

## بررسی اثر پی پرین بر غلظت بزاقی کافئین در داوطلبین سالم

عارفه غلامپور<sup>۱</sup>(MD)، ماریا هاشمی<sup>۱</sup>(BSc)، محمدمهدی رضایی<sup>۱</sup>(MD)، محمدرضا شیران<sup>۲</sup>(PharmD, PhD)،  
علی اکبر مقدم نیا<sup>۱</sup>(PharmD, PhD)\*

۱- گروه فارماکولوژی و فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل  
۲- گروه فارماکولوژی و فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

دریافت: ۹۱/۶/۲۵، اصلاح: ۹۱/۸/۱۷، پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۷

### خلاصه

**سابقه و هدف:** پی پرین آلکالوئید اصلی *piper nigrum* (لفل سیاه) فعالیت آنزیم های میکروزومال کبدی را تغییر می دهد. پروب کافئین برای تعیین فعالیت آنزیم CYP1A2 استفاده می شود. آنزیم CYP1A2 از آنزیم های مهم در متابولیسم داروها می باشد که بیش از ۱۳ درصد سیتوکروم های کبدی را تشکیل می دهد. این مطالعه به نقش احتمالی پیش مداوای پی پرین در غلظت کافئین می پردازد.

**مواد و روشها:** این مطالعه به صورت Cross over در ۲۰ داوطلب سالم (۱۰ زن و ۱۰ مرد) و در قالب دو گروه پلاسبو و پی پرین قبل از کافئین انجام شد. پس از ثبت اطلاعات فردی (شامل سن، جنس، قد، وزن)، پی پرین به صورت خوراکی با دوز ۱۵mg طی سه روز متوالی تجویز شد و در روز چهارم پس از گرفتن نمونه بزاق اولیه، ۵۰mg کافئین در یک نوشیدنی به افراد داده شد و در زمان های ۰/۵، ۲/۵ و ۵ ساعت پس از مصرف کافئین، نمونه های بزاق تهیه شد و غلظت کافئین موجود در آن با استفاده از دستگاه HPLC (ستون C8، فاز متحرک متانول (۴۰٪)، آب (۶۰٪)، دکتور UV با طول موج حداکثر ۲۱۰ نانومتر و سرعت جریان مایع ۰/۸ml/min) اندازه گیری شد. داده های مربوط به غلظت در افراد شرکت کننده در مطالعه با استفاده از نرم افزار P-Pharm تحلیل شدند. پارامترهای کینتیکی شامل کلیرانس، حجم انتشار، نیمه عمر در دو گروه مقایسه شدند. (IRCT: ۲۰۱۲۰۹۲۳۹۲۷۱N۳).

**یافته ها:** محدوده سنی شرکت کنندگان بین ۱۹ تا ۲۳ سال و محدوده وزن بدن بین ۴۵ تا ۱۲۰ کیلوگرم و میانگین و انحراف معیار BMI، ۲۴/۷۱±۴/۶۹ بود. نیمه عمر کافئین در گروه پی پرین ۳/۵۹±۱/۴۲ و در گروه پلاسبو ۴/۳۹±۰/۷۴ و کلیرانس در گروه پی پرین ۲۰/۱۷±۸/۷۶ و در گروه پلاسبو ۱۴/۹۴±۱/۸۶ بود. همچنین ثابت سرعت حذف در گروه پی پرین ۰/۲۲±۰/۰۹ و در گروه پلاسبو ۰/۱۶±۰/۰۳ به دست آمد. اختلاف بین تمامی پارامترهای کینتیکی به جز حجم ظاهری انتشار معنی دار بوده است ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** با توجه به یافته ها، می توان گفت، که پی پرین متابولیسم کافئین را که عمدتاً به وسیله CYP1A2 انجام می شود، تشدید می کند.

**واژه های کلیدی:** پی پرین، CYP1A2، کافئین، کلیرانس کلیوی، HPLC، متابولیسم کبدی.

### مقدمه

روی آثار فارماکولوژیک پی پرین نشان داد که پی پرین دارای آثار محافظ سولوی و آنتی اکسیدان (۹ و ۱۰)، ضد تومور و تعدیل کنندگی سیستم ایمنی (۱۱)، تسهیل در یادگیری (۱۲)، آثار ضد دردی (۱۳ و ۱۴)، اثرات محافظتی در برابر آسیبهای بافتی (۱۵) و اثر مهار بر روی آنزیم های متابولیزه کننده دارو در جوندگان است (۱۶). همچنین درمان موش های آزمایشگاهی با پی پرین موجب افزایش غلظت داروهای نظیر توفیلین، ریفامپین، فنی توفین و پروپرانولول می شود (۱۷ و ۱۸). چنین اثری توسط پی پرین در افزایش غلظت توفیلین، ریفامپین، فنی توفین و پروپرانولول در انسان هم دیده شده است (۱۹). همچنین

مواد خاص موجود در بعضی از مواد غذایی می توانند روی متابولیسم داروها اثراتی اعمال کنند (۱-۳) که به وسیله مکانیسم هایی غلظت داروها را دستخوش تغییر می کنند. این تغییرات ممکن است به صورت القاء یا مهار آنزیم های متابولیزه کننده و انتقال دهنده ها اعمال شوند (۵-۱۳). فلفل سیاه به صورت گسترده ای در سراسر دنیا به عنوان چاشنی خوراکی استفاده می شود. تغذیه افراد با رژیمهای پرفلفل، ممکن است تغییراتی در متابولیسم بعضی از داروها در بدن اعمال کند (۶). پی پرین آلکالوئید خالص شده از *piper nigrum* (لفل سیاه) است (۷) که به یک خانواده شبه capsaicin تعلق دارد (۸). مطالعات اخیر

شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند تا در زمان مقتضی غلظت کافئین در آنها اندازه گیری شوند (۲۵).

**مراحل آماده‌سازی برای تزریق به دستگاه HPLC:** در روز تزریق، نمونه‌ها از فریزر خارج شده و در آزمایشگاه به حال خود رها شدند تا یخ آنها به آرامی در دمای محیط ذوب شود، سپس ۵۰۰ میکرولیتر از بزاق ذوب شده به یک لوله پلاستیکی ته مخروطی در پیچ دار منتقل شد، ۵۰۰ میکرولیتر اسید پرکلریک ۶٪ به آن اضافه گردید. این اسید به انعقاد پروتئین‌های موجود در نمونه‌ها کمک می‌کند. سپس به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد. بعد از آن، محلول حاصل را در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور  $g \times 3500$  سانتریفیوژ کرده و سپس لایه آلی (بالایی) برداشته و به یک لوله پلاستیکی تمییز منتقل گردید (۲۵).

