستاتین (*simvastatin*) بیش‌تر بیش‌تر از بقیه استاتین‌ها می‌باشد. پژوهشگران این طرح مدعی شدند که ژنوتیپ *SLCO1B1**5 و جنس مؤنث با عوارض متوسط ناشی از استاتین‌ها که با افزایش آنزیم کراتین فسفو کیناز (creatine phosphokinase: CPK) تا 3 برابر حالت نرمال مشخص می‌شود، مرتبط است (17). در مطالعه‌ای که بر روی جمعیت آمریکایی‌های غیرآفریقایی انجام شد، 10 درصد از بیمارانی که استاتین مصرف می‌کردند و LDL آن‌ها کاهش یافته بود، دچار مشکل عضلانی شدند و مجدداً استاتین دریافت نکردند و دارو برای آن‌ها قطع شد ولی بقیه مجدداً استاتین دریافت کردند. بعد از بررسی و مقایسه بین این دو گروه به این نتیجه رسیدند که پلی‌مورفیسیم rs4149056 در ژن *SLCO1B1* عامل بسیار مهمی در بروز علائم عضلانی مرتبط با استاتین‌ها در این بیماران بوده است (18). با توجه به این که آتورواستاتین یکی از پر مصرف‌ترین داروهای خانواده استاتین‌ها در ایران است و فراوانی آللی rs4149056 در ژن *SLCO1B1* و ارتباط آن با میوپاتی در بیماران ایرانی به خوبی مشخص نیست، بر آن شدیم که برای نخستین بار ارتباط میان پلی‌مورفیسیم فوق را با پاسخ‌دهی بالینی و بروز عارضه میوپاتی در بیماران قلبی - عروقی مصرف‌کننده آتورواستاتین مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه و جمعیت مورد بررسی

تمامی مراحل انجام مطالعه توسط کمیته

1. Statin Response Examined by Genetic Haplotype Markers

اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران، پردیس خودگردان رامسر با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1396.6184 تأیید و تصویب شد. بیماران با اخذ رضایت نامه کتبی حاضر به همکاری در این طرح تحقیقاتی شدند و اطلاعات تمامی بیماران به صورت محرمانه باقی ماند و انتشار داده ها نیز به صورت بی نام خواهد بود. همچنین در هر مقطعی از مطالعه، در صورت عدم تمایل بیمار به ادامه همکاری با گروه تحقیقاتی، بیماری توانست این موضوع را اعلام و از مطالعه خارج شود. این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی بوده و جمعیت مورد مطالعه شامل بیماران مصرف کننده آتورواستاتین (به دلیل هایپرلیپیدمی، بیماری عروق کرونر و ...) بودند که در سال 1396 و 1397 به درمانگاه تخصصی قلب و عروق بیمارستان امام سجاد (ع) رامسر و بیمارستان شهید رجایی تنکابن مراجعه کردند. بیماران با سن بالای 20 سال، دارای هایپرلیپیدمی، بیماران مبتلا به بیماری عروق کرونر، نیازمند به مصرف استاتین یا سابقه مصرف آن و بیماران با ملیت ایرانی و ساکن غرب مازندران وارد مطالعه شدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل افرادی که اخیراً سابقه بالابودن CPK به دلیل سندروم حاد کرونری یا انفارکتوس میوکارد داشتند، عدم همکاری بیمار، عدم رعایت دوز مصرفی استاتین توسط بیمار، حاملگی، داشتن بیماری فعال کبدی و کلیوی و هرگونه اختلال اندوکرینی و یا بدخیمی و فوت بیماران بود. همچنین در طول مطالعه سعی شد تا حد امکان از مصرف سایر داروهایی که قابلیت تاثیرگذاری جانبی بر پروفایل لیپیدهای خون را دارند، اجتناب شود. مطالعه به گونه ای انجام شد که فاقد هرگونه صدمه جسمی و روحی، عواقب و پیامدهای جانبی برای بیماران باشد. همه بیماران حداقل به مدت 8 هفته آتورواستاتین را با دوز 40 میلی گرم روزانه دریافت کردند و کلیه مارکرهای لیپیدی بیماران و همچنین سطح آنزیم CPK (به عنوان معیاری از میوپاتی) اندازه گیری و نیز گزارش

بیماران مبنی بر درد و سوزش و کوفتگی عضلانی بدون سابقه قبلی پس از طی دوره درمانی مذکور ثبت شد. سپس دوز دارو به 20 میلی گرم روزانه تعدیل شده و پس از 4 هفته مصرف، مجدداً مارکرهای لیپیدی و سطح CPK و گزارشات بیماران ثبت و ارزیابی شدند. جهت انجام آزمایشات مختلف از هر بیمار به مقدار 3 سی سی خون محیطی دریافت شده و به لوله های آغشته به سیرتات سدیم منتقل شد. بخشی از نمونه خون جهت بررسی مارکرهای لیپیدی و سطح CPK به آزمایشگاه بیمارستان فرستاده شد و پس از کسب نتایج، اطلاعات هر بیمار در فرم تدوین شده ثبت نتایج بیماران تکمیل شد. بخش دیگر نمونه خونی، بلافاصله به فریزر -20°C جهت تعیین بعدی ژنوتیپ هر بیمار در پلی مورفیسم rs4149056 *SLCO1B1* ژن منتقل شد.

