Original Article

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

Naderi-Tehrani M[1], Heydari AZ[2], Hamidi GH[2*], Nasrollahi S[2]

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 A1, $A2_a$, receptors of adenosine, which has a protective effect on neuropathic pain in some doses by inhibiting $A2_a$, $A2_b$ 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. **N**europathic 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: hamiidi@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 کافئین بر هیپرآلژزیای ناشی از درد نوروپاتیک در موش صحرایی: نقش مسیر نیتریک‌اکسید

منیر نادری تهرانی [۱]، اژدر حیدری [۲]، غلامعلی حمیدی [*۳]، سعیده نصراللهی [۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: درد نوروپاتیک، نوعی درد مزمن است که در اثر آسیب به سیستم عصبی مرکزی و محیطی ایجاد می‌شود. کافئین آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌های $A1,A2_a,A2_b$ آدنوزین است که در برخی از دوزها اثر محافظتی بر درد دارد. با توجه به این‌که ظاهراً نیتریک‌اکسید بر بخشی از اثرات مرکزی کافئین تأثیرگذار است، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر دریافت مزمن کافئین بر هیپرآلژزیای حرارتی در موش‌های صحرایی نوروپاتیک و اندازه‌گیری سطح متابولیت‌های نیتریک‌اکسید می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر بر روی ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم انجام شد. درد نوروپاتیک به‌روش آسیب فشاری مزمن عصب سیاتیک (CCI) القا شد. حیوانات به‌صورت تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی 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 کافئین را به‌مدت ۲۸ روز دریافت می‌کردند. هیپرآلژزیای حرارتی در روزهای ۲۸،۲۱،۱۴،۷،۴ پس از جراحی بررسی شد. سطح متابولیت‌های نیتریک‌اکسید در بافت نخاع حیوانات با روش گریس اندازه‌گیری شد.

نتایج: موش‌های نوروپاتیک کاهش در آستانه‌ی درد را نشان دادند، دریافت مزمن کافئین در دوزهای۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری هیپرآلژزیای حرارتی را کاهش داد ($P<۰/۰۱$،$P<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که دریافت مزمن کافئین می‌تواند هیپرآلژزیای حرارتی را در موش‌های نوروپاتیک کاهش دهد و به‌نظر می‌رسد که مسیر نیتریک‌اکسید در اثرات کافئین بر آستانه‌ی درد در مدل CCI دخالتی ندارد.

واژگان کلیدی: درد نوروپاتیک، کافئین، نیتریک اکسید، هیپرآلژزیا

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

مقدمه

درد نوروپاتیک، نوعی درد مزمن است که در اثر آسیب به سیستم عصبی مرکزی و محیطی به‌وجود می‌آید و با دو علامت هیپرآلژزیا (افزایش حساسیت به محرک‌های آسیب‌رسان) و آلودینیا (حساسیت به محرک‌های غیرآسیب‌رسان) مشخص می‌شود، عواملی همچون آسیب‌های نخاعی و مغزی، بیماری دیابت، بیماری ایدز، و شیمی‌درمانی به دنبال سرطان‌ها از علل ایجادکننده‌ی این نوع درد است و میزان شیوع آن در جهان در حدود ۱/۵ تا ۸ درصد تخمین زده شده‌است [۱].

