مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۴، تیر ۱۳۹۱، صفحه ۱۴-۷

اثر پی پرین در پارامترهای بیوشیمیایی ناشی از سمیت کبدی استامینوفن در موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی

محمدتقی کاظمی(MD) [۱]، محمد پورنصراله(MD) [۲]، محمدمهدی رضایی(MD)[۱]، سیدغلامعلی جورسرایی(PhD)[۳]، قربان ملیجی(PhD)[۴]، سهراب کاظمی(MSc)[۵]، ابراهیم ذبیحی(PhD)[۶]، مهدی پورامیر(PhD)[۷]، علی اکبرمقدم نیا(PharmD, PhD)[۵*]

۱- دانشگاه علوم پزشکی بابل
۲- گروه پاتولوژی بیمارستان کودکان امیرکلا
۳- مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری حضرت فاطمه زهرا (س)، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۴- گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل
۵-گروه فارماکولوژی و فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی- مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل
۶- گروه فارماکولوژی و فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۷-گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بابل

دریافت: ۹۰/۹/۱، اصلاح: ۹۰/۱۱/۱۹، پذیرش: ۹۱/۲/۱۳

خلاصه

سابقه و هدف: مسمومیت با استامینوفن یکی از علل مهم آسیب‌های کبدی است. این اثرات عمدتا ناشی از تولید متابولیت سمی NAPQI (N-acetylp-benzoquinoneimine) در اثر فعالیت آنزیمهای سایتوکروم اکسیداز است. پی پرین دارای آثار آنتی اکسیدانی بوده و همچنین CYP3A و CYP2E1 را مهار می‌کند. در این مطالعه نقش پی پرین به صورت پیش مداوا در سمیت کبدی استامینوفن بررسی خواهد شد.

مواد و روشها: در این مطالعه رت های نر نژاد ویستار (۲۵۰-۱۵۰ گرم) که به ۵ گروه ۸ تایی، شامل گروه سالین، پی پرین (۱۰mg/kg)، استامینوفن (در دو دوز ۵۰۰ و ۱۰۰۰mg/kg به فاصله ۱۸ ساعت)، پی پرین به همراه استامینوفن و سیلای مارین (۲۵mg/kg) به همراه استامینوفن تقسیم شدند، انجام گردید. فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) در سرم با کیتهای مربوطه و فعالیت توتال آنتی اکسیدان به روش FRAP ارزیابی شد.

یافته ها: پی پرین به صورت پیش مداوا از افزایش بیش از حد AST و ALT پس از مسمومیت حاد با استامینوفن جلوگیری کرد (به ترتیب، ۱۱۰۸/۶۵±۱۷۱۱/۲۵ و ۴۶۳/۵۵±۴۹۶ در مقایسه با گروه استامینوفن، ۵۹۳۴/۷۳±۳۹۵۶/۲۹ و ۳۴۱۳/۴۷±۱۹۱۴/۵۷). میزان توتال آنتی اکسیدان در گروه استامینوفن نسبت به گروه سالین و پی پرین بیشتر بود (به ترتیب، $p<0/009$ و $p<0/003$). اما نسبت به گروه پی پرین- استامینوفن و گروه سیلای مارین- استامینوفن تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که پی پرین تا حدودی می‌تواند از افزایش آنزیم‌های کبدی پس از مسمومیت با استامینوفن جلوگیری کند. (ظرفیت آنتی اکسیدانی در حضور پی پرین علیرغم انتظار کاهش یافت که احتمالا در اثر پاسخ بدنی است) و احتمالا در حضور پی پرین نیاز نیست بدن به طور واکنشی ظرفیت مقابله با NAPQI را با آزاد کردن آنتی اکسیدان ها افزایش دهد به عبارتی، اثر آنتی اکسیدانی پی پرین تا حد زیادی مصرف آنتی اکسیدان های بدنی را کاهش می‌دهد.

واژه های کلیدی: استامینوفن، پی پرین، سیلی مارین، ان استیل - پی بنزکوینون ایمین، آسپارتات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، آنتی اکسیدانت، FRAP.

مقدمه

استامینوفن به طور گسترده در تسکین درد و کاهش تب به کار می‌رود (۱). با وجود این، مسمومیت (overdose) با استامینوفن یکی از علل آسیب‌های کبدی معرفی شده است. به دنبال مصرف استامینوفن، ۹۰٪ آن از طریق فاز دو متابولیسم به متابولیتهای غیرسمی تبدیل می شود. درصد کمی از استامینوفن

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجو محمدتقی کاظمی و طرح تحقیقاتی به شماره ۷۲۴۵۲۰۱۲ مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی – مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بابل می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، گروه فارماکولوژی، تلفن: ۴-۲۱۹۹۵۹۱-۰۱۱۱
e-mail: moghadamnia@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.1.3]

