

نشانگرهای زیستی در آسیب کبدی ناشی از مصرف دارو (DILI):

یک گام دیگر به جلو

با اینکه بسیار نادر هستند اما DILI یک شرایط جدی به شمار می آید، هم برای شخص بیمار که در معرض نارسانی حاد کبد قرار میگیرد و هم برای صنعت داروسازی و نهادهای نظارتی که مسئول رسیدگی و نظارت بر توسعه و پیشبرد علوم داروسازی هستند. چنین نهادهایی هستند که باید در صورت نیاز اطلاعات و عوارض جانبی را اطلاع دهند و یا پس از عرضه داروهای زبان بار را از بازار جمع آوری نمایند. محدودیتی جدی در تشخیص و پیش بینی بروز عارضه DILI نبود نشانگرهای زیستی مشخص است. علاوه بر استفاده گسترده از نشانگرهای زیستی رایج در DILI، هنوز هم تشخیص صحیح و قابل اتکا بسیار دشوار است. این محدودیت ها نیاز به ایجاد نشانگرهای زیستی حساس و دقیقتر برای نشانگرهای زیستی DILI را افزایش داده است. این نشانگرهای زیستی میتوانند تشخیص و پیش بینی و روند درمانی بیماری DILI را ارتقا بخشند. تا امروز چندین نشانگر زیستی قابل توجه برای عارضه DILI معرفی شده اند که از جمله آنها نشانگرهای زیستی مبتنی بر مکانیستیک، برای مثال گلوتامات دهیدروژناز، پروتئین با دسته بندی جابه جایی 1 و کراتین-18، که میتواند اطلاعاتی در رابطه با ماکنیزم آسیب عوامل مسبب مختلف ارائه نماید. علاوه بر اینها، میکرو RNA ها هم به عنوان کاندیدهای نشانگر زیستی DILI غیر تهاجمی، با پتانسیل بالا توجهات بسیاری را به سوی خود جلب کرده اند، الیخصوص miR-122. پیشرفت های حاصل شده در تکنولوژی «omics» هم رویکردی جدید در مطالعات نشانگرهای زیستی ایجاد کرده است. قابلیت مشاهده تعداد بالایی از مولکول ها (برای مثال متابولیت

¹ drug-induced liver injury

ها، پروتئین و یا DNA) به طور همزمان تشخیص «میزان سمی بودن^۲» را ممکن میسازد که به نوبه خود در ارزیابی های ایمنی و تشخیص بیماری کمک شایان توجهی به شمار می رود. از طرف دیگر مطالعات Omics محور هم میتوانند اطلاعاتی درباره مکانیزمهای ضمنی فرمهای مختلف از عارضه DILI را در راستای سهولت در تشخیص نشانگرهای زیستی معایناتی در مراحل ابتدایی عارضه و پیاده سازی ایمن تر داروهای شخصی سازه شده فراهم نمایند. در این مقاله علمی پیشرفتهای اخیر در حوزه مطالعات نشانگرهای زیستی DILI را مورد بررسی قرار داده ایم.

کلمات کلیدی: سمیت کبدی، آسیب کبدی ناشی از مصرف دارو، پیش بینی، تشخیص، نتیجه

معرفی

آسیب کبدی ناشی از مصرف دارو (DILI) یکی از واکنش های مضر است که در بخش کوچکی از بیماران پدیدار میشود. عارضه DILI عمدتاً در دسته بیماری های ذاتی قرار میگیرد و در صورت پیش بینی بر حسب دز و ویژگی های دارویی دسته بندی میشود (برای مثال اوردز آستامینافون یا APAP) و در صورت عدم پیش بینی ویژه طبقه بندی میشود، با همان ویژگی ها. مورد دوم در نتیجه تعامل با خواص دارویی، فاکتورهای پذیرنده و شرایط محیطی در اشخاص با احتمال ابتلا است. بنابراین، هیچ مدل های حیوانی دارای کاربردی برای DILI نوع ویژه موجود نیستند، برخلاف وجود مدل های موشی برای سمیت کبد APAP. عارضه DILI میتواند تاثیر بسزایی بر سلامتی بیمار داشته باشد و نارسایی کبدی حاد ایجاد کند. با این حال اکثر پرونده های DILI ویژه نتیجه ای مطلوب با سرعت بازیابی سلامت بالا پس از خروج داروی مقصر از بدن داشته اند. این عارضه میتواند چالش پزشکی بالایی داشته باشد چون تقریباً میتواند تمامی شرایط حاد و مضمن عارضه کبدی و صفراوی را به خود بگیرد و در حال حاضر هیچ نشانگر زیستی یا تست تشخیصی بخصوصی برای این شرایط وجود ندارد. پس یک تشخیص پزشکی DILI شدیداً وابسته به صرف نظر کردن از علت های جایگزین دیگر و گردآوری یک تاریخچه کامل از مصرف داروهای سازگار است. نبود

² toxicity signatures

نشانگرهای زیستی برای این بیماری میتواند به روند پیشبرد دارو نیز تاثیر بگذارد و در نهایت به حذف کاندیدهای دارویی با پتانسیل سمیت کبدی ویژه شود. این امر میتواند عواقب اقتصادی قابل توجهی داشته باشد و باعث شود گروه بزرگی از پذیرندگان دارویی از دستیابی به درمان مورد نیاز شان منع شوند، تنها به این خاطر که دارو برای بخش کوچکی از بیماران مضر است. نشانگرهای زیستی جدید و حساستر برای DILI میتواند نظارت بهتری را بر بیماران تحت درمان با داروهای جدید فراهم کند و آسیب کبدی را با تشخیص زودهنگام و توقف تجویز برطرف سازد.