روش تعیین ژنوتیپ

به طور خلاصه ابتدا DNA ژنومیک از هر نمونه خونی جدا سازی شده و سپس از روش ARMS-PCR² جهت تعیین ژنوتیپ $521\text{T}>\text{C}$ در پلی مورفیسم rs4149056 *SLCO1B1* استفاده شد (19). در ذیل به جزئیات روش تعیین ژنوتیپ اشاره شده است.

از دو جفت پرایمر به توالی زیر استفاده شد:

P1:5'-AAGTAGTTAAATTGTAATAGAAATGC-3'
P2:5'-GGGTCATACATGTGGATATAAGT-3'
P3:5'-AAGCATATTACCCATGAAC G-3'
P4:5'-GTAGACAAAGGGAAAGTGATCATA-3'

واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر T100 (BIO-RAD,USA) و در حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل 2/5 میکرولیتر میکس بافر 10X و MgCl_2 ، 0/2 میلی مول از هر dNTP، حدود 40 پیکومول از هر پرایمر، 2 میکرولیتر Taq DNA Polymerase و تقریباً 200 نانوگرم DNA ژنومیک (2 میکرولیتر) و آب مقطر استریل تا حجم نهایی 25 میکرولیتر انجام شد. شرایط

1. Amplification Refractory Mutation System-PCR

زده شد. برای مقایسه تغییرات شاخص‌های مورد بررسی در نوبت اول و دوم اندازه‌گیری بر حسب ژنوتیپ، آزمون t زوجی و آنالیز واریانس (ANOVA) به کار گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل تفاوت‌ها در فراوانی‌های آللی و همچنین رابطه بین فراوانی ژنوتیپ‌ها با شاخص‌های پژوهش از آزمون χ^2 (Chi-square) استفاده شد. مقادیر $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

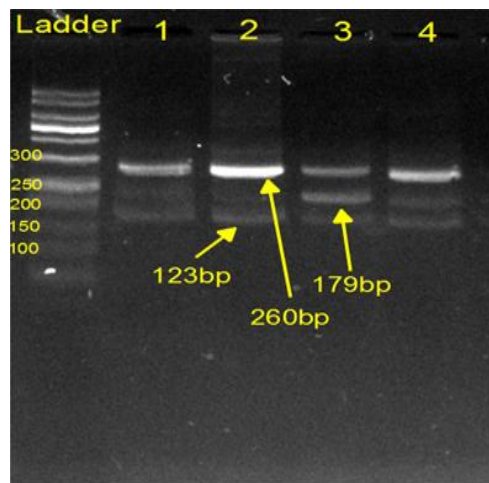
یافته‌ها

در این پژوهش تعداد 161 نفر مورد مطالعه قرار گرفتند. بازه سنی بیماران مورد مطالعه بین 38 تا 85 سال بوده است. همان‌طور که در جدول شماره 1 مشاهده می‌شود، از میان بیماران مورد مطالعه، 9 مورد (5/59 درصد) در بازه سنی 50 سال و کم‌تر، 34 مورد (21/12 درصد) در بازه سنی 51 تا 60 سال، 45 مورد (27/95 درصد) در بازه سنی 61 تا 70 سال، 37 مورد (22/98 درصد) در بازه سنی 71 تا 80 سال و 36 مورد (22/36 درصد) در بازه سنی 81 سال و بالاتر قرار داشتند. میانگین سنی بیماران مورد بررسی 68/63 سال با انحراف معیار 12/813 است. همان‌طور که در جدول شماره 2 قابل مشاهده است، از میان بیماران مورد مطالعه، 70 مورد (43/5 درصد) مرد و 91 مورد (56/5 درصد) زن بودند. از میان بیماران مورد مطالعه از نظر داشتن سابقه بیماری، 41 مورد (25/6 درصد) دارای سابقه بیماری دیابت، 76 مورد (47/5 درصد) دارای سابقه بیماری IHD، 46 مورد (28/7 درصد) دارای سابقه بیماری CHF و 96 مورد (60 درصد) دارای سابقه فشار خون بالا بودند.

