

Effect of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine on Liver CYP2C19 Enzyme Activity in Isolated Perfused Rat Liver Using Omeprazole Probe

Mohammadreza Rouini¹,
Navid Neyshaburinezhad²,
Alireza Foroumadi³,
Hoda Lavasani⁴,
Yalda Hosseinzadeh Ardakani⁵

¹ Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Resident in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ MSc in Developmental Biology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received September 28, 2019 ; Accepted May 20, 2020)

Abstract

Background and purpose: This study aimed at investigating the effects of 3,4-Methylenedioxy methamphetamine (MDMA) on liver cytochrome 2C19 enzyme activity, which is a major liver enzyme in the metabolism of a wide range of drugs, using omeprazole as a probe of the CYP2C19 activity in isolated perfused rat liver.

Materials and methods: This experimental study was done in 20 male Sprague–Dawley (SD) rats (weighing 250–300 g). After isolating the animal liver, omeprazole was administered at 400 µm and the concentration of omeprazole and its metabolite were determined. The liver was then washed with perfusion buffer, and MDMA was transferred at 300 ng/ml unilaterally from the same liver for 30 minutes. After re-washing the liver with perfusion buffer, omeprazole was passed through the liver for second time and the metabolic ratio was determined after exposure to MDMA. This process was also done in a group of animals at 600 ng/ml of MDMA.

Results: Analysis of data from three end-time intervals after exposure to liver at 300 and 600 ng/ml of MDMA, showed 26.6% and 20.6% reduction in the activity of CYP2C19. Findings showed that MDMA administration could significantly reduce the activity of CYP2C19.

Conclusion: According to this study, liver exposure to MDMA can significantly reduce cytochrome 2C19 activity, but, further studies are needed to examine this issue more closely.

Keywords: metabolism, MDMA, omeprazole, liver perfusion, CYP2C19

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (187): 1-14 (Persian).

* Corresponding Author: Yalda Hosseinzadeh Ardakani - Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: yh-ardakani@tums.ac.ir)

بررسی اثرات اکستاسی بر روی فعالیت سیتوکروم 2C19 کبدی با استفاده از پروب امپرازول در مدل پرفیوژن کبدی موش صحرایی

محمدرضا روئینی^۱
نوید نیشابوری نژاد^۲
علیرضا فرومدی^۳
هدی لواسانی^۴
یلدا حسین زاده اردکانی^۵

چکیده

سابقه و هدف: این پژوهش در راستای بررسی اثرات مهارى اکستاسی (MDMA) بر روی فعالیت آنزیمی سیتوکروم 2C19 کبدی که یکی از آنزیم‌های مهم کبدی در پروسه متابولیسم طیف وسیعی از داروها می‌باشد، با استفاده از امپرازول به عنوان نشانگر فعالیت آنزیم (پروب) سیتوکروم 2C19 و روش پرفیوژن کبد ایزوله شده موش صحرایی انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از ۲۰ موش صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley با وزن ۲۵۰ الی ۳۰۰ گرم استفاده شد. پس از ایزوله نمودن کبد حیوان، امپرازول با غلظت ۴۰۰ میکرومولار عبور داده شده و غلظت امپرازول و متابولیت آن تعیین شد. سپس کبد با بافر پرفیوژن شستشو داده شده و MDMA با غلظت ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به صورت یکطرفه از همان کبد برای مدت ۳۰ دقیقه عبور داده شد. در مرحله بعد و متعاقب شستشوی مجدد کبد با بافر پرفیوژن، امپرازول برای بار دوم از کبد عبور داده شده و نسبت متابولیسی پس از مواجهه با MDMA تعیین گردید. این فرآیند در گروه دیگری از حیوانات با غلظت ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از MDMA نیز تکرار شد.

یافته‌ها: تحلیل داده‌های حاصل از نمونه‌های سه فاصله زمانی پایانی پس از مواجهه کبد با MDMA به ترتیب نشانگر ۲۶/۶ درصد و ۲۰/۶ درصد کاهش در میزان نسبت متابولیسی امپرازول در دو غلظت ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از ماده بود.

استنتاج: با توجه به نتایج این مطالعه، مواجهه کبد با MDMA می‌تواند موجب کاهش معنی‌دار در فعالیت سیتوکروم 2C19 شود. برای بررسی دقیق‌تر این موضوع نیاز به مطالعات بیش‌تر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: متابولیسم، اکستاسی، امپرازول، پرفیوژن کبدی یکطرفه، سیتوکروم 2C19

مقدمه

بین ۰/۳ تا ۱/۳ درصد از مردم جهان، حداقل یک بار از مواد آفتامینی استفاده نموده‌اند (۲۰۱). اکستاسی یا ۳،۴-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)

در دو دهه اخیر، مصرف مواد محرک آفتامینی، از بزرگ‌ترین معضله‌های سوء مصرف مواد در سراسر جهان بوده است. به گزارش سازمان ملل در سال ۲۰۰۹ میلادی

مؤلف مسئول: یلدا حسین زاده اردکانی: تهران، میدان انقلاب اسلامی، خیابان ۱۶ آذر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی E-mail:yh-ardakani@tums.ac.ir

۱. استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. رزیدنت علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

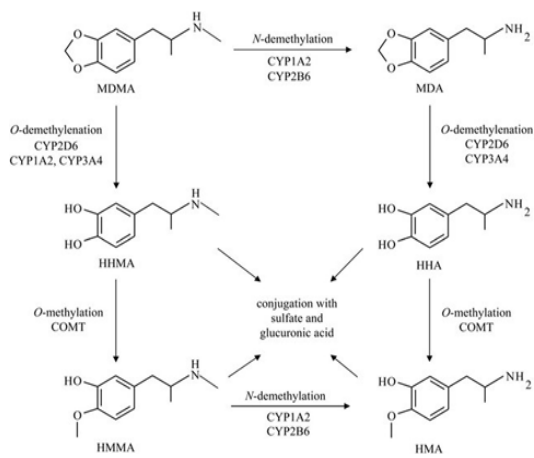
۳. استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴. کارشناس ارشد زیست‌شناسی تکاملی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵. دانشیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۹/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۲/۳۱

صورت کامل جذب و وارد جریان خون و مسیره‌های متابولیکی در کبد می‌گردد. لذا کبد یکی از مهم‌ترین ارگان‌های درگیر در بروز سمیت شدید ناشی از سوء مصرف این ماده می‌باشد. در فرآیند متابولیسم MDMA، دو مسیر O-دمتیلناسیون (O-demethylenation) و N-دمتیلناسیون (N-demethylation) مطرح هستند که هر یک توسط آنزیم‌های جداگانه‌ای صورت می‌گیرند (تصویر شماره ۱) (۱۲).



