مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۶،آبان ۱۳۹۱، صفحه ۳۲-۲۵

فنوتیپ فعالیت متابولیکی آنزیم سیتوکروم پی 1A2 (CYP1A2) با تجویز کافئین خوراکی در نمونه ای از داوطلبین سالم مازندرانی

سید شهاب رستمکلایی(MD)[۱]، سعید قارویی آهنگر(MD)[۱]، محمدتقی کاظمی(MD)[۱]، محمدرضا شیران (PharmD, PhD)[۲]،
علی اکبر مقدم نیا (PharmD, PhD)[*۱]

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

دریافت:۹۰/۱۲/۲۸، اصلاح: ۹۱/۴/۱۴، پذیرش: ۹۱/۶/۸

خلاصه

سابقه و هدف: اندازه گیری غلظت پلاسمایی کافئین در تعیین سطح فعالیت آنزیم میکروزومال کبدی CYP1A2 کمک کننده می باشد. این مطالعه، به منظور بررسی وضعیت آنزیم فوق با کمک اندازه گیری غلظت بزاقی کافئین پس از مصرف خوراکی(به عنوان پروب) در نمونه ای از افراد داوطلب سالم مازندرانی انجام شد.

مواد و روشها: غلظت بزاقی کافئین در ۱۰۰ داوطلب سالم مازندرانی (۸۲ نفر مرد و ۱۸ نفر زن) در زمانهای ۰، ۰/۵، ۲ و ۵ ساعت پس از مصرف خوراکی یک لیوان قهوه حاوی ۵۰ میلیگرم کافئین با استفاده از روش HPLC انجام شد. ستون دستگاه از نوع C8 و فاز متحرک شامل متانل (۶۰٪) و آب (۴۰٪) بود. دتکتور به کار رفته UV بوده و حداکثر طول موج در ۲۱۰ نانومتر تثبیت گردید.

یافته ها: محدوده سنی و نمایه توده بدن بین ۱۸ تا ۵۵ (۶/۹±۲۴/۵) سال و ۱۶/۷ تا ۳۷/۴ (۳/۷±۲۳/۴۵) بود. ضریب تغییرات میانگین ۳/۲٪ و ضریب R^2 مساوی ۰/۹۹۷ به دست آمد. میانگین و انحراف معیار نیمه عمر حذفی ۰/۱۲۴±۲/۰۱ ساعت بود که در آقایان بیشتر از خانم ها به دست آمد (خانمها ۱/۹۸، آقایان ۲/۰۲ ساعت). نیمه عمر حذف دارو در افراد بالاتر از ۳۰ سال سن (۲/۰۵ ساعت) بیشتر از افراد زیر ۳۰ سال (۲ ساعت) به دست آمد. میانگین غلظت حد اکثرکافئین ۰/۰۲±۰/۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر و ثابت سرعت حذف ۰/۰۱۶±۰/۴۱ به دست آمد.

نتیجه گیری: فعالیت آنزیم سیتوکروم پی 1A2 در افراد ما در حد متوسط و طبیعی می باشد و نیمه عمر حذفی در افراد مسن بیشتر از افراد جوان است.

واژه های کلیدی: فنوتیپ *CYP1A2*، کافئین، نیمه عمر حذفی، *HPLC*، بزاق.

مقدمه

تفاوت‌های بین فردی زیادی در پاسخ به داروها و عوامل فارماکولوژیک وجود دارند (۱). وقتی دارویی با یک دوز مشخص به دو فرد با جنس یکسان و وزن تقریبا یکسان تجویز می‌شود، تفاوت غلظت پلاسمایی می‌تواند تا بیش از هزار برابر متغییر باشد (۲). تداخلات بین دارو- دارو، دارو- غذا، جنس، سن، وجود بیماری زمینه‌ای (مثل نارسایی کبدی یا کلیوی) و حاملگی همگی می توانند بر تفاوت‌های بین فردی در پاسخ به اثر داروها تأثیر گذار باشند. هر چند پاسخ بین فردی به عوامل دارویی می تواند کاملاً تکرارپذیر باشد ولی ممکن است تفاوتهای ژنتیکی نیز در بروز پاسخ به داروها دخیل باشند (۳). تخمین زده می‌شود که عامل ژنتیکی مسئول ۲۰ تا ۹۵ درصد تنوع در متابولیسم و بروز اثرات بیولوژیک داروها می‌باشد (۴). اغلب داروها و سموم توسط CYP 1, CYP 2 و CYP 3 متابولیزه می‌شوند (۱۰-۵). آنزیم CYP1A2 در متابولیسم داروهای مختلف نقش مهمی بازی می کند. این آنزیم یکی از مهمترین آنزیم های P450 بوده و تقریباً ۱۳ درصد از تمام گروههای این آنزیم در کبد انسانی را شامل می شود (۱۱). فرآیند حذف تعداد قابل توجهی از داروهای مهمی مثل تئوفیلین (۱۲)، تاکرین (۱۳)، کلوزاپین (۱۴)، الانزاپین (۱۵) عمدتاً به فعالیت CYP1A2 بستگی دارد و بر این تعداد هر روزه افزوده می شود. گوناگونی مشاهده شده در آنزیم CYP1A2 بر پایه تفاوت در فاکتورهای ژنتیکی و مهار یا القای آنزیمی می باشد. بسته به جمعیت مورد مطالعه و روش مورد استفاده تفاوت بین فردی تا ۶۰ برابر نیز مشاهده شده است(۱۶). تعیین فنوتیپ جهت ارزیابی متابولیسم قبل و در حین درمان دارویی می تواند به یافتن دوز مطلوب، پیشگویی عوارض جانبی و دستیابی به علتهای عدم پاسخ درمانی مناسب در هر فرد، کمک کننده باشد. همچنین تعیین فنوتیپ یک آنزیم که به طور عمده درکبد بیان می شود، می تواند