**تزریق به دستگاه:** آنالیز نمونه‌ها توسط دستگاه HPLC (Knauer) و ستون آنالیز C8 (250 × 4.6 mm with Eurospher 100-5 precolumn) انجام شد. برای آنالیز کافئین و متابولیت‌های آن از فاز متحرک متانول (۴۰٪) و آب (۶۰٪) و سرعت جریان (flow rate) ۰/۸ ml/min و طول موج ۲۱۰ نانومتر استفاده شد. از نمونه‌های آماده شده به مقدار ۲۰ میکرولیتر (μL) به کمک سرنگ همیلتون استفاده شد. به ستون تزریق گردید. قبل از هر تزریق سرنگ همیلتون توسط متانول شستشو داده شد. از هر نمونه بزاق یک تزریق و برای هر فرد در مجموع چهار تزریق انجام شد. در صورت لزوم تزریق‌ها تکرار می‌شدند. از سطح زیر منحنی هر پیک یا Area و یا ارتفاع هر پیک یا Height آن برای اندازه‌گیری کافئین استفاده شد. نیمه عمر حذفی خوراکی کافئین در بزاق با استفاده از نرم افزار کینتیکی P-Pharm محاسبه گردید و به عنوان معیاری از فعالیت آنزیم CYP1A2 نظر گرفته شد (۲۶).

**تهیه غلظت‌های استاندارد کافئین و رسم منحنی کالیبراسیون:** از کافئین غلظت‌های ۱۱۲،۵، ۲۲۵، ۴۵۰، ۶۷۵ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی لیتر تهیه شد و به دستگاه با کیفیتی که قبلاً توضیح داده شد، تزریق گردید. محلول‌های مربوطه در فاز متحرک (متانول ۴۰٪ + آب ۶۰٪) تهیه شدند.

#### روش تجزیه و تحلیل داده‌ها (Data Processing & Staistical Analysis)

داده‌ها در دو مرحله تنظیم و تحلیل شدند: داده‌های فردی و حاصل از آنالیز نمونه‌ها ابتدا وارد نرم افزار Excel شدند. منحنی‌های کالیبراسیون بر اساس نسبت سطح زیر منحنی غلظت‌های کافئین یا نسبت طول پیک‌های کافئین به طور جداگانه رسم شدند. پارامترهای خط به دست آمده شامل معادله خط، شیب (slope)، عرض از مبدا (intercept) و ضریب  $r^2$  به وسیله Excel محاسبه و مقایسه شدند. همچنین محاسباتی که مربوط به اعتبار سنجی روش آنالیز بودند، انجام شد. این محاسبات شامل محاسبه نسبت ضریب تغییرات (CV or coefficient variation)، دقت بین روز (interday precision) و دقت میان روز (intraday precision) و درصد تکرارپذیری (percentage of reproducibility) بودند که با کمک نرم افزار Excel به دست آمدند.

برای محاسبه پارامترهای فارماکوکینتیکی، از نرم افزار P-Pharm استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها ابتدا فرض شد که کافئین در یک مدل دو بخشی کینتیکی در بدن وارد شده است و پارامترهای مربوطه شامل کلیرانس، حجم انتشار، ثابت سرعت حذف، غلظت پایه و نیمه عمر حذفی اندازه‌گیری شد. برای

دیده شده که تجویز یک گرم فلفل سیاه به صورت تک دوز، سطح زیر منحنی غلظت-زمان در پلاسما و زمان کلیرانس فنی توئین از خون را بیش از دو برابر افزایش می‌دهد (۱۸). آنزیم‌های سیتوکروم P450 گروهی از پروتئین‌های حاوی هم (heme) می‌باشند که مسئول بیوژنز استروئیدها و سایر ترکیبات حد واسط فیزیولوژی بوده و در متابولیسم اکسیداتیو بسیاری از ترکیبات درونزاد (نظیر صفرآ و اسید آراشیدونیک) و نیز اکثر زنبوبوتیک‌ها و داروها دخیل می‌باشند (۲۱ و ۲۰). گرچه آنزیم‌های سیتوکروم P450 منحصر به کبد نمی‌باشند ولی از نظر کمی، کبد مهمترین سایت اکسیداسیون داروها در انسان می‌باشد (۲۲). آنزیم CYP1A2 از آنزیم‌های مهم در متابولیسم داروها می‌باشد که حدود ۱۳٪ سیتوکروم‌های کبدی را تشکیل می‌دهد و حدود ۵٪ داروهای موجود در بازار دارویی (مثل کلوزاپین، کافئین و توفیلین) عمدتاً به وسیله CYP1A2 متابولیزه می‌گردند (۲۳). CYP1A2 در متابولیسم ۷۵٪ داروهای میتواند موثر باشد که مصرف آنها با بروز عوارض جانبی در بیماران همراه بوده است (۲۴). با توجه به نقش پی پرین در فعالیت آنزیم‌های کبدی، این تحقیق در صدد یافتن رابطه بین اثرات پیش مداوای پی پرین بر میزان غلظت کافئین به عنوان Probe شناخته شده فعالیت CYP1A2 می‌باشد.

#### مواد و روشها

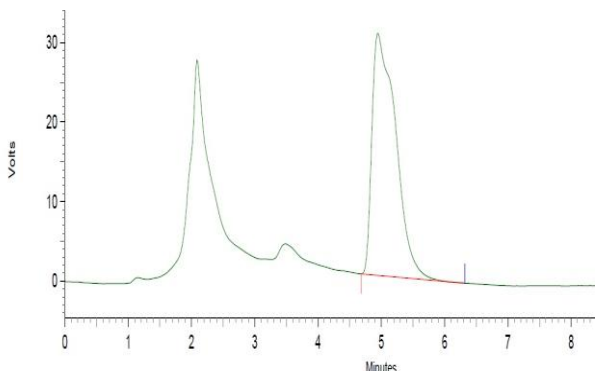
این مطالعه مداخله‌ای به صورت مقاطع یا cross-over با شماره ثبت کارآزمایی بالینی: (۲۰۱۲۰۹۳۳۹۲۷۸N۳: IRCT) روی ۲۰ داوطلب سالم و در دو مرحله انجام شد. پس از تصویب این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی بابل، تمامی داوطلبین پس از اطلاع از مطالعه و امضاء رضایتنامه آگاهانه وارد مطالعه شدند.