نشانگرهای زیستی در تشخیص DILI

تشخیص

یک نشانگر زیستی را میتوان یک ویژگی تعریف کرد که به عنوان شاخصی از فرآیند زیستی، فرآیندهای بیماری زا یا پاسخ دارویی به یک مداخله دارویی دانست که میتوان آن را اندازه گیری و ارزیابی نمود. با اینکه نشانگرهای زیستی بیشترین اهمیت را در دوره پیش بالینی و آزمونهای پزشکی اولیه و ارزیابی های ایمنی یک داروی جدید دارند، در روند تشخیص بیماری، تعیین مرحله پیشرفت آن و پیش بینی و نظارت بر واکنش دارویی هم حائز اهمیت هستند. در نبود نشانگرهای زیستی مورد نیاز برای DILI، این عارضه با کمک سرم آسیب کبدی نشانگرهای زیستی و به صورت کلی تشخیص داده میشود، از جمله این سرم ها میتوان به آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالن فسفاتاز (ALP) و بیلی روبین (TBL) اشاره کرد. ALT، AST و ALP آنزیم های داخل سلولی هستند که در صورت تشخیص داده شدن در سرم میتوانند آسیب به سلولهای کبدی یا سلول های صفراوی را مشخص کنند. از طرف دیگر یک افزایش در سرم TBL نارسایی کبدی را آشکار میکند، اما با وجود اینکه صرفاً برای تشخیص نارسایی کبد استفاده میشود، در عمل کمتر حساسیت نشان میدهد و معمولاً در مراحل پیشرفته تر بروز آسیب خود نشان میدهد. ALT، AST و ALP مختص کبد نیستند و شرایط خارج کبدی از جمله آسیب میوکارد، بیماری های اسکلتی عضلانی، هیپرتیروئیدی و بیماری استخوانی هم با افزایش ALT، AST و ALP مرتبط هستند. جالبتر اینکه شواهدی مبنی تاثیر پذیری سطح پلاسمای ALT و ALP به خاطر تفاوت های ژنتیکی در حال کشف شدن است.

آلانین آمینوترانسفراز برای تشخیص آسیب کبدی موثرتر از AST است، چرا که بیشتر به شکل پروتئین سیتوزولی در کبد حضور داشته و غلظت کمتری در جاهای دیگر بدن دارد، در حالیکه AST هم در فرم سیتوزولی و میتوکندری در کبد، قلب، عضلات استخوانی، کلیه، مغز و پانکراس، بافت شش و حتی گلبول های قرمز حضور دارد. در مقابل ALT انسانی در دو ایزوفرم با ظرفیت آنزیم مشابه به هم ALT1 و ALT2 موجود است و حضور ALT2 محدود به بافت های غیر کبدی هم میشود، به طور ویژه عضلات قلب و اسکلت. در مطالعات اخیر چنین یافت شده است که ارزیابی میزان مشارکت فعالیت های ALT1 و ALT2 به کل فعالیت ALT در پلاسما آسیب های کبدی را از غیر کبدی جدا میکند. استفاده از سنجش میزان فعالیت ALT استاندارد در حال حاضر در روش های پزشکی استفاده میشود، هر چند هیچ تمایزی بین سرم ALT و سایر ارگان ها و یا ایزوفرم ها قائل نمیشود.

فنتایپ بیماری

آسیب کبدی ناشی از مصرف دارو خود به سه دسته از الگوهای آسیب های کبدی تقسیم میشود (هپاتوسلولار، کلستاز، و ترکیبی)، این دسته بندی در اصل وابسته به ویژگی های بافتشناسی است. آسیب های هپاتوسلولار معمولاً ریشه در نکرز سلولهای کبدی و التهاب دارند، در حالیکه استاز صفرا، التهاب پورتال و آسیب مجرای صفراوی معمولاً در آسیب های کلستاز دیده میشوند. آسیب ترکیبی هم همانطور که از نامش پیداست ترکیبی از دو آسیب دیدگی کبدی فوق الذکر است. از آنجایی که بیوپسی معمولاً تشکیل دهنده بخشی از روند تشخیص DILI نیستند، الگوی آسیب معمولاً از روی معیارهای تحلیلی خصوصیات کبد به دست می آید. دقیق تر اینکه رابطه بین معیارهای ALT و ALP در زمان شروع عارضه DILI برای تعیین نوع آسیب کبدی مطابق با فرمول R به کار میروند.

$$R = (ALT/ULN) \wedge (ALP/ULN)$$

یک مقدار R بزرگتر از 5 نشاندهنده آسیب هپاتوسلولار است، مقدار $R < 2$ آسیب کلستاز و مقدار $2 < R < 5$ آسیب ترکیبی را نشان میدهد. مقایسه اخیر بین نوسانات ALT و AST در گروه بزرگی از بیماران DILI نشان میدهد

که AST میتواند جایگزین خوبی برای ALT در محاسبات مقدار R باشد، مخصوصا در مواردی که مقادیر ALT در آنست DILI غایب هستند، اما گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز^۳ (GGT) کمتر از جایگزین های ALP قابل اتکا است.

روند درمانی و پیش بینی

مقدار ALT به تنهایی میتواند ارزش پیش بینی کمی در رابطه با روند درمانی DILI داشته باشد اما در ترکیب با TBL میتواند شاخص پیش بینی خوبی ارائه کند. امروزه به این یافته قانون «های»^۴ گفته میشود و بر پایه یافته های پزشکی محقق فقید هایمن زیمرمان بر روی بیماران مبتلا به DILI از نوع آسیب هپاتوسلولار است. طبق این یافته زردی در حدود 10-50٪ ریسک میزان خطر را بسیار بالا میبرد و نیاز به پیوند کبد وجود دارد. در غیاب ALP قانون های AST و یا مقدار ALT بیشتر از سه برابر ULN و TBL بیشتر از 2 برابر ULN را تعریف میکند و همچنین جایگزینی برای ارزیابی های ALT و TBL. به همین خاطر هم از سوی وزارت غذا و داروی آمریکا به عنوان معیاری برای عارضه حاد DILI تعیین شده است.