جدول شماره 1: توزیع فراوانی بیماران مورد بررسی بر حسب سن

سن بیماران	تعداد (درصد)	انحراف معیار $\pm$ میانگین
50 سال و کم‌تر	9 (5/59)	
51 تا 60 سال	34 (21/12)	
61 تا 70 سال	45 (27/95)	
71 تا 80 سال	37 (22/98)	
81 سال و بالاتر	36 (22/36)	
جمع کل	161 (100)	

دمایی انجام واکنش به شرح ذیل صورت پذیرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای 95°C به مدت 5 دقیقه، 35 سیکل شامل دمای 95°C به مدت 30 ثانیه و دمای آنیلینگ 48°C به مدت 30 ثانیه و 72°C به مدت 30 ثانیه و در انتها 7 دقیقه در دمای 72°C جهت طولیل شدن نهایی زنجیر. محصولات PCR پس از مخلوط شدن با Loading Buffer در چاهک‌های مخصوص ژل آگارز 2/5 درصد و رنگ آمیزی شده با Safe stain، تحت عمل الکتروفورز قرار گرفته و در دستگاه عکس برداری از ژل تحت نور UV مشاهده باندهای DNA و ثبت تصویر مربوطه از ژل صورت پذیرفت. بر این اساس در نتیجه الکتروفورز، ژنوتیپ هموزیگوت TT با دو باند 260bp و 179bp، ژنوتیپ هموزیگوت CC با دو باند 260bp و 123bp و ژنوتیپ هتروزیگوت TC با 3 باند 260bp و 123bp و 179bp مشخص شدند (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: نتایج الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز 2/5 درصد. شماره 1 و 2: ژنوتیپ هموزیگوت CC، شماره 3: ژنوتیپ هموزیگوت TT، شماره 4: ژنوتیپ هتروزیگوت TC

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 22 برای ویندوز انجام شد. متغیرهای پیوسته به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است. فراوانی آلل و توزیع ژنوتیپ‌ها به وسیله شمارش ژن‌ها تخمین

جدول شماره 2: توزیع فراوانی بیماران مورد بررسی بر حسب

جنسیت

جنسیت بیماران	تعداد (درصد)
مرد	70 (43/5)
زن	91 (56/5)
جمع کل	161 (100)

با توجه به نتایج آزمون کای دو، اختلاف معنی داری بین فراوانی آلل های T و C پلی مورفسم rs4149056 در ژن *SLCO1B1* وجود ندارد ($P > 0/05$ و $X^2 = 0/013$).

از میان 88 بیمار مرد، 41 مورد (46/6 درصد) دارای ژنوتیپ TT، 32 مورد (36/4 درصد) دارای ژنوتیپ TC و 15 مورد (17 درصد) دارای ژنوتیپ CC بودند. همچنین از میان 116 بیمار زن، 51 مورد (41 درصد) دارای ژنوتیپ TT، 50 مورد (43/1 درصد) دارای ژنوتیپ TC و 15 مورد (12/9 درصد) دارای ژنوتیپ CC بودند. همچنین هیچ گونه رابطه معنی داری بین جنسیت بیماران و بروز ژنوتیپ خاص در ژن *SLCO1B1* بیماران وجود نداشت. با توجه به داده های جدول شماره 3، بر اساس نتایج آزمون آنالیز واریانس، بین میانگین کلسترول بیماران در نوبت اول، نوبت دوم و میانگین تغییرات دو نوبت بر حسب ژنوتیپ ها تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0/05$). همچنین بر اساس نتایج آزمون تی همبسته مشاهده می شود که میانگین کلسترول در هر 3 ژنوتیپ مورد بررسی در دو نوبت اندازه گیری تفاوت معنی داری داشته ($P < 0/05$) و میانگین کلسترول در نوبت دوم افزایش داشته است.

جدول شماره 3: نتایج مقایسه تغییرات سطح خونی کلسترول (میلی گرم/

دسی لیتر) در نوبت های اول و دوم اندازه گیری بر حسب ژنوتیپ

ژنوتیپ	TT	TC	CC	ANOVA
نوبت اول اندازه گیری	159/31 ± 45/379	173/91 ± 46/720	167/81 ± 40/545	P = 0/177
نوبت دوم اندازه گیری	217/71 ± 48/234	224/70 ± 47/956	217/04 ± 44/136	P = 0/657
Paired-sample T-test	P = 0/001	P = 0/001	P = 0/001	---
میانگین تغییرات	58/40 ± 36/778	50/79 ± 50/097	49/23 ± 37/584	P = 0/471

با توجه به داده های جدول شماره 4، بر اساس نتایج آزمون آنالیز واریانس، بین میانگین LDL بیماران در نوبت اول، نوبت دوم و میانگین تغییرات دو نوبت بر حسب

ژنوتیپ ها تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0/05$). همچنین بر اساس نتایج آزمون تی همبسته مشاهده می شود که میانگین LDL در هر 3 ژنوتیپ مورد بررسی در دو نوبت اندازه گیری تفاوت معنی داری داشته ($P < 0/05$) و میانگین LDL در نوبت دوم افزایش داشته است.