افراد مورد مطالعه به طور تصادفی به دو گروه ۱۰ نفری تقسیم شدند. برای گروه اول در ابتدا ۱۵ mg پی پرین روزانه به مدت سه روز و به صورت کپسول‌های خوراکی در بسته بندی کد دار تجویز شد تا مسئله blindness در هر دو گروه دارو و کنترل رعایت شده باشد. در روز چهارم ابتدا یک نمونه بزاق اولیه از افراد تهیه شد. سپس به همین گروه ۵۰mg کافئین در قالب یک نوشیدنی با گرمای ملایم و حاوی ۲۰۰ میلی گرم پودر قهوه نسکافه در ۱۰۰ میلی لیتر داده شد. در همان روز نمونه بزاق این افراد در زمان‌های ۰/۵، ۲/۵ و ۵ ساعت پس از مصرف کافئین تهیه شد. یک ماه بعد به همین گروه، طبق همان برنامه قبلی کپسول پلاسبو داده شد و سه روز بعد برای آنها ۵۰mg کافئین تجویز شد و مجدداً در همان روز نمونه بزاق این افراد در زمان‌های ۰/۵، ۲/۵ و ۵ ساعت پس از مصرف کافئین تهیه شد. برای گروه دوم در ابتدا پلاسبو و یک ماه بعد پی پرین طبق برنامه ریزی پیش گفته تجویز شد. در انتها، داده‌های متناظر (پلاسبو و داده‌های مربوط به پی پرین) جمع شده و دو سری داده در دو گروه ۲۰ نفره کنترل و دارو به دست آمد.

**جمع آوری نمونه بزاقی:** در زمان‌های ۰/۵، ۲/۵ و ۵ ساعت بعد از زمان صفر از آن‌ها نمونه بزاقی جمع آوری شد. حجم نمونه بزاق برای هر بار حداکثر ۱۰ میلی لیتر بود.

**آماده‌سازی نمونه‌های بزاقی:** لوله‌های حاوی بزاق که روی هر کدام از آنها مشخصات آن (شامل زمان نمونه‌گیری و نام افراد) نوشته شده بود، وارد یخچال

**کروماتوگرام پیک نمونه استاندارد کافئین:** پیک های مربوط به غلظت های استاندارد کافئین پس از تزریق به دستگاه HPLC به شرح ذیل می باشند. پیک دقیقه ۲ به عنوان پیک استاندارد کافئین در نظر گرفته شد (شکل ۱).



شکل ۱. کروماتوگرام محلول استاندارد ۱۱۲٫۵ ng/ml کافئین

**آنالیز داده ها با کمک P-Pharm:** چون نتیجه توزیع نشان دهنده

نرمال بودن داده هاست، تست های مربوط به توزیع نرمال در نظر گرفته و چون گروه ها paired هستند از تست paired T-Test استفاده شد.

**مقایسه پارامترهای فارماکوکینتیکس در دو گروه پلاسبو و پی پرین قبل از کافئین:** با توجه به نتایج مشخص شد که اختلاف بین تمامی پارامترهای کینتیکی دو گروه (t1/2, Cl, Kel) غیر از پارامتر حجم ظاهری انتشار (Vd) به طور قابل توجهی معنی دار است (p<۰/۰۵). نیمه عمر کافئین در گروه پی پرین کمتر از گروه پلاسبو به دست آمد. این اختلاف معنی دار است به عبارت دیگر ممکن است پی پرین متابولیسم کافئین را افزایش داده باشد (جدول ۱).

**جدول ۱. مقایسه داده های کینتیکی کافئین در گروه های دریافت**

**کننده پیشی درمان پلاسبو و پی پرین قبل از کافئین**

گروه درمانی	Cl (کلیرنس)	Vd (حجم انتشار)	Kel*	T1/2**
-------------	-------------	-----------------	------	--------

پلاسبو (n=20)

میانگین	۱۴/۹۴	۹۴/۰۳	۰/۱۶	۴/۳۹
حداقل	۱۲/۴۲	۷۰/۰۹	۰/۱۲	۳/۳۳
حداکثر	۱۹/۰۷	۱۳۸/۹۵	۰/۲۹	۵/۶۴
انحراف معیار	۱/۸۶	۱۵/۸۵	۰/۰۲	۰/۷۴
Fold	۱/۵۳	۱/۹۸	۱/۶۹	۱/۶۹
C.V.***	۱۲/۴۶	۱۶/۸۵	۱۷/۲۵	۱۶/۸۳

پی پرین (n=20)

میانگین	۲۰/۱۷	۸۹/۷۷	۰/۲۲	۳/۵۹
حداقل	۷/۴۰	۷۳/۷۴	۰/۰۹	۱/۴۱
حداکثر	۴۳/۰۰	۹۹/۶۶	۰/۴۸	۷/۳۰
انحراف معیار	۸/۷۶	۷/۶۹	۰/۰۹	۱/۴۲
Fold	۵/۸۰	۱/۳۵	۵/۱۵	۵/۱۵
C.V.***	۴۳/۴۱	۸/۵۷	۴۲/۳۷	۳۹/۶۲

\* ثابت سرعت حذف    \*\* نیمه عمر    \*\*\* ضریب تغییرات میانگین

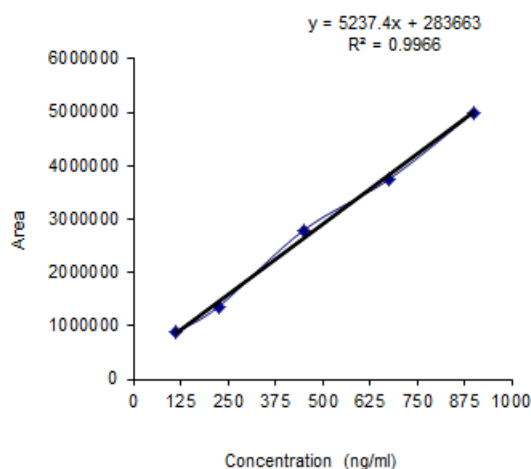
مدلینگ این پارامترها، ابتدا به عنوان ورودی داده های اولیه، کلیرانس ۲۰ میلیلیتر بر دقیقه، حجم ظاهری انتشار ۸۰ لیتر، ثابت سرعت به بخش مرکزی ۱، ثابت سرعت ورود به بخش محیطی ۱ و زمان مخفی ظهور غلظت (lag time) ۰ در نظر گرفته شد. پس از انجام مدلینگ، گزارش یافته های مدلینگ با کمترین عدد AIC (akaike information criteria) به عنوان معیار در نظر گرفته شد و پارامترهای بعدی مثل Kel و t1/2 از روی یافته های به دست آمده از مدلینگ، محاسبه گردیدند. سپس با استفاده از نمودار توزیع غلظت در مقابل زمان، منحنی هر یک از افراد داوطلب به طور جدا گانه رسم گردید. در صورت لزوم پارامترهای فارماکوکینتیکی به دست آمده در دو جنس مختلف با استفاده از T-Test تحلیل و در تمام موارد p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