میزان اعتبار قانون های در بسیاری از گروه های مبتلایان به عارضه DILI تایید شده است. هر چند افزایش های ALP در قانون های بارها زیر سوال برده شده است و یافته های اخیر نشان میدهند که یک سطح ALP بالاتر از 2 برابر ULN نقشی حفاظتی در پیشرفت نارسایی حاد کبدی ندارد. با وجود حساسیت بالا قانون های فاید ویژگی کافی است و اکثر موارد DILI مطابق با معیارهای قانون های نتیجه درمان کامل مطلوبی از خود نشان میدهند. با استفاده از طیف گسترده تر از معیارهای تحلیلی ما الگوریتم ترکیبی با ویژگی بالاتر برای پیش بینی نارسایی حاد کبدی بر اساس آنست داده DILI ارائه کرده ایم.

³ gamma-glutamyl transpeptidase

⁴ Hy's Law

جدول 1، سرم جدید کاندیدهای نشانگر زیستی پلاسما DILI

نشانگر زیستی	گروه مطالعاتی (N)	مقایسه با ALT	ارجاع
GLDH	انسان: اوردز APAP، سیروز و آسیب کبدی، کارسینوم هیپاتوسلولار	ضریب همبستگی کل: 0.88 همبستگی پایین تر در مصرف بیش از حد APAP از دیگر آسیب های کبد	اشکومیگر 2013
GLDH	انسان: اوردز APAP	ضریب همبستگی (اوج ALT): 0.45	آنتوئین 2013
GLDH	انسان: داوطلبان سالم هپارین دریافت میکردند	ضریب همبستگی (اوج ALT): 0.76	هاریلتال 2012
MDH	انسان: اوردز APAP، سیروز و آسیب کبدی، کارسینوم هیپاتوسلولار	ضریب همبستگی کل: 0.74. کمتر کبد خاص از ALT.	اشکومیگر 2013
HMGB1	موش: اوردز APAP	افزایش های قابل تشخیص پیش از افزایش ALT. مقدار حداکثری سریعتر از ALT حاصل شد	آنتوئین 2009
HMGB1	انسان: اوردز APAP	ضریب همبستگی: HMGB1 0.60 استیله مرتبط با پیش بینی بدتر	آنتوئین 2012
HMGB1	انسان: اوردز APAP	ضریب همبستگی (اوج ALT): 0.67. می توان سمیت کبدی بالینی را بعد از مصرف بیش از حد APAP و قبل از ALT پیش بینی کرد.	آنتوئین 2013
K18	موش: اوردز APAP	افزایشات قابل تشخیص از FL-K18 و CK18 قبل از ALT.	آنتوئین 2009
K18	انسان: اوردز APAP	ضریب همبستگی: 0.58. طول K18 کامل در ارتباط با پیش بینی بدتر	آنتوئین 2012
K18	انسان: اوردز APAP	ضریب همبستگی (اوج ALT): FL- K18، 0.59، CK18، FL-0.57. می توان سمیت کبدی بالینی را بعد از مصرف بیش از حد APAP و قبل از ALT پیش بینی کرد.	آنتوئین 2013
K18	انسان: داوطلبان سالم APAP دریافت میکردند، شرکت در یک مسابقه ماجراجویی	ضریب همبستگی (اوج ALT): FL- K18، 0.70، CK18، 0.66. بدون افزایش پس از آسیب عضلانی، که باعث افزایش ALT شده است	تولین 2014
miR-122, mir-192	موش: اوردز APAP	کبد MIRS غنی شده است. دز و مدت زمان قرار گرفتن در معرض تغییرات بسته به پلاسما قابل تشخیص زودتر از ALT	وانگ 2014

miR-122, mir-192	انسان: اوردز APAP	میزان سرمی افزایش یافته و پس اوردز بیش از حد APAP ضریب به miR-122 همبستگی (اوج ALT): 0.46.	استارکی لوئیس 2011
miR-122	انسان: داوطلبان سالم APAP دریافت می‌کردند، شرکت در یک مسابقه ماجراجویی	ضریب همبستگی (اوج ALT): 0.62. بدون افزایش پس از آسیب عضلانی، که باعث افزایش ALT شده	تولین 2014
پرو فایل miRNA یازده	انسان: اوردز APAP و هپاتیت ایسکمیک	پتانسیل تشخیصی (اوردز APAP اما نه در بیماران ایسکمیک). کمبود miRNA در شرایط بهبود بیماران مختلف.	واردتال 2014

GLDH: گلوتامات دهیدروژناز، MDH: مالات دهیدروژناز، HMGB1: گروه پر تحرک جعبه 1 پروتئین، K18:

کراتین-18، K18: FL-K18 با طول کامل، CK18: قطعه کاسپاس کراتین 18، miR: microRNA.

نشانه‌های زیستی مستعد برای عارضه DILI

توجه بیشتر در ساخت نشانه‌های زیستی DILI حساستر و ویژه تر برای تشخیص و پیش بینی زودهنگام منجر به کشف چندین کاندید مستعد شده است (جدول 1). بسیاری از این کاندیدها در اصل به عنوان مدل های APAP شناسایی شده اند، اما میتوانند برای جنبه های ویژه عارضه DILI هم مناسب باشند.

