

## The effect of chronic caffeine administration on hyperalgesia in a rat neuropathic pain model: role of nitric oxide pathway

Naderi-Tehrani M<sup>1</sup>, Heydari AZ<sup>2</sup>, Hamidi GH<sup>2\*</sup>, Nasrollahi S<sup>2</sup>

1- Student Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

2- Physiology Research Center, Institute for Basic Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

Received: 2019/02/6 | Accepted: 2019/05/18

### Abstract:

**Background:** Neuropathic pain is a chronic pain caused by damage to the central nervous system and the peripheral. Caffeine is a non-selective antagonist of A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, receptors of adenosine, which has a protective effect on neuropathic pain in some doses by inhibiting A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> receptors. Considering that the nitric oxide (NO) levels are apparently effective in the parts of caffeine central effects, thus, the purpose of this study was to investigate the effect of chronic caffeine administration on the hyperalgesia in neuropathic rats and levels of nitric oxide metabolites (NOx).

**Materials and Methods:** The present study was conducted on 40 adult male rats weighing 220-250 gr. Neuropathic pain was induced by chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve. Animals were randomly divided into 5 groups (n=8). The control group, which did not intervene on the sciatic nerve, the sham group, which the animals were surgically implanted but the sciatic nerve was not tied, the CCI group and test groups received oral doses of caffeine orally (100 and 300 mg/L) for 28 days. Hyperalgesia was measured in all groups with Plantar test on days 4, 7, 14, 21, and 28 after surgery. The levels of NOx were measured by the Griess method in lumbar spinal cord tissue on day 28.

**Results:** Neuropathic rats showed decreased pain thresholds in hyperalgesia. Chronic caffeine at the doses of 100 and 300 mg/L in drinking water for 28 days significantly alleviated hyperalgesia ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ).

**Conclusion:** According to the results of this study, chronic intake of caffeine can reduce hyperalgesia in neuropathic rat. It seems that the NO pathway is not involved in the central effect of caffeine on pain threshold in the CCI model of neuropathic pain.

**Keywords:** Neuropathic pain, Caffeine, Nitric oxide, Hyperalgesia

**\*Corresponding Author:**

Email: hamidi@yahoo.com

Tel: 0098 315 554 0021

Fax: 0098 315 557 5057

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2019; Vol. 23, No 3, Pages 223-240

Please cite this article as: Naderi-Tehrani M, Heydari AZ, Hamidi GH, Nasrollahi S., Effect of chronic caffeine administration on hyperalgesia in a rat neuropathic pain model: role of nitric oxide pathway. *Feyz* 2019; 23(3): 223-40.

# تأثیر دریافت مزمن کافین بر هیپرآلرژیای ناشی از درد نوروپاتیک در موش صحرایی: نقش مسیر نیتریک اکسید

منیر نادری تهرانی<sup>۱</sup>، اژدر حیدری<sup>۲</sup>، غلامعلی حمیدی<sup>۳</sup>، سعیده نصراللهی<sup>\*</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: درد نوروپاتیک، نوعی درد مزمن است که در اثر آسیب به سیستم عصبی مرکزی و محیطی ایجاد می‌شود. کافین آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌های A1, A2<sub>a</sub>, A2<sub>b</sub> آدنوزین است که در برخی از دوزها اثر محافظتی بر درد دارد. با توجه به این که ظاهراً نیتریک اکسید بر بخشی از اثرات مرکزی کافین تأثیرگذار است، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر دریافت مزمن کافین بر هیپرآلرژیای حرارتی در موش‌های صحرایی نوروپاتیک و اندازه‌گیری سطح متabolیت‌های نیتریک اکسید می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر بر روی ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. درد نوروپاتیک به روش آسیب فشاری مزمن عصب سیاتیک (CCI) القا شد. حیوانات به صورت تصادفی به ۵ گروه ۸ تابی تقسیم شدند: گروه کنترل که مداخله‌ای بر روی عصب سیاتیک آن‌ها انجام نشد، گروه شم که حیوانات آن جراحی شده ولی عصب سیاتیک گره زده نشد، گروه CCI و گروه‌های آزمایش که دوزهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آب آشامیدنی کافین را به مدت ۲۸ روز دریافت می‌کردند. هیپرآلرژیای حرارتی در روزهای ۲۱, ۲۱, ۲۸, ۲۸ پس از جراحی بررسی شد. سطح متabolیت‌های نیتریک اکسید در بافت نخاع حیوانات با روش گریس اندازه‌گیری شد.

نتایج: موش‌های نوروپاتیک کاهش در آستانه درد را نشان دادند، دریافت مزمن کافین در دوزهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به طور معنی‌داری هیپرآلرژیای حرارتی را کاهش داد ( $P < 0.001$ ).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که دریافت مزمن کافین می‌تواند هیپرآلرژیای حرارتی را در موش‌های نوروپاتیک کاهش دهد و به نظر می‌رسد که مسیر نیتریک اکسید در اثرات کافین بر آستانه درد در مدل CCI دخالتی ندارد.