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجو سید شهاب رستمکلایی و طرح تحقیقاتی به شماره ۲۰۱۱۹۱۰۱۵ دانشگاه علوم پزشکی بابل می باشد.

*مسئول مقاله:
آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، گروه فارماکولوژی، تلفن: ۵-۲۱۹۹۵۹۱-۰۱۱۱
e-mail: moghadamnia@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.6.3.9]

روشی برای پیگیری عملکرد کبدی در بیماران مبتلا به بیماری های کبدی باشد (۱۷). تعیین فعالیت آنزیم میتواند به آسانی به وسیله انجام تست های عملکردی بافت هایی که آنزیم مربوطه را بیان می کنند، انجام شود. CYP1A2 در سلولهای خونی و یا ترکیبات قابل دسترس بدن بیمار وجود ندارد و به طور عمده در کبد محدود شده است، بنابراین بیوپسی کبد تنها روش انجام این تست است ولی از لحاظ اخلاقی و عملی قابل انجام نیست (۱۸).

در عوض داروهای مختلفی (مثل فناستین،کافئین، تئوفیلین، ملاتونین) وجود دارند که به عنوان پروب، استفاده می شوند. براساس غلظت پیش ماده ها و متابولیت ها در ماتریس های مختلفی مثل پلاسما، بزاق، هوای بازدمی یا ادرار بعد از مصرف این پروبها، میتوان فعالیت کلی آنزیم مربوطه را مشخص نمود. کافئین اولین سوبسترای انتخابی جهت بررسی فنوتیپ CYP1A2 است که امروزه مورد استفاده است. از روی غلظتهای کافئین در خروجی پلاسمایی یا هر نمونه دیگر و نیز اندازه گیری متابولیت آن، پارا گزانتین، میتوان فعالیت این آنزیم را مشخص نمود (۲۴-۱۹). از آنجایی که از فعالیت این آنزیم در نمونه های مازندرانی یافته ای در دست نیست،

این پژوهش طراحی و اجراء شده است تا به بررسی میزان فعالیت CYP1A2 (فنوتیپ) در نمونه ای از افراد سالم مازندرانی بپردازد تا از آن بتوان به عنوان معیاری برای ارزیابی و بهینه کردن عملکرد بالینی داروهایی که از مسیر این آنزیم متابولیزه میشوند، استفاده نمود.

مواد و روشها

افراد شرکت کننده: این مطالعه مقطعی فارماکوکینتیکی پس از تائید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل بر روی ۱۰۰ داوطلب (۸۲ مرد و ۱۸ زن) سالم ساکن استان مازندران پس از اخذ رضایت نامه کتبی انجام شد. افراد داوطلب در محدوده سنی بین ۱۸ تا ۵۵ (۶/۹±۲۴/۵) سال و وزنی ۴۲ الی ۱۲۰ کیلوگرم (۱۰/۱±۷۲/۴) بودند که سلامتی آنها توسط پزشک تایید شده بود. افراد در صورت استعمال سیگار، باردار بودن و مصرف داروهای القا کننده و یا مهار کننده آنزیم CYP1A2 در یکماه گذشته، به این مطالعه وارد نشدند. افراد شرکت کننده در طول مطالعه از مصرف کافئین و یا فرآورده های حاوی آن یا هر دارویی که به طور مستقیم یا غیرمستقیم در متابولیسم دارو تداخل ایجاد می کرد، اجتناب کردند.

مواد: کافئین (مرک، آلمان)، پرکلریک اسید (مرک، آلمان)، متانول با درجه آنالیتیکی برای HPLC (مرک، آلمان) و آب دیونیزه تهیه شدند.