داروهای ضدّصرع، ضدّافسردگی‌ها و اوپیوئیدها از داروهای مورد استفاده به‌منظور درمان درد نوروپاتیک است، با این وجود مکانیسم دقیق آن هنوز کاملاً مشخص نشده است و به درمان‌های دارویی به خوبی پاسخ نمی‌دهد، به این دلیل مطالعات زیادی به‌منظور یافتن مکانیسم‌ها و درمان‌های جدید همچنان در حال انجام است [۱]. کافئین آلکالوئیدی گیاهی از خانواده‌ی متیل‌گزانتین‌ها است که ترکیب اصلی در قهوه، چای و نوشیدنی‌های گازدار محتوی کولا است. کافئین به‌عنوان یک محرک سیستم عصبی مصرف گسترده‌ای در جهان دارد، علاوه بر این‌که اثرات سودمند آن در پیشگیری از برخی از بیماری‌ها همچون آلزایمر و پارکینسون در مطالعات زیادی تأیید شده است. اثرات بیولوژیک کافئین در سلول از طریق مکانیسم‌های مختلفی انجام می‌شود، کافئین در درجه‌ی اوّل آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌ی $A2_a$ و A1 آدنوزین است [۴-۲]. آدنوزین یک نوکلئوزید پورینی است که از تجزیه‌ی آدنوزین ۵َ- مونوفسفات (AMP) حاصل می‌شود [۵]. این ترکیب به‌عنوان تعدیل‌کننده در بدن و به‌ویژه در سیستم عصبی عمل می‌کند و دارای چهار نوع گیرنده‌ی $A1,A2_a,A2_b,A3$ است، گیرنده‌ی A1 گیرنده‌ای مهاری است که فعال‌شدن آن باعث مهار آنزیم آدنیل-

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

* **نشانی نویسنده مسؤول:**
دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

تلفن: ۰۳۱۵۵۵۴۰۰۲۱ **دورنویس:** ۰۳۱۵۵۵۷۵۰۵۷

پست الکترونیک: hamiidi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۸/۲/۲۸