تصویر شماره ۱: شکل شماتیک فرآیند متابولیسم MDMA

در حین متابولیسم و در طی فرآیند O-دمتیلناسیون استخلاف متیلن دی‌اکسی موجود در این ماده، ترکیبات فعال کاتکولی با نامهای ۳،۴-دی‌هیدروکسی مت‌آمفتامین و ۳،۴-دی‌هیدروکسی آمفتامین ایجاد می‌شوند که این ترکیبات، پتانسیل تولید ترکیبات فعال ارتوکینونی، در مسیرهای متابولیکی بعدی را دارا هستند. ساختارهای اورتوکینونی از نظر شیمیایی بسیار فعال بوده و قادر به واکنش با ساختارهای نوکلئوفیل داخل سلولی مانند گروه‌های سیستین، گلوکوتیون احیا شده و سولفیدریل هستند که این واکنش، با ایجاد اختلال در ساختار ماکرومولکول‌هایی نظیر پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA، منتهی به مهار عملکردی ماکرومولکول و آسیب‌های شدید سلولی می‌شود. بسیاری از سمیت‌های سلولی مشاهده شده در ارگان‌هایی نظیر کلیه، مغز، قلب و کبد متعاقب سوء

یکی از مشهورترین محرک‌های صنعتی و اعتیادآور رایج در میان جوانان بوده و به نام‌های اکستاسی، (E) ای، (X) اکس و ETC معروف است. این ترکیب، در نقش یک آگونیست غیرمستقیم، موجب افزایش آزادسازی و جلوگیری از باز جذب پیش سیناپسی سروتونین، دوپامین و نوراپی نفرین شده و با افزایش غلظت این میانجی‌های عصبی، موجب بروز علائم گول زنده جسمی همچون احساس هوشیاری، به تأخیر افتادن خستگی و خواب آلودگی، داشتن انرژی و استقامت، برانگیختگی جنسی و علائم مطلوب روانی شامل احساس خودمانی بودن، سرخوشی، احساس سلامت، برون‌گرایی و اجتماعی شدن و ... می‌گردد (۳،۴). از سوی دیگر، مصرف این ماده نیز همانند سایر داروهای محرک و توهم‌زا، موجب بروز عوارض جانبی کوتاه مدت و بلند مدت بسیاری در عملکردهای جسمی فرد می‌شود. از جمله عوارض کوتاه مدت آن می‌توان به قفل شدن فک، بی‌قراری، عدم توانایی صحیح در صحبت کردن، تعریق زیاد و غیرعادی، افزایش ضربان قلب و فشارخون، سردرد، تهوع و استفراغ، افزایش دمای بدن و مرگ، حتی به هنگام مصرف مقادیر کم، اشاره نمود (۵). عوارض بلند مدت، معمولاً در پی بروز تغییرات دائمی در نورون‌های مغزی افراد مصرف‌کننده ایجاد می‌گردند که شامل افسردگی‌های شدید مقاوم به درمان، مشکلات شناختی و حافظه و سمیت‌های شدید مغزی، قلبی و کبدی می‌باشد (۸-۶). مکانیسم‌های متعددی در خصوص علل بروز عوارض ناشی از مصرف این ماده پیشنهاد شده‌اند که از جمله می‌توان به هایپرترمی ناشی از تخریب هیپوتالاموس، تخریب عملکرد میتوکندری، تداخل‌های دارویی متعدد و همچنین سمیت شدید سلولی، ناشی از ایجاد متابولیت‌های فعال و مخرب، متعاقب متابولیسم این مواد، اشاره نمود. از این میان، مطالعات بسیاری، عوارض مشاهده شده در پی مصرف ترکیبات آمفتامینی را به متابولیت‌های فعال سمی ناشی از متابولیسم این مواد در بدن نسبت داده‌اند (۱۱-۹). پس از مصرف قرص‌های خوراکی اکستاسی، MDMA به

مصرف مواد محرک، به ترکیبات ثانویه ناشی از متابولیسم این مواد نسبت داده شده‌اند (۱۲).

مسیر متابولیسمی O-دمتیلناسیون، بیش‌تر توسط سیتوکروم 2D6 (۱۳) و پس از آن، سیتوکروم 3A4 و تا حدودی سیتوکروم‌های دیگر نظیر 2B6 و 1A2 انجام می‌پذیرد (۱۴). رخداد مهمی که در حین متابولیسم MDMA در این مسیر رخ می‌دهد، مهار برگشت‌ناپذیر آنزیم متابولیزه کننده به دست مواد حاصل از متابولیسم است که به آن "مهار براساس مکانیزم" (Mechanism Based Inhibition) و یا "خودکشی آنزیمی" نیز گفته می‌شود. دلیل این رخداد، ایجاد کمپلکس با ساختار کاربن در حین اتصال ماده (سوبسترا) به آنزیم و ایجاد اتصال برگشت‌ناپذیر محصول (متابولیت) با آنزیم، توضیح داده شده است (۱۵). همچنین بسیاری از دانشمندان نیز تشکیل گروه‌های اورتوکینونی در حین متابولیسم و حمله این گروه‌ها به خود آنزیم متابولیزه کننده را دلیل مهار متابولیسمی مشاهده شده، دانسته‌اند. شایان ذکر است به دلیل اتصال برگشت‌ناپذیر ایجاد شده با آنزیم، فعالیت آنزیم به صورت کامل مختل شده و تا زمان تولید مجدد این آنزیم در بدن، عملکرد آنزیمی در سلول‌ها مختل خواهد بود و یا به بیان دیگر تا زمان تولید مجدد آنزیم در بدن، فعالیت آنزیمی مورد نظر در بدن وجود نخواهد داشت. بر طبق مطالعاتی که تاکنون بر روی مهار متابولیسمی سیتوکروم 2D6 صورت پذیرفته است، تولید مجدد این آنزیم در بدن بین ۱۰ تا ۱۴ روز به طول می‌انجامد. از آنجا که احتمال مصرف داروهای مختلف در این افراد بسیار زیاد است، عدم فعالیت آنزیمی در مدت زمان مذکور، می‌تواند بسیار خطرناک بوده و منجر به بروز عوارض دارویی خطرناک و یا عدم مشاهده پاسخ درمانی در این افراد گردد. تولید گروه‌های اورتوکینونی ناشی از متابولیسم MDMA و همچنین اثر تخریبی آن بر سلول‌های کبدی، در مورد سیتوکروم 2D6 و مهار متابولیسمی این ایزوآنزیم، بررسی و به اثبات رسیده است (۱۶، ۱۴). اخیراً برخی مطالعات پر کلینیکال نشان داده‌اند که این واکنش مهاری، علاوه

بر آنزیم سیتوکروم 2D6 (سیتوکروم متابولیزه کننده اصلی)، در سایر آنزیم‌های متابولیزه کننده MDMA نیز که به صورت مستقیم در فرآیند دمتیلناسیون و تشکیل گروه‌های اورتوکینونی دخیل نیستند نیز، ممکن است رخ دهد. به نظر می‌رسد تشکیل گروه‌های فعال شیمیایی پس از متابولیسم دارو در این زمینه دخیل باشند (۱۷).