مبتنی بر مکانیستیک

گلوتامات دهیدروژناز (GLDH) یک آنزیم میتوکندری است که در کبد و با مقدار کمتر در کلیه و بسیار نادر در عضلات اسکلتی یافت میشود. این آنزیم بسیار ویژه-بافت تر از ALT و AST است. اشخاص سالم سطحی قابل اندازه گیری و ثابت از سرم GLDH دارند که با گذر سن و جنسیت تغییری نمیکند. یک افزایش در گردش GLDH نشان دهنده نارسایی در ناحیه میتوکندری و در نتیجه از بین رفتن یکپارچگی غشای میتوکندری است، که در خلال نکروز هپاتوسلولار روی میدهد. GLDH به خوبی با افزایش ALT هماهنگی دارد، مخصوصا در بیمارانی که آسیب های کبدی مختلف دارند، از جمله اوردز APAP، اما آنچنان حساس نیست تا سمیت کبدی APAP را پیش از ALT نشان دهد. علاوه بر این، داوطلبان سالم هیپارین زیر پوستی دریافت می‌کردند که بنا بر گزارشات باعث افزایش در GLDH به

همراه افزایش بدون علامت⁵ ALT میشد، این خود نشان دهنده رابطه بین GLDH و ALT است. نتایج مشابه برای مالات دهیدروژناز (MDH) هم مشاهده شده است، یک آنزیم تشکیل یافته در چرخه سیتریک اسید که پس از آسیب دیدن بافت به داخل سرم وارد میشود. با تمام اینها MDH بستگی کمتری به بافت دارد و سطح سرم آن با آسیب خارج کبدی تحت تاثیر قرار نمیگیرد.

HMGB1 یک پروتئین کروماتین-اتصال با فعالیت پیش التهابی تنظیم شده از طریق گیرنده های تولیک⁶ و گیرنده برای سیگنال دهی محصولات نهایی پیشرفته گلیکاسیون است. این پروتئین به صورت منفعلانه از سوی سلول های نکروتیک به فرم هایپوآستیلتید آزاد میشود، اما نه از سوی سلول های نکروتیک آپوپتوز یا ثانویه. بر خلاف آن، به صورت فعالانه در فرم هایپرآستیلتید شده از سلول های مصون منتشر میشود. همچنین HMGB1 نوعی نماینده از سلول نکروز یا سلول مصون فعال شده بسته به شرایط استیلته اش است. کراتین-18 عضوی از خانواده پروتئین کراتین است، که در ساختار سلولی و پیوستگی آن نقش دارد. بسیار شبیه به HMGB1، کراتین-18 با طول کامل دچار برآمدگی به واسطه کاسپاس میشود که بخشی از سازماندهی مجدد ساختاری در حین آپوپتوز بوده و پس از آن میتواند وارد جریان خون شود. پس مقادیر متمایز غلظت سرم از کراتین-18 هایی با طول کامل یا کاسپاس میتواند نشانی از سطح سلول نکروز و آپوپتوز دخیل باشد. شکل های مولکولی HMGB1 و K18 به عنوان نشانگرهای حساس به خون در آسیب های کبدی حاد تشخیص داده شده اند و میتوانند آگاهی خوبی نسبت به فرآیند مکانیستیک سمیت کبدی APAP از خود نشان دهند. این نشانگرهای زیستی از ALT هم حساستر تشخیص داده شده اند و با افزایش واضح پیش از ALT در بیمارانی که اوردز APAP دریافت کرده باشند. استفاده از نشانگرهای زیستی در درمان های پزشکی میتواند سرعت تصمیم گیری در رابطه با درمان را افزایش دهد. هرچند، ارزش و کاربرد پزشکی در موارد مرتبط با DILI ویژه همچنان ناشناخته باقی مانده است.

⁵ asymptomatic

⁶ Tolllike

MicroRNA

MicroRNA ها (miRNAs) نوکلئوتید های کوچک غیر کد کننده RNA دخیل در تنظیمات پسا-رونویسی خصوصیات ژن هستند. آسیب به ارگان های بدن معمولا باعث انتشار miRNA ها در جریان خون و تا حدودی در ادرار میشوند که به طور معمول در مایعات زیستی ثابت است، ویژگی ای که باعث شده است miRNA ها توجهات بیشتری را به خود جلب کنند. از آنها به عنوان نشانگرهای زیستی غیر تهاجمی یاد میشود. تا کنون چندین مطالعه تغییر در مقدار سرم miRNA را پس از آسیب های کبدی نشان داده است. MiR-122 و miR-192 اولین miRNA هایی بوده اند که پس از دز های سمی APAP در موش مشاهده شده اند و کمی بعد هم رفتاری مشابه در انسان را از خود نشان داده اند. MiR-122 و miR-192 هر دو miRNA های غنی در کبد هستند، گستردگی miR-122 با درصد 72٪ در موش ها گزارش شده است. سرم miR-122 در اولین مراحل آسیب هپاتوسلولار در بیماران تازه بستری شده با اوردز APAP مشاهده شده است، حتی زمانی که ALT همچنان نرمال به نظر میرسید. این ویژگی miR-122 را به طور ویژه برای تشخیص بیماری و شناسایی کاندیدهای دارویی برای بیماران مستعد سمیت کبدی ارزشمند میسازد. همین مساله میتواند با نشانگرهای زیستی کنونی بدون تشخیص باقی بماند. علاوه بر این، miR-122 بیشتر حساس به کبد است تا ALT، همانطور که در گروه آزمایشاتی انسانی نشان داده شده است. برای مثال در آسیب های عضلانی میزان miR-122 ثابت باقی ماند در حالیکه میزان ALT دچار تغییر شده بود. داده تازه نشان میدهد miRNA-122 میتواند ارزش پیش بینی کننده نیز داشته باشد، این موضوع با سطوح بالای اوردز APAP در بیمارانی که تحت معیارهای کالج کینگ واجد پیوند کبد شناخته شده بودند، بررسی شده است. هر چند ارزش miR-122 برای DILI ویژه هنوز مورد مطالعه است. لازم به ذکر است در حالیکه miR-122 به عنوان یک نشانگر زیستی DILI حامل خونی حساس عملکرد خوبی دارد، سطح ادرار miRNA ها پس از اوردز APAP افزایش محسوسی ندارند، نه در حیوانات و نه در انسان. یافته های اخیر همچنین نشان میدهند سرم miRNA، به جای miRNA های تکی ارزش تشخیص بالاتری دارد. این یافته بر اساس تست miRNA 11 مختلف در بیماران مبتلا به آسیب کبدی حاد با علل مختلف کسب شده است.