واژگان کلیدی: درد نوروپاتیک، کافین، نیتریک اکسید، هیپرآلرژیا

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۹۸ صفحات ۲۳۰-۲۲۳

## مقدمه

داروهای ضدصرع، ضدآفسردگی‌ها و اوپیوئیدها از داروهای مورد استفاده به منظور درمان درد نوروپاتیک است، با این وجود مکانیسم دقیق آن هنوز کاملاً مشخص نشده است و به درمان‌های داروبی به خوبی پاسخ نمی‌دهد، به این دلیل مطالعات زیادی به منظور یافتن مکانیسم‌ها و درمان‌های جدید همچنان در حال انجام است [۱]. کافین آکالالوئیدی گیاهی از خانواده‌ی متلی گزانتین‌ها است که ترکیب اصلی در قهوه، چای و نوشیدنی‌های گازدار محتوی کولا است. کافین به عنوان یک محرك سیستم عصبی مصرف گسترده‌ای در جهان دارد، علاوه بر این که اثرات سودمند آن در پیشگیری از برخی از بیماری‌ها همچون آنزالیم و پارکینسون در مطالعات زیادی تأیید شده است. اثرات بیولوژیک کافین در سلول از طریق مکانیسم‌های مختلفی انجام می‌شود، کافین در درجه‌ی اول آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌ی A2<sub>a</sub> و A1 آدنوزین است [۲-۴]. آدنوزین یک نوکلئوزید پورینی است که از تجزیه‌ی آدنوزین-۵-مونوفسفات (AMP) حاصل می‌شود [۵]. این ترکیب به عنوان تعديل‌کننده در بدنه و بهویژه در سیستم عصبی عمل می‌کند و دارای چهار نوع گیرنده‌ی A1, A2<sub>a</sub>, A2<sub>b</sub>, A3 است، گیرنده‌ی A1 گیرنده‌ای مهاری است که فعال شدن آن باعث مهار آنژیم آدنیل-

درد نوروپاتیک، نوعی درد مزمن است که در اثر آسیب به سیستم عصبی مرکزی و محیطی به وجود می‌آید و با دو علامت هیپرآلرژیا (افزایش حساسیت به محرك‌های آسیب‌رسان) و آلوداینیا (حساسیت به محرك‌های غیرآسیب‌رسان) مشخص می‌شود، عواملی همچون آسیب‌های نخاعی و مغزی، بیماری دیابت، بیماری ایدز، و شیمی درمانی به دنبال سلطان‌ها از علل ایجاد کننده‌ی این نوع درد است و میزان شیوع آن در جهان در حدود ۱/۵ تا ۸ درصد تخمین زده شده است [۶].

۱. دانشجویی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۴. دانشجویی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

\*نشانی نویسنده مسئول

دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی  
تلفن: ۰۳۱۵۵۵۷۵۰۵۷ - ۰۳۱۵۵۵۴۰۰۲۱

پست الکترونیک: hamiidi@yahoo.com

تاریخ پذیرش تهایی: ۱۳۹۸/۰۲/۲۸ تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷

ال-آرژینین به عنوان پیش‌ساز NO و یا تجویز ترکیباتی که منجر به رهایش مستقیم NO از سیناپس‌ها می‌شود، سبب تشید و تداوم درد در برخی از مدل‌های حیوانی درد نوروپاتیک شده است [۱۱]. نقش این ترکیب در تشید درد به اسید آمینه‌ی گلولاتام مریبوط است که در آسیب عصب از پایانه‌های عصبی آزاد شده، باعث تحریک گیرنده‌ی (ان-متیل-دی-آسپاراتیک اسید (NMDA) مریبوط به خود می‌شود، تحریک این گیرنده متعاقباً سبب فعال‌سازی آنژیم NOS و تولید NO می‌شود [۱۱]. NO به نوبه‌ی خود با اثر بر نورون‌های آوران حسی درد و تولید GMP<sub>c</sub> و فعال‌کردن پروتئین کینازها و افزایش فعالیت و بیان کانال‌های سدیمی و کلسیمی ولتاژی در غشاء نورون‌ها سبب افزایش فرکانس پتانسیل عمل و افزایش شدت و حساسیت به درد می‌شود. در مقابل نقش NO در کاهش درد مریبوط به فعال‌کردن کانال‌های پتانسیمی وابسته به ATP و افزایش خروج پتانسیم از سلول و به دنبال آن هیپرپلاریزاسیون غشا و کاهش فرکانس تولید پتانسیل عمل است [۱۲، ۱۱]. با توجه به مطالب فوق و نقش متفاوت گیرنده‌های آدنوزینی بر تولید NO به نظر می‌رسد برخی از اثرات آدنوزین از طریق تعدیل مسیر نیتریک اسید انجام می‌شود [۱۱]. به این دلایل مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی مصرف مزمن کافئین و نقش مسیر نیتریک اسید بر آستانه‌ی درد نوروپاتیک مسیر انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه به روش تجربی بر روی ۴۰ سر موشِ صحرایی نر بالغ نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۵۰ گرم و به مدت ۹ ماه در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام شد، حیوانات در فضه‌های چهارتایی نگهداری می‌شدند، آب و غذا به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار می‌گرفت و در شرایط ۱۲ ساعت روشناختی - تاریکی با درجه حرارت  $23\pm 2$  درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند [۱۳]. کلیه‌ی حیوانات از مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان تهیه شدند و همه‌ی مراحل آزمایش شامل تکثیر، انجام آزمایش و معدوم کردن حیوانات مطابق با قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی و اصول مصوب کمیته‌ی اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان و با کد اخلاق (IR.KAUMS.MEDNT.REC.1397.040) صورت گرفت.