**یافته ها**

**مشخصات افراد شرکت کننده:** محدوده سنی شرکت کنندگان بین

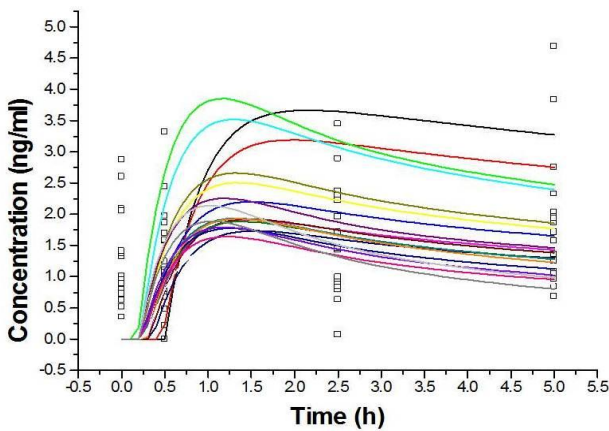
۱۹-۲۳ (۲۱/۱±۱/۳۷) سال بود. ۱۰ نفر از شرکت کنندگان خانم و ۱۰ نفر آقا بودند که میانگین و انحراف معیار سن در خانم ها و آقایان به ترتیب ۲۱/۳±۱/۵۶ و ۲۱/۹±۱/۱۹ سال بود. غالب شرکت کنندگان از استان مازندران بودند. افراد مورد مطالعه همگی داوطلبین سالم بوده و بیماری خاصی نداشتند. تمامی شرکت کنندگان در این مطالعه دانشجوی بودند. محدوده وزن بدن شرکت کنندگان بین ۴۵-۱۲۰ (۷۰/۷±۱۸/۹۸) کیلوگرم بوده و میانگین BMI (نمایه توده بدن) افراد شرکت کننده در این مطالعه ۲۴/۷۱±۴/۶۹ بود.

**منحنی استاندارد:** برای تعیین غلظت نمونه های مجهول منحنی استاندارد با حداقل ۵ غلظت از کافئین استاندارد (تهیه شده از کارخانه merck) به عنوان استاندارد رسم گردید. پیک های استاندارد کافئین در غلظت های ۱۱۲/۵، ۲۲۵، ۴۵۰، ۶۷۵ و ۹۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. نمودار به دست آمده بر حسب area یا سطح زیر منحنی پیک های به دست آمده محاسبه شد. شاخص R<sup>2</sup> (linearity) نیز در نمودار ذکر شده است (نمودار ۱). ضریب تغییرات (CV, coefficient variation) برای پیک های به دست آمده بر اساس سطح زیر منحنی معادل ۲/۲۱٪ به دست آمد که بیانگر دقت کار است.



نمودار ۱. منحنی استاندارد سطح زیر منحنی پیک ها در مقابل غلظت های مختلف کافئین

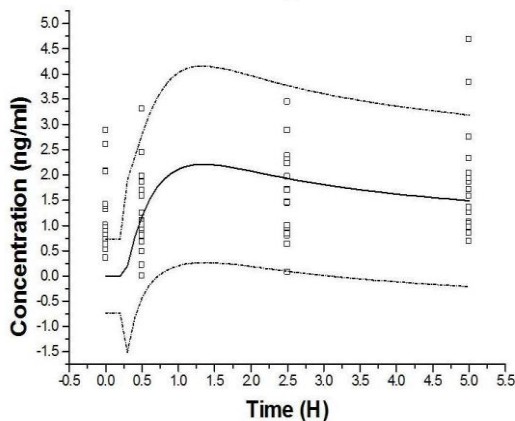
ج- نمودار غلظت در مقابل زمان در گروه پی پیرین: رابطه بین غلظت در مقابل زمان به تفکیک هر فرد در گروه پلاسبو نشان داده شد (نمودار ۴).



نمودار ۴. رابطه بین غلظت کافئین در مقابل زمان در تک تک افراد گروه پی پیرین پس از مدلینگ دو بخشی خوراکی

با توجه به گراف، در تمامی غلظت های مربوط به ساعات مختلف نمونه گیری، افرادی غلظت های پراکنده ای نشان داده اند.

د- نمودار کلی غلظت کافئین در گروه پی پیرین در مقابل زمان: نتایج نشان دهنده یک روند منطقی در تغییرات غلظت در مقابل زمان است که هر قدر زمان پیش می رود غلظت کمتر می شود. نقطه اوج غلظت ها نیز، تقریباً یک ساعت پس از مصرف اتفاق می افتد (نمودار ۵).



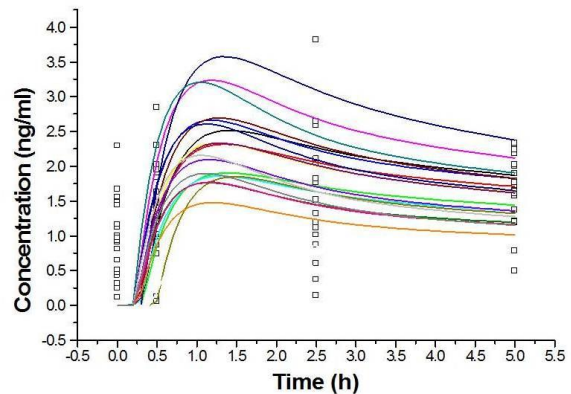
نمودار ۵. رابطه بین غلظت کافئین در مقابل زمان در گروه پی پیرین منحنی غلظت به همراه حدود اعتماد ۹۵٪ میانگین داده های غلظت کافئین در مقابل زمان

**نمودار Bayesian predictions individual pharmacokinetics**

بین داده های غلظتی مشاهده شده و قابل انتظار نیز رابطه خطی قابل قبولی وجود دارد (نمودار ۶). این نمودار میزان همبستگی توزیع داده های مشاهده شده و توزیع قابل انتظار جامعه را نشان می دهد. تعداد نسبتاً قابل توجهی از نقاط حول خط prediction توزیع شده اند که تا حدودی بیانگر همبستگی قابل قبول بین داده های محاسبه شده و فرضی قابل انتظار است.