در حالیکه miRNAها میتوانند به صورت منفعلانه و در حین نکروتیک و یا آپوپتوز سلول مرده وارد جریان خون شوند، انتشار فعالانه شان هم میتواند بوسیله اگزوسومزها صورت گیرد. اگزوسومزها یکی از اشکال ساختار اطراف غشای سلولی هستند که تقریباً از سوی هر نوع سلولی آزاد میشوند. نقش کامل اگزوسومز در کنار انتقال و تحویل مواد مختلف از قبیل مولکولهای سیگنال رسان و زباله سلولی همچنان در حال بررسی است. مواد تشکیل دهنده اگزوسومزها محدود به miRNA نمی‌شوند بلکه حاوی پروتئین، لیپید و نوکلئیک اسیدهای اضافی (miRNAها) نیز میشود. اگزوسومزها اخیراً یکی از مهمترین مناطق تحقیق در پی یافتن نشانگرهای زیستی مناسب برای عارضه DILI بوده اند، به این خاطر که ترکیبات سازنده اگزوسومزها تحت فشار سلولی دچار تغییر میشود. اگزوسومزهای در حال چرخش نشات گرفته از بافت های مختلف در بسیاری از مایعات بدن یافت میشوند، خون و ادرار منابع بهتری برای نشانگرهای زیستی غیر تهاجمی هستند. چالش عمده در تشخیص اگزوسومزهای مشتق شده از سلولهای کبدی است. در کنار این نتایج امیدوار کننده ای با استفاده از مدل‌های حیوانی برای نشان دادن افزایش در اگزوسومزهای mRNA های مختص کبد و miRNA های غنی در کبد یافت شده است. جالبتر اینکه با وجود تشخیص افزایش سطح miR-122 و miR-155 در سرم غنی از اگزوسومز / تکه های پلاسما در موش با آسیب کبد ناشی از مصرف الکل یا لیپوپلی ساکارید، این miRNA ها در سرم / تکه های پلاسما غنی از پروتئین موش هایی با اوردز APAP با افزایش روبرو میشوند. این یافته نشان میدهد الگوی توزیع miRNA میتواند بسته به علل متفاوت باشد. تنوع در miRNA های مشتق شده از اگزوسومزها هم در شرایط کبدی مختلف گزارش شده است، از جمله هیپاتیت مزمن و رایج بی و سی و استئاتوهپاتیت غیر الکلی در مقایسه با کنترل‌های سالم. علاوه بر این الگوی رفتاری miRNA برای انعکاس مرحله تصلب بافت ها و درجه التهاب کبد در بیماران مبتلا به هیپاتیت سی مزمن مشاهده شده است.

نشانه‌های زیستی مشتق شده از «امیکز»^۸

به لطف تکنولوژی امیکز رویکرد جدیدی برای مطالعات نشانه‌های زیستی ایجاد شده است. قابلیت مشاهده تعداد بالایی از مولکول‌ها (برای مثال متابولیت‌ها، پروتئین و یا DNA) به طور همزمان تشخیص «میزان سمی بودن»^۹ را ممکن می‌سازد که به نوبه خود در ارزیابی‌های ایمنی و تشخیص بیماری کمک شایان توجهی به شمار می‌رود. متابولومیک تکنیک مناسبی به شمار می‌رود، معمولاً از طریق اسپکتومتری یا طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای. این تکنولوژی ارزیابی کلی تغییرات متابولیک را ممکن ساخته و شناسایی خصوصیات متابولیک مرتبط با آن را سهولت می‌بخشد، برای مثال بیماری‌ها یا واکنش‌های درمانی. تکنولوژی متابولومیک برای شناسایی کاندیدهای نشانه‌گر زیستی در بسیاری از بیماری‌های کبدی به کار می‌رود. از جمله این بیماری‌های رایج کبد می‌توان به کبد چرب فاقد الکل، استئاتوز، فیروز، سیروز، سرطان کبد، و کلانژیوکارسینوما اشاره کرد. علاوه بر این، یک مقایسه بین خصوصیات متابولیک پلاسما بیماران مبتلا به هپاتیت خود ایمنی، سیروز صفراوی اولیه، التهاب هپاتیت اتوایمون / سندرم سیروز صفراوی اولیه همپوشانی شده، DILI و کنترل‌های سلامتی منجر به ایجاد فنوتایپ هپاتیت خود ایمنی متابولیک با حساسیت بیش از 93٪ شده است. به همین ترتیب سرم Y-گلوتامیل به عنوان نشانه‌گر زیستی مستعد برای تفکیک گونه‌های مختلف بیماری‌های کبدی معرفی شده‌اند.

هرچند، در حوزه سمیت کبدی، مطالعات متابولومیک انجام شده تا امروز بیشتر محدود به DILI ذاتی در حیوانات یا مدل‌های مجازی^{۱۰} بوده‌اند. یک رنگ‌نگاری مایع با عملکرد بالا یا تحلیل اسپکتومتری از درمان موش با سرم گالاکتوزامین تفاوت‌هایی در برخی متابولومیک‌ها نشان داده است، از جمله آمینو اسیدها و لیپیدهای غشای سلولی در مقایسه با کنترل موش‌ها. برخی از این یافته‌ها با درجه بافت‌شناسی تعیین شده از شدت آسیب کبدی همخوانی دارند. مطالعه‌ای مشابه از نمونه دریافت شده از موش‌های تحت درمان با دارو نشان‌دهنده افزایش سطح اسید صفرا به علاوه چندین تغییر متابولیت دیگر میشود که در کنار نشانه‌های شیمیایی پزشکی سنتی میتواند دقت و قابلیت

⁸ Omics

⁹ toxicity signatures

¹⁰ in vitro

اتکای تشخیص سمیت کبدی را افزایش دهد. مطالعات اخیر بر روی حیوانات نشان دهنده برتری خصوصیات متابولیک بر متابولیت های تکی هستند که میتوانند سمیت کبدی که شامل سمیت کبدی ویژه¹¹ هم میشود را نیز پیش بینی کنند.