## گروه‌های مورد آزمایش

حیوانات به صورت تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند و در

سیکلاز (AC) و مهار تشکیل آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) از آدنوزین تری‌فسفات (ATP) و به دنبال آن مهار عملکردهای سلولی مرتبط با این ترکیب می‌شود، از سوی دیگر گیرنده‌ی A2 گیرنده‌ای تحریکی است و فعال‌شدن آن، سبب فعال‌شدن AC و تشکیل cAMP و تقویت عملکردهای سلولی مرتبط با این مولکول می‌شود [۳]. آدنوزین از طریق فعال‌کردن گیرنده‌ی A1 اثر کاهش‌دهنده بر درد دارد [۷، ۶]. گیرنده‌های A2 و A1 در لایه‌های سطحی شاخ خلفی نخاع در نورون‌های پس‌سیناپسی و به صورت محیطی در سلول‌های گلیال، و سلول‌های ایمنی حضور دارند [۸]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که برخی از دوزهای کافئین نیز اثر کاهش‌دهنده بر درد دارد و به این دلیل به عنوان یک داروی ضددرد کمکی به فرمولاسیون برخی از داروها از جمله ضدالتهاب‌های غیراستروئیدی اضافه و باعث اثربخشی بیشتر دارو می‌شود [۳]. احتمالاً بخشن اثرات کافئین بر کاهش درد از طریق مهار گیرنده‌های A2<sub>b</sub> و A2<sub>a</sub> آدنوزین به انجام می‌رسد [۳]. از سوی دیگری برخی مطالعات انسانی و حیوانی نشان داده‌اند که تجویز حاد کافئین در دوزهای پایین سبب کاهش آستانه‌ی درد (تشید درد) و کاهش اثربخشی داروهای ضددردی همچون آمی-تریپتیلین و کاربامازپین می‌شود و این اثر احتمالاً با مهار گیرنده‌ی A1 آدنوزین به انجام می‌رسد [۹]. از سوی دیگر در مطالعه‌ای حیوانی نشان داده شده است، مصرف مزمن کافئین در دوزهای ۲۷ تا ۶۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تأثیری بر پیشرفت درد نداشته است، به عبارت دیگر اثر حفاظتی در برابر تشید درد داشته و احتمالاً این اثر ناشی از مهار گیرنده‌ی A2<sub>b</sub> و A2<sub>a</sub> آدنوزین است [۱۰]. همان‌گونه که ذکر شد گیرنده‌ی A1 آدنوزین مهاری است و تحریک آن منجر به کاهش سطح نیتریک اسید (NO) می‌شود، در مقابل تحریک گیرنده‌ی A2 سبب افزایش سطح NO می‌شود [۱۱]. یک مولکول گازی و رادیکال آزاد است که در سیستم عصبی به عنوان یک انتقال‌دهنده‌ی پیام‌های عصبی و تعديل‌کننده عمل می‌کند، NO تحت تأثیر آنژیم نیتریک اسید سنتاز (NOS) از اسید آمینه‌ی ال-آرژینین تولید می‌شود. آنژیم NOS در تمام سطوح سیستم عصبی مرکزی و بهویژه در شاخ خلفی نخاع بیان می‌شود، مولکول NO یک فعال‌کننده‌ی قوی برای آنژیم گوانولیل سیکلاز (GC) است و به دنبال آن سبب افزایش تولید گوانوزین مونوفسفات حلقوی (GMP) از گوانوزین تری‌فسفات (GTP) می‌شود، این مولکول با اثر بر پروتئین کینازها، کانال‌های یونی و آنژیم فسفودی‌استراز عملکردهای داخل سلولی خود را انجام می‌دهد [۱۱]. علاوه بر این NO در فرآیند درد نیز نقش دارد و در این مورد به صورت دوگانه عمل می‌کند، در گزارش‌هایی تجویز