نمودار غلظت در مقابل زمان: پس از تعیین منحنی استاندارد، غلظت کافئین در زمان های ۰، ۰/۵، ۲/۵ و ۵ ساعت از روی سطح زیر منحنی پیک های غلظت به دست آمدند. آن گاه مدلینگ پس از تعیین مدل دو بخشی خوراکی و ورود داده های اولیه شامل کلیرانس (۲۰ میلی لیتر در دقیقه)، حجم انتشار (۸۰ لیتر)، ثابت سرعت حذف (۱) و ضریب بازدهی بدنی یا  $F$  (۱) انجام شد. داده ها به صورت تقریبی و با کمک جداول کتاب های فارماکولوژی انتخاب و وارد نرم افزار شدند. یافته های به دست آمده پس از مدلینگ به صورت زیر نشان داده شده اند:

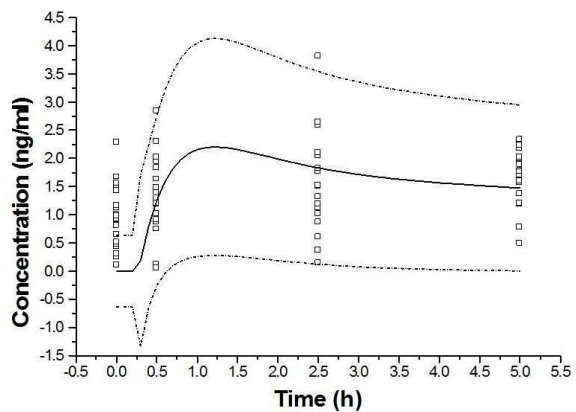
الف- نمودار غلظت در مقابل زمان در گروه پلاسبو: رابطه بین غلظت در مقابل زمان به تفکیک هر فرد در گروه پلاسبو نشان داده شده است (نمودار ۲).



نمودار ۲. رابطه بین غلظت کافئین در مقابل زمان در تک تک افراد گروه پلاسبو پس از مدلینگ دو بخشی خوراکی

با توجه به گراف، تنها در غلظت های مربوط به ساعت ۲/۵ نمونه گیری یک نفر غلظت های پراکنده ای نشان داده است.

ب- نمودار کلی غلظت کافئین در مقابل زمان: نتایج نشان دهنده یک روند منطقی در تغییرات غلظت در مقابل زمان است که هر قدر زمان پیش می رود غلظت کمتر می شود. نقطه اوج غلظت ها نیز، تقریباً یک ساعت پس از مصرف اتفاق می افتد (نمودار ۳).



نمودار ۳. رابطه غلظت کافئین در مقابل زمان داده ها در مقابل زمان منحنی غلظت به همراه حدود اعتماد ۹۵٪ میانگین داده های غلظت کافئین در مقابل زمان

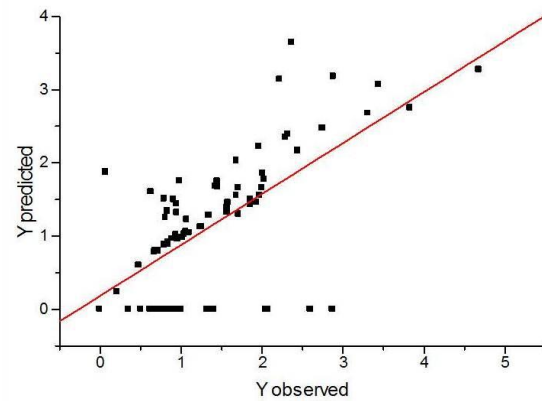
متابولیسم ۷۵٪ داروهایی دخیل است که مصرف آنها با بروز عوارض جانبی در بیماران همراه بوده است (۲۴).

در مطالعه حاضر نشان داده شد، پی پرین که یک آلکالوئید مشتق از فلفل سیاه است (۷)، می تواند به طور معنی داری سرعت دفع کافئین از بدن را نسبت به گروه پلاسبو افزایش دهد و طبیعتاً اثرات فارماکولوژیک آن نیز کمتر خواهد بود. با توجه به اینکه پی پرین در مطالعه حاضر در دوزهای کم مورد استفاده قرار گرفته است، به نظر می رسد که قادر است شاخص های مهم فارماکوکینتیکی کافئین مثل کلیرانس و نیمه عمر را از طریق تاثیر بر قدرت آنزیم های متابولیزه کننده کافئین تغییر دهد. این به این معنی است که اثر مستقیم آن در تحریک دفع دارو محتمل نمی باشد و یا تداخل همزمان آن با کافئین در این مورد مطرح نیست. اما شاید چنین تغییری در پارامترهای کینتیکی کافئین ناشی از دخالت های آنزیمی در حضور پی پرین باشد که به احتمال زیاد، پی پرین سبب تحریک آنزیمی شده است. از طرفی ممکن است این مسئله در افرادی که رژیم های غذایی پر فلفل مصرف می کنند، در مقایسه با سایرین، سطح بزاقی پایین تری از داروهای مصرفی از جمله کافئین ایجاد کند که به تبع آن در معرض کاهش و یا عدم دریافت اثرات درمانی ناشی از آن داروها قرار گیرند. در نتیجه نیاز به دوزهای بالاتری از دارو جهت دریافت اثر درمانی مشابه باشد. کماینکه در این مطالعه، سطح بزاقی کافئین در گروه پی پرین نسبت به گروه پلاسبو کمتر بود. داروهای بسیاری شناخته شده اند که CYP1A2 در متابولیسم آنها موثر است که در بعضی از آنها نقش عمده و در بعضی نقش کمتری دارد (۲۵). این آنزیم در متابولیسم مواد آندوزن (۵۰) و حذف توکسین های محیطی نیز نقش مهمی دارد و می تواند باعث فعال شدن بسیاری از کارسینوژن های محیطی از جمله آمین های هتروسیکلیک غذایی، مایکوتوکسین های خاص، نیتروزآمین های مخصوص تنباکو و آریل آمین ها شود (۵۱).