از آنجا که مطابق با فرضیه بیان شده، احتمال حمله گروه‌های فعال نوکلئوفیلی تولید شده در حین متابولیسم، به تمامی ماکرومولکول‌های موجود در سلول وجود دارد، تغییر عملکرد سایر سیستم‌های آنزیمی بدن که به هیچ عنوان در متابولیسم این مواد دخیل نیستند نیز، دور از ذهن به نظر نمی‌رسد. با توجه به این که اکستازی می‌تواند در افراد گوناگون و با احتمال مصرف داروهای مختلف در این افراد، مورد سوء مصرف واقع گردد، تغییر فعالیت سایر آنزیم‌ها نیز در این افراد، می‌تواند در پاسخ درمانی و یا بروز عوارض جانبی سایر دارو درمانی‌ها بسیار مهم باشد. لذا در این مطالعه، امکان بروز مهار متابولیسمی بر روی سیتوکروم 2C19 (به عنوان آنزیمی که در مسیر متابولیسم اکستازی نقش مستقیمی ندارد) بررسی گردید. بدین منظور، احتمال تغییر عملکرد و فعالیت آنزیمی، با استفاده از محاسبه تغییرات نسبت متابولیکی امپرازول به عنوان سوبسترای اختصاصی پذیرفته شده سیتوکروم 2C19 (پروپ)، متعاقب مواجهه کبد با غلظت‌های مختلف MDMA در مدل پرفیوژن کبدی یکطرفه موش صحرائی (۱۸، ۱۹) بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه محلول‌های ذخیره امپرازول و MDMA

در این مطالعه تجربی محلول ۴۰ میلی‌مولار امپرازول در متانول تهیه و سپس توسط فویل آلومینیوم از نور محافظت شده و برای استفاده در آزمون‌های مختلف در یخچال نگهداری شد (۲۰). همچنین محلول ذخیره MDMA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تهیه و در

۳- تعیین غلظتی از امپرازول که در آن فعالیت آنزیم CYP2C19 در محدوده اشباع قرار گیرد، به نحوی که امکان بررسی مهار آنزیمی احتمالی در حداکثر میزان فعالیت آنزیم فراهم گردد.

۴- تعیین مدت زمان لازم جهت شستشوی کبد پس از مواجهه با امپرازول.

۵- تعیین مدت زمان لازم جهت تماس کبد ایزوله شده با MDMA جهت حصول اطمینان از وقوع مهار متابولیسمی در بافت کبدی در دو غلظت ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر از آن.

۶- تعیین مدت زمان لازم برای شستشوی کبد پس از مواجهه با MDMA.

مطالعات حیوانی

طراحی گروه های مطالعه

در این مطالعه، از ۲۰ موش صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley با وزن ۲۵۰ الی ۳۰۰ گرم استفاده شد. این موش ها در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دما و رطوبت کنترل شده، نگهداری می شدند و دسترسی به آب و غذای یکسان داشتند. موش های صحرایی به صورت اتفاقی در سه گروه ذیل تقسیم شدند. گروه اول شامل ۸ موش صحرایی بود که در ۴ زیرگروه تقسیم شدند. در این گروه بافر پرفیوژن حاوی امپرازول با غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار از کبد ایزوله شده حیوان به روش پرفیوژن یک طرفه (هر زیرگروه شامل دو حیوان) به مدت یک ساعت عبور داده شد. هدف از انجام این بخش از مطالعه، بدست آوردن بهترین غلظت از سوبسترا (پروب امپرازول) جهت بررسی تغییرات فعالیت آنزیم و همچنین برآورد حداقل مدت لازم جهت دستیابی به حالت پایا از سوبسترا (پروب) و متابولیت در مایع پرفیوژن خارج شده از کبد بود.

یخچال نگهداری شد. غلظت های مورد نیاز بعدی نیز با رقیق سازی در بافر کریس - هنسلیت تهیه شد.

روش کلی انجام مطالعه

همان گونه که در مقدمه بیان شد، پژوهش حاضر با هدف بررسی میزان تغییرات فعالیت سیتوکروم 2C19 متعاقب مواجهه کبد ایزوله شده موش صحرایی با غلظت های مختلف MDMA طراحی گردید. شایان ذکر است گروه های حاضر در مطالعه بنحوی طراحی شدند که تغییرات ایجاد شده در میزان فعالیت آنزیم پیش و پس از مواجهه آن با MDMA، در هر کبد به صورت مجزا قابل مشاهده باشد تا از تاثیر تغییرات بین فردی در میزان فعالیت آنزیم مورد نظر، جلوگیری به عمل آید. مراحل انجام مطالعه به صورت شماتیک در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۲: مراحل انجام مطالعه به صورت شماتیک

لذا برای دستیابی به این هدف، مراحل زیر طراحی شده و به ترتیب انجام پذیرفتند:

۱- بهینه سازی روش تعیین مقدار پروب امپرازول (سوبسترا) و ۵- هیدروکسی امپرازول (متابولیت) در مایع پرفیوژن.

۲- تعیین مدت زمان لازم جهت تماس کبد ایزوله شده با پروب امپرازول به منظور دستیابی به تعادل حالت پایا (Steady State) در غلظت امپرازول و متابولیت آن در مایع پرفیوژن خروجی از کبد ایزوله شده حیوان.

در گروه دوم، ۴ حیوان به دو زیرگروه (هر زیر گروه شامل ۲ حیوان) تقسیم شدند تا مدت زمان لازم جهت شستشوی کبد با بافر پرفیوژن در مرحله اول و سوم شستشو (پس از مواجهه کبد با پروب امپرازول) و مرحله دوم شستشو (پس از مواجهه کبد با MDMA) مشخص شود.

در گروه سوم، ۸ حیوان به دو زیرگروه (هر زیر گروه شامل ۴ حیوان) جهت بررسی تاثیر عبور MDMA با غلظت‌های ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از کبد در فعالیت آنزیم مورد نظر، تقسیم شدند.

این مطالعه به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد اخلاق: ۲۹۴۱۴-۳۳-۰۲-۹۴ رسیده است.

نحوه انجام پرفیوژن کبدی

جهت ایزوله نمودن کبد حیوان و انجام آزمون پرفیوژن کبدی، ابتدا حیوان با ترکیبی از محلول کتامین (۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و محلول زایلین (۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و به روش تزریق داخل صفاقی بیهوش شد. پس از باز کردن حفره شکمی، ابتدا مجرای صفراوی توسط نخ بخیه مسدود شده و سپس ورید باب (مجرای ورودی مایع پرفیوژن) توسط آنژیوکت شماره ۱۶ کانوله گردید. برای جلوگیری از ایجاد لخته در مسیر، ۳ میلی‌لیتر نرمال سالین هپارینه با غلظت ۱۰ واحد در میلی‌لیتر از طریق آنژیوکت طوسی و ورید باب به کبد تزریق شد. در ادامه، دیافراگم و قفسه سینه باز شده و ورید اجوف فوقانی با استفاده از آنژیوکت شماره ۱۸ کانول گذاری شد. از این ورید به‌عنوان مجرای خروجی مایع پرفیوژن و به‌منظور نمونه برداری در زمان‌های مشخص، استفاده شد. سرعت جریان بافر پرفیوژن در کبد در طول آزمایش باید ثابت بماند. در این مطالعه سرعت جریان مایع ۸/۳ میلی‌لیتر در دقیقه بوده است. در طول روند پرفیوژن، محتویات مخزن توسط گاز کربوژن، اکسیژن‌دهی شده و کبد نیز با نرمال‌سالین ۳۷°C مرطوب نگه‌داشته شد.