متابولیت‌های NO در بافت نخاع، حیوانات ابتدا با اتیلن‌دی‌اتر تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و دایسکشن نخاع در قطعات نخاعی L4-L6 انجام شد، سپس قطعات نخاعی موردنظر به دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد متنقل شد [۱۶]. اندازه‌گیری NO به طور غیرمستقیم و از طریق اندازه‌گیری متabolیت‌های پایدار آن (نیترات و نیتریت) انجام پذیرفت. اساس این روش واکنش و تشکیل یک کروموفور از دی‌آزوتابسیون یک سولفانیل آمید به کمک نیتریت در محیط اسیدی و ترکیب آن با یک آمین دو حلقه‌ای مثل Naphthalene (ethylenediamine dihydrochloride) NEDD است. برای اندازه‌گیری متabolیت‌ها، بافت نخاع در بافر فسفات هموژنیزه شد، سپس پروتئین‌ها با اضافه کردن تری کلورواستیک اسید ۱۰ درصد به سوسپانسیون هموژنیزه باقی و سانتریفیوژ کردن، رسوب داده شدند، به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های پروتئین‌زدایی شده، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول وانادیم کلراید (VCL<sub>3</sub>) و ۵۰ میکرولیتر سولفانیل آمید و ۵۰ میکرولیتر NEDD افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انجام واکنش، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت، با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد [۱۷].

#### تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد، پس از بررسی توزیع نرمال داده‌های آماری از آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر و تست تعقیبی توکی جهت مقایسه گروه‌ها استفاده شد. در تمام گروه‌ها معنی‌داری در سطح  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. به منظور بررسی سطح متabolیت‌های NO در گروه‌های موردنظر از آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده و معنی‌داری در سطح  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

#### نتایج

نمودار شماره‌ی ۱ نتایج مربوط به بررسی آستانه‌ی درد نوروپاتیک در تست هیپرآلرژیای حرارتی در گروه‌های کنترل، شم و آسیب مزمن عصب را توسط آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر و تست تعقیبی توکی نشان می‌دهد ( $F_{(28,3)} = 96/3, P < 0.001$ ). میانگین آستانه‌ی درد در گروه کنترل به نسبت گروه شم تفاوت معنی‌داری نشان نداد. میانگین آستانه‌ی درد در گروه آسیب مزمن عصب به نسبت گروه شم کاهش یافت و در روزهای ۲۸، ۲۱، ۲۰، ۱۴، ۱۲، ۱۰ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد ( $P < 0.01$ ).

هر گروه ۸ سر موش قرار داشت: گروه کنترل که مداخله‌ای در عصب سیاتیک آن‌ها صورت نگرفت، گروه شم که در این گروه پوست و عضله در ناحیه بالای ران برش داده شد و پس از نمایان شدن عصب سیاتیک، پوست و عضله بدون دستکاری عصب، با نخ نایلون ۴-۰ بخیه زده شد، و گروه آسیب مزمن فشاری عصب (CCI) که حیوانات آن جراحی شده و عصب سیاتیک به وسیله‌ی چهار گره تحت فشار مزمن قرار گرفت، ۲ گروه آزمایش CCI که غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آب آشامیدنی کافین (سیگما، آمریکا) را به صورت خوراکی طی مدت ۲۸ روز و سایر گروه‌ها هم تنها آب آشامیدنی دریافت می‌کردند [۱۴].