(<۵-۱۰٪) به وسیله ایزومرهای CYP450 متابولیزه می‌شود که در نتیجه آن متابولیت سمی استامینوفن، N-acetylp-benzoquinoneimine (NAPQI)، تولید می‌شود. در شرایط نرمال NAPQI به وسیله کانجوگیشن با گلوتاتیون سم زدایی می‌شود. در مسمومیت با استامینوفن به دنبال حذف گلوتاتیون سلولی، NAPQI به ماکرومولکول های سلولی باند می‌شود و به دنبال آن آسیب هپاتو سلولار و مرگ سلولی ایجاد می‌شود. عقیده بر این است که مسمومیت کبدی استامینوفن زمانی ایجاد می‌شود که ذخیره گلوتاتیون به کمتر از ۳۰ درصد نرمال برسد (۲). پس از به اتمام رسیدن ذخیره گلوتاتیون سلولی، متابولیت واکنشگر استامینوفن به تعداد قابل توجهی از پروتئین‌های میتوکندری و سیتوزول باند می‌شود (۳). در پی آن، تنفس میتوکوندریال مختل شده (۵و۴)، سطح آدنوزین تری فسفات (ATP) هپاتوسلولار کاهش می‌یابد (۷و۶)، منفذ تراوایی انتقالی غشاء میتوکندری باز می‌شود (۸) و سیتوکروم c از میتو کندری آزاد می‌شود (۱۰و۹). چندین سیتوکروم P450 می‌توانند استامینوفن را به NAPQI تبدیل کنند که شامل CYP2E1 (۱۱)، CYP1A2 (۱۱)، CYP3A (۱۲)، CYP2A6 (۱۳) و CYP2D6 (۱۴) می‌باشند. در این میان CYP2E1، CYP1A2 و CYP3A نقش برجسته ای در مسمومیت ناشی از استامینوفن ایفا می‌کنند (۱۴). پی پرین آلکالوئیدی است که به طور طبیعی در Piper nigrum و Piper longum (فلفل سیاه و فلفل بلند) یافت می‌شود. مطالعات اخیر بر روی آثار فارماکولوژیک پی پرین نشان داد که پی پرین دارای آثار محافظ سلولی و آنتی اکسیدان (۱۶و۱۵)، ضد تومور و تعدیل کنندگی سیستم ایمنی (۱۷)، کنترل درد و تداخل با سیستم اوپیوئیدی (۱۸)، افزایش دهنده عمق بیحسی با لیدوکائین در اندودونتیکس (۱۹) و اثر مهاری بر روی آنزیم‌های متابولیزه کننده دارو در جوندگان است (۲۰). پی پرین CYP3A را مهار می‌کند (۲۰). همچنین پی پرین سبب کاهش سطح CYP2E1 در میکروزوم های کبد می‌شود(۲۱). بررسی انجام شده توسط Sabina و همکاران نشان داد که تجویز پی پرین به دنبال مسمومیت حاد با استامینوفن موجب کاهش سمیت کبدی استامینوفن می‌شود (۲۲). تاکنون نقش تجویز پی پرین به صورت پیش مداوا (pretreatment) در درمان مسمومیت کبدی استامینوفن مورد مطالعه قرار نگرفته است. از آنجایی که CYP2E1 و CYP3A در ایجاد مسمومیت کبدی استامینوفن نقش مهمی دارند و پی پرین سبب کاهش فعالیت این دو آنزیم می‌شود و علاوه بر این، پی پرین دارای اثر آنتی اکسیدان می‌باشد، بنابراین با توجه به آثار متابولیکی پی پرین و سمیت کبدی استامینوفن، در این مطالعه نقش احتمالی تجویز پی پرین به صورت پیش مداوا در کاهش سمیت کبدی استامینوفن بررسی خواهد شد.