جهت ارزیابی قابلیت زیستی کبد در طول آزمایش، درجه حرارت و pH بافر پرفیوژن و همچنین میزان آنزیم‌های کبدی (ALT و AST) در مایع پرفیوژن اندازه‌گیری شدند. روش آنالیز امپرازول و متابولیت آن: فاز متحرک شامل مخلوطی از محلول ۰/۲۲ مولار دی‌سدیم هیدروژن فسفات (Na₂HPO₄) که با اسید اورتو فسفریک به pH=۵/۹ رسانده شده است و استونیتریل با نسبت ۷۴ به ۲۶ (حجم/حجم) بود. فاز متحرک قبل از استفاده، توسط فیلترهای میلی‌پور (۰/۴۵ μM) فیلتر شد. جهت اندازه‌گیری دارو و متابولیت آن، فاز متحرک با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه از ستون مذکور در بخش دستگاه‌ها عبور داده شد. میزان جذب دارو و متابولیت آن در طول موج ۳۰۲ نانومتر بررسی شد. حجم نمونه‌های تزریقی به دستگاه ۱۰۰ میکرولیتر و زمان ۱۵ دقیقه برای هر تزریق در نظر گرفته شد. با استفاده از این روش، زمان نگهداری برای ۵- هیدروکسی امپرازول و امپرازول به ترتیب برابر ۳/۵ و ۱۲ دقیقه بود.

آماده سازی نمونه های پرفیوژن جهت تزریق به دستگاه HPLC

نمونه‌های پرفیوژن بعد از جمع‌آوری در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در زمان‌های تعیین شده، به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه قرار داده شدند تا سلول‌ها و ذرات سومی معلق آن‌ها جداسازی گردد. سپس ۱ میلی‌لیتر روی میکروتیوب‌ها به آهستگی با میکروپیپت جدا شده و به یک میکروپیپت جدید منتقل شده و سپس تا زمان انجام آنالیز در فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین مدت زمان لازم برای مواجهه کبد ایزوله شده با امپرازول به‌منظور دستیابی به حالت پایا از امپرازول در مایع پرفیوژن

از آن‌جا که جهت بررسی نسبت متابولیکی باید پرفیوژن کبدی تا زمانی ادامه یابد که غلظت‌های

سوبسترا (پروب) و متابولیت آن در مایع خارج شده از کبد به تعادل (حالت پایا) رسیده باشند، لذا در این بخش از مطالعه، به منظور محاسبه حداقل مدت زمان لازم جهت حصول اطمینان از دستیابی به تعادل در غلظت امپرازول و متابولیت آن در مایع خروجی پرفیوژن، محلول تهیه شده از امپرازول در بافر کربس با غلظت ۵۰ میکرومولار از کبد ایزوله موش صحرایی عبور داده شده و تا ۳۰ دقیقه پس از شروع پرفیوژن، در فواصل زمانی هر ۵ دقیقه از مایع خارج شده از کبد نمونه گیری شد و سپس با تعیین مقدار امپرازول و متابولیت آن، زمان مناسب برای رسیدن به تعادل و بررسی مراحل بعدی مطالعه محاسبه شد.

تعیین غلظتی از امپرازول که در آن غلظت، فعالیت آنزیم CYP2C19 در محدوده اشباع قرار گیرد

از آنجا که تولید متابولیت مورد نظر توسط مسیرهای متابولیکی دیگر نیز محتمل می باشد، در بسیاری منابع معتبر، جهت ارزیابی میزان نسبت متابولیکی پروب در محیط "برون تن" توصیه شده است که ارزیابی در غلظت اشباع (غلظتی برابر با حد اقل دو برابر Km گزارش شده از پروب) صورت گیرد (۲۱). لذا در این مطالعه و بمنظور تعیین محدوده غلظت اشباع پروب مورد استفاده، محلول هایی از امپرازول با غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار در بافر پرفیوژن تهیه و از کبد ایزوله شده موش صحرایی به مدت ۳۰ دقیقه عبور داده شد. در نهایت با تعیین مقدار امپرازول و متابولیت آن در مایع پرفیوژن خارج شده از کبد در زمان های مختلف و تعیین نسبت متابولیت به دارو، غلظت مناسب جهت انجام این مطالعه محاسبه شد.

تعیین مدت زمان لازم برای شستشوی کبد پس از مواجهه با امپرازول (مراحل شستشوی اول و سوم)

همان گونه که در مقدمه ذکر شد در طراحی این مطالعه و با هدف کاهش تاثیر تغییرات بین فردی در نتایج، بررسی تغییرات فعالیت آنزیم مورد نظر در هر

حیوان پیش و پس از مواجهه با اکستاسی بررسی گردید. به منظور دستیابی به این مهم، لازم بود که ابتدا پروب از کبد ایزوله شده عبور داده شود تا میزان تسبب متابولیکی پیش از مواجهه با اکستاسی تعیین شود و سپس کبد شستشو داده شده و در مواجهه با اکستاسی قرار گیرد. لذا جهت تعیین مدت زمان لازم برای شستشوی کبد پس از مواجهه اولیه با امپرازول و قرارگیری در برابر MDMA، پرفیوژن کبدی با بیشترین غلظت بکار گرفته شده در مطالعه (غلظت ۴۰۰ میکرومولار از امپرازول) به مدت ۳۰ دقیقه انجام و پس از اتمام مدت زمان ذکر شده، بافر کربس بدون حضور دارو از کبد ایزوله شده عبور داده شد و در فواصل زمانی ۵ دقیقه از مایع خارج شده از کبد نمونه گیری شد و پس از آنالیز نمونه های برداشت شده، زمانی که غلظت نمونه در آن به کم تر از ۵ درصد غلظت اولیه امپرازول رسیده باشد، به عنوان حداقل زمان لازم برای شستشو محاسبه گردید. شایان ذکر است از آنجا که در مطالعات مشابه انجام شده بر روی میکروزوم های کبدی، معمولاً به میزان ۵ تا ۱۰ برابر جهت خاتمه دادن به واکنش رقیق سازی می گردد، در این مطالعه نیز به دلیل پیچیده تر بودن فرآیند نسبت به میکروزوم های کبدی و امکان توزیع دارو در داخل سلول های کبد، نقطه نهایی اتمام شستشو، رسیدن به ۵ درصد غلظت اولیه قرار داده شد.

تعیین مدت زمان لازم برای تماس کبد ایزوله شده با MDMA جهت حصول اطمینان از وقوع مهار متابولیکی در بافت کبدی پس از مواجهه با آن

از آنجا که در منابع، غلظت پلاسمایی MDMA پس از مصرف دوزهای رایج در انسان، حدود ۳۰۰ نانوگرم در میلی لیتر و غلظت سمی آن در حدود ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر ذکر شده بود، در این پژوهش نیز برای ارزیابی میزان مهار آنزیمی از دو غلظت ذکر شده استفاده شد (۲،۱). لازم به ذکر است که غلظت سرمی ۶۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر تقریباً بالاترین غلظت ممکن

پرفیوژن کبدی محاسبه شد. همچنین نسبت متابولیکی در زمان‌های مختلف، از حاصل تقسیم غلظت متابولیت به غلظت امپرازول در هر نقطه زمانی تعیین شد. محاسبات آماری و تهیه نمودارها: برای تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین داده‌ها از آزمون paired t-test با $P < 0/05$ و نرم‌افزار Microsoft Office Excell 2013 استفاده شد. انحراف از استاندارد (SD) شاخص پراکندگی داده‌ها بودند و داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شدند. از نرم‌افزار Microsoft Office Excell 2013 برای رسم نمودارها استفاده شد.