دسته بندی متابولیک از ادرار هم برای یافتن متابولیت های مرتبط با عارضه DILI صورت گرفته است. داوطلبان سالم سطوح غیر سمی از APAP داخل ادرار و ترکیبات متابولیک پلاسما ارائه کردند، هم پس از مقایسه قبل و هم بعد از نمونه گیری دز. در طول کل بررسی ها این سطوح غیر سمی بیشتر به تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی داخل سرم حساسیت نشان میدادند. لازم به ذکر است با اینکه بسیاری از مطالعات متابولیک انجام شده تا این تاریخ به دنبال یافتن انواع متابولیت های درون زاد بوده اند، اما متابولیت های شناسایی شده معمولا بین آثار تحقیقاتی متفاوت هستند. تفاوت در طراحی مطالعه در کنار درمان های مختلف میتواند به چنین تفاوت هایی منتهی شود. حتی باید در ذهن داشت که تفاوت های بینافردی بین متابولومیک ها رایج بوده و میتوانند نشان دهنده تنوع در شرایط محیطی و شرایط پذیرنده بین موضوعات مختلف باشند. با همه اینها، متابولومیک ها میتوانند یک روش عملی برای شناسایی بیماران DILI باشند، حتی در مدت کوتاهی از شروع درمان با یک داروی خاص و در نتیجه همه اینها خطر آسیب جدی به کبد را به خاطر قطع درمان با مشاهده تغییرات متابولیک بخصوص کاهش دهند. در کنار متابولومیک ها، پروتئومیکس هم در جستجوی نشانگرهای زیستی DILI میتواند مسمر ثمر باشد. یک مقایسه کاوشگرانه در سرم کلی پروتئومیکس DILI نتایج قابل توجهی با آپولیپوپروتئین E نشان داده است که نشان میدهد قدرت زیادی در ایجاد تمایز بین کنترل های DILI دارد. در حالی که کدهرین¹² 5 و اسید چرب متصل کننده پروتئین 1 مرتبط با DILI با استفاده از رویکرد چینش تسبیحی یک آنتی بادی موفق به حصول این نتیجه شده اند. به همین ترتیب مطالعات مرتبط با طیف ژنوم در گروه مطالعاتی DILI منجر بوجود آمدن تعدادی آلل های HLA شده اند که به نظر مرتبط با فرم های مشخصی از عارضه DILI میشود. این آلل ها که ارزش های پیش بینی کننده منفی بالایی دارند میتوانند به عنوان نشانگرهای زیستی جهت شناسایی DILI و یا تشخیص عامل مسبب در بیماران شوند که بیش از یک عامل

¹¹ idiosyncratic hepatotoxicity

¹² cadherin

سمیت کبدی دریافت میکنند، و در نتیجه اینها روند تشخیص DILI را سرعت بخشند. هر چند، شکل های DILI مرتبط با HLA بیشتر محدود به عامل های مسبب متداول میشوند و بسیاری از انواع DILI ارتباط مستحکم کمی با HLA پیدا میکنند.

چشم اندازهای آینده

آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلکالن فسفاتاز و بیلی روبین توتال تا امروز تنها نشانگرهای زیستی شناخته شده برای عارضه DILI در درمان های پزشکی هستند. با اینکه این نشانگرها نقش پر رنگی در تشخیص بیماری ها دارند، اما صرفا برای سمیت کبدی تعبیه نشده اند، افزایش این مقادیر بیوشیمیایی در تمامی شرایط کبدی به چشم میخورد. علاوه بر این این نشانگرهای زیستی فاقد حساسیت کمی در قبال ایجاد آسیب کبدی دارند پس برای تشخیص زود هنگام و پیش بینی این قبیل آسیب ها چندان کاربرد ندارند. این نکته اهمیت بالایی در آزمایشات پزشکی دارد. حضور نشانگرهای زیستی DILI با تخصص ارتقا یافته و حساسیت بیشتر میتواند داروهای مستعد ایجاد سمیت کبدی را در مراحل اولیه شناسایی کند. همین مساله میتواند باعث کاهش تاثیرات سو دارو در مراحل پایانی درمان شده و از جمع آوری دارو از بازار جلوگیری کند. علاوه بر این چنین نشانگرهای زیستی میتواند ایمنی بیمار را بالا ببرد، به خاطر نظارت ارتقا یافته در حین شروع درمان و همچنین تشخیص سریع و دقیق DILI.

نبود نشانگرهای زیستی مختص به عارضه DILI تا حدود زیادی در نتیجه درک مکانیستیک محدود از این شرایط است. ورود به «عصر امیکز» امید بیشتری برای پیشرفت های علمی در زمینه جنبه مکانیستیک عارضه DILI ایجاد کرده است. در همین مدت کوتاه هم پیشرفت های خوبی حاصل شده و کاندیدهایی برای نشانگرهای زیستی مبتنی بر مکانیستیک معرفی شده اند. از جمله این موارد میتوان به HMGB1، K18 و miR-122 اشاره کرد. هر چند، تلاش بیشتر در پیش یافتن طیف بهتری از نشانگرهای زیستی مختص عارضه DILI مورد نیاز است. علاوه بر اعتبار در درمان های پزشکی، چنین نشانگرهای زیستی باید اختصاصی بودن و حساسیت بیشتر از خود نشان دهند، در کنار این موضوع باید در مایعات بدن شرایط منطقی و با ثباتی از خود نشان دهند تا یافته هایی با قابلیت اتکای بالا ارائه