مواد و روشها

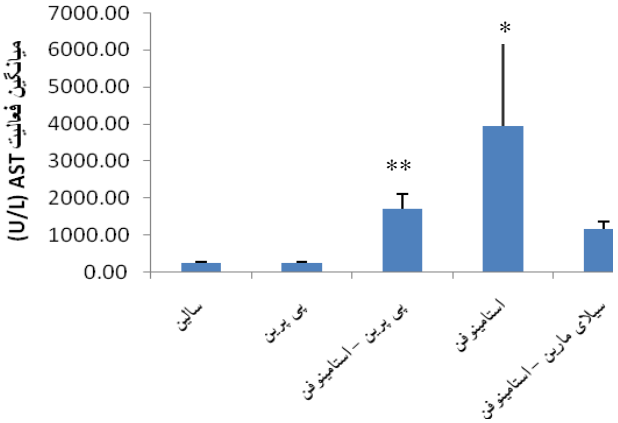
در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی (رت) نر به وزن ۲۵۰-۱۵۰ گرم از نژاد ویستار استفاده شدند. در طول آزمایش رتها در شرایط استاندارد و قفس‌های جداگانه نگهداری شدند. داروهای مورد استفاده در این مطالعه شامل؛ پی پرین (Merk, Germany)، سیلای مارین (Sigma, USA)، استامینوفن (Merk, Germany) و نرمال سالین بودند. رت ها به طور تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند و از ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش در شرایط بی غذایی قرار گرفتند. به گروه اول به مدت ۵ روز ۱ میلی لیتر/ کیلوگرم وزن بدن سالین داخل صفاقی تزریق شد. گروه دوم به مدت ۵ روز ۱۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن پی پرین داخل صفاقی دریافت کرد. پی پرین پودر ابتدا در ۱٪ حجم نهایی Tween ۸۰ پخش شده و سپس با افزودن نرمال سالین به حجم مورد نظر رسانده شد. به گروه سوم به مدت ۵ روز پی پرین داخل صفاقی با همان دوز تزریق شد. در روز چهارم، ۴ ساعت پس از تزریق پی پرین، استامینوفن با دوز ۵۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن و در پنجمین روز نیز ۴ ساعت پس از تزریق پی پرین، استامینوفن با دوز ۱۰۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن تزریق شد. گروه چهارم به مدت ۳ روز ۱ میلی لیتر/ کیلوگرم سالین داخل صفاقی، در روز چهارم، هم زمان با گروه های سوم و پنجم، استامینوفن با دوز ۵۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن و در روز پنجم استامینوفن با دوز ۱۰۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن دریافت کرد. گروه پنجم، به مدت ۵ روز ۲۵ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن سیلای مارین داخل صفاقی به عنوان کنترل مثبت، در روز چهارم، ۴ ساعت پس از تزریق سیلای مارین، استامینوفن با دوز ۵۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن و در پنجمین روز نیز ۴ ساعت پس از تزریق سیلای مارین، استامینوفن با دوز ۱۰۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن دریافت کرد. در روز ششم، ۲۰ ساعت پس از تزریق دوز دوم استامینوفن، رت ها با کلروفرم به تدریج بیهوش شده و خون گیری از شریان اگزیلاری انجام شد. از کبد و کلیه جهت بررسی های هیستوپاتولوژیک نمونه گرفته شد. به دلیل حلالیت کم استامینوفن، محلول‌های آن در حجم‌های بیشتری تهیه و در مقادیر ۱۰ و ۲۰ میلی لیتر در کیلو گرم وزن بدن رت ها تزریق شد. برای جداسازی سرم، خون تهیه شده به مدت ۱ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (با دور ۳۰۰۰) شد. بعد از جداسازی، سرم در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. فعالیت آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در سرم با استفاده از کیت های commercial و فعالیت Total Antioxidant با روش FRAP (ferric reducing ability of plasma) ارزیابی شد. داده های حاصل از آنزیم‌های کبدی و سنجش FRAP به صورت میانگین ±SEM نشان داده شده است. در سنجش FRAP، نمودار جذب نوری در مقابل غلظت‌های مختلف نمونه های استاندارد رسم شد. معادله خط و نیز ضریب R^2 معدل ۰/۹۹۸، شیب و عرض از مبداء خط کالیبراسیون محاسبه گردید. با توجه به توزیع داده ها، برای تحلیل از تست غیر پارامتریک Kruskal-Wallis H test استفاده شد. در صورت لزوم نیز برای مقایسه دو گروه از تست Mann-Whitney U test استفاده گردید و $p<0/05$ معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها

اثر پی پرین بر میزان آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز پس از مسمومیت با استامینوفن: همانگونه که انتظار می‌رفت رت هایی که به تنهایی استامینوفن دریافت کردند، افزایش چشمگیری در میزان این آنزیم نشان دادند که در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین، اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p<0/001$). گروه رت های دریافت کننده پی پرین به صورت چهار روز درمان قبل از نمونه گیری افزایش قابل توجهی در این آنزیم نشان ندادند که با گروه

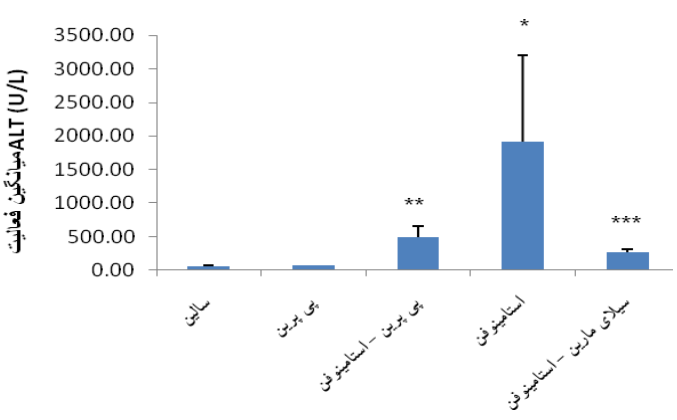
[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.1.3]

سالین قابل مقایسه است. از طرفی پی پرین به صورت پیش مداوا (pretreatment) در گروه پی پرین- استامینوفن توانست کاهش قابل توجهی در میزان آنزیم مربوطه پس از مسمومیت با استامینوفن ایجاد کند که البته تفاوت مشاهده شده در مقایسه با گروه استامینوفن از نظر آماری معنی دار نبود. بین گروههای پی پرین و پی پرین- استامینوفن اختلاف معنی داری مشاهده شد (p<۰/۰۰۱). رت های گروه سیلای مارین- استامینوفن که به صورت پیش مداوا سیلای مارین دریافت کردند، کاهش قابل ملاحظه ای در بالا رفتن آنزیم AST پس از مسمومیت با استامینوفن نشان دادند که البته در مقایسه با گروه استامینوفن از نظر آماری تفاوت معنی داری مشاهده نشد. مقایسه انجام شده بین گروه های پی پرین- استامینوفن و سیلای مارین- استامینوفن، نشان داد که بین این دو گروه نیز اختلاف معنی داری وجود ندارد (نمودار ۱).