سیکلاز (AC) و مهار تشکیل آدنوزین مونوفسفات حلقوی ($_{C}$AMP) از آدنوزین تری‌فسفات (ATP) و به‌دنبال آن مهار عملکردهای سلولی مرتبط با این ترکیب می‌شود، از سوی دیگر گیرنده‌ی A2 گیرنده‌ای تحریکی است و فعال‌شدن آن، سبب فعال-شدن AC و تشکیل $_{C}$AMP 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 مختلفی نشان داده‌اند که برخی از دوزهای کافئین نیز اثر کاهش‌دهنده بر درد دارد و به این دلیل به‌عنوان یک داروی ضدّدرد کمکی به فرمولاسیون برخی از داروها از جمله ضدّالتهاب‌های غیراستروئیدی اضافه و باعث اثربخشی بیشتر دارو می‌شود [۳]. احتمالاً بخشی از اثرات کافئین بر کاهش درد از طریق مهار گیرنده‌های $A2_b$ و $A2_a$ آدنوزین به انجام می‌رسد [۳]. از سوی دیگری برخی مطالعات انسانی و حیوانی نشان داده‌اند که تجویز حادّ کافئین در دوزهای پایین سبب کاهش آستانه‌ی درد (تشدید درد) و کاهش اثربخشی داروهای ضدّدردی همچون آمی-تریپتیلین و کاربامازپین می‌شود و این اثر احتمالاً با مهار گیرنده‌ی A_1 آدنوزین به انجام می‌رسد [۹]. از سوی دیگر در مطالعه‌ای حیوانی نشان داده شده‌است، 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 تشدید درد داشته و احتمالاً این اثر ناشی از مهار گیرنده‌ی $A2_b$ و $A2_a$ آدنوزین است [۱۰]. همان‌گونه که ذکر شد گیرنده‌ی A1 آدنوزین مهاری است و تحریک آن منجر به کاهش سطح نیتریک‌اکسید (NO) می‌شود، در مقابل تحریک گیرنده‌ی A2 سبب افزایش سطح NO می‌شود [۱۱]. NO یک مولکول گازی و رادیکال آزاد است که در سیستم عصبی به‌عنوان یک انتقال‌دهنده‌ی پیام‌های عصبی و تعدیل‌کننده عمل می‌کند، NO تحت تأثیر آنزیم نیتریک‌اکسید سنتاز (NOS) از اسید آمینه‌ی ال-آرژنین تولید می‌شود. آنزیم NOS در تمام سطوح سیستم عصبی مرکزی و به‌ویژه در شاخ خلفی نخاع بیان می‌شود، مولکول NO یک فعال‌کننده‌ی قوی برای آنزیم گوانیل سیکلاز (GC) است و به‌دنبال آن سبب افزایش تولید گوانوزین مونوفسفات حلقوی ($_{C}$GMP) از گوانوزین تری‌فسفات (GTP) می‌شود، این مولکول با اثر بر پروتئین‌کینازها، کانال‌های یونی و آنزیم فسفودی‌استراز عملکردهای داخل سلولی خود را انجام می-دهد [۱۱]. علاوه بر این NO در فرآیند درد نیز نقش دارد و در این مورد به‌صورت دوگانه عمل می‌کند، در گزارش‌هایی تجویز ال-آرژنین به‌عنوان پیش‌ساز NO و یا تجویز ترکیباتی که منجر به رهایش مستقیم NO از سیناپس‌ها می‌شود، سبب تشدید و تداوم درد در برخی از مدل‌های حیوانی درد نوروپاتیک شده‌است [۱۱]. نقش این ترکیب در تشدید درد به اسید آمینه‌ی گلوتامات مربوط است که در آسیب عصب از پایانه‌های عصبی آزادشده، باعث تحریک گیرنده‌ی (ان-متیل-دی آسپارتیک‌اسید (NMDA) مربوط به خود می‌شود، تحریک این گیرنده متعاقباً سبب فعال‌سازی آنزیم NOS و تولید NO می‌شود [۱۱]. NO به نوبه‌ی خود با اثر بر نورون‌های آوران حسّی درد و تولید $_{C}$GMP و فعال‌کردن پروتئین کینازها و افزایش فعالیت و بیان کانال‌های سدیمی و کلسیمی ولتاژی در غشای نورون‌ها سبب افزایش فرکانس پتانسیل عمل و افزایش شدت و حساسیت به درد می‌شود. در مقابل نقش NO در کاهش درد مربوط به فعال‌کردن کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP و افزایش خروج پتاسیم 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 نیتریک‌اکسید انجام می‌شود [۱۱]. به این دلایل مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی مصرف مزمن کافئین و نقش مسیر نیتریک‌اکسید بر آستانه‌ی درد نوروپاتیک مسیر انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به روش تجربی بر روی ۴۰ سر موشِ صحراییِ نرِ بالغِ نژادِ Wistar در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم و به‌مدت ۹ ماه در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام شد، حیوانات در قفس‌های چهارتایی نگهداری می‌شدند، آب و غذا به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار می‌گرفت و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی با درجه حرارت ۲±۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند [۱۳]. کلیه‌ی حیوانات از مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی‌کاشان تهیه شدند و همه‌ی مراحل آزمایش شامل تکثیر، انجام آزمایش و معدوم‌کردن 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 به‌صورت تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند و در

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 زده‌شد، و گروه آسیب مزمن فشاری عصب (CCI) که حیوانات آن جراحی شده و عصب سیاتیک به‌وسیله‌ی چهار گره تحت فشار مزمن قرار گرفت، ۲ گروه آزمایش CCI که غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آب آشامیدنی کافئین (سیگما، آمریکا) را به‌صورت 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 کلیه‌ی 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 میله‌ی کوچک شیشه‌ای بافت‌های اطراف عصب جدا و به‌وسیله‌ی نخ بخیه‌ی کرومیک ۴-۰ چهار گره شل به فواصل یک میلی‌متر قبل از سه شاخه شدن عصب زده‌شد، گره‌ها به شکلی زده‌شد که اختلالی در جریان خون عصب به‌وجود نیاورد. سپس با استفاده از نخ بخیه ۴-۰ نایلون، عضله و پوست به‌صورت جداگانه بسته شدند [۱۵].