فعالیت سیتوکروم ها (CYPs) به طور قابل ملاحظه ای به فعالیت بخش فوقانی آنزیم و میزان القا آنزیم توسط مواد خارجی بستگی دارد. فاکتورهای تاثیرگذار در فعالیت آنزیم، می توانند سبب افزایش غلظت پلاسمایی داروها تا حد مسمومیت یا کاهش آن تا حدی که هیچ تاثیر درمانی نداشته باشند، شوند (۵۲). البته برای تفکیک اثرات روده ای یا کبدی پی پرین، خصوصاً در توجیه مکانیسم آن در این مطالعه، نیاز به بررسی ها و تحقیقات بیشتری است.

در مطالعات قبلی اثر تحریکی پی پرین بر روی CYP1A2 نشان داده شده است. در بررسی Kang و همکاران (۵۳) میزان سیتوکروم P450 میکروزومال کبد در گروه تحت درمان با پی پرین در مقایسه با گروه کنترل حدوداً دو برابر می شود. در مطالعه ای دیگر نشان داده شده است که پی پرین موجب افزایش سطح CYP1A2 می شود و به همین دلیل پی پرین سمیت کبدی تراکلریدکربن را نیز در rat مهار می کند (۵۴). همچنین توفیلین که ساختاری شبیه کافئین دارد، یکی از داروهایی است که قسمت عمده متابولیسم آن توسط CYP1A2 انجام می شود. در یک مطالعه کاهش قابل توجهی در سطح پلاسمایی توفیلین در حضور پی پرین مشاهده شده (۵۵).

با توجه به نتایج مطالعه ما، به نظر می رسد که پی پرین توانسته است فعالیت آنزیم CYP1A2 را به نحوی افزایش دهد و به همین دلیل است که نیمه عمر کافئین در گروه پی پرین کمتر است ولی مطالعات دیگری هم در دست است که نشان می دهند پی پرین سبب کاهش فعالیت آنزیم CYP1A2



نمودار ۶. نمودار Bayesian غلظت های پیش بینی شده تک تک افراد جامعه مورد پژوهش در مقابل غلظت های مشاهده شده کافئین بر اساس best-fit line. مربع های سیاه نشاندهنده وضعیت هماهنگی بین داده ها است.

همچنین در تست Friedman مشخص شده که تفاوت داخل گروهی در گروه پلاسبو و گروه پی پرین در میزان کلیرانس به ترتیب  $p=0/003$  و  $p=0/004$  معنی دار است. پارامترهای مختلف بین دو گروه نیز با هم مقایسه شدند. مقایسه بین Clearance اختلاف معنی داری را نشان داد ( $p<0/01$ )، همچنین مقایسه Kel با  $p=0/008$  و  $t/2$  با  $p<0/01$  معنی دار بودند. فقط تفاوت در پارامتر کینتیکی حجم ظاهری انتشار یا  $Vd$  معنی دار نیست. در این مطالعه اختلاف معنی داری بین دو جنس مشاهده نشد.

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه نشان داده شد که پی پرین سبب افزایش کلیرانس کافئین و کاهش قابل توجه نیمه عمر آن شده است. کافئین اولین سوبسترای انتخابی جهت بررسی فنوتیپ CYP1A2 است (۲۷ و ۲۸). در مطالعاتی که میکروزوم های کبدی و مهارکننده ها و یا آنتی بادی های مخصوص CYP1A2 را مورد آزمایش قرار دادند، ثابت شد که CYP1A2 انسانی نقش محوری در متابولیسم کافئین و به ویژه در کاتالیز واکنش های N-دمتیلاسیون دارد (۳۲-۳۹). بنابراین ممکن است تداخل فارماکوکینتیکی بین کافئین و داروهای موثر بر فعالیت CYP1A2 اتفاق بیفتد. برای مثال فلووکسامین یک سوبسترا و مهارکننده قدرتمند CYP1A2 است (۳۳-۳۶) و فعالیت CYP1A2 را کاهش می دهد، در نتیجه می تواند منجر به مسمومیت زایی کافئین شود (۳۵). فعالیت آنزیم های CYP1A2 تحت تاثیر عوامل مختلفی همچون عوامل محیطی، ژنتیکی، هورمونی، تغذیه ای و بیماری ها می باشد (۳۷-۴۷). مشاهده چنین تنوعی در فعالیت CYP1A2 سبب مشکلاتی در تعیین دوزها داروهای می شود که به وسیله این آنزیم ها متابولیزه می گردند (۴۸). این آنزیم اهمیت بسیار بالایی در متابولیسم داروها و نیز تبعات ناشی از آن مثل تداخلات دارویی مربوطه دارد (۴۹). آنزیم CYP1A2 از آنزیم های مهم در متابولیسم داروها می باشد که بیش از ۱۳٪ سیتوکروم های کبدی را تشکیل می دهد (۲۳) و در

می توان گفت، این مطالعه نشان داده است که پی پرین متابولیسم کافئین را که عمدتاً به وسیله CYP1A2 انجام می شود تشدید می کند.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل به دلیل حمایت از این تحقیق و از آقای دکتر امین رستمی، استاد فارماکوکینتیکس دانشگاه منچستر بدلیل در اختیار گذاشتن نرم افزار P-Pharm و از کلیه داوطلبین شرکت کننده در این پژوهش که همکاری صمیمانه داشتند تشکر میگردد.

می شود (۵۶و۵۷)، بنابراین با یافته های مطالعه ما همخوانی ندارند. در این میان شاید لازم باشد که مطالعات دیگری بر روی نمونه های بزاقی صورت گیرد تا تغییرات موجود بهتر ارزیابی شوند. البته علت وجود چنین تفاوت هایی شاید مربوط به نحوه طراحی مطالعه آنان و بررسی نمونه های پلاسمایی از حیث وجود کافئین باشد. چنانچه طراحی به سمت بررسی نمونه های بزاقی باشد، شاید اختلافات واقعی بهتر پیدا شوند.