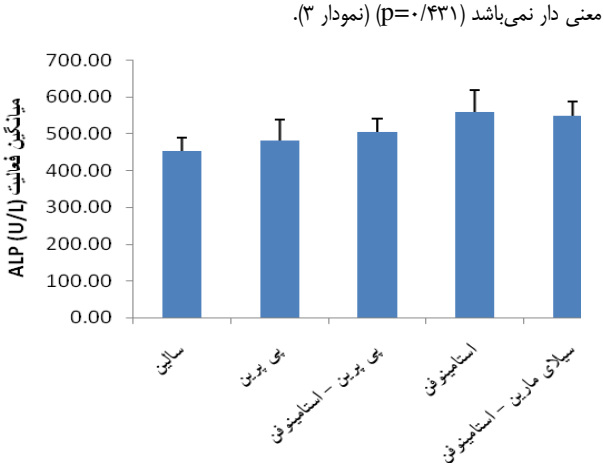
نمودار ۱. میانگین (SEM) میزان آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز در گروه های درمانی پنج گانه مورد مطالعه از رت های نر شامل سالین (۱ میلیلیتر/کیلوگرم)، پی پرین (۱۰ میلیگرم/کیلوگرم)، استامینوفن (تا ۱۰۰۰ میلیگرم/کیلوگرم) و سیلایمارین (۲۵ میلیگرم/کیلوگرم). تعداد رت در هر گروه ۸ سر بوده است. * تفاوت استامینوفن با گروه سالین با p<۰/۰۱ معنی دار است. ** تفاوت بین گروه پی پرین و پی پرین- استامینوفن با p<۰/۰۱ معنی دار است.

اثر پی پرین بر میزان آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز پس از مسمومیت با استامینوفن: رت های گروه استامینوفن، افزایش چشمگیری در میزان ALT نشان دادند که این میزان در مقایسه با گروه سالین از نظر آماری تفاوت معنی داری نشان داد (p<۰/۰۰۱). در گروه پی پرین افزایش قابل توجهی در میزان ALT مشاهده نشد که با گروه سالین قابل مقایسه است (جدول ۱). پی پرین به صورت پیش مداوا در گروه پی پرین- استامینوفن توانست کاهش قابل توجهی در میزان این آنزیم پس از مسمومیت با استامینوفن ایجاد کند که البته تفاوت مشاهده شده در مقایسه با گروه استامینوفن از نظر آماری معنی دار نبود. بین گروه های پی پرین و پی پرین- استامینوفن اختلاف معنی داری در میزان ALT مشاهده شد (p<۰/۰۰۱). رت های گروه سیلای مارین- استامینوفن کاهش قابل ملاحظه ای در بالا رفتن آنزیم ALT پس از مسمومیت با استامینوفن نشان دادند که در مقایسه با گروه استامینوفن از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود داشت (p=۰/۰۴۹). بین گروههای پی پرین- استامینوفن و سیلای مارین- استامینوفن اختلاف معنی داری وجود ندارد (نمودار ۲).



نمودار ۲. میانگین (SEM) میزان آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز در گروه های درمانی پنج گانه مورد مطالعه از رت های نر شامل سالین (۱ میلیلیتر/کیلوگرم)، پی پرین (۱۰ میلیگرم/کیلوگرم)، استامینوفن (تا ۱۰۰۰ میلیگرم/کیلوگرم) و سیلایمارین (۲۵ میلیگرم/کیلوگرم). تعداد رت در هر گروه ۸ سر بوده است. * تفاوت با سالین با p<۰/۰۱ معنی دار است. ** تفاوت بین گروه پی پرین و پی پرین- استامینوفن با p<۰/۰۱ معنی دار است. * تفاوت بین گروه سیلایمارین- استامینوفن و استامینوفن با p=۰/۰۴۹ معنی دار است.**

اثر پی پرین بر میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز پس از مسمومیت با استامینوفن: تفاوت چشمگیری در میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز در بین گروهها مشاهده نشد (جدول ۱). میزان ALP در گروه استامینوفن در مقایسه با گروه سالین تفاوت معنی داری را از نظر آماری نشان نداد (p=۲۰۳). بین گروه های پی پرین و پی پرین- استامینوفن نیز اختلاف معنی دار نبود (p=۰/۹۱۶). تفاوت مشاهده شده بین گروههای استامینوفن و پی پرین- استامینوفن معنی دار نبود (p=۰/۴۸۷). بین گروه های استامینوفن و سیلای مارین- استامینوفن نیز تفاوت معنی دار نبود (p=۰/۸۱۷). مقایسه انجام شده بین گروه های پی پرین- استامینوفن و سیلی مارین- استامینوفن نشان داد که بین این دو گروه نیز اختلاف معنی دار نمی‌باشد (p=۰/۴۳۱) (نمودار ۳).