ارزیابی رفتاری درد نوروپاتیک

تست رفتاری بررسی فرآیند درد توسط دستگاه Plantar test (Ugo Bassil, Italy) جهت بررسی هیپرآلژزیای حرارتی در حیوانات در روزهای ۲۸،۲۱،۱۴،۷،۴ پس از جراحی انجام گرفت. بخش جانبی و میانی کف پای سالم و پای آسیب‌دیده به‌ترتیب در گروه‌های کنترل، شم و CCI با استفاده از دستگاه Plantar test از میان سطح پلکسی گلاس در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار گرفت. سپس زمان عقب‌کشیدن پا (آستانه‌ی درد نوروپاتیک) ثبت شد. تحریکات گرمایی سه مرتبه با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه تکرار شدند و درنهایت میانگین زمان واکنش ثبت شد [۱۵].

اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک‌اکسید

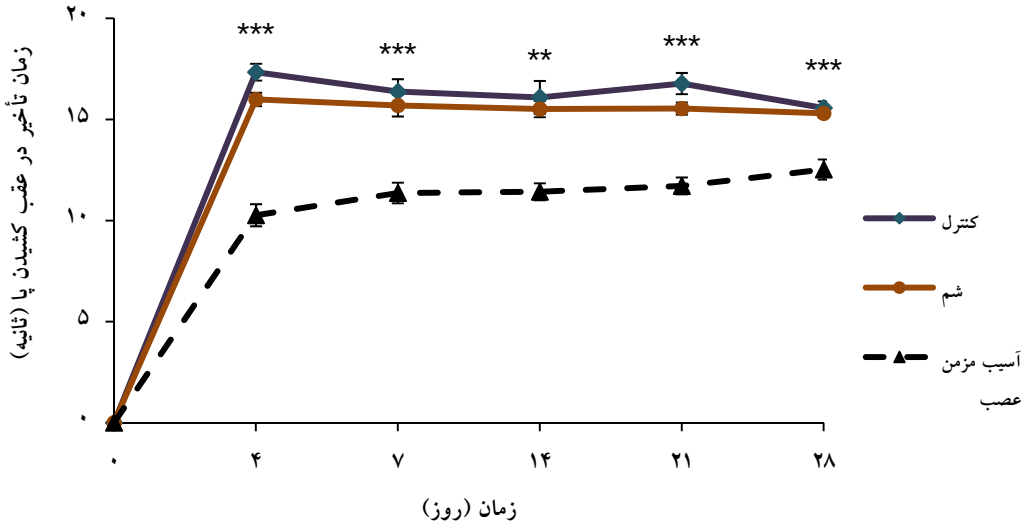
پس از انجام تست‌های رفتاری به‌منظور اندازه‌گیری سطح متابولیت‌های NO در بافت نخاع، حیوانات ابتدا با اتیلن‌دی‌اتر تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و دایسکشن نخاع در قطعات نخاعی L4-L6 انجام شد، سپس قطعات نخاعی موردنظر به دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شد [۱۶]. اندازه‌گیری NO به‌طور غیرمستقیم و از طریق اندازه‌گیری متابولیت‌های پایدار آن (نیترات و نیتریت) انجام پذیرفت. اساس این روش واکنش و تشکیل یک کروموفور از دی آزوتاسیون یک سولفانیل آمید به کمک نیتریت در محیط اسیدی و ترکیب آن با یک آمین دو حلقه‌ای مثل (1-N-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride) NEDD است. برای اندازه‌گیری متابولیت‌ها، بافت نخاع در بافر فسفات هموژنیزه شد، سپس پروتئین‌ها با اضافه‌کردن تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به سوسپانسیون هموژنیزه بافتی و سانتریفیوژ کردن، رسوب داده‌شدند، به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های پروتئین‌زدایی شده، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول وانادیم کلراید (VCL_3) و ۵۰ میکرولیتر سولفانیل آمید و ۵۰ میکرولیترNEDD افزوده شد و نمونه‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انجام واکنش، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی با استفاده از اسپکتروفتومتر 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 مقایسه‌ی گروه‌ها استفاده شد. در تمام گروه‌ها معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته‌شد. به‌منظور بررسی سطح متابولیت‌های NO در گروه‌های موردنظر از آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده و معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