جدول شماره 4: نتایج مقایسه تغییرات سطح خونی LDL (میلی گرم/دسی لیتر) در نوبت های اول و دوم اندازه گیری بر حسب ژنوتیپ

ژنوتیپ	TT	TC	CC	ANOVA
نوبت اول اندازه گیری	96/27 ± 33/400	95/68 ± 31/719	86/88 ± 28/561	P = 0/408
نوبت دوم اندازه گیری	118/92 ± 30/684	125/32 ± 29/576	113/04 ± 34/227	P = 0/214
Paired-sample T-test	P = 0/001	P = 0/001	P = 0/001	---
میانگین تغییرات	22/65 ± 21/419	29/47 ± 21/515	26/15 ± 19/667	P = 0/183

با توجه به داده های جدول شماره 5، بر اساس نتایج آزمون آنالیز واریانس، بین میانگین HDL بیماران در نوبت اول، نوبت دوم و میانگین تغییرات دو نوبت بر حسب ژنوتیپ ها تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0/05$). همچنین بر اساس نتایج آزمون تی همبسته مشاهده می شود که میانگین HDL در 2 ژنوتیپ TT و TC مورد بررسی در دو نوبت اندازه گیری تفاوت معنی داری نداشته است ($P > 0/05$) اما میانگین HDL در ژنوتیپ CC مورد بررسی در دو نوبت اندازه گیری تفاوت معنی داری داشته ($P < 0/05$)، و میانگین HDL در نوبت دوم کاهش داشته است.

جدول شماره 5: نتایج مقایسه تغییرات سطح خونی HDL (میلی گرم/

دسی لیتر) در نوبت اول و دوم اندازه گیری بر حسب ژنوتیپ

ژنوتیپ	TT	TC	CC	ANOVA
نوبت اول اندازه گیری	47/35 ± 13/098	45/56 ± 16/842	48/08 ± 16/594	P = 0/777
نوبت دوم اندازه گیری	44/65 ± 13/256	44/39 ± 12/753	41/88 ± 14/572	P = 0/644
Paired-sample T-test	P = 0/058	P = 0/474	P = 0/034	---
میانگین تغییرات	-2/69 ± 12/334	-1/18 ± 12/816	-6/19 ± 12/645	P = 0/247

با توجه به داده های جدول شماره 6، بر اساس نتایج آزمون آنالیز واریانس، بین میانگین تری گلیسیرید (TG) بیماران در نوبت اول، نوبت دوم و میانگین تغییرات دو نوبت بر حسب ژنوتیپ ها تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0/05$). همچنین بر اساس نتایج آزمون تی همبسته

احتمالی 0/92 ($P > 0/05$) نشان‌دهنده یکسان بودن شانس افزایش CPK برای افراد با آلل T و C است.

بحث

تحقیقات مختلف حاکی از نقش ژن *SLCO1B1* و پلی‌مورفیسیم‌های آن به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد عارضه میوپاتی در بیماران مصرف‌کننده داروهای خانواده استاتین می‌باشد. در این مطالعه برای نخستین بار در ایران بروز عارضه میوپاتی در گروهی از بیماران دریافت‌کننده آتورواستاتین و ارتباط آن با پلی‌مورفیسیم rs4149056 ژن *SLCO1B1* مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه میزان تغییرات کلسترول در نوبت اول و دوم درمان با آتورواستاتین، سطح کلسترول تام در هر 3 نوع ژنوتیپ در نوبت اول و دوم تفاوت معنی‌داری را نشان داد. به عبارت دیگر تغییر دوز دارو سبب تغییر معنی‌داری در میزان کلسترول تام شد ولی تغییرات میزان کلسترول برحسب ژنوتیپ ارتباط معنی‌داری نداشت و این یعنی ژنوتیپ عامل تأثیرگذار روی سطح کلسترول نبود. درمقایسه میزان تغییرات LDL نیز نتایج به همین صورت بود، یعنی تفاوت در ژنوتیپ‌ها اثر معنی‌داری بر روی سطح LDL نداشت ولی در مقایسه هر فرد با خودش در 2 نوبت این تفاوت معنی‌دار با تغییر دوز دارو دیده شد. در مقایسه میزان تغییرات HDL در افرادی که ژنوتیپ CC داشتند تفاوت دوز توانست باعث تغییر معنی‌داری در میزان HDL شود، در صورتی که در افراد با ژنوتیپ‌های TT و TC این تفاوت دیده نشد و همچنین در مقایسه ژنوتیپ‌ها باهم نیز این تفاوت معنی‌دار نبود. در مقایسه میزان تغییرات تری‌گلیسیرید، فقط در افراد با ژنوتیپ TC تفاوت معنی‌دار در فرد بین نوبت اول و نوبت دوم دیده شد، درحالی‌که در ژنوتیپ‌های TT و CC این تفاوت معنی‌دار نبود، یعنی تغییر دوز دارو از 40 به 20 میلی‌گرم تفاوت چندانی در میزان تری‌گلیسیرید ایجاد نکرد و در مقایسه ژنوتیپ‌ها باهم، تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در مطالعه ما در بررسی سطح آنزیم CPK در