دهند و ارزیابی را ساده تر کنند. قابلیت ارزیابی و اعتبار سنجی نشانگرهای زیستی فوق الذکر به خاطر نبود مدل های حیوانی عملی برای DILI ویژه بسیار محدود است. با وجود اینکه سیستم کشت سلولی ارتقا یافته از قبیل کشت بنیادی پرتوان القایی مشتق شده از سلولهای کبدی در حال ظهور هستند، گروه بزرگی از بیماران DILI بهترین رویکرد برای اعتبار سنجی نشانگرهای زیستی هستند. این مساله نشانگر اهمیت تلاش جمعی برای ایجاد یک پایگاه اطلاعاتی برای عارضه DILI است. پایگاهی که بتواند یافته های کوچک در واحد های بیمارستانی گسترده را یکجا جمع کند. چنین پایگاه ثبت اطلاعاتی با نام «The Pro-Euro-DILI Registry» اخیرا به صورت بین المللی تشکیل یافته است و یافته ها و اطلاعات کسب شده از بیماران برای مطالعات آتی در رابطه با انتخاب و اعتبار سنجی نشانگرهای زیستی مختص عارضه DILI به کار خواهند رفت.

REFERENCES

- Aithal, G. P. (2015). Pharmacogenetic testing in idiosyncratic drug-induced liver injury: current role in clinical practice. *Liver Int.* 35, 1801–1808. doi: 10.1111/liv.12836
- Aithal, G. P., Walkins, P. B., Andrade, R. J., Larrey, D., Mookhia, M., Takikawa, H., et al. (2011). Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89, 806–815. doi: 10.1038/clpt.2011.58
- Andrade, R. J., Lucena, M. I., Fernández, M. C., Pelaez, G., Pachkoria, K., GarcíaRuiz, E., et al. (2005). Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* 129, 512–521. doi: 10.1053/j.gastro.2005.05.006
- Antoine, D. J., Dear, J. W., Lewis, P. S., Platt, V., Coyle, J., Masson, M., et al. (2013). Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology* 58, 777–787. doi: 10.1002/hep.26294
- Antoine, D. J., Jenkins, R. E., Dear, J. W., Williams, D. P., McGill, M. R., Sharpe, M. R., et al. (2012). Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *J. Hepatol.* 56, 1070–1079. doi: 10.1016/j.jhep.2011.12.019
- Antoine, D. J., Williams, D. P., Kipar, A., Jenkins, R. E., Regan, S. L., Sathish, J. G., et al. (2009). High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis in vivo. *Toxicol. Sci.* 112, 521–531. doi: 10.1093/toxsci/kfp235
- Bala, S., Petrasek, J., Mundkur, S., Catalano, D., Levin, I., Ward, J., et al. (2012). Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced and inflammatory liver disease. *Hepatology* 56, 1946–1957. doi: 10.1002/hep.25873
- Bell, L. N., Vuppalanchi, R., Watkins, P. B., Bonkovsky, H. L., Serrano, J., Fontana, R. J., et al. (2012). Serum proteomic profiling in patients with drug-induced liver injury. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35, 600–612. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04982.x
- Benichou, C. (1990). Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J. Hepatol.* 11, 272–276.
- Beyoglu, D., and Idle, J. R. (2013). The metabolomic window into hepatobiliary disease. *J. Hepatol.* 59, 842–858. doi: 10.1016/j.jhep.2013.05.030
- Biomarkers Definitions Working Group (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89–95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989

Björnsson, E., and Olsson, R. (2005). Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology* 42, 481–489. doi: 10.1002/hep. 20800

Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., et al. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 22, 5551–5560. doi: 10.1093/emboj/cdg516

Buness, A., Roth, A., Herrmann, A., Schmitz, O., Kamp, H., Busch, K., et al. (2014). Identification of metabolites, clinical chemistry markers and transcripts associated with hepatotoxicity. *PLoS ONE* 9:e97249. doi: 10.1371/journal.pone.0097249

Chalasan, N., Bonkovsky, H. L., Fontana, R., Lee, W., Stolz, A., Talwalkar, J., et al. (2015). Features and outcomes of 899 patients with drug-induced liver injury: the DILIN prospective study. *Gastroenterology* 148, 1340–1352. doi: 10.1053/j.gastro.2015.03.006

de Jong, O. G., Verhaar, M. C., Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., et al. (2012). Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J. Extracell. Vesicles* 1, 18396. doi: 10.3402/jev.v1i0.18396

Giboney, P. T. (2005). Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *Am. Fam. Physician* 71, 1105–1110.

Glinghammar, B., Rafter, I., Linström, A., Hedberg, J., Andersson, H., Lindblom, P., et al. (2009). Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int. J. Mol. Med.* 23, 621–631. doi: 10.3892/ijmm_00000173

Gonzalez, E., van Liempd, S., Conde-Vancells, J., Gutierrez-de Juan, V., PerezCormenzana, M., Mayo, R., et al. (2012). Serum UPLC-MS/MS metabolic profiling in an experimental model for acute-liver injury reveals potential biomarkers for hepatotoxicity. *Metabolomics* 8, 997–1011. doi: 10.1007/s11306-011-0329-9

Harrill, A. H., Roach, J., Fier, I., Eaddy, J. S., Krutz, C. L., Antoine, D. J., et al. (2012). The effects of heparins on the liver: application of mechanistic serum biomarkers in a randomized study in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 214–220. doi: 10.1038/clpt.2012.40

Kim, J. W., Ryu, S. H., Kim, S., Lee, H. W., Lim, M. S., Seong, S. J., et al. (2013). Pattern recognition analysis for hepatotoxicity induced by acetaminophen using plasma and urinary ¹H NMR-based metabolomics in humans. *Anal. Chem.* 85, 11326–11334. doi: 10.1021/ac402390q

Ku, N., Strnad, P., Zhong, B., Tao, G., and Omary, M. B. (2007). Keratins let liver live: mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology* 46, 1639–1649. doi: 10.1002/hep.21976

Kubes, P., and Mehal, W. Z. (2012). Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology* 143, 1158–1172. doi: 10.1053/j.gastro.2012.09.008

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735–739. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00809-6

Li, Y., Wang, L., Ju, L., Deng, H., Zhang, Z., Hou, Z., et al. (2016). A systemic strategy for screening and application of specific biomarkers in hepatotoxicity using metabolomics combined with ROC curves and SVMs. *Toxicol. Sci.* 150, 390–399. doi: 10.1093/toxsci/kfw001

Mikus, M., Drobin, K., Gry, M., Bachmann, J., Lindberg, J., Yimer, G., et al. (2016). Elevated levels of circulating CDH5 and FABP1 in association with human drug-induced liver injury. *Liver Int.* doi: 10.1111/liv.13174 [Epub ahead of print].