یافته‌ها

بررسی خطی بودن منحنی کالیبراسیون امپرازول و متابولیت آن در بافر پرفیوژن

منحنی استاندارد امپرازول در محدوده غلظتی ۵ تا ۵۰۰ میکرومولار و متابولیت آن در محدوده غلظتی ۰/۸ تا ۸۰ میکرومولار بررسی شد که نتایج نشان دهنده خطی بودن منحنی استاندارد امپرازول ($R^2 = 0/9998$) و همچنین ۵-هیدروکسی امپرازول ($R^2 = 0/9999$) بود.

تعیین مدت زمان لازم برای تماس کبد ایزوله شده با امپرازول جهت دستیابی به حالت پایا:

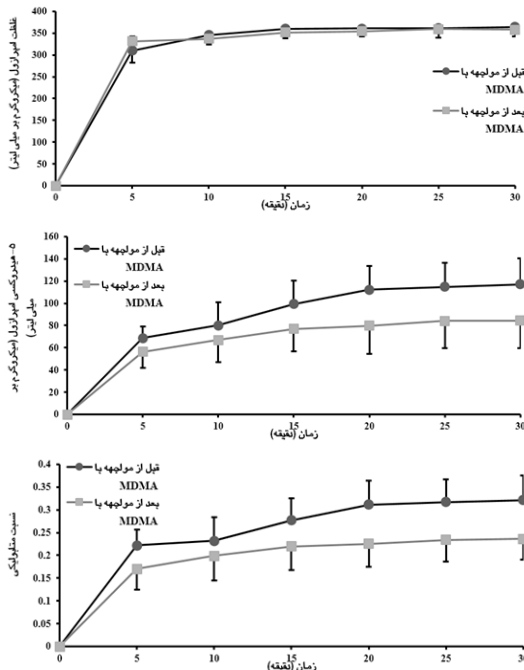
بر اساس نتایج از پرفیوژن کبد ایزوله شده با امپرازول غلظت ۵۰ میکرومولار، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تقریباً پس از گذشت حداقل ۱۵ دقیقه از شروع پرفیوژن با امپرازول، حالت پایا برقرار شده است. لذا با توجه به نیاز به حداقل سه غلظت در زمان‌های مختلف در حالت پایا، جهت محاسبه میانگین غلظت در حالت تعادل، مدت زمان لازم جهت حصول اطمینان از دستیابی به تعادل در غلظت این پروب در کبد ایزوله شده و مایع پرفیوژن، برابر با ۳۰ دقیقه محاسبه شد (تصویر شماره ۳).

اکستازی در سرم است که در شرایط مسمومیت و overdose با این ترکیب رخ می‌دهد. بنابراین آزمایش با غلظت‌های بالاتر اکستازی به نظر بی‌ارزش می‌رسد. همچنین مدت زمان لازم جهت حصول اطمینان از وقوع مهار متابولسمی در بافت کبدی ایزوله شده با توجه به مطالعات پیشین در آزمایشگاه بیوفارماسی جهت تعیین مکانیسم مهار اکستازی بر روی سیتوکروم 2D6 به‌عنوان آنزیم اصلی مسوول متابولیسم این ماده و برآورد اولیه از ایجاد مهار آنزیمی توسط MDMA، تعیین و محاسبه گردید (۲۲).

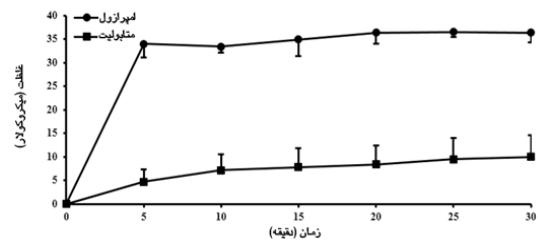
تعیین مدت زمان لازم برای شستشوی کبد پس از مواجهه با MDMA (مرحله شستشوی دوم)

همان‌گونه که شد، به‌منظور جلوگیری از تاثیر تغییرات بین فردی در نتیجه مطالعه، پروب مورد نظر باید پس از مواجهه کبد با اکستازی، مجدداً از آن عبور داده شود، لذا بمنظور اطمینان از خروج اکستازی از کبد و عدم ادامه فرآیند متابولیسم این ماده، کبد ایزوله شده باید با مایع پرفیوژن عاری از MDMA شستشو داده شود و سپس جهت بررسی مهار احتمالی رخ داده، پروب مجدداً از آن عبور داده شود. بدین منظور، پرفیوژن کبدی با بیش‌ترین غلظت به کار گرفته شده در مطالعه از MDMA (غلظت ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه انجام و پس از اتمام مدت زمان ذکر شده، بافر کریس بدون حضور MDMA، از کبد ایزوله شده عبور داده شد و در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای خارج شده از کبد نمونه‌گیری شد و پس از آنالیز نمونه‌های برداشت شده، زمانی که غلظت نمونه در آن به کم‌تر از ۵ درصد غلظت اولیه MDMA رسیده باشد، به عنوان حداقل زمان لازم برای شستشو محاسبه شد. پردازش داده‌ها و تعیین پارامترهای فارماکوکینتیکی: با استفاده از منحنی کالیبراسیون، غلظت پروب امپرازول و متابولیت آن در نمونه‌های پرفیوژن در هر زمان تعیین شد. به منظور تعیین میانگین غلظت امپرازول و متابولیت آن در حالت پایا، میانگین غلظت هر ترکیب در زمان‌های ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه در بافر

و پس از مواجهه با MDMA و همچنین پروفایل نسبت متابولیکی محاسبه شده، در تصاویر شماره ۵ و ۶ نشان داده شده است. همان گونه که انتظار می‌رفت، به دلیل استفاده از غلظت اشباع از پروب مورد نظر، غلظت امپرازول پیش و پس از مواجهه با MDMA، تغییر محسوسی از نظر آماری نشان نداد. به نحوی که میانگین غلظت امپرازول در سه زمان پایانی نمونه گیری برابر $10/1 \pm 362$ میکرومولار، پیش از مواجهه کبد با این ماده و معادل $3/2 \pm 357$ میکرومولار پس از مواجهه آن با MDMA محاسبه شد ($P=0/07$). با وجود عدم مشاهده تغییر در غلظت امپرازول، میزان تولید متابولیت ۵- هیدروکسی امپرازول در تمامی حیوانات گروه تیمار، کاهش معنی دار نشان داد به نحوی که میانگین غلظت متابولیت در سه زمان پایانی نمونه گیری از $11 \pm 114/6$ میکرومولار به $12 \pm 82/8$ میکرومولار در مایع خروجی تغییر نمود ($P=0/0001$) و در نتیجه این کاهش، نسبت متابولیکی نیز از $0/05 \pm 316$ در گروه کنترل به $0/03 \pm 232$ در گروه تیمار، کاهش نشان داد ($P=0/0001$).