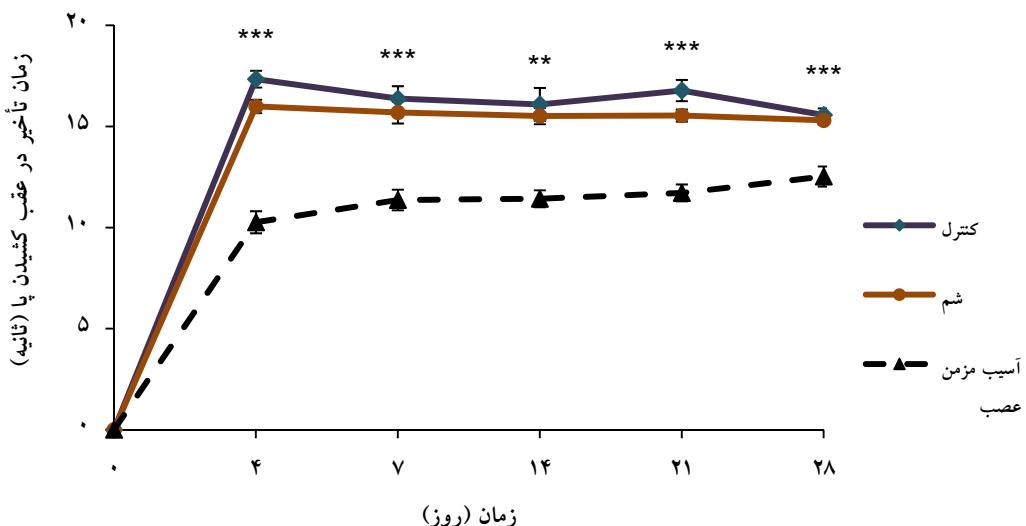
#### روش جراحی

جهت ایجاد مدل CCI (Chronic Constriction Injury) از روش Bennett و Xie استفاده شد، با استفاده از مواد بیهوشی سعی شد درد کمی به حیوان تحمیل شود و کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات در طول مطالعه رعایت شد. بعد از بیهوش نمودن حیوان موهای بالا و پشت ران حیوان کاملاً تراشیده و با استفاده از تیغ بیستوری شکافی به طول ۲ سانتی‌متر بر روی ران پای چپ حیوان ایجاد شد. پس از بریدن عضلات، قسمت مشترک سه شاخه عصب سیاتیک نمایان شد، سپس با استفاده از ۲ میلی‌متری کوچک شیشه‌ای بافت‌های اطراف عصب جدا و به وسیله‌ی نخ بخیه کرومیک ۴-۰ چهار گره شل به فواصل یک میلی‌متر قبل از سه شاخه شدن عصب زده شد، گره‌ها به شکلی زده شد که اختلالی در جریان خون عصب به وجود نیاورد. سپس با استفاده از نخ بخیه ۴-۰ نایلون، عضله و پوست به صورت جداگانه بسته شدند [۱۵].

#### ارزیابی رفتاری درد نوروپاتیک

تست رفتاری بررسی فرآیند درد توسط دستگاه Plantar (Ugo Bassil, Italy) test در حیوانات در روزهای ۲۸، ۲۱، ۱۴، ۷، ۴ پس از جراحی انجام گرفت. بخش جانبی و میانی کف پای سالم و پای آسیب‌دیده به ترتیب در گروه‌های کنترل، شم و CCI با استفاده از دستگاه Plantar test از میان سطح پلکسی گلاس در معرض تشیعث ثابت حرارتی قرار گرفت. سپس زمان عقب‌کشیدن پا (آستانه‌ی درد نوروپاتیک) ثبت شد. تحریکات گرمایی سه مرتبه با فواصل ۱۰ دقیقه تکرار شدند و در نهایت میانگین زمان واکنش ثبت شد [۱۵].

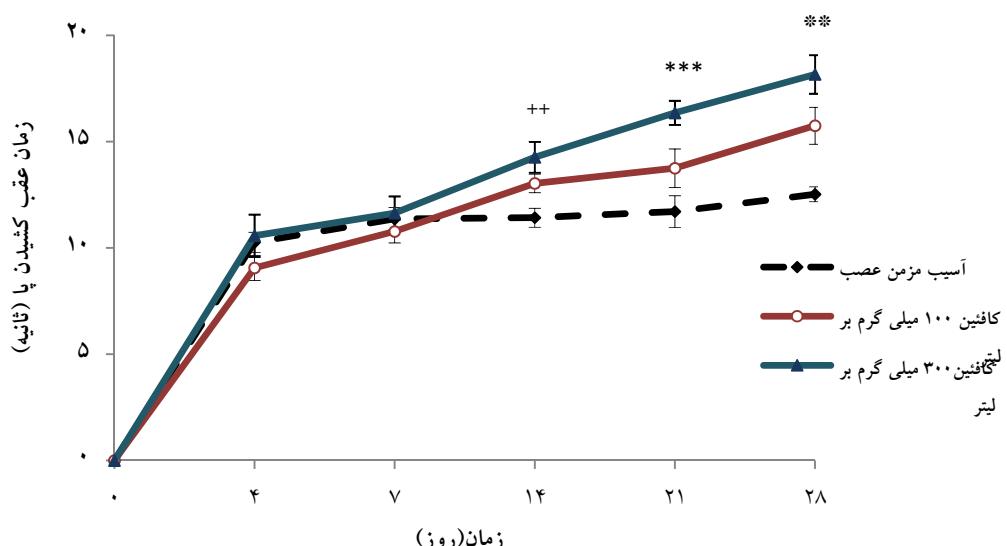
اندازه‌گیری متabolیت‌های نیتریک اکسید پس از انجام تست‌های رفتاری به منظور اندازه‌گیری سطح



نمودار شماره ۱- بررسی تأخیر در زمان عقب کشیدن پا (آستانه‌ی درد نوروپاتیک) در تست هیپرآلزیای حرارتی مقایسه با گروه شام.  $n=8$ , Mean $\pm$ SEM,  $P<0.05$ .

۱۰۰ به نسبت گروه آسیب مزمن عصب افزایش یافت و در روز ۲۸ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد ( $P<0.01$ ). میانگین آستانه‌ی درد در گروه دریافت‌کننده کافئین ۳۰۰ به نسبت گروه آسیب مزمن عصب افزایش یافت و در روزهای ۱۴، ۲۱، ۲۸ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد ( $P<0.01$ ).