روش اجراء: به داوطلبین یک لیوان قهوه حاوی ۵۰ میلیگرم کافئین تحویل شد تا آن را بنوشد. در زمانهای ۰/۵، ۲ و ۵ ساعت پس از تجویز کافئین، حدود ۵ میلی لیتر نمونه بزاق تهیه شد. سپس لوله های حاوی بزاق در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند تا در زمان مقتضی، غلظت کافئین اندازه گیری شوند.

آنالیز توسط دستگاه HPLC: آنالیز نمونه های بزاقی با استفاده از روش از قبل ارائه شده با اندکی تغییرات و توسط دستگاه HPLC مدل KAUNER) انجام شد (۲۵). جداسازی توسط ستون C8 با مشخصات Eurospher C8 analytical column (250 × 4.6 mm with precolumn) و با استفاده از فاز متحرک متانول (۶۰٪) و آب (۴۰٪) وسرعت جریان (flow rate) ۰/۸ ml/min انجام شد. شناسایی و اندازه گیری کافئین با استفاده از Kauner UV detector (K-2600) در طول موج حداکثر ۲۱۰ نانومتر انجام شد.

روش استخراج کافئین از نمونه های بزاقی: برای تعیین غلظت کافئین، نمونه های بزاقی از فریزر خارج شده و در آزمایشگاه به حال خود رها شدند تا به آرامی در دمای محیط ذوب شوند. سپس ۰/۱ میلی لیتر از بزاق ذوب شده به لوله پلاستیکی ته مخروطی دریچ دار منتقل شد. ۵۰۰ میکرولیتر اسید پرکلریک ۶٪ به آن اضافه گردید. سپس به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد. بعد از آن، محلول حاصل در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور g × ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس از لایه فوقانی هر بار به مقدار ۱۰ میکرولیتر مستقیما" به ستون جدا کننده HPLC تزریق گردید.

محدوده قابل اندازه گیری برای کافئین ۱ میکروگرم بر میلی لیتر و CV (coefficient of variation) محاسبه شده به عنوان معیاری از صحت و دقت متد در همه موارد کمتر از ۱۰٪ در نظر گرفته شد. نیمه عمر حذفی کافئین با استفاده از نرم افزار کینتیکی P-Pharm محاسبه گردید و به عنوان معیاری از فعالیت آنزیم CYP1A2 در نظر گرفته شد.

برای مقایسه میانگین های گزارش شده در پارامترهای فارماکوکینتیکی به دست آمده در دو جنس مختلف و در دو گروه سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال از آزمون آماری T-Test استفاده شد و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، نیمه عمر حذفی کافئین به طور میانگین۰/۱۲۴±۲/۰۱ ساعت و میانگین غلظت اولیه بزاقی کافئین در جامعه مورد مطالعه µg/ml ۰/۰۲±۰/۱۶ محاسبه شد. میانگین ثابت سرعت حذف بزاقی کافئین ۰/۰۲±۰/۳۵ محاسبه شد. تفاوت بین حداکثر و حداقل از نظر نیمه عمر حذفی کافئین ۱/۵۸ برابر به دست آمد (جدول ۱).

جدول۱. نیمه عمر حذفی، ثابت میزان حذف بزاقی کافئین و غلظت های پایه کافئین در ۱۰۰ نفر افراد داوطلب سالم مازندرانی در مطالعه فنوتایپینگ آنزیم CYP1A2

پارامترهای PK	Mean±SD	95% CI Lower	95% CI Upper	Min	Max	Fold[2]
نیمه عمر کافئین(h)	۲/۰۱±۰/۱۲۴	۱/۹۸	۲/۰۳	۱/۴۵	۱/۵۸	۱/۰۸
$^{1}K_{el}$ (h^{-1})	۰/۳۵±۰/۰۲۴	۰/۳۴	۰/۳۵	۰/۳۰	۰/۴۸	۱/۶
Basic Conce (micg/ml)	۰/۱۶±۰/۰۲۲	۰/۱۶	۰/۱۷	۰/۱۳	۰/۲۹	۲/۲۳

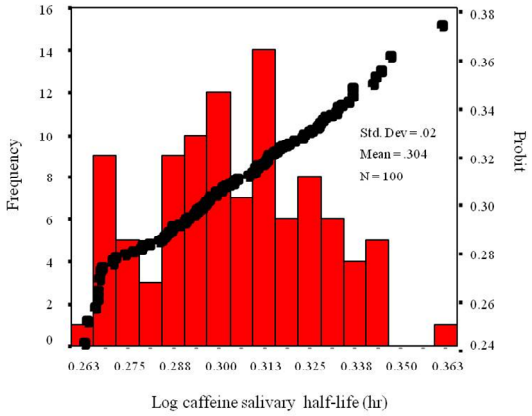
[1]Ke_{saliva}; salivary caffeine elimination rate constant, Base; calculated baseline salivary concentrations of CA by model, CA t½; caffeine