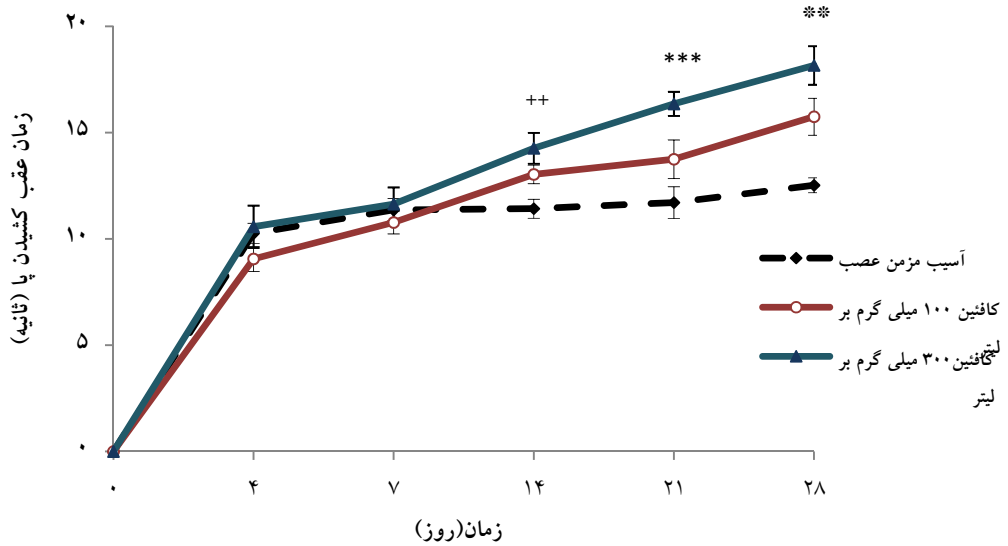
نتایج

نمودار شماره‌ی ۱ نتایج مربوط به بررسی آستانه‌ی درد نوروپاتیک در تست هیپرآلژزیای حرارتی در گروه‌های کنترل، شم و آسیب مزمن عصب را توسط آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر و تست تعقیبی توکی نشان می‌دهد ($F(۲۸،۳)=۹۶/۳$، $P<۰/۰۰۱$). 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 ۴،۷،۱۴،۲۱،۲۸ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد ($P<۰/۰۱$،$P<۰/۰۱$).



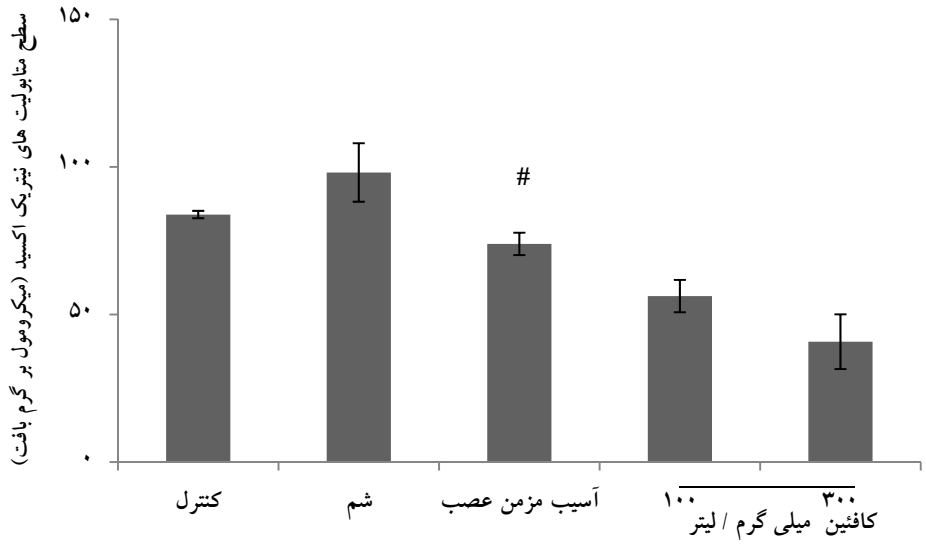
نمودار شماره ۱- بررسی تأخیر در زمان عقب‌کشیدن پا (آستانه‌ی درد نوروپاتیک) در تست هیپرآلژزیای حرارتی $^{**}P<۰/۰۱$، $^{***}P<۰/۰۰۱$ مقایسه با گروه شم. n=۸،Mean±SEM, $P<۰/۰۵$