نمودار ۳. میانگین (SEM) میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروههای درمانی پنج گانه مورد مطالعه از رت های نر شامل سالین (۱ میلیلیتر/کیلوگرم)، پی پرین (۱۰ میلیگرم/کیلوگرم)، استامینوفن (تا ۱۰۰۰ میلیگرم/کیلوگرم) و سیلایمارین (۲۵ میلیگرم/کیلوگرم). تعداد رت در هر گروه ۸ سر بوده است.

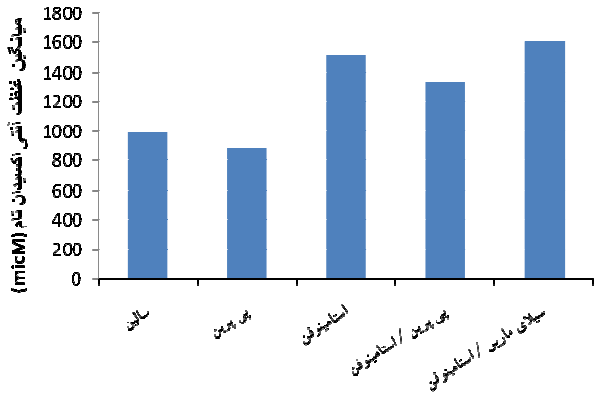
[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.1.3]

جدول ۱. میانگین (انحراف معیار) فعالیت آنزیمهای کبدی و میزان آنتی اکسیدانی تام در گروههای درمانی با یا بدون مسمومیت با استامینوفن

گروههای درمانی	ALT (u/l)	AST (u/l)	ALP (u/l)	FRAP (micM)
سالین (۱ ml/kg)	۶۴/۸۸±۱۰/۷۱	۲۴۸/۱۳±۵۳/۴۹	۴۵۳/۲۵±۱۰۴/۳۷	۹۹۵/۲±۱۵۵/۷
پی پرین (۱۰ mg/kg)	۷۱/۷۵±۱۱/۴۹	۲۵۱±۵۸/۹۳	۴۸۱/۹±۱۵۷/۷	۸۸۵/۶۷±۱۳۶/۰۵
استامینوفن (۱۰۰۰ mg/kg)	۴۹۶±۴۶۳/۵۵	۱۷۱۱/۲۵±۱۱۰۸/۶۵	۵۰۴/۶۳±۱۰۳/۱۳	۱۳۳۰/۹±۵۱۰/۴۵
پی پرین + استامینوفن	۱۹۱۴/۵۷±۳۴۱۳/۴۷	۳۹۵۶/۳±۵۹۳۴/۷	۵۵۸/۶±۱۶۰/۸۷	۱۵۱۷/۹±۶۷۲/۳
سیلایمارین (۲۵ mg/kg)+ استامینوفن	۲۶۹/۲۵±۱۴۲/۵۷	۱۱۶۷/۵±۵۹۵/۷	۵۴۸/۱۳±۱۰۹/۰۵	۱۶۱۲/۷±۶۹۱/۸

AlT: alanine amino transferase, AST: aspartate amino transferase, ALP: alkaline phosphatase, FRAP: ferric reducing ability of plasma

اثر پی پرین بر میزان توتال آنتی اکسیدان پس از مسمومیت با استامینوفن: میزان توتال آنتی اکسیدان در گروه استامینوفن بیشتر از گروه سالین و پی پرین بود (جدول ۱). مقایسه داده های گروه استامینوفن با گروه سالین نشان داد که بین این دو گروه، تفاوت معنی دار می‌باشد (p=۰/۰۰۹). همچنین تفاوت بین گروه استامینوفن با گروه پی پرین نیز معنی دار بود (p=۰/۰۰۳). اختلاف معنی داری بین گروههای پی پرین و پی پرین- استامینوفن مشاهده شد (p=۰/۰۰۳). بین گروه های استامینوفن و پی پرین-استامینوفن تفاوت معنی دار نبود. بین گروه های استامینوفن و استامینوفن- سیلی مارین نیز اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در مقایسه بین گروه پی پرین- استامینوفن با گروه سیلای مارین- استامینوفن تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۴).