با توجه به نتیجه آنالیز داده ها، مشخص می شود که پی پرین می تواند به طور معنی داری سبب افزایش کلیرانس کافئین نسبت به پلاسبو شود. از طرفی سبب کاهش معنی داری در نیمه عمر کافئین هم می شود. با توجه به این مسئله

Archive of SID

## Effect of Piperine on Caffeine Salivary Concentration in Healthy Volunteers

A. Gholampour (MD)<sup>1</sup>, M. Hashemi (BSc)<sup>1</sup>, M.M. Rezaee (MD)<sup>1</sup>, M.R. Shiran (Pharm D, PhD)<sup>2</sup>,  
A.A. Moghadamnia (Pharm D, PhD)<sup>1\*</sup>

1. Department of Pharmacology & Physiology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

2. Department of Pharmacology & Physiology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

J Babol Univ Med Sci; 15(4); Jul 2013; pp: 12-21

Received: Sep 15<sup>th</sup> 2012, Revised: Nov 7<sup>th</sup> 2012, Accepted: Jan 6<sup>th</sup> 2013.

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Piperine (the alkaloid of piper nigrum) can change the activities of microsomal enzymes. Caffeine probe were applied to determination of CYP1A2 enzyme activity. CYP1A2 enzyme is important enzymes in drugs metabolism that induces over 13% of liver cytochromes. This study was done to determine of piperine pretreatment role on caffeine concentration.

**METHODS:** This cross over study was performed on 20 healthy volunteers (10 men and 10 women) in two groups of placebo and piperine before using caffeine. After recording personal data including age, gender, height and weight; piperine (15mg) was orally administered during consecutive 3 days and at the 4<sup>th</sup> day after taking saliva sample, 50mg caffeine given to individuals and saliva samples were taken at 0.5, 2.5 and 5h after using caffeine. The caffeine saliva levels were assayed using HPLC method (C8 analytical column, 40: 60 methanol: water as mobile phase, UV detector at 210nm wave length and 0.8ml/min rate of fluid flow). Data were fitted in a "double-compartment PK model" using P-Pharm 1.5 software and analyzed under statistical tests. Pharmacokinetics parameters including clearance, volume of distribution and half-life were compared in two groups.

**FINDINGS:** The mean  $\pm$  SD of the age and body mass index were 21.1 $\pm$ 1.37 years (range: 19-23 years) and 24.71 $\pm$ 4.69, respectively and the body weight range was 45-120 kg. The half-life and clearance of caffeine were respectively lower and higher than in piperine pretreatment group compared to the placebo, (3.59 $\pm$ 1.42 vs 4.39 $\pm$ 0.74h, p=0.01 and 20.17 $\pm$ 8.76 vs 14.94 $\pm$ 1.86ml/min, p<0.01) respectively. The elimination ratio constants in piperine group was greater than placebo (0.22 $\pm$ 0.09 vs 0.16 $\pm$ 0.02, p=0.008). The difference between all PK parameters except volume of distribution was significant.

**CONCLUSION:** According to the results, it is suggested that piperine may induce CYP1A2 enzyme activity in hepatic microsomal system.

**KEY WORDS:** Piperine, CYP1A2, Caffeine, Clearance, HPLC, Hepatic metabolism.

\*Corresponding Author;

Address: Department of Pharmacology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Tel: +98 111 2199591-3

E-mail: moghadamnia@yahoo.com

## References

1. Evans AM. Influence of dietary components on the gastrointestinal metabolism and transport of drugs. *Ther Drug Monit* 2000;22(1):131-6.
2. Wilkinson GR. The effects of diet, aging and disease-states on presystemic elimination and oral drug bioavailability in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;27(2-3):129-59.
3. Walter-Sack I, Klotz U. Influence of diet and nutritional status on drug metabolism. *Clin Pharmacokinet* 1996;31(1):47-64.
4. Ayrton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 2001;31(8-9):469-97.
5. Wilkinson GR. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996;24(5):475-90.
6. Lauterburg BH, Velez ME. Glutathione deficiency in alcoholics: risk factor for paracetamol hepatotoxicity. *Gut* 1988;29(9):1153-7.
7. Durgaprasad S, Pai CG, Vasanthkumar, Alvres JF, Namitha S. A pilot study of the antioxidant effect of curcumin in tropical pancreatitis. *Indian J Med Res* 2005;122(4):315-8.
8. Kapelyukh Y, Paine MJ, Marechal JD, Sutcliffe MJ, Wolf CR, Roberts GC. Multiple substrate binding by cytochrome P450 3A4: estimation of the number of bound substrate molecules. *Drug Metab Dispos* 2008;36(10): 2136-44.
9. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2000;14(6):329-34.
10. Selvendiran K, Singh JP, Krishnan KB, Sakthisekaran D. Cytoprotective effect of piperine against benzo[a]pyrene induced lung cancer with reference to lipid peroxidation and antioxidant system in Swiss albino mice. *Fitoterapia* 2003;74(1-2):109-15.
11. Sunila ES, Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. *J Ethnopharmacol* 2004;90(2-3):339-46.
12. Moghadamnia AA, Zangoori V, Zargarnajaj SS, Tayyebi P, Moghadamnia Y, Jorsaraee SA. Effect of breastfeeding piperine on the learning of offspring mice: interaction with caffeine and diazepam. *J Exp Pharmacol* 2010;2:112-20.
13. Moghadamnia AA, Hosseini-Motlagh L, Jandaghi-Jafarei M. Analgesia effect of piperine, a comparative study using formalin test vs. hot-plate. *J Golestan Univ Med Sci* 2004;6(1-2):8-16. [in Persian]
14. Moghadamnia AA, Afraz E. The effects of piperine on the jumping induced by naloxone in morphine dependent mice. *DARU J Pharm Sci* 2001;4(1-2):41-3.
15. Kazemi MT, PourNasrollah M, Rezaei MM, et al. Effect of piperine pretreatment on biochemical profiles of acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *J Babol Univ Med Sci* 2012;14(4):7-14. [in Persian]
16. Bhardwaj RK, Glaeser H, Becquemont L, Klotz U, Gupta SK, Fromm MF. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302(2):645-50.
17. Atal CK, Zutshi U, Rao PG. Scientific evidence on the role of Ayurvedic herbals on bioavailability of drugs. *J Ethnopharmacol* 1981;4(2):229-32.
18. Velpandian T, Jasuja R, Bhardwaj RK, Jaiswal J, Gupta SK. Piperine in food: interference in the pharmacokinetics of phenytoin. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2001;26(4):241-7.
19. Zutshi RK, Singh R, Zutshi U, Johri RK, Atal CK. Influence of piperine on rifampicin blood levels in patients of pulmonary tuberculosis. *J Assoc Physicians India* 1985;33(3):223-4.
20. Shiran MR, GharooeeAhangar S, Rostamkolae S, et al. Phenotyping of CYP3A by oral midazolam in healthy Mazandarani volunteer (Iran). *J Babol Univ Med Sci* 2011;13(4):19-25. [in Persian]