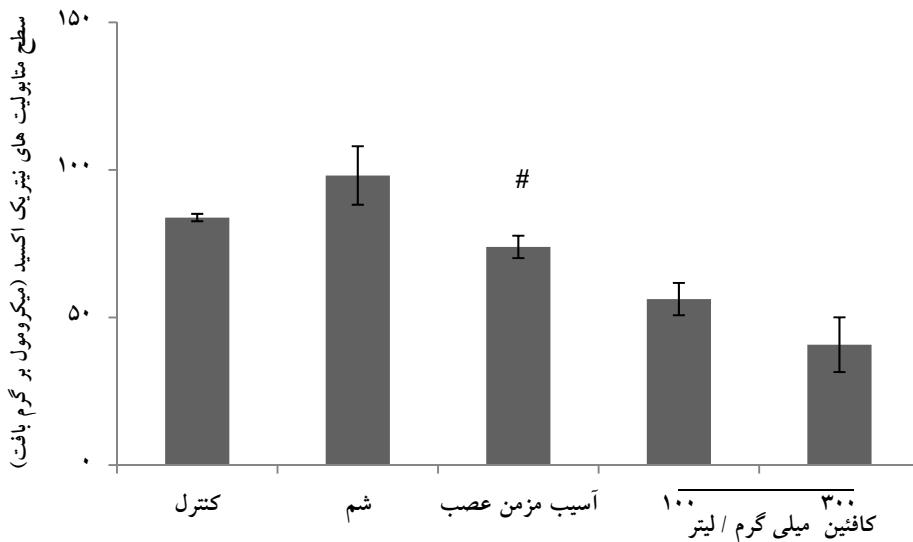
نمودار شماره ۲ نتایج مربوط به تجویز مزمن کافئین به مدت ۲۸ روز را بر میانگین آستانه‌ی درد نوروپاتیک توسط آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر و تست تعییی توکی، در تست هیپرآلزیای حرارتی را نشان می‌دهد ( $F(2,21)=14.1$ ). میانگین آستانه‌ی درد در گروه دریافت‌کننده کافئین



نمودار شماره ۲- اثر غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر کافئین بر تأخیر در زمان عقب کشیدن پا (آستانه‌ی درد نوروپاتیک) در تست هیپرآلزیای حرارتی.  $n=8$ , Mean $\pm$ SEM,  $P<0.05$ ,  $^{**}$ ,  $^{***}$ ,  $^{++}$  مقایسه با گروه آسیب مزمن عصب.

کافین ۳۰۰ (۴۰/۷۷±۹/۲۸) میکرومول بر گرم بافت بود. میانگین سطح متabolیت‌های NO در گروه شم به نسبت گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $P=0/08$ ). میانگین سطح متabolیت‌های NO در گروه آسیب مزمن به نسبت گروه شم به طور معنی‌داری کمتر بود ( $P<0/05$ ). میانگین سطح متabolیت‌های NO در گروه‌های کافین ۱۰۰ و ۳۰۰ به نسبت گروه آسیب مزمن تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $P=0/1$ ,  $P=0/5$ ).

نمودار شماره ۳ نتایج مربوط به غلظت متabolیت‌های NO را در بافت نخاع گروه‌های کنترل، شم و گروه آسیب مزمن عصب، کافین ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و کافین ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را توسط آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی نشان می‌دهد. میانگین سطح متabolیت‌های NO در گروه کنترل دهد. گروه شم (۱۰۲/۴۱±۹/۹)، گروه آسیب مزمن (۸۳/۸۵±۱/۱)، گروه کافین ۱۰۰ (۷۳/۹±۳/۸۰)، گروه کافین ۳۰۰ (۵۶/۲۳±۵/۴۷) و گروه عصب (۷۳/۹±۳/۸۰)



نمودار شماره ۳- اندازه‌گیری سطح متabolیت‌های نیتریک اکسید در بافت نخاع در گروه‌های کنترل، شم، آسیب مزمن و گروه دریافت‌کننده‌ی کافین با غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر.  $P<0/05$  مقایسه با گروه شم  $n=8$ . Mean±SEM,  $P<0/05$

از دوزها عمدتاً در دوزهای ۲۵-۱۰۰ گرم اثرات ضددردی دارد [۳]، از سوی دیگر تجویز حاده کافین در دوزهای پایین سبب تشدید درد نوروپاتیک در برخی از مدل‌های حیوانی درد شده است [۱۰]. مطالعه‌ی انجام شده توسط Wei-Ping Wu و همکاران نشان داده است که مصرف مزمن کافین در دوزهای ۲۷ و ۶۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به مدت ۱۴ روز سبب کاهش تظاهرات رفتاری درد نوروپاتیک القا شده در مدل partial sciatic PNSL (nerve injury می‌شود [۱۰]. مکانیسم‌های مختلفی در مورد اثرات محافظتی غلظت‌های بالای کافین و مصرف طولانی مدت آن وجود دارد [۳]. کافین میل ترکیبی متفاوتی به گیرنده‌های A2 و آدنوزین دارد [۱۸]، گیرنده‌های A2 و A1 در شاخ خلفی نخاع در نورون‌های پس‌سیناپسی آوران‌های اوپیه و به صورت محیطی در سلول‌های گلیال، آستروцит‌ها و سلول‌های ایمنی وجود دارند، گیرنده‌های A1 عمدتاً در ماده‌ی ژلاتینی شاخ خلفی وجود دارند. گیرنده‌های A1 متمرکز شده‌اند [۸,۷] از آن جایی که