نمودار ۴. میانگین (SEM) میزان توتال آنتی اکسیدان با استفاده از تست FRAP در گروه های درمانی پنج گانه مورد مطالعه از رتهای نر شامل سالین (۱ میلیلیتر/کیلوگرم)، پی پرین (۱۰ میلیگرم / کیلوگرم)، استامینوفن (تا ۱۰۰۰ میلیگرم/کیلوگرم) و سیلایمارین (۲۵ میلیگرم/کیلوگرم). تعداد رت در هر گروه ۸ سر بوده است. *تفاوت بین گروه سالین و استامینوفن با p=۰/۰۰۹ معنی دار است. **تفاوت بین گروه پی پرین با استامینوفن و استامینوفن با پی پرین- استامینوفن با p=۰/۰۰۳ معنی دار است.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر پی پرین مورد استفاده، سبب اثرات کاهشی در فعالیت آنزیمهای AST و ALT در مقایسه با استامینوفن گردید. هر چند این تغییرات از نظر آماری معنی دار نبودند ولی کمک می کنند تا در این زمینه بررسیهای بیشتری صورت گیرند. علیرغم اینکه استامینوفن یک داروی ضد درد و ضد تب بی خطر در دوزهای نرمال است ولی در مسمومیت به دلیل عدم سم زدایی کامل به وسیله کبد برای حذف کامل NAPQI می‌تواند به شدت خطرناک باشد. تاکنون تاثیرات اکسیداتیو NAPQI بر روی سلول‌های کبدی محرز شده است (۲۴و۲۳). بنابراین اغلب اقدامات در جهت مقابله با آن به نوعی حذف آثار اکسیداسیون متابولیت فعال استامینوفن است. علاوه بر درمان‌های استاندارد مثل تجویز داروهای خنثی کننده اثر الکتروفیلی NAPQI مثل NAC و درمان‌های دیگری نیز به کار رفته‌اند که آثار قابل توجه آنتی اکسیدانی دارند (۲۶و۲۵). پی پرین اثرات آنتی اکسیدانی برجسته ای دارد که در مطالعات قبلی به آن‌ها اشاره شده است (۲۸و۲۷). علاوه بر این پی پرین موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های CYP2E1 (۲۱) و CYP3A (۲۰) می‌شود.

علیرغم اینکه در این مطالعه پی پرین سبب کاهش مشخصی در فعالیت آنزیم‌های AST و ALT در مقایسه با گروه دریافت کننده استامینوفن شد، ولی از نظر آماری اختلافات به دست آمده معنی دار تلقی نشد هرچند شیب تغییرات به نفع پیشگیری از افزایش این آنزیم‌ها است. اگر تعداد نمونه های کار شده افزایش می‌یافت و یا دوز های بالاتری از پی پرین استفاده می‌شد، این اختلاف از نظر آماری معنی دار می‌شد. در عین حال در برخی از مطالعات تاثیر پی پرین به طور معنی داری در کاهش آثار بیوشیمیایی استامینوفن نشان داده شد (۲۲). لازم به ذکر است که تغییرات در این آنزیم‌ها به تنهایی نمی‌تواند معیاری کامل از اثر بخشی یا عدم اثرات پی پرین در مسمومیت استامینوفن باشد و برای تایید اثرات واقعی پی پرین نیاز به مطالعات تکمیلی مثلا هیستوپاتولوژیک است که در ادامه این مطالعه در حال انجام است. با نگاهی به سطح آنزیم‌های کبدی مشخص می‌شود که استامینوفن در آنزیم‌های AST و ALT افزایش بسیار زیادی نسبت به گروه سالین و حتی پی پرین به تنهایی ایجاد می‌کند.

افزایش این آنزیم‌ها شاخص بیوشیمیایی برجسته ای از آسیب کبدی است. پی پرین علیرغم کاهش قابل توجه در میزان این آنزیم‌ها در حضور استامینوفن، اثر معنی داری ایجاد نکرد. احتمالا افزایش دوز یا دوره پیش درمان بتواند اثر برجسته تری از پی پرین نشان دهد. هرچند در همین حد هم می‌توان گفت که احتمالا پی پرین باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های متابولیزه کننده استامینوفن شده است هرچند کافی نیست ولی این کاهش احتمالی در فعالیت این آنزیم‌هاست که سبب شده است احتمالا تولید متابولیت سمی NAPQI کمتر شود. دلیل دیگری

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.1.3]

که ممکن است برای علت معنی دار نشدن اثر پی پرین در مقابل استامینوفن در میزان آنزیم‌های کبدی بیان کرد شاید مربوط به دوز های استامینوفن باشد که احتمالا برای چنین مطالعه ای شاید بسیار بالاست و بهتر بود که از دوز های Sub lethal استفاده می‌شد. شاید در این صورت اثر پی پرین به طور برجسته تری ظاهر می‌شد.