21. Meyer UA. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996;24(5):449-59.
22. Black AE, Hayes RN, Roth BD, Woo P, Woolf TF. Metabolism and excretion of atorvastatin in rats and dogs. *Drug Metab Dispos* 1999;27(8):916-23.
23. Daly AK, Cholerton S, Gregory W, Idle JR. Metabolic polymorphisms. *Pharmacol Ther* 1993;57(2-3):129-60.
24. Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA* 2001;286(18):2270-9.
25. Rostamkolae S, Gharooee Ahangar S, Kazemi MT, Shiran MR, Moghadamnia AA. Determination of CYP1A2 phenotype after oral administration of caffeine in a sample of healthy volunteer from Mazandaran province. *J Babol Univ Med Sci* 2012;14(6):25-32. [in Persian]
26. Mortimer O, Lindstrom B, Laurell H, Bergman U, Rane A. Dextromethorphan: polymorphic serum pattern of the O-demethylated and didemethylated metabolites in man. *Br J Clin Pharmacol* 1989;27(2):223-7.
27. Daniel WA. The influence of long-term treatment with psychotropic drugs on cytochrome P450: the involvement of different mechanisms. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005;1(2):203-17.
28. Kot M, Daniel WA. Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. *Pharmacol Rep* 2007;59(3):296-305.
29. Berthou F, Flinois JP, Ratanasavanh D, Beaune P, Riche C, Guillouzo A. Evidence for the involvement of several cytochromes P-450 in the first steps of caffeine metabolism by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1991;19(3):561-7.
30. Berthou F, Guillois B, Riche C, Dreano Y, Jacqz-Aigrain E, Beaune PH. Interspecies variations in caffeine metabolism related to cytochrome P450A enzymes. *Xenobiotica* 1992;22(6):671-80.
31. Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF. Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(20):7696-700.
32. Grant DM, Campbell ME, Tang BK, Kalow W. Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver. Kinetics and inhibition studies. *Biochem Pharmacol* 1987;36(8):1251-60.
33. Brosen K, Skjelbo E, Rasmussen BB, Poulsen HE, Loft S. Fluvoxamine is a potent inhibitor of cytochrome P450IA2. *Biochem Pharmacol* 1993;45(6):1211-14.
34. Jeppesen U, Gram LF, Vistisen K, Loft S, Poulsen HE, Brosen K. Dose-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2C19 and CYP2D6 by citalopram, fluoxetine, fluvoxamine and paroxetine. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;51(1):73-8.
35. Jeppesen U, Loft S, Poulsen HE, Brsen K. A fluvoxamine-caffeine interaction study. *Pharmacogenetics* 1996;6(3):213-22.
36. Tanaka E, Kurata N, Yasuhara H. How useful is the "cocktail approach" for evaluating human hepatic drug metabolizing capacity using cytochrome P450 phenotyping probes in vivo? *J Clin Pharm Ther* 2003;28(3):157-65.
37. Alvares AP, Pantuck EJ, Anderson KE, Kappas A, Conney AH. Regulation of drug metabolism in man by environmental factors. *Drug Metab Rev* 1979;9(2):185-205.
38. Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* 2002;3(6):561-97.
39. DeLeve LD, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995;24(4):787-810.
40. Dorne JL, Walton K, Renwick AG. Human variability in xenobiotic metabolism and pathway-related uncertainty factors for chemical risk assessment: a review. *Food Chem Toxicol* 2005;43(2):203-16.
41. Ehrenpreis ED, Ehrenpreis S. Cytochrome P450: Role in drug-induced hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 1998;2(4):457-70.

42. Hakooz N, Hamdan I. Effects of dietary broccoli on human in vivo caffeine metabolism: a pilot study on a group of Jordanian volunteers. *Curr Drug Metab* 2007;8(1):9-15.
43. Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999;20(1-2):12-24, 25-137.
44. Pantuck EJ, Pantuck CB, Garland WA, et al. Stimulatory effect of brussels sprouts and cabbage on human drug metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1979;25(1):88-95.
45. Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, Wolf CR. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica* 1998;28(12):1129-65.
46. Tanaka E. Update: genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes in humans. *J Clin Pharm Ther* 1999;24(5):323-9.
47. Verbeeck RK. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64(12):1147-61.
48. Ghobadi C, Mirhosseini N, Shiran MR, et al. Single-dose pharmacokinetic study of clomiphene citrate isomers in anovular patients with polycystic ovary disease. *J Clin Pharmacol* 2009;49(2):147-54.
49. Moghadamnia AA, Rostami-Hodjegan A, Abdul-Manap R, Wright CE, Morice AH, Tucker GT. Physiologically based modelling of inhibition of metabolism and assessment of the relative potency of drug and metabolite: dextromethorphan vs. dextrorphan using quinidine inhibition. *Br J Clin Pharmacol* 2003;56(1):57-67.
50. Guengerich F. Cytochrome P450 enzymes. *Am Scientist* 1993;81:440-7.
51. Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, Kunze KL. Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* 1995;5(5):259-74.
52. Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 2005;35(4):325-61.
53. Kang MH, Won SM, Park SS, Kim SG, Novak RF, Kim ND. Piperine effects on the expression of P4502E1, P4502B and P4501A in rat. *Xenobiotica* 1994;24(12):1195-204.
54. Piyachaturawat P, Kingkaeohoi S, Toskulkao C. Potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity by piperine. *Drug Chem Toxicol* 1995;18(4):333-44.
55. Hirotsu Y, Yamamoto K, Tomishi H, Nishihori T, Umeda T, Tanaka K. Effects of capsaicin on the pharmacokinetics of digoxin, phenytoin, and theophylline in rats. *Jpn J Ther Drug Monit* 2007;24(1):23-8.
56. Foti RS, Wahlstrom JL. The role of dietary supplements in cytochrome P450-mediated drug interactions. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas* 2008;7(2):66-84.
57. Saxena A, Tripathi KP, Roy S, Khan F, Sharma A. Pharmacovigilance: Effects of herbal components on human drugs interactions involving cytochrome P450. *Bioinformation* 2008;3(5):198-204.