[2]Fold: ratio of max/min

هیستوگرام توزیع فراوانی نیمه عمر کافئین در افراد شرکت کننده نرمال است. این نمودار نشانگر آن است که اکثر افراد از نظر فعالیت آنزیم در حد متوسط

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.6.3.9]

می باشند (نمودار ۱)، یا به عبارت دیگر، این صفت در افراد این مطالعه از یک توزیع نرمال پیروی میکند. مقایسه نشان داد که افراد بالای ۳۰ سال نسبت به گروه سنی زیر ۳۰ سال نیمه عمر حذفی بالاتری از کافئین در بزاق دارند (p=۰/۰۲۶). شاخص غلظت پایه بین مرد و زن تفاوت معنی داری داشت (p۰/۰۱۶) ولی اختلاف واضحی در نیمه عمر کافئین بین آنها دیده نشد.



نمودار ۱. توزیع فراوانی و probit plot (منحنی احتمال) نیمه عمر کافئین با در نظر گرفتن کل جامعه شرکت کننده در مطالعه تعیین فنوتایپ آنزیم CYP1A2 در داوطلبین سالم مازندرانی

بحث و نتیجه گیری

میانگین مقدار نیمه عمر حذفی افراد شرکت کننده در این مطالعه با مقادیر بدست آمده در بعضی مطالعات نزدیک بوده و با آن ها قابل مقایسه است (۲۷و۲۶). CYP1A2 در متابولیسم داروهای بسیاری از جمله کلوزاپین، کافئین و تئوفیلین دخیل است (۲۸). مشخص شده است که تفاوت بین فردی زیادی در فعالیت CYP1A2 وجود دارد و عوامل متعدد محیطی و ژنتیکی در این گوناگونی دخیل هستند (۱۶). اطلاع یافتن از میزان تنوع در فعالیت CYP1A2 در یک جامعه می تواند به پزشکان جهت تعیین دوزاژ داروها کمک کند(۲۹).

تاکنون روشهای متعددی برای تعیین فنوتیپ CYP1A2 پیشنهاد شده است، مانند استفاده از پروب هایی مثل کافئین، فناستین، تئوفیلین، ملاتونین و C- lablled (کربن نشاندار) در هوای بازدمی. اما بهترین روش برای ارزیابی فعالیت CYP1A2 استفاده از پروب کافئین است (۳۰و۱۸و۹). کافئین یک سوبسترا برای CYP1A2 است و متابولیسم آن عمدتا به وسیله این آنزیم صورت می گیرد، تنها مقدار کمی از کافئین بدون تغییر دفع می شود (۳۱و۲۸و۱۸).

در این مطالعه نیمه عمر حذفی کافئین به عنوان شاخص فعالیت CYP1A2 در نظر گرفته شد. مقادیر نیمه عمر حذفی کافئین برای هر فرد محاسبه شد. همچنین مقادیر ثابت حذف بزاقی و غلظت پایه نیز محاسبه گردید. میانگین نیمه عمر حذفی کافئین افراد شرکت کننده در این مطالعه با مقادیر به دست آمده در بعضی مطالعات قابل مقایسه است (۲۷و۲۶). مقایسه داده ها نشان می دهد که فعالیت متابولیکی این آنزیم در افراد جامعه ایرانی به جمعیت های شرق آسیا شبیه است(۳۲). هر چند به علت روش های اندازه گیری متفاوت آنها، مقایسه مستقیم ممکن است امکان پذیر نباشد. در جدول ۲ خصوصیات کینتیکی کافئین در بزاق در ۲ مطالعه قبلی آورده شده است.

جدول۲. مقایسه خصوصیات کینتیکی کافئین در بزاق در ۲ مطالعه

Pk parameter	CA t½ (h)	$Ke_{saliva}(h^{-1})$
Scott et al (۲۷ ,۲۶)	۴/۰	۰/۱۶
Newton et al (۲۷ ,۲۶)	۵/۴	۰/۱۶

در مطالعات انجام شده در جوامع مختلف، نشان داده شد که میزان فعالیت آنزیم CY1A2 در خانم ها کمتر از آقایان است (۳۳) ولی در این مطالعه تفاوت چشمگیری بین دو جنس وجود نداشت. البته شاید این مسئله به دلیل تعداد نمونه های کمتر زنان باشد و ممکن است با طراحی مطالعه ای دیگر با تعداد بیشتر از داوطلبین زن، این نسبت عوض شود. تقریبا در تمام شرکت کنندگان با وجود اجتناب از مصرف متیل گزانتین ها قبل از آزمایش، غلظت پایه کافئین وجود داشت. مطالعات انجام شده بر روی خصوصیات فارماکوکینتیکی کافئین در بزاق بسیار محدود است.