## بحث

هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر تجویز مزمن کافین بر آستانه‌ی درد نوروپاتیک در مدل CCI و بررسی تغییرات سطح متabolیت‌های NO بود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که انجام مدل CCI سبب القای درد نوروپاتیک و ایجاد هیرا آژزیای حرارتی شده و تجویز مزمن کافین در غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۸ روز هیرا آژزیای حرارتی ایجاد شده در این مدل را کاهش داد؛ در حالی که سطح متabolیت‌های NO نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد. تحقیق حاضر اوّلین مطالعه‌ای است که در مورد اثر کافین و مسیر NO در درد نوروپاتیک انجام شده است. کافین آکالالوئیدی گیاهی است و آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌های A<sub>1,A<sub>2a,A<sub>2b</sub></sub></sub> آدنوزین می‌باشد که به علت اثرات محرك بر سیستم عصبی و متعاقباً رفع خواب‌آلودگی، خستگی و افزایش هوشیاری مصرف گستره‌ای دارد [۱۸]. مطالعاتی نشان داده‌اند که تجویز حاده کافین در برخی

NO در گروه‌های دریافت‌کننده کافئین نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشته است. همان‌طور که قبل اشاره شد، تحریک گیرنده‌ی A2<sub>b</sub> و A2<sub>a</sub> آدنوزین می‌تواند سبب افزایش تولید NO و تحریک گیرنده‌ی A1 سبب کاهش سطح NO شود. با توجه به این‌که اثر محافظتی دوزهای بالای کافئین بر درد نوروپاتیک از طریق مهار گیرنده‌ی A2<sub>b</sub> و A2<sub>a</sub> انجام می‌شود، این احتمال مطرح بود که اثر محافظتی کافئین بر درد در مدل CCI تاحدی به واسطه‌ی کاهش سطح NO انجام شود، ولی بر خلاف انتظار سطح متabolیت‌های NO نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد، که این احتمال را مطرح می‌کند که کافئین در مدل CCI تأثیری بر مسیر NO ندارد، با این وجود به این علت که سطح متabolیت‌ها با وجود عدم معنی‌داری نسبت به گروه کنترل روند کاهشی نشان داده است، اندازه‌گیری بیان آزمیم NOS، یا روش‌های اندازه‌گیری دقیق‌تر از روش گریس که در این تحقیق استفاده شد، می‌تواند شواهد محکم‌تری در مورد تعامل کافئین و مسیر NO به دست دهد؛ هرچند در تحقیق حاضر امکان این بررسی‌ها وجود نداشت.

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که مصرف مزمن کافئین به مدت ۲۸ روز اثر محافظت‌کننده در برابر درد نوروپاتیک دارد و سبب کاهش هیپرآلزیای حرارتی می‌شود، با توجه به عدم معنی‌داری در سطح متabolیت‌های نیتریک‌اکسید نسبت به گروه کنترل، احتمالاً تعامل کافئین و مسیر نیتریک‌اکسید بر درد نوروپاتیک در مدل CCI تأثیری ندارد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی و پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد با شماره‌ی ۹۷۶۵ می‌باشد. بدین‌وسیله نویسنده‌گان از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه برای حمایت از این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

### References:

- [1] Alles SRA, Smith PA. Etiology and pharmacology of neuropathic pain. *Pharmacol Rev* 2018; 70(2): 315-47.
- [2] Luszczki JJ, Zuchora M, Sawicka KM, Kozińska J, Czuczwar SJ. Acute exposure to caffeine decreases the anticonvulsant action of ethosuximide, but not that of clonazepam, phenobarbital and valproate against pentetetrazole-induced seizures in mice. *Pharmacol Rep* 2006; 58(5): 652-9.
- [3] BernsteinGA, Carroll ME, Thuras PD, Cosgrove KP, Roth ME. Caffeine dependence in teenagers. *Drug Alcohol Depend* 2002; 66(1): 1-6.
- [4] Tavares C, Sakata RK. Caffeine in the treatment of pain. *Rev Bras Anestesiol* 2012; 62(3): 394-401.