مشاهده می‌شود که میانگین TG در 2 ژنوتیپ TT و CC مورد بررسی در دو نوبت اندازه‌گیری تفاوت معنی‌داری نداشته است ($P > 0/05$) اما میانگین TG در ژنوتیپ TC مورد بررسی در دو نوبت اندازه‌گیری تفاوت معنی‌داری داشته ($P < 0/05$) و میانگین TG در نوبت دوم افزایش داشته است.

جدول شماره 6: نتایج مقایسه تغییرات سطح خونی تری‌گلیسیرید (میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در نوبت اول و دوم اندازه‌گیری بر حسب ژنوتیپ

ژنوتیپ	TT	TC	CC	ANOVA
نوبت اول اندازه‌گیری	137/23 ± 65/320	124/05 ± 43/469	135/08 ± 62/369	P = 0/431
نوبت دوم اندازه‌گیری	134/99 ± 44/527	130/77 ± 42/051	136/27 ± 54/475	P = 0/826
Paired-sample T-test	P = 0/548	P = 0/001	P = 0/689	---
میانگین تغییرات	-2/24 ± 32/846	6/42 ± 11/198	1/19 ± 15/015	P = 0/133

از میان بیماران مورد مطالعه، در 64 مورد (38/7 درصد) درد عضلانی، 45 مورد (28 درصد) سوزش عضلات، 38 مورد (23/6 درصد) ضعف عضلات و 14 مورد (8/7 درصد) گرفتگی عضلات گزارش شده است. از میان بیماران با CPK بالا (29 مورد)، 17 مورد (58/6 درصد) دارای ژنوتیپ TT، 4 مورد (13/8 درصد) دارای ژنوتیپ TC و 8 مورد (27/6 درصد) دارای ژنوتیپ CC بودند. همچنین از میان 132 بیمار با CPK نرمال، 61 مورد (46/2 درصد) دارای ژنوتیپ TT، 53 مورد (40/2 درصد) دارای ژنوتیپ TC و 18 مورد (13/6 درصد) دارای ژنوتیپ CC بودند. در خصوص ارتباط میان CPK سرم و ژنوتیپ بیماران مشخص شد که ژنوتیپ CC به میزان 2 برابر در افراد دارای CPK بالا درصد شیوع بالاتری دارد ($P < 0/05$).

از میان بیمارانی که عدم پاسخ به درمان داشتند (9 مورد)، 4 مورد (44/5 درصد) دارای ژنوتیپ TT، 3 مورد (33/3 درصد) دارای ژنوتیپ TC و 2 مورد (22/2 درصد) دارای ژنوتیپ CC بودند. با توجه به مقایسه‌های آماری صورت گرفته، رابطه معنی‌داری بین عدم پاسخ به درمان بیماران و ژنوتیپ آن‌ها، مشاهده نشد. همچنین نسبت بخت (OR) 1/0349 با ضریب اطمینان (CI) 95 درصد برابر با 0/69-1/51 و ارزش