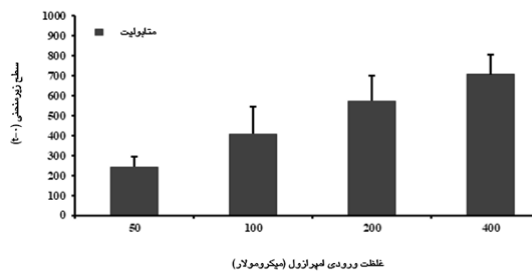
تصویر شماره ۵: منحنی تغییرات غلظت امپرازول (A)، ۵-هیدروکسی امپرازول (B) و نسبت متابولیکی (C) در بافر پرفیوژن در برابر زمان پیش و پس از مواجهه با غلظت ۳۰۰ نانوگرم در میلی لیتر از MDMA. (هر آزمایش به طور مستقل سه بار تکرار شد و داده ها به صورت میانگین \pm SEM نشان داده شده است).



تصویر شماره ۳: حداقل مدت زمان لازم جهت حصول اطمینان از دستیابی به تعادل در غلظت امپرازول و متابولیت آن در کبد ایزوله شده و مایع پرفیوژن پس از مواجهه با غلظت ۵۰ میکرومولار از امپرازول. (هر آزمایش به طور مستقل سه بار تکرار شد و داده ها به صورت میانگین \pm SEM نشان داده شده است).

تعیین غلظتی از امپرازول که در آن فعالیت آنزیم *CYP2C19* در محدوده اشباع قرار گیرد

با توجه به عدم افزایش متناسب سطح زیر منحنی غلظت در برابر زمان متابولیت متعاقب افزایش غلظت سوبسترای عبور داده شده از کبد ایزوله و به تبع آن، مشاهده کاهش نسبت متابولیکی در طی افزایش غلظت امپرازول و همچنین ثابت ماندن نسبت برداشت شده از دارو توسط کبد، غلظت ۴۰۰ میکرومولار به عنوان غلظت اشباع از دارو برای محاسبه تغییرات فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۴: مقایسه تغییرات سطح زیر منحنی غلظت در برابر زمان ۵-هیدروکسی امپرازول پس از عبور غلظتهای مختلف امپرازول از کبد ایزوله شده موش صحرایی جهت تعیین غلظتی از امپرازول که در آن فعالیت آنزیم *CYP2C19* در محدوده اشباع قرار گیرد

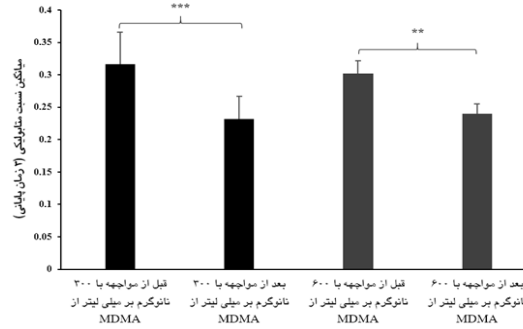
نتایج بررسی مهار متابولیسمی آنزیم *CYP2C19* پس از مواجهه با MDMA با غلظت ۳۰۰ نانوگرم در میلی لیتر نمودار تغییرات غلظت امپرازول و متابولیت آن در بافر پرفیوژن در طی زمانهای مختلف نمونه گیری، پیش

با توجه به آنالیز کینتیکی انجام شده در حالت پایا و متعاقب عبور MDMA با غلظت ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر از چهار کبد ایزوله شده، می توان دریافت که غلظت امپرازول در مایع خروجی از کبد پیش و پس از عبور ماده با غلظت ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر تقریباً مشابه بوده و تغییر محسوسی در مقدار توزیع امپرازول در بافت کبدی پس از مواجهه آن با MDMA رخ نداده است ($P=0/425$) (میانگین غلظت امپرازول در سه فاصله زمانی پایانی در نمونه های مایع خروجی پرفیوژن به ترتیب $325/9 \pm 6/4$ در مقابل $323/3 \pm 4/7$ میکرومولار پیش و پس از مواجهه کبد با MDMA بود).

این درحالی است که مقدار متابولیت تولید شده بر مبنای میانگین غلظت متابولیت در سه فاصله زمانی پایانی در آزمون های انجام شده به ترتیب از $98/1 \pm 3/6$ میکرومولار به $78/9 \pm 3/1$ میکرومولار پیش و پس از مواجهه کبد با MDMA کاهش یافته است که تقریباً معادل با ۲۰ درصد کاهش در میزان تولید متابولیت در نمونه های بافر خارج شده از کبد پس از مواجهه با ماده می باشد ($P=0/0001$) و به تبع آن نسبت متابولیکی محاسبه شده از امپرازول نیز در نمونه های خارج شده از کبد، کاهش می یابد از $0/24 \pm 0/02$ در گروه کنترل به $0/30 \pm 0/02$ پس از مواجهه با MDMA را نشان می دهد ($P=0/002$).

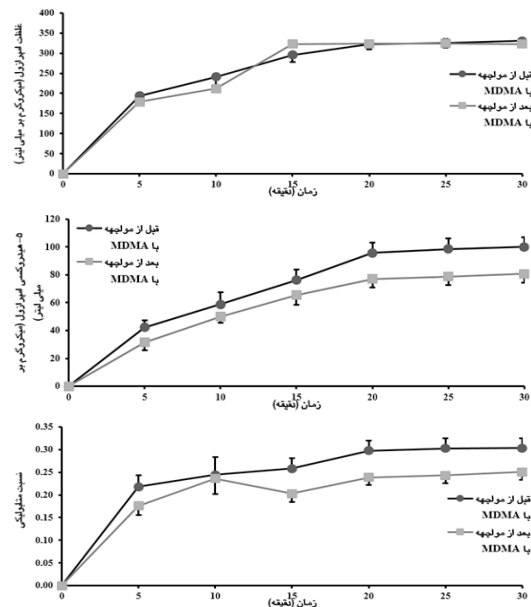
بحث

با توجه به شیوع مصرف MDMA به خصوص در بین جوانان، ارزیابی اثرات زیانبار ناشی از مصرف این ماده شیمیایی بر روی بدن افراد مصرف کننده، از اهمیت بسزایی برخوردار است. مصرف بلندمدت اکستازی می تواند با تخریب پایانه اعصاب سرتونینی و دوپامینی به افسردگی و انزوا و گوشه گیری فرد مصرف کننده و حتی مرگ بیانجامد. از دیگر سو، مطالعات نشان داده اند که بسیاری از عوارض عصبی ترکیبات آمفتامینی، ناشی از متابولیسم آن ها در بدن و تولید متابولیت های دارای سمیت عصبی است (۲۲،۹). لذا مطالعه بر جزئیات



تصویر شماره ۶: نمودار میانگین نسبت متابولیکی بر مبنای متوسط سه فاصله زمانی نمونه گیری انتهایی پیش و پس از مواجهه با اکستازی با غلظت ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر در هر یک از نمونه های کبد پرفیوژن شده. (هر آزمایش به طور مستقل سه بار تکرار شد و داده ها به صورت میانگین \pm SEM نشان داده شده است. $***P \leq 0/001$ $**P \leq 0/01$)

نتایج بررسی مهار متابولیسمی آنزیم CYP2C19 پس از مواجهه با MDMA با غلظت ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر نمودار تغییرات غلظت امپرازول و متابولیت آن در بافر پرفیوژن در طی زمان های مختلف نمونه گیری، پیش و پس از مواجهه با MDMD و همچنین پروفایل نسبت متابولیکی محاسبه شده، در تصاویر شماره ۶ و ۷ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۷: منحنی تغییرات غلظت امپرازول (A)، ۵-هیدروکسی امپرازول (B) و نسبت متابولیکی (C) در بافر پرفیوژن در برابر زمان پیش و پس از مواجهه با غلظت ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر از MDMA. (هر آزمایش به طور مستقل سه بار تکرار شد و داده ها به صورت میانگین \pm SEM نشان داده شده است).