در مطالعه حاضر، از مدل متفاوتی برای ارزیابی خصوصیات فارماکوکینتیکی کافئین در بزاق که فنوتایپ آنزیم CYP1A2 را روشن می کند، استفاده شده است. به این معنا که بدون در نظر گرفتن اثر تداخلی غلظت های احتمالی پایه کافئین، از مدلینگ خاص فارماکوکینتیکی استفاده گردید که اثر غلظت های پایه را حذف می نماید. در مدلهای دیگر از نسبت غلظت پاراگزانتین به کافئین، به عنوان معیاری از فنوتایپ آنزیم CYP1A2 استفاده شده است (۳۴). که این مدل مستلزم اندازه گیریهای اضافی غلظت های متابولیت کافئین است. برتری مدل مطالعه حاضر به این است که دیگر نیاز به این گونه اندازه گیریها نمی باشد.

در مطالعه Scott و همکاران، ثابت سرعت حذف بزاقی کافئین در بزاق افراد سالم از ۰/۴ فراتر نرفت ولی در مطالعه ما بالاترین میزان ثابت حذف بزاقی کافئین ۰/۴۸ بود که به مطالعات قبلی نزدیک بود (۲۶). در مطالعه حاضر، سن اکثر شرکت کنندگان بین ۲۰ تا ۳۰ سال بود. برای مقایسه تفاوت های ناشی از سن در داده ها، افراد این مطالعه به دو گروه سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال تقسیم شدند. مقایسه نشان داد که افراد بالای ۳۰ سال نسبت به گروه سنی زیر ۳۰، نیمه عمر حذفی بالاتری از کافئین را در بزاق دارند و این ممکن است فعالیت کمتر CYP1A2 آنها را توجیه کند، این یافته با نتایج بعضی مطالعات همخوانی دارد (۳۶و۳۵). هرچند در یک مطالعه بزرگ رابطه ای بین سن و فعالیت CYP1A2 به اثبات نرسید (۲۹).

در مطالعه ما شاخص غلظت پایه بین جنس مرد و زن تفاوت معنی داری داشت. اما در مطالعات قبلی در خصوص غلظت پایه مقایسه ای یافت نشد. اختلاف واضحی در نیمه عمر کافئین در پژوهش ما بین خانم ها و آقایان دیده نشد. هرچند در این مطالعه تعداد زنان به مردان کمتر بود ولی با مطالعات محققین دیگر، قابل مقایسه بود (۳۳). در مطالعات قبلی کاهش فعالیت CYP1A2 در زنان گزارش شده است (۳۳) که البته در بعضی مطالعات دیگر این تفاوت از نظر آماری قابل قبول نبوده است (۳۸و۳۷). وضعیت مربوط به هورمون های جنسی می تواند بیان ژن را تغییر دهد. زنانی که میزان پروژسترون و استروژن در آنها به علت دریافت OCP (قرصهای خوراکی پیشگیری از بارداری)، فاز لوتئال سیکل قاعدگی یا حاملگی بیشتر است، فعالیت CYP1A2 کمتری را نشان دادند. میزان بیشتر کافئین موجب میزان کمتر حذف کافئین می شود (۴۰و۳۹). در این مطالعه میزان گوناگونی بین فردی در نیمه عمر حذفی کافئین ۱/۵۸محاسبه شد. در مطالعات

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.6.3.9]

قبلی گوناگونی بین فردی از ۶ تا ۲۰۰ برابر گزارش شده است (۴۴-۴۱). تفاوتهای گسترده بین فردی می تواند ناشی از گوناگونی ژنتیکی و یا اثر عوامل محیطی باشد. گوناگونی فعالیت CYP1A2 در چین ۲۴٪، استرالیا ۵٪ و در مطالعه ژاپن ۱/۱۴٪ گزارش شد (۴۶و۴۵و۳۲) که این بیانگر اختلاف بین نژادی نیز می باشد. در نتیجه میزان گوناگونی در جامعه مورد مطالعه به جوامع شرق دور نزدیکتر می باشد. شاخص کلیرانس پلاسمایی کافئین، روش استاندارد طلایی برای ارزیابی فعالیت CYP1A2 است (۴۷و۱۸)، ولی جمع آوری نمونه های پلاسمایی برای محاسبه کلیرانس روش عملی و آسانی نیست. بنابراین روشهای مختلفی بر پایه محاسبه نسبت های سوبسترا و متابولیت در محیط های پلاسما، بزاق و ادرار ارائه شده است (۴۷و۳۴). در همه این روشها اجتناب از مصرف مواد غذایی کافئین دار حدود ۱۲ ساعت قبل از انجام تست ضروری است (۴۷). رعایت این شرط برای بیماران سرپایی مشکل است (۴۸). این موضوع می تواند منجر به مخدوش شدن تخمین فعالیت CYP1A2 شود.