بیماران با ژنوتیپ‌های مختلف از میان 161 نمونه، 132 نمونه دارای CPK نرمال و 29 نمونه دارای CPK بالا بودند که در میان بیماران با CPK بالا، ژنوتیپ TT و در میان بیماران با CPK نرمال، ژنوتیپ‌های TC و فراوانی بالایی داشت، اما ژنوتیپ CC در افراد دارای CPK بالا 2 برابر شیوع بالاتری نشان داد. با وجود این، بین آلل‌های T و C اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در سال 2011 بر روی جمعیت‌های مختلف کشور برزیل از نظر ارتباط *SLCO1B1* rs4149056 با بروز عارضه میوپاتی در مصرف‌کنندگان استاتین مطالعه‌ای صورت گرفت که در این بین فراوانی *SLCO1B1* rs4363657 و rs4149056 در آمریکایی‌ها بیش‌تر از بقیه و در آفریقایی‌ها و گروه‌های نژادی این فراوانی کم‌تر بوده است و بررسی‌ها نشان دادند که فراوانی این آلل‌ها می‌توانند ارتباط مستقیمی با منشا قومی داشته باشد و از این یافته‌ها توانستند به کارایی و انتخاب نوع استاتین مناسب برای افراد مختلف دست پیدا کنند (20). بنابر مطالعه‌ای که در سال 2012 در کشور هلند انجام شد، پلی‌مورفیسم در ژن *SLCO1B1* نشان‌دهنده میوپاتی ناشی از سیم‌واستاتین بوده است و این میزان اثر را روی داروی آتورواستاتین ندیدند (21). در مطالعه دیگری که در سال 2012 در کشور برزیل انجام شد و به بررسی ارتباط هاپلو تیپ‌های *SLCO1B1* و میالژی ناشی از مصرف استاتین‌ها در بین بیماران مبتلا به هایپرکلسترولمی پرداخته بود، از میان بیماران مورد مطالعه 9/8 درصد افراد مبتلا به میالژی و 11/2 درصد افراد دارای CPK با 3 برابر حد نرمال بودند و نتایج نشان داد که هیچ ارتباطی بین پلی‌مورفیسم‌های *SLCO1B1* rs2306283 و rs4149056 با میالژی و بالا بودن CPK و ژنوتیپ TC+CC rs4149056 با CPK وجود ندارد. این یافته‌ها تاکید کردند که میزان اثر *SLCO1B1* در میالژی بستگی به نوع استاتین مصرفی دارد، به‌طوری که در سیم‌واستاتین بیش‌تر از آتورواستاتین دیده می‌شود (9).

در مطالعه ما، 18 درصد افراد دارای CPK بالا و دارای میوپاتی بودند و میزان CPK بالا در افراد با ژنوتیپ CC بیش‌تر مشاهده شد که با مطالعاتی که در گذشته انجام شده‌اند و به مراتب تاکید کردند بروز ژنوتیپ CC سبب کاهش انتقال استاتین به سلول‌های کبدی و افزایش احتمال بروز میوپاتی می‌شود همخوانی دارد. در مطالعه که با استفاده از برقراری ارتباط میان داده‌های تحقیقات علمی بالینی (Clinical Practice Research Datalink) به بررسی انواع پلی‌مورفیسم‌های ژن *SLCO1B1* و ارتباط آن‌ها با عارضه میوپاتی ناشی از مصرف استاتین‌ها در بریتانیا پرداخته است، این‌طور نتیجه‌گیری شد که پلی‌مورفیسم rs4149056 در ژن *SLCO1B1* با میوپاتی ناشی از استاتین‌ها همراه است، به‌طوری که نتایج نشان دادند حداقل یک آلل C در ژنوتیپ TC+CC، عامل مهمی در بروز میوپاتی در بیماران مصرف‌کننده استاتین‌ها می‌باشد (22).

Voora و همکاران (17)، Brunham و همکاران (21) و Hermann و همکاران (23) نیز مطالعاتی را در خصوص ارتباط میان میوپاتی ناشی از آتورواستاتین با پلی‌مورفیسم در ژن *SLCO1B1* انجام دادند، ولی ارتباط معنی‌داری میان این دو عامل پیدا نکردند. در مطالعه‌ای که توسط Hubáček و همکاران در سال 2015 در کشور چک بر روی مبتلایان به دیس‌لیپیدمی که تحت درمان با دوزهای پائین سیم‌واستاتین یا آتورواستاتین (10 یا 20 میلی گرم روزانه) بودند انجام شد، ارتباطی میان پلی‌مورفیسم در ژن *SLCO1B1* و ریسک بروز میالژی/میوپاتی یافت نشد (24). در مطالعه دیگر از نوع مروری که توسط Li و همکاران انجام شد، به این نتیجه رسیدند که ارتباط معنی‌داری میان میوپاتی ناشی از سیم‌واستاتین و پلی‌مورفیسم rs4149056 در ژن *SLCO1B1* وجود دارد (25). در مطالعه‌ای که توسط Linskey و همکاران در سال 2020 در ایالات متحده آمریکا انجام شد ارتباط معنی‌داری میان قطع مصرف