نمودار شماره‌ی ۲ نتایج مربوط به تجویز مزمن کافئین به‌مدت ۲۸ روز را بر میانگین آستانه‌ی درد نوروپاتیک توسط آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر و تست تعقیبی توکی، در تست هیپرآلژزیای حرارتی را نشان می‌دهد ($F(۲،۲۱)=۱۴/۱$، $P<۰/۰۰۱$). میانگین آستانه‌ی درد در گروه دریافت‌کننده‌ی کافئین ۱۰۰ به نسبت گروه آسیب مزمن عصب افزایش یافت و در روز ۲۸ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد ($P<۰/۰۱$). میانگین آستانه‌ی درد در گروه دریافت‌کننده‌ی کافئین ۳۰۰ به نسبت گروه آسیب مزمن عصب افزایش یافت و در روزهای ۱۴،۲۱،۲۸ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$، $P<۰/۰۱$).



نمودار شماره ۲- اثر غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کافئین بر تأخیر در زمان عقب‌کشیدن پا (آستانه‌ی درد نوروپاتیک) در تست هیپرآلژزیای حرارتی. $^{**}P<۰/۰۱$ ، $^{++}$ و $^{***}P<۰/۰۰۱$ مقایسه با گروه آسیب مزمن عصب. n=۸،Mean±SEM, $P<۰/۰۵$

نمودار شماره ۳ نتایج مربوط به غلظت متابولیت‌های NO را در بافت نخاع گروه‌های کنترل، شم و گروه آسیب مزمن عصب، کافئین ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و کافئین ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را توسط آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی نشان می‌دهد. میانگین سطح متابولیت‌های NO در گروه کنترل (۸۳/۸۵±۱/۲۴)، گروه شم (۱۰۲/۴۱±۹/۹)، گروه آسیب مزمن عصب (۷۳/۹±۳/۸۰)، گروه کافئین ۱۰۰ (۵۶/۲۳±۵/۴۷) و گروه کافئین ۳۰۰ (۴۰/۷۷±۹/۲۸) میکرومول بر گرم بافت بود. میانگین سطح متابولیت‌های NO در گروه شم به نسبت گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P=۰/۰۸). میانگین سطح متابولیت‌های NO در گروه آسیب مزمن به نسبت گروه شم به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P<۰/۰۵). میانگین سطح متابولیت‌های NO در گروه‌های کافئین ۱۰۰ و ۳۰۰ به نسبت گروه آسیب مزمن تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P=۰/۱، P=۰/۵).



نمودار شماره ۳- اندازه‌گیری سطح متابولیت‌های نیتریک‌اکسید در بافت نخاع در گروه‌های کنترل، شم، آسیب مزمن و گروه دریافت‌کننده‌ی کافئین با غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر. P<۰/۰۵ # مقایسه با گروه شم P<۰/۰۵، n=۸،Mean±SEM

بحث

هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر تجویز مزمن کافئین بر آستانه‌ی درد نوروپاتیک در مدل CCI و بررسی تغییرات سطح متابولیت‌های NO بود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که انجام مدل CCI سبب القای درد نوروپاتیک و ایجاد هیپرآلژزیای حرارتی شده و تجویز مزمن کافئین در غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۸ روز هیپرآلژزیای حرارتی ایجادشده در این مدل را کاهش داد؛ در