کینتیک و متابولیسم اکستاسی بیش از پیش اهمیت می‌یابد که از مهم‌ترین وجوه آن متابولیسم و سمیت کبدی این ترکیب است. همان‌گونه که ذکر شد، در مسیر O-دمتیلناسیون، ایجاد ترکیبات اورتو کینونی در حین متابولیسم MDMA می‌تواند منجر به مهار برگشت ناپذیر آنزیم متابولیزه کننده شود (۲۴). از سوی دیگر، واکنش ترکیبات اورتو کینونی تولید شده در این مسیر نیز، مشابه سایر ساختارهای کینونی، با ماکرومولکول‌های نوکلئوفیل داخل سلولی بسیار محتمل است که این امر می‌تواند منجر به ایجاد اختلال در ساختار پروتئین‌ها، چربی‌ها و حتی DNA و در نهایت منتهی به آسیب‌های شدید سلولی شود (۲۵). لذا با توجه به پیش‌فرض مذکور، در این مطالعه، امکان بروز و همچنین میزان اثر مهاری اکستاسی بر روی سایر سیستم‌های آنزیمی موجود در سلول که به صورت مستقیم در متابولیسم MDMA دخیل نمی‌باشند، مد نظر قرار داده شد. بدین منظور تغییرات احتمالی فعالیت سیتوکروم 2C19 متعاقب مواجهه با MDMA با استفاده از امپرازول به عنوان سوبسترای اختصاصی پذیرفته شده این آنزیم (۲۶)، مورد بررسی قرار گرفت. از آن‌جا که این آنزیم نقش برجسته‌ای در متابولیسم بسیاری از داروهای ضد افسردگی رایج در درمان دارا می‌باشد، آگاهی از چگونگی تاثیر MDMA بر فعالیت این آنزیم نقش حائز اهمیتی در پیش‌بینی اثرات درمانی و عوارض جانبی داروها در بالین خواهد داشت.

جهت انجام این مطالعه، از مدل پرفیوژن کبد ایزوله شده موش صحرائی استفاده شد که تکنیکی بسیار متداول در مطالعه فرآیندهای فارماکو کینتیک، متابولیسمی و تداخل داروهای مختلف می‌باشد (۲۷). در این روش ساختمان و سیستم عروقی بافت مورد نظر حفظ شده و از اثرات سایر بافت‌ها، سیستم هورمونی مرکزی و تغییرات جریان خون نیز در امان است. مواد از طرق فیزیولوژیک به درون سلول‌ها نفوذ کرده و مکانیسم‌های جذب، انتقال و دفع آن‌ها به‌طور طبیعی حفظ می‌شود. لذا نتایج منتج از این مدل می‌تواند بهتر از سایر مدل‌های برون‌تن

(میکروزوم‌های کبدی و هپاتوسیت‌ها) به پیش‌بینی وقایع متابولیسمی در بالین بپردازد. همچنین با هدف کاهش تاثیر تغییرات بین فردی در نتیجه نهایی مطالعه، طراحی پژوهش به گونه‌ای انجام شد که امکان بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پیش و پس از مواجهه با MDMA در هر کبد به صورت مجزا امکان‌پذیر گردد. بدین منظور بخش نخست مطالعه طراحی و پارامترهای لازم مورد بررسی قرار گرفتند. همان‌گونه که در پیش فرض مطالعه مطرح شد، بررسی و مقایسه نتایج در دو گروه دریافت کننده MDMA با دو غلظت ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، بیانگر وقوع مهار متابولیسمی و کاهش فعالیت آنزیم می‌باشد.

در بررسی آماری، نسبت متابولیسمی پس از مواجهه کبد با غلظت ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر کاهش معنی‌دار نشان داد و این کاهش فعالیت آنزیمی ناشی از تغییر در میزان تولید متابولیت در هر دو گروه مورد مطالعه بود. از آنجا که این سیتوکروم نقش مهمی در متابولیسم داروهای گوناگون به‌ویژه داروهای ضد افسردگی، ایفا می‌نماید (۲۸، ۲۹)، لذا نتایج مطالعه حاضر بیانگر نیاز به توجه و انجام مطالعات بیش‌تر در بالین، در خصوص بررسی تغییرات احتمالی فعالیت این آنزیم پس از سوء مصرف مواد محرک همچون اکستاسی می‌باشد. از سوی دیگر، مقایسه نتایج به‌دست آمده در دو گروه مورد مطالعه (گروه‌های دریافت کننده غلظت ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از MDMA) بیانگر تغییرات نسبتاً مشابه در میزان تولید متابولیت پس از مواجهه کبد با هر دو غلظت استفاده شده از MDMA در مطالعه می‌باشد. از آن‌جا که طراحی مطالعه حاضر به نحوی صورت پذیرفته بود که بررسی تغییرات فعالیت آنزیم در مواجهه با غلظت اشباع از پروب (روند درجه صفر)، صورت پذیرد؛ لذا عدم تغییر در میزان کاهش مشاهده شده در تولید متابولیت حتی پس از مواجهه با غلظت دو برابر از MDMA را می‌توان به عدم وابستگی مهار مشاهده شده به غلظت مهار کننده (MDMA) نسبت داد. البته

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به اهمیت بررسی اثر داروهای محرک صنعتی بر روی فعالیت سیتوکروم‌های کبدی و تغییرات احتمالی در وضعیت متابولیسمی فرد مصرف‌کننده، مطالعه حاضر طراحی شد. ارزیابی تغییرات فعالیت سیتوکروم 2C19 نشان داد که فعالیت این آنزیم می‌تواند تحت تاثیر سوء مصرف MDMA کاهش یابد. با این وجود، مطالعات گسترده‌تر در بالین و همچنین بررسی تاثیر سوء مصرف اکستازی بر روی سایر سیتوکروم‌های مهم کبدی از جمله سیتوکروم‌های 1A2، 2C9 و 2B6 که نقش بی‌بدیلی در متابولیسم داروها و تاثیر بر روی پروفایل اثربخشی و عوارض جانبی این داروها دارند، ضروری به نظر می‌رسد.

برای تایید صحت مطلب عنوان شده به مطالعات پیش‌تر در این زمینه نیاز است.