آتورواستاتین به دلیل بروز میوپاتی و پلی مورفیسیم rs4149056 در ژن *SLCO1B1* یافت نشد (26). در حالی که در مطالعه ما بین داشتن ژنوتیپ و بروز میوپاتی و CPK بالا اختلاف معنی داری مشاهده شد و افراد با ژنوتیپ CC از میزان CPK بالاتری برخوردار بودند و این ژنوتیپ می تواند عاملی برای ابتلا به CPK بالا و میوپاتی باشد. نتایج مطالعه حاضر با مطالعه متا-آنالیزی که توسط Turongkaravee و همکاران (27) در سال 2021 و همچنین مطالعه ای که توسط Zaineh و همکاران (28) که در سال 2021 انجام شده اند و به بررسی نقش پلی مورفیسیم های rs4149056 ژن *SLCO1B1* در بروز میوپاتی ناشی از استاتین ها پرداختند و به ارتباط قوی میان ژنوتیپ های CC و TC و افزایش احتمال بروز عارضه میوپاتی در بیماران مصرف کننده استاتین اشاره کرده اند و همچنین مطالعه مروی Li و همکاران (25) که به ارتباط معنی دار میان پلی مورفیسیم rs4149056 در ژن *SLCO1B1* و بروز میوپاتی در مصرف کنندگان استاتین پی بردند، هم راستا می باشد. با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می رسد که تفاوت در دوز داروی آتورواستاتین، از 40 میلی گرم به 20 میلی گرم توانسته است در میزان کلسترول، تری گلیسیرید و LDL تفاوت های قابل ملاحظه و معنی داری را ایجاد کند، اما میانگین این تغییرات در ژنوتیپ های مختلف معنی دار نبوده است. در خصوص بروز میوپاتی در بیماران مصرف کننده داروی ما نتایج حاکی از آن بوده که افراد با ژنوتیپ CC، بیش تر در گروهی که CPK بالا داشتند دیده شدند. به عبارت دیگر بروز CPK بالا با افرادی که ژنوتیپ CC دارند رابطه معنی داری دارد که این نتایج هم راستا با مطالعاتی است که در گذشته انجام شدند و بیان کردند

که آلل C باعث کاهش انتقال داروی استاتین به سلول شده و دارو می تواند اثر بیش تری بر روی عضله داشته باشد و در نتیجه باعث بروز میوپاتی شود. برای اظهار نظر در مورد ارتباط بین مصرف استاتین ها با بروز میوپاتی، بهتر است علاوه بر پلی مورفیسیم های ژن *SLCO1B1*، پلی مورفیسیم های آنزیم های متابولیزه کننده این داروها (CYP450) نیز همزمان مورد ارزیابی قرار گیرند تا نتایج از قطعیت برخوردار شود.

این مطالعه برای اولین بار در ایران و در استان مازندران به انجام رسیده است و برای این که بتوانیم نتایج این مطالعه را در بالین مورد استفاده قرار دهیم نیاز است که مطالعات بعدی روی تعداد بیش تری بیمار در بازه زمانی گسترده تر و با تنوع داروهای بیش تری از خانواده استاتین ها مورد بررسی قرار بگیرند. هر چند که مطالعه ما در خصوص آتورواستاتین نیز تأیید کننده مطالعات قبلی در سایر کشورها بوده است مبنی بر این که آتورواستاتین دارویی نیست که پلی مورفیسیم های ژن *SLCO1B1* بتوانند روی بروز میوپاتی ناشی از آن اثر بگذارند.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مازندران می باشد. داده های ارائه شده برگرفته از پایان نامه خانم مهرآسا قنبری جهت کسب درجه دکترای داروسازی می باشد. نویسندگان، مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت های مادی و معنوی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران اعلام می نمایند.

References

- Chidakel A, Mentuccia D, Celi F. Peripheral metabolism of thyroid hormone and glucose homeostasis. *Thyroid* 2005; 15(8): 899-903.
- Zineh I. HMG-CoA reductase inhibitor pharmacogenomics: overview and implications for practice. *Future Cardiol* 2005; 1(2): 191-206.