تاکنون هیچ مطالعه ای اثر افزایش جریان بزاق بر نسبت پاراگزانتین را در بزاق بررسی نکرده است. با وجود این، یک مطالعه قبلی ارتباط زیاد بین غلظت های کافئین در بزاق و سرم را برای نمونه های جمع آوری شده، ۱۰۵ دقیقه پس از دریافت کافئین را نشان داده است. در آن مطالعه، ترشح بزاق بوسیله آدامس جویدنی بدون قند به مدت ۱ دقیقه تحریک شد (۴۹). غلظت کافئین در بزاق انعکاس غلظت آن در سرم می باشد و این موضوع استفاده از بزاق را جهت تخمین خصوصیات فارماکوکینتیکی کافئین حمایت می کند. نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که محاسبه نیمه عمر حذفی کافئین با استفاده از Population Pharmacokinetics (POPPK) برای نمونه های بزاقی می تواند یک روش تخمین ساده و قوی فعالیت CYP1A2 باشد. این روش راحت بوده و نیازی به تصحیح غلظت های پایه ندارد. بنابراین در صورت عدم اجتناب شرکت کنندگان از غذاها و نوشیدنی های حاوی متیل گزانتین، نیز قابل انجام است.

همچنین در این روش جهت جمع آوری نمونه نیازی به ماندن افراد به مدت طولانی در کلینیک نمی باشد. در مطالعه ما ضریب تغییرات میانگین زیر ۵٪ برای متد اندازه گیری به دست آمد. این یافته نشان می‌دهد که دقت کار با این روش قابل قبول و بالاست. بنابراین، این یافته ها با یافته های دیگران قابل مقایسه خواهد بود. از سوی دیگر با استفاده از نتایج به دست آمده از سایر تستها مانند تست "ارتباط بین غلظت‌های بزاقی مشاهده شده و غلظت‌های پیش بینی شده با کمک توزیع داده های فردی مدل Bayesian" بیانگر این موضوع می‌باشند که مدل به کار رفته برای تحلیل وضعیت غلظت های بزاقی در مقابل زمان در این مطالعه مناسب بوده است. در این مدل، علی‌رغم اینکه بعضی افراد محدوده غلظتی متفاوتی از بقیه نشان دادند، ارتباط بین غلظت موجود با غلظت‌های بزاقی قابل انتظار، یک ارتباط کاملا واضحی است.

فعالیت CYP1A2 تفاوت‌های بین فردی قابل توجهی در جمعیت‌ها دارد. در مطالعه ما توزیع نرمالی از فعالیت آنزیم CYP1A2 در نمونه ای از جمعیت ایرانی (مازندرانی) مشاهده شد و تفاوتی در فعالیت آنزیم CYP1A2 بین آقایان و خانم ها وجود نداشت. با توجه به یافته‌های به دست آمده در این مطالعه، می توان گفت، افراد ما که نماینده‌ای از جامعه ایران می‌باشند، جزء متابولیزه کننده‌های در حد متوسط و بعبارت دیگر طبیعی داروهای سوبسترای CYP1A2 هستند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر امین رستمی، استاد فارماکوکینتیکس دانشگاه منچستر به دلیل در اختیار گذاردن نرم افزار P-Pharm و از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل به دلیل حمایت مالی از تحقیق و از خانم ماریا هاشمی کارشناس آزمایشگاه فارماکولوژی تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.6.3.9]

Determination of CYP1A2 Phenotype after Oral Administration of Caffeine in a Sample of Healthy Volunteer from Mazandaran Province

S.Sh. Rostamkolaee (MD)[1], S. GharooeeAhangar (MD) [1], M.T. Kazemi (MD)[1], M.R. Shiran (PharmD, PhD)[2], A.A. Moghadamnia (PharmD, PhD)[1*]

1. Department of Pharmacology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
2. Department of Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(6); Nov 2012; pp: 25-32

Received: Mar 18th 2012, Revised: Jul 4th 2012, Accepted: Aug 29th 2012.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Assay of caffeine (CA) plasma concentration can help to find out the activity level of hepatic microsomal cytochrome oxidase 1A2 (CYP1A2). This study was conducted to evaluate the phenotype of activity of CYP2A1 in a sample of Iranian volunteers based on salivary concentration of CA as typical probe of CYP1A2.