از اثرات دیگر پی پرین اثر آنتی اکسیدانی آن است که در مطالعات فراوانی به آن پرداخته شده است (۲۸و۲۷). با توجه به این اثر انتظار می‌رفت که پی پرین باعث شود تا اثرات اکسیدانی متابولیت استامینوفن در سرم رت های مورد آزمایش به طور چشم گیری کاهش یابد همچنین آثار آنتی اکسیدانی خود را نیز به طور برجسته ای نشان دهد. درحالیکه نتایج بدست آمده با تست FRAP عکس موارد مورد انتظار را نشان داد. در گروه دریافت کننده استامینوفن حتی این اثر آنتی اکسیدانی برجسته تر است. این وضعیت را شاید بتوان اینگونه تفسیر نمود که باتوجه به اینکه آثار اکسیدانی متابولیت سمی بسیار بالاست این واکنش بدنی است که سبب آزاد شدن بیش از حد عوامل آنتی اکسیدان می‌شود تا ظرفیت مقابله با متابولیت اکسیدان را افزایش دهد. این توجیه قبلا در خصوص واکنش‌های آنتی اکسیدانی بدن در یک مطالعه گزارش شده است (۲۹). البته در آن مطالعه زمان کوتاهی پس از مطالعه ظرفیت آنتی اکسیدانی نمونه ها اندازه گیری شد. در مطالعه ما زمان دریافت دوز دوم استامینوفن تا زمان نمونه برداری ۲۰ ساعت بود. احتمالا بدن در دراز مدت از ذخایر دیگر خود عوامل آنتی اکسیدان را آزاد می‌کند که این موضوع نیاز به بررسی دقیق‌تر دارد. در خصوص آثار سیلای مارین نیز با توجه به مکانیسم‌های ذکر شده در مطالعات گذشته (۳۱و۳۰) آثار دیده شده بر روی آنزیم‌های کبدی قابل انتظار بود و در مواردی اختلاف داده‌ها در گروه استامینوفن تنها با استامینوفن و سیلای مارین از نظر آماری معنی دار بود. اما در آثار آنتی اکسیدان آن، تغییراتی دیده شد که شبیه اثرات پی پرین است و با همان استدلال توجیه می‌شود که احتمالا بدن در واکنش به این دارو ظرفیت آنتی اکسیدانی را بر حسب عدم ضرورت کاهش داده است.

بر اساس یافته های این مطالعه می‌توان پیشنهاد داد که پی پرین تا حدودی می‌تواند از آثار افزایشی استامینوفن در میزان آنزیم‌های کبدی جلوگیری کند یا در واقع از اثرات مخرب کبدی آن بکاهد هرچند برای تایید این فرضیه نیاز است که یافته های هیستوپاتولوژیک استخراج شود تا آن را تایید نماید. از طرفی ظرفیت آنتی اکسیدانی در حضور پی پرین علیرغم انتظار کاهش یافته است که احتمالا در اثر پاسخ بدنی است. یعنی در صورت وجود پی پرین نیاز نیست بدن به طور واکنشی ظرفیت مقابله با NAPQI را با آزاد کردن آنتی اکسیدان ها افزایش دهد یعنی اثر آنتی اکسیدانی پی پرین تا حد زیادی مصرف آنتی اکسیدان های بدنی را کاهش می‌دهد. این مسئله در مورد سیلای مارین هم صدق می‌کند. به هر حال برای افزایش آگاهی و دانش بیشتر در خصوص این مکانیسم‌ها نیاز به مطالعات تکمیلی بیشتر با طراحی دوز های متفاوت است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری آقای مصطفی شیخ زاده و خانم ماریا هاشمی تشکر می شود.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.1.3]

Effect of Piperine Pretreatment on Biochemical Profiles of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats

M.T. Kazemi (MD) [1], M. Pour Nasrollah (MD) [2], M.M. Rezaei (MD) [1], S.G.A. Jorsaraei (PhD)[3], Gh. Maliji (PhD)[4], S. Kazemi (MSc)[5], E. Zabihi (PhD)[6], M. Pouramir (PhD)[7], A.A. Moghadamnia (PharmD, PhD)[5*]

1. Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
2. Department of Pathology, Amirkola Children Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
3. Fatemeh Zahra Infertility and Reproductive Health Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
4. Department of Immunology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
5. Department of Pharmacology, Cellular & Molecular Biology Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
6. Department of Pharmacology & Physiology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
7. Department of Biochemistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(4); Jul 2012; pp: 7-14.

Received: Nov 22nd 2011, Revised: Feb 8th 2012, Accepted: May 3rd 2012.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Acetaminophen overdose is the most frequent cause of liver injuries. N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) has been proposed as the toxic metabolite of acetaminophen induced by cytochrome P-450. Piperine has antioxidant activities and has been introduced as an inhibitor of CYP3A and P4502E1 activities. This study was done to evaluate pretreatment effect of piperine in acetaminophen induced hepatotoxicity in rat.

METHODS: In this study, the rats (weighing 150-250g) were divided into 5 groups: saline, piperine (10 mg/kg), acetaminophen (sequential doses of 500 and 1000 mg/kg within 18 hours), piperine with acetaminophen and silymarin (25 mg/kg) with acetaminophen. Activity of alkaline phosphatase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in serum were evaluated and the total antioxidant activity was measured by FRAP method.

FINDINGS: Piperine as pretreatment prevented increasing in AST and ALT after acute acetaminophen poisoning (respectively, 1711.25±1108.65 and 496±463.55, compared to acetaminophen, 3956.29±5934.73 and 1914.57±3413.47). Total antioxidant level in acetaminophen group was higher than the saline and piperine groups (respectively, $p<0.009$ and $p<0.003$) but no statistical significant differences in results were seen between piperine-acetaminophen and silymarin-acetaminophen groups.

CONCLUSION: Piperine may partially prevent increasing level of the enzymes after acetaminophen poisoning. It may be concluded that in presence of piperine the level of antioxidants trends to be decreased. In other word, piperine can decrease the need of high antioxidant capacity to deal NAPQI produced following acetaminophen induced hepatotoxicity.