Murakami, Y., Toyoda, H., Tanahashi, T., Tanaka, J., Kumada, T., Yoshioka, Y., et al. (2012). Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. *PLoS ONE* 7:e48366. doi: 10.1371/journal.pone.0048366

Rafter, I., Gråberg, T., Kotronen, A., Strömmer, L., Mattson, C. M., Kim, R. W., et al. (2012). Isoform-specific alanine aminotransferase measurement can distinguish hepatic from extrahepatic injury in humans. *Int. J. Mol. Med.* 30, 1241–1249. doi: 10.3892/ijmm.2012.1106

Robles-Diaz, M., García-Cortes, M., Medina-Caliz, I., Gonzalez-Jimenez, A., Gonzalez-Grande, R., Navarro, J. M., et al. (2015). The value of serum aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transpeptidase as biomarkers in hepatotoxicity. *Liver Int.* 35, 2474-2482. doi: 10.1111/liv.12834

Robles-Diaz, M., Lucena, M. I., Kaplowitz, N., Stephens, C., Medina-Caliz, I., González-Jimenez, A., et al. (2014). Use of Hy's law and a new composite algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury. *Gastroenterology* 147, 109–118. doi: 10.1053/j.gastro.2014.03.050

Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191–195. doi: 10.1038/nature00858

Schomaker, S., Warner, R., Bock, J., Johnson, K., Potter, D., Van Winkle, J., et al. (2013). Assessment of emerging biomarkers of liver injury in human subjects. *Toxicol. Sci.* 132, 276–283. doi: 10.1093/toxsci/kft009

Slim, M., Stephens, C., Robles-Díaz, M., MedinaCaliz, I., Grove, J. I., OrtegaAlonso, A., et al. (2016). Pro-Euro-DILI registry: a collaborative effort to enhance the understanding of DILI. *J. Hepatol.* 64(Suppl. 2), S293.

Soga, T., Sugimoto, M., Honma, M., Mori, M., Igarashi, K., Kashikura, K., et al. (2011). Serum metabolomics reveals γ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J. Hepatol.* 55, 896–905. doi: 10.1016/j.jhep.2011.01.031

Starkey Lewis, P. J., Dear, J., Platt, V., Simpson, K. J., Craig, D. G., Antoine, D. J., et al. (2011). Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology* 54, 1767–1776. doi: 10.1002/hep.24538

Sun, J., Slavov, S., Schnackenberg, L. K., Ando, Y., Greenhaw, J., Yang, X., et al. (2014). Identification of a metabolic biomarker panel in rats for prediction of acute and idiosyncratic hepatotoxicity. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 10, 78–89. doi: 10.1016/j.csbj.2014.08.001

Thulin, P., Nordahl, G., Gry, M., Yimer, G., Aklillu, E., Makonnen, E., et al. (2014). Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver Int.* 34, 367–378. doi: 10.1111/liv.12322

Wang, J. B., Pu, S. B., Sun, Y., Li, Z. F., Niu, M., Yan, X. Z., et al. (2014). Metabolomic profiling of autoimmune hepatitis: the diagnostic utility of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Proteome Res.* 13, 3792–3801. doi: 10.1021/pr500462f

Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B., Troisch, P., Brightman, A., Hu, Z., et al. (2009). Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 106, 4402–4407. doi: 10.1073/pnas.0813371106

Ward, J., Kanchagar, C., Veksler-Lublinsky, I., Lee, R. C., McGill, M. R., Jaeschke, H., et al. (2014). Circulating microRNA profiles in human patients with acetaminophen hepatotoxicity or ischemic hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 12169–12174. doi: 10.1073/pnas.1412608111

Wetmore, B. A., Brees, D. J., Singh, R., Watkins, P. B., Andersen, M. E., Loy, J., et al. (2010). Quantitative analyses and transcriptomic profiling of circulating messenger RNAs as biomarkers of rat liver injury. *Hepatology* 51, 2127–2139. doi: 10.1002/hep.23574

Yang, X., Greenhaw, J., Shi, Q., Su, Z., Qian, F., Davis, K., et al. (2012). Identification of urinary microRNA profiles in rats that may diagnose hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 125, 335–344. doi: 10.1093/toxsci/kfr321

Yang, X., Salminen, W. F., Shi, Q., Greenhaw, J., Gill, P. S., Bhattacharyya, S., et al. (2015). Potential of extracellular microRNAs as biomarkers of acetaminophen toxicity in children. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284, 180–187. doi: 10.1016/j.taap.2015.02.013

Yang, X., Weng, Z., Mendrick, D. L., and Shi, Q. (2014). Circulating extracellular vesicles as a potential source of new biomarkers of drug-induced liver injury. *Toxicol. Lett.* 225, 401–406. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.01.013

Yuan, X., Waterworth, D., Perry, J. R., Lim, N., Song, K., Chambers, J. C., et al. (2008). Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 520–528. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.09.012

Zhang, Y., Jia, Y., Zheng, R., Guo, Y., Wang, Y., Guo, H., et al. (2010). Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin. Chem.* 56, 1830–1838. doi: 10.1373/clinchem.2010.147850