3. Hanson M, Fareed M, Argenio S, Agunwamba A, Hanson T. Coronary artery disease. *Prim Care* 2013; 40(1): 1-16.
4. Hansson G. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352(16): 1685-1695.
5. Torpy J, Burke A, Glass R. Coronary heart disease risk factors. *JAMA* 2009; 302(21): 2388.
6. Diamond G, Forrester J. Analysis of probability as an aid in the clinical diagnosis of coronary-artery disease. *N Engl J Med* 1979; 300(24): 1350-1358.
7. Morice M, Serruys P, Kappetein A, Feldman T, Ståhle E, Colombo A, et al. Five-year outcomes in patients with left main disease treated with either percutaneous coronary intervention or coronary artery bypass grafting in the synergy between percutaneous coronary intervention with taxus and cardiac surgery trial. *Circulation* 2014; 129(23): 2388-2394.
8. Leusink M, Onland-Moret N, de Bakker P, de Boer A, Maitland-van der Zee A. Seventeen years of statin pharmacogenetics: a systematic review. *Pharmacogenomics* 2016; 17(2): 163-180.
9. Sortica V, Ojopi E, Genro J, Callegari-Jacques S, Ribeiro-dos-Santos Â, de Moraes M, et al. Influence of genomic ancestry on the distribution of SLCO1B1, SLCO1B3 and ABCB1 gene polymorphisms among Brazilians. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 110(5): 460-468.
10. Miyaki K, Matsubara A, Nishiwaki A, Tomida K, Morita H, Yoshida M, et al. Pitavastatin attenuates leukocyte-endothelial interactions induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Curr Eye Res* 2009; 34(1): 10-17.
11. Kei A, Filippatos T, Elisaf M. The safety of ezetimibe and simvastatin combination for the treatment of hypercholesterolemia. *Exp Opin Drug Saf* 2016; 15(4): 559-569.
12. Finegold J, Manisty C, Goldacre B, Barron A, Francis D. What proportion of symptomatic side effects in patients taking statins are genuinely caused by the drug? Systematic review of randomized placebo-controlled trials to aid individual patient choice. *Eur J Prev Cardiol* 2014; 21(4): 464-474.
13. Rahal A, ElMallah A, Poushaju R, Itani R. Do statins really cause diabetes?: A meta-analysis of major randomized controlled clinical trials. *Saudi Med J* 2016; 37(10): 1051-1060.
14. Mancini G, Tashakkor A, Baker S, Bergeron J, Fitchett D, Frohlich J, et al. Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: Canadian Working Group Consensus update. *Can J Cardiol* 2013; 29(12): 1553-1568.
15. Singh S, Singh A, Singh P, Murad M, Iyer P. Statins are associated with reduced risk of esophageal cancer, particularly in patients with Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11(6): 620-629.
16. Bansal D, Undela K, D'Cruz S, Schifano F. Statin use and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *PloS One* 2012; 7(10): e46691.
17. Voora D, Shah S, Spasojevic I, Ali S, Reed C, Salisbury B, et al. The SLCO1B1*5Genetic variant is associated with statin-induced side effects. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(17): 1609-1616.
18. Khine H, Yuet W, Adams-Huet B, Ahmad Z. Statin-associated muscle symptoms and SLCO1B1 rs4149056 genotype in patients with familial hypercholesterolemia. *Am Heart*

- J 2016; 179: 1-9.
19. Ang S, Nugroho AK, Sadewa AH, Hakim L. The SLCO1B1*15 haplotype associated with lower clinical outcome in Indonesian tuberculosis patients. *J Med Sci* 2018; 50(1): 50-58.
 20. Santos P, Soares R, Nascimento R, Machado-Coelho G, Mill J, Krieger J, et al. SLCO1B1 rs4149056 polymorphism associated with statin-induced myopathy is differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population: Amerindians as a high risk ethnic group. *BMC Med Genomics* 2011; 12(1): 136.
 21. Brunham L, Lansberg P, Zhang L, Miao F, Carter C, Hovingh G, et al. Differential effect of the rs4149056 variant in SLCO1B1 on myopathy associated with simvastatin and atorvastatin. *Pharmacogenomics J* 2012; 12(3): 233-237.
 22. Carr D, O'meara H, Jorgensen A, Campbell J, Hobbs M, McCann G, et al. SLCO1B1 genetic variant associated with statin-induced myopathy: a proof-of-concept study using the clinical practice research datalink. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 94(6): 695-701.
 23. Hermann M, Bogsrud M, Molden E, Åsberg A, Mohebi B, Ose L, et al. Exposure of atorvastatin is unchanged but lactone and acid metabolites are increased several-fold in patients with atorvastatin-induced myopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79(6): 532-539.
 24. Hubáček J, Dlouhá D, Adámková V, Zlatohlavek L, Viklický O, Hrubá P, et al. SLCO1B1 polymorphism is not associated with risk of statin-induced myalgia/myopathy in a Czech population. *Med Sci Monit* 2015; 21: 1454-1459.
 25. Li X, Sun S, Xu X, Zhao Z, Li W. The Association between Genetic Polymorphisms and Simvastatin-Induced Myopathy: A Narrative Synthesis of Evidence. *Drug Res* 2019; 69(4): 185-193.
 26. Linskey D, English J, Perry D, Ochs-Balcom H, Ma C, Isackson P, et al. Association of SLCO1B1 c. 521T>C (rs4149056) with discontinuation of atorvastatin due to statin-associated muscle symptoms. *Pharmacogenet Genomics* 2020; 30(9): 208-211.
 27. Turongkaravee S, Jittikoon J, Lukkunaprasit T, Sangroongruangsri S, Chaikledkaew U, Thakkinstian A. A systematic review and meta-analysis of genotype-based and individualized data analysis of SLCO1B1 gene and statin-induced myopathy. *Pharmacogenomics J* 2021.
 28. Shahrure ZM, Irshaid YM, Mustafa KN, Abujbara MA, Al Shhab M, El-Khateeb MS, et al. SLCO1B1 Gene Polymorphisms (rs2306283 and rs4149056) and Statin-Induced Myopathy in Jordanian Diabetics. *Curr Clin Pharmacol* 2021; 16: 1-8.