تاکنون مطالعاتی در رابطه با عوارض عصبی (۷،۲۳) و اثرات سمی اکستازی بر روی کبد (۶،۸) انجام شده است. اما با این وجود مطالعات بر روی تاثیر MDMA بر روی میزان فعالیت سیتوکروم‌های کبدی و همچنین تغییرات ظرفیت متابولیسمی افراد مصرف‌کننده اکستازی بسیار محدود بوده است. با توجه به جستجوی انجام شده، مطالعه حاضر تنها مطالعه‌ای است که به بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های کبدی پرداخته است که در متابولیسم خود ماده، نقشی ایفا نمی‌نمایند. نتایج این مطالعه بیانگر اهمیت بررسی تغییرات فعالیت آنزیمی کبد متعاقب سوء مصرف این مواد بوده و بررسی بیش‌تر نتایج در بالین و پیرو مطالعات انسانی ضروری می‌نماید.

References

1. Degenhardt L, Roxburgh A, Dunn M, Campbell G, Bruno R, Kinner SA, et al. The epidemiology of ecstasy use and harms in Australia. *Neuropsychobiology* 2009; 60(3-4): 176-187.
2. Palamar JJ, Kamboukos D. An examination of sociodemographic correlates of ecstasy use among high school seniors in the United States. *Subst Use Misuse* 2014; 49(13): 1774-1783.
3. Bedi G, Hyman D, de Wit H. Is ecstasy an "empathogen"? Effects of +/-3,4-methylenedioxymethamphetamine on prosocial feelings and identification of emotional states in others. *Biol Psychiatry* 2010; 68(12): 1134-1140.
4. Piper BJ. A developmental comparison of the neurobehavioral effects of ecstasy (MDMA). *Neurotoxicol Teratol* 2007; 29(2): 288-300.
5. Fisk JE, Murphy PN, Montgomery C, Hadjiefthyvoulou F. Modelling the adverse effects associated with ecstasy use. *Addiction* 2011; 106(4): 798-805.
6. Carvalho M, Pontes H, Remiao F, Bastos ML, Carvalho F. Mechanisms underlying the hepatotoxic effects of ecstasy. *Curr Pharm Biotechnol* 2010; 11(5): 476-495.
7. Sarkar S, Schmued L. Neurotoxicity of ecstasy (MDMA): an overview. *Curr Pharm Biotechnol* 2010; 11(5): 460-469.
8. Shahraki MR, Irani M. The effects of ecstasy on liver function tests, blood glucose, and lipids profile of male rats. *Int J High Risk Behav Addict*. 2014; 3(4): e21076.
9. de la Torre R, Farre M. Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(10): 505-508.
10. Kalant H. The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *CMAJ* 2001; 165(7): 917-928.
11. Perfetti X, O'Mathuna B, Pizarro N, Cuyas

- E, Khymenets O, Almeida B, et al. Neurotoxic thioether adducts of 3,4-methylenedioxymethamphetamine identified in human urine after ecstasy ingestion. *Drug Metab Dispos* 2009; 37(7): 1448-1455.
12. Green AR, Mechan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev* 2003; 55(3): 463-508.
 13. Schmid Y, Vizeli P, Hysek CM, Prestin K, Meyer Zu Schwabedissen HE, Liechti ME. CYP2D6 function moderates the pharmacokinetics and pharmacodynamics of 3,4-methylene-dioxymethamphetamine in a controlled study in healthy individuals. *Pharmacogenet Genomics* 2016; 26(8): 397-401.
 14. Jamshidfār S, Ardakani YH, Lavasani H, Rouini M. Inhibition of mirtazapine metabolism by Ecstasy (MDMA) in isolated perfused rat liver model. *Daru* 2017; 25(1): 16.
 15. Wu D, Otton SV, Inaba T, Kalow W, Sellers EM. Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. *Biochem Pharmacol* 1997; 53(11): 1605-1612.
 16. Van LM, Heydari A, Yang J, Hargreaves J, Rowland-Yeo K, Lennard MS, et al. The impact of experimental design on assessing mechanism-based inactivation of CYP2D6 by MDMA (Ecstasy). *J Psychopharmacol* 2006; 20(6): 834-841.
 17. Yubero-Lahoz S, Pardo R, Farre M, Mathuna BO, Torrens M, Mustata C, et al. Changes in CYP1A2 activity in humans after 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) administration using caffeine as a probe drug. *Drug Metab Pharmacokinet* 2012; 27(6): 605-613.
 18. Neyshaburinezhad N, Rouini MR, Entezari H, Lavasani H, Ardakani YH. Evaluation of changes in cytochrome P450 2C19 activity in type 2 diabetic rats before and after treatment, by using isolated perfused liver model. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2020; 23(5): 629-635.
 19. Neyshaburinezhad N, Seidabadi M, Rouini M, Lavasani H, Foroumadi A, Ardakani YH. Evaluation of hepatic CYP2D1 activity and hepatic clearance in type I and type II diabetic rat models, before and after treatment with insulin and metformin. *DARU J Pharm Sci* (2020). <https://doi.org/10.1007/s40199-020-00350-z>.
 20. Payan M, Rouini MR, Tajik N, Ghahremani MH, Tahvilian R. Hydroxylation index of omeprazole in relation to CYP2C19 polymorphism and sex in a healthy Iranian population. *Daru* 2014; 22(1): 81.
 21. Parmentier Y, Pothier C, Hewitt N, Vincent L, Caradec F, Liu J, et al. Direct and quantitative evaluation of the major human CYP contribution (fmCYP) to drug clearance using the in vitro Silensomes model. *Xenobiotica* 2019; 49(1): 22-35.
 22. Jamali B, Sheikholeslami B, Hosseinzadeh Ardakani Y, Lavasani H, Rouini MR. Evaluation of the Ecstasy influence on tramadol and its main metabolite plasma concentration in rats. *Drug Metab Pers Ther* 2017; 32(3): 137-145.
 23. Gorska AM, Kaminska K, Wawrzczak-Bargiela A, Costa G, Morelli M, Przewlocki R, et al. Neurochemical and Neurotoxic Effects of MDMA (Ecstasy) and Caffeine After Chronic Combined Administration in Mice. *Neurotox Res* 2018; 33(3): 532-548.
 24. O'Mathuna B, Farre M, Rostami-Hodjegan A, Yang J, Cuyas E, Torrens

- M, et al. The consequences of 3,4-methylenedioxymethamphetamine induced CYP2D6 inhibition in humans. *J Clin Psychopharmacol* 2008; 28(5): 523-529.
25. Song BJ, Moon KH, Upreti VV, Eddington ND, Lee IJ. Mechanisms of MDMA (ecstasy)-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and organ damage. *Curr Pharm Biotechnol* 2010; 11(5): 434-443.
26. Chang M, Dahl ML, Tybring G, Gotharson E, Bertilsson L. Use of omeprazole as a probe drug for CYP2C19 phenotype in Swedish Caucasians: comparison with S-mephenytoin hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype. *Pharmacogenetics* 1995; 5(6): 358-363.
27. Liu Y, Weber SJ, Onua ET. Hepatic clearance and drug metabolism using isolated perfused rat liver. *Curr Protoc Pharmacol* 2004; Chapter 7:Unit 7.9.
28. Hodgson K, Tansey KE, Uher R, Dernovsek MZ, Mors O, Hauser J, et al. Exploring the role of drug-metabolising enzymes in antidepressant side effects. *Psychopharmacology (Berl)* 2015; 232(14): 2609-2617.
29. Lee SJ. Clinical Application of CYP2C19 Pharmacogenetics Toward More Personalized Medicine. *Front Genet* 2012; 3: 318.