KEY WORDS: *Acetaminophen, Piperine, Silymarin, N-acetyl-p-benzoquinone imine, Aspartate aminotransferase, Alanine aminotransferase, Antioxidant, Ferric reducing ability of plasma.*

***Corresponding Author;**
Address: Department of Pharmacology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
Tel: +98 111 2199591-4
E-mail:moghadamnia@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.1.3]

References

1.D'Arcy PF. Paracetamol. Adverse Drug React Toxicol Rev 1997;16(1):9-14.

2.Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. J Pharmacol Exp Ther 1973;187(1):185-94.

3.Cohen SD, Khairallah EA. Selective protein arylation and acetaminophen-induced hepatotoxicity. Drug Metab Rev 1997;29(1-2):59-77.

4.Meyers LL, Beierschmitt WP, Khairallah EA, Cohen SD. Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. Toxicol Appl Pharmacol 1988;93(3):378-87.

5.Ramsay RR, Rashed MS, Nelson SD. In vitro effects of acetaminophen metabolites and analogs on the respiration of mouse liver mitochondria. Arch Biochem Biophys 1989;273(2):449-57.

6.Jaeschke H. Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol. J Pharmacol Exp Ther 1990;255(3):935-41.

7.Tirmenstein MA, Nelson SD. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols. Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. J Biol Chem 1990;265(6):3059-65.

8.Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. Hepatology 2004; 40(5): 1170-1179.

9.Adams ML, Pierce RH, Vail ME, et al. Enhanced acetaminophen hepatotoxicity in transgenic mice overexpressing BCL-2. Mol Pharmacol 2001;60(5):907-15.

10.Knight TR, Jaeschke H. Acetaminophen-induced inhibition of Fas receptor-mediated liver cell apoptosis: mitochondrial dysfunction versus glutathione depletion. Toxicol Appl Pharmacol 2002;181(2):133-41.

11.Raucy JL, Lasker JM, Lieber CS, Black M. Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2. Arch Biochem Biophys 1989;271(2):270-283.

12.Guo GL, Moffit JS, Nicol CJ, et al. Enhanced acetaminophen toxicity by activation of the pregnane X receptor. Toxicol Sci 2004;82(2):374-80.

13.Chen W, Koenigs LL, Thompson SJ, et al. Oxidation of acetaminophen to its toxic quinone imine and nontoxic catechol metabolites by baculovirus-expressed and purified human cytochromes P450 2E1 and 2A6. Chem Res Toxicol 1998;11(4):295-301.

14.Dong H, Haining RL, Thummel KE, Rettie AE, Nelson SD. Involvement of human cytochrome P450 2D6 in the bioactivation of acetaminophen. Drug Metab Dispos 2000;28(12):1397-400.

15.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.

16.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.

17.Sunila ES, Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. J Ethnopharmacol 2004;90(2-3):339-46.

18.Moghadamnia AA, Afraz E. The effects of piperine on the jumping induced by naloxone in morphine dependent mice. DARU 2001;4(1-2):41-3.

19.Madani ZS, Moghadamnia AA, Kashiri Z. Effect of piperine for management of pulpal dental pain. J Babol Univ Med Sci 2002;4(4):13-16. [in Persian]

20.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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.1.3]

21.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.

22.Sabina EP, Souriyan ADH, Jackline D, Rasool MK. Piperine, an active ingredient of black pepper attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. Asian Pac J Trop Med 2010;3(12):971-6.

23.Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. Proc Natl Acad Sci U S A 1984;81(5):1327-31.

24.Dahlin DC, Nelson SD. Synthesis, decomposition kinetics, and preliminary toxicological studies of pure N-acetyl-p-benzoquinone imine, a proposed toxic metabolite of acetaminophen. J Med Chem 1982;25(8):885-6.

25.Piperno E, Berssenbruegge DA. Reversal of experimental paracetamol toxicosis with N-acetylcysteine. Lancet 1976; 2(7988):738-9.

26.Peterson RG, Rumack BH. Treating acute acetaminophen poisoning with acetylcysteine. JAMA 1977;237(22): 2406-7.

27.Mittal R, Gupta RL. In vitro antioxidant activity of piperine. Methods Find Exp Clin Pharmacol 2000;22(5):271-4.

28.Vijayakumar RS, Surya D, Nalini N. Antioxidant efficacy of black pepper (Piper nigrum L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. Redox Rep 2004;9(2):105-10.

29.Dadkhah A, Fatemi F, Kazemnejad S, Rasmi Y, Ashrafi-Helan J, Allameh A. Differential effects of acetaminophen on enzymatic and non-enzymatic antioxidant factors and plasma total antioxidant capacity in developing and adult rats. Mol Cell Biochem 2006;281(1-2):145-52.

30.Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin--new effects and applications. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2005;149(1):29-41.

31.Kosina P, Kren V, Gebhardt R, Grambal F, Ulrichova J, Walterova D. Antioxidant properties of silybin glycosides. Phytother Res 2002;16 (Suppl 1):S33-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.1.3]