گیرنده‌ی A<sub>1</sub> یک گیرنده‌ی مهاری است و مهار آن توسط دوزهای پایین و متوسط کافئین منجر به تشدید درد می‌شود، این احتمال وجود دارد که مصرف مزمن کافئین در دوزهای بالا به واسطه‌ی مهار گیرنده‌های A2<sub>b</sub> و A2<sub>a</sub> که یک گیرنده‌ی تحریکی است، منجر به کاهش درد شود، همچنین این احتمال وجود دارد که اثر مهارکنندگی بر گیرنده‌های A<sub>1</sub> و تشدید درد به واسطه‌ی اثر مهارکنندگی بر گیرنده‌های A2<sub>b</sub> و A2<sub>a</sub> پوشیده و سبب کاهش هیپرآلزیا شود [۳]، مطالعاتی دیگر نشان داده است که موش‌های سوری که گیرنده‌ی آدنوزینی A2<sub>b</sub> و A2<sub>a</sub> آن‌ها حذف شده است، هیپرآلزیک هستند [۱۰]. بنابراین از آنجایی که اثرات مصرف مزمن کافئین نظر حذف گیرنده‌ی A2<sub>b</sub> و A2<sub>a</sub> است، به احتمال قوی اثرات محافظتی کافئین در پدیده‌ی درد از طریق مهار گیرنده‌های آدنوزین است [۱۰]. مطالعاتی نیز پیشنهاد می‌کنند که اثرات کافئین در دوزهای بالا تنها از طریق مهار گیرنده‌های آدنوزین انجام نمی‌شود، بلکه سایر مسیرها همچون اثر مهاری بر سیکلواکسیژنازها و اثرات تعديل‌کنندگی بر مسیر NO نیز می‌تواند دخیل باشد [۱۱,۱۰]. یک میانجی عصبی گازی شکل و قابل انتشار در سیناپس‌های معزز و نخاع است که به روش آزمیم از NOS ساخته می‌شود، مطالعات مختلف اثری دوگانه در فرآیند درد برای این ترکیب گزارش کرده‌اند، در آسیب و التهاب عصبی آزادسازی پیش‌سیناپسی گلوتامات از فیبرهای آوران حسی سبب افزایش تولید و آزادسازی NO در نورون پس‌سیناپسی می‌شود که می‌تواند علاوه بر انتشار در سیناپس‌ها و اثر بر پایانه‌های عصبی و سلول‌های گلیال، مجدداً به صورت پیش‌سیناپسی باعث آزادسازی گلوتامات و افزایش حساسیت مرکزی و معیطری و متعاقباً افزایش هیپرآلزیا شود [۱۹,۱۳,۱۲]. از سوی دیگر مطالعاتی نشان داده‌اند تجویز مقادیر کم ال‌آرژینین به عنوان پیش‌ساز NO و یا ترکیباتی که سبب رهایش مستقیم NO از سیناپس‌ها می‌شود، سبب کاهش هیپرآلزیای حرارتی در برخی از مدل‌های حیوانی درد شده است [۱۹]. با توجه به نقش تعديل‌کننده‌ی کافئین بر مسیر NO در تحقیق حاضر سطح متabolیت‌های NO در بافت نخاع حیوانات مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که سطح متabolیت‌های

- [5] Ferré S, Orrú M, Guitart X. Paraxanthine: Connecting caffeine to nitric oxide neurotransmission. *J Caffeine Res* 2013; 3(2): 72-8.
- [6] Sawynok J. Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience* 2016; 338: 1-18.
- [7] El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Bertorelli R, Ongini E, Costentin J, Vaugeois JM. Adenosine A2A receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A2A receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 2001; 134(1): 68-77.
- [8] Sawynok J. Adenosine receptor activation and nociception. *Eur J Pharmacol* 1998; 347(1): 1-11.
- [9] Wu WP, Hao JX, Fredholm BB, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ. Effect of acute and chronic administration of caffeine on pain-like behaviors in rats with partial sciatic nerve injury. *Neurosci Lett* 2006; 402(1-2): 164-6.
- [10] Bruce C, Yates DH, Thomas PS. Caffeine decreases exhaled nitric oxide. *Thorax* 2002; 57(4): 361-3.
- [11] Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 2011; 25(3): 243-54.
- [12] Yan YY, Li CY, Zhou L, Ao LY, Fang WR, Li YM. Research progress of mechanisms and drug therapy for neuropathic pain. *Life Sci* 2017; 190: 68-77.
- [13] Boison D. Methylxanthines, seizures, and excitotoxicity. *Handb Exp Pharmacol* 2011; (200): 251-66.
- [14] Banafsheh HR, Hajhashemi V, Minaiyan M, Mesdaghinia A, Abed A. Antinociceptive effects of maprotiline in a rat model of peripheral neuropathic pain: possible involvement of opioid system. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18(8): 752.
- [15] Banafsheh H, Mesdaghinia A, Honarkar-Ramezani M, Noorani-Arani M, Banitaba-Bidgoli, Hamidi GA. Effect of lithium on neuropathic pain induced by partial ligation of rat sciatic nerve. *Feyz* 2012; 15(4): 294-301. [in Persian]
- [16] Wen J, Sun D, Tan J, Young W. A consistent, quantifiable, and graded rat lumbosacral spinal cord injury model. *J Neurotrauma* 2015; 32(12): 875-92.
- [17] Heydari A, Davoudi S. The effect of sertraline and 8-OH-DPAT on the PTZ-induced seizure threshold: Role of the nitrergic system. *Seizure* 2017; 45: 119-24.
- [18] Mareš P. A1 not A2A adenosine receptors play a role in cortical epileptic afterdischarges in immature rats. *J Neural Transm (Vienna)* 2014; 121(11): 1329-36.
- [19] Grace PM, Gaudet AD, Staikopoulos V, Maier SF, Hutchinson MR, Salvemini D. Nitroxidative signalling mechanisms in pathological pain. *Trends Neurosci* 2016; 39(12): 862-79.