METHODS: Saliva concentration of CA in 100 Iranian healthy subjects from Mazandaran province (82 men and 18 women) was measured at 0, 0.5, 2, and 5 h after drinking a cup of coffee containing 50 mg caffeine using HPLC method. C8 analytical column and a mobile phase composed of methanol (60%) and water (40%) were used for the chromatographic separation. The peak was detected using a UV detector set at 210 nm.

FINDINGS: The mean ± SD of age and body mass index were 24.5 ± 6.9 years (range: 18-55 years) and 23.45 ±3.7 (range: 16.7-37.4), respectively. The CV was 3.2% and good linearity (R^2= 0.997) was confirmed. The mean elimination half time of CA was 2.01 ± 0.124 h (1.98 h for females and 2.02 h for males) and elimination half-time of CA in above 30 years old (2.05 h) was higher than below 30 years old (2.00 h). The mean Cmax of CA was 0.16 ± 0.02 micg/ml and Kel was calculated 0.41 ± 0.016.

CONCLUSION: A normal phenotype of CYP2A1 activity was observed in the Iranian participants in this study. The CYP2A1 activity is higher in elderly subjects than in young.

KEY WORDS: *CYP2A1, Caffeine, Elimination half time, HPLC, Saliva.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Department of Pharmacology, Babol University of Medical Sciences, 4717641367, Babol, Iran
Tel:+98 111 2199591-5
E-mail:moghadamnia@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.6.3.9]

References

1. Maitland-van der Zee AH, de Boer A, Leufkens HG. The interface between pharmacoepidemiology and pharmacogenetics. Eur J Pharmacol 2000;410(2-3):121-30.
2. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. J Intern Med 2001;250(3):186-200.
3. Drazen JM, Silverman EK, Lee TH. Heterogeneity of therapeutic responses in asthma. Br Med Bull 2000;56(4): 1054-70.
4. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. N Engl J Med 2003; 348(6):538-49.
5. Ketter TA, Flockhart DA, Post RM, et al. The emerging role of cytochrome P450 3A in psychopharmacology. J Clin Psychopharmacol 1995;15(6):387-98.
6. Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. Curr Drug Metab 2002;3(6):561-97.
7. Wilkinson GR. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. J Pharmacokinet Biopharm 1996;24(5):475-90.
8. Murray M. Mechanisms and significance of inhibitory drug interactions involving cytochrome P450 enzymes (review). Int J Mol Med 1999;3(3):227-38.
9. Gu L, Gonzalez FJ, Kalow W, Tang BK. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. Pharmacogenetics 1992;2(2):73-7.
10. Lehmann DE. Enzymatic shunting: resolving the acetaminophen-warfarin controversy. Pharmacotherapy 2000; 20(12):1464-8.
11. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. J Pharmacol Exp Therap 1994:270(1):414-23.
12. Sarkar MA, Hunt C, Guzelian PS, Karnes HT. Characterization of human liver cytochromes P-450 involved in theophylline metabolism. Drug Metab Dispos 1992;20(1):31-7.
13. Spaldin V, Madden S, Pool WF, Woolf TF, Park BK. The effect of enzyme inhibition on the metabolism and activation of tacrine by human liver microsomes. Br J Clin Pharmacol 1994;38(1):15-22.
14. Bertilsson L, Carrillo JA, Dahl ML, et al. Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. Br J Clin Pharmacol 1994;38(5):471-3.
15. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM. Olanzapine. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. Clin Pharmacokinet 1999;37(3):177-93.
16. Sesardic D, Boobis AR, Edwards RJ, Davies DS. A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form d in the rat, catalyses the O-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking. Br J Clin Pharmacol 1988;26(4): 363-72.
17. Lelouet H, Bechtel YC, Paintaud G, Brientini MP, Miguet JP, Bechtel PR. Caffeine metabolism in a group of 67 patients with primary biliary cirrhosis. Int J Clin Pharmacol Ther 2001;39(1):25-32.
18. Kalow W, Tang BK. The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. Clin Pharmacol Ther 1993;53(5):503-14.
19. Breimer DD. Interindividual variations in drug disposition. Clinical implications and methods of investigation. Clin Pharmacokinet 1983;8(5):371-7.
20. Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9 , 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail". Clin Pharmacol Ther 2003;74(5):437-47.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.6.3.9]

21. Frye RF, Matzke GR, Adedoyin A, Porter JA, Branch RA. Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. Clin Pharmacol Ther 1997;62(4):365-76.
22. Streetman DS, Bleakley JF, Kim JS, et al. Combined phenotypic assessment of CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase with the "Cooperstown cocktail". Clin Pharmacol Ther 2000; 68(4): 375-383.
23. Tanaka E, Kurata N, Yasuhara H. How useful is the "cocktail approach" for evaluating human hepatic drug metabolizing capacity using cytochrome P4 ٥٠phenotyping probes in vivo? J Clin Pharm Ther 2003; 28(3): 157-165.
24. Zhu B, Ou-Yang DS, Chen XP, et al. Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach. Clin Pharmacol Ther 2001;70(5):455-61.
25. Altun ML. HPLC method for the analysis of paracetamol, cafeine and dipyrone. Turk J Chem 2002;26(4):521-8.
26. Scott NR, Stambuk D, Chakraborty J, Marks V, Morgan MY. The pharmacokinetics of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in patients with chronic liver disease. Br J Clin Pharmacol 1989;27(2):205-13.
27. Newton R, Broughton LJ, Lind MJ, Morrison PJ, Rogers HJ, Bradbrook ID. Plasma and salivary pharmacokinetics of caffeine in man. Eur J Clin Pharmacol 1981;21(1):45-52.
28. Carrillo JA, Benitez J. Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications. Clin Pharmacokinet 2000;39(2):127-53.
29. Tantcheva-Poor I, Zaigler M, Rietbrock S, Fuhr U. Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test. Pharmacogenetics 1999;9(2):131-44.
30. Lelo A, Miners JO, Robson RA, Birkett DJ. Quantitative assessment of caffeine partial clearances in man. Br J Clin Pharmacol 1986;22(2):183-6.
31. Miners JO, Birkett DJ. The use of caffeine as a metabolic probe for human drug metabolizing enzymes. Gen Pharmacol 1996;27(2):245-9.
32. Ou-Yang DS, Huang SL, Wang W, et al. Phenotypic polymorphism and gender-related differences of CYP1A2 activity in a Chinese population. Br J Clin Pharmacol 2000;49(2):145-51.
33. Relling MV, Lin JS, Ayers GD, Evans WE. Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. Clin Pharmacol Ther 1992;52(6):643-58.
34. Fuhr U, Rost KL, Engelhardt R, et al. Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations. Pharmacogenetics 1996;6(2):159-76.
35. Tanaka E. In vivo age-related changes in hepatic drug-oxidizing capacity in humans. J Clin Pharm Ther 1998; 23(4):247-55.
36. Chung WG, Kang JH, Park CS, Cho MH, Cha YN. Effect of age and smoking on in vivo CYP1A2, flavin-containing monooxygenase, and xanthine oxidase activities in Koreans: determination by caffeine metabolism .Clin Pharmacol Ther 2000;67(3):258-66.
37. Kalow W, Tang BK. Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. Clin Pharmacol Ther 1991;50(5 Pt 1):508-19.
38. Catteau A, Bechtel YC, Poisson N, Bechtel PR, Bonaiti-Pellie C. A population and family study of CYP1A2 using caffeine urinary metabolites. Eur J Clin Pharmacol 1995;47(5):423-30.
39. Balogh A, Klinger G, Henschel L, Borner A, Vollanth R, Kuhnz W. Influence of ethinylestradiol-containing combination oral contraceptives with gestodene or levonorgestrel on caffeine elimination. Eur J Clin Pharmacol 1995; 48(2):161-6.
40. Lane JD, Steege JF, Rupp SL, Kuhn CM. Menstrual cycle effects on caffeine elimination in the human female. Eur J Clin Pharmacol 1992;43(5):543-6.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.6.3.9]

41. Tang BK, Zhou Y, Kadar D, Kalow W. Caffeine as a probe for CYP1A2 activity: potential influence of renal factors on urinary phenotypic trait measurements. Pharmacogenetics 1994;4(3):117-24.
42. Butler MA, Lang NP, Young JF, et al. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. Pharmacogenetics 1992;2(3):116-27.
43. Le Marchand L, Franke AA, Custer L, Wilkens LR, Cooney RV. Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. Pharmacogenetics 1997;7(1):11-19.
44. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Shin S, Kadlubar FF, Kamataki T. Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994;3(5):413-21.
45. Ilett KF, Castleden WM, Vandongen YK, Stacey MC, Butler MA, Kadlubar FF. Acetylation phenotype and cytochrome P450IA2 phenotype are unlikely to be associated with peripheral arterial disease. Clin Pharmacol Ther 1993;54(3):317-22.
46. 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.
47. Rostami-Hodjegan A, Nurminen S, Jackson PR, Tucker GT. Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. Pharmacogenetics 1996;6(2): 121-149.
48. Fuhr U, Rost KL. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. Pharmacogenetics 1994;4(3):109-16.
49. Biederbick W, Joseph G, Rump A, Theisohn M, Klaus W. Caffeine in saliva after peroral intake: early sample collection as a possible source of error. Ther Drug Monit 1997;19(5):521-4.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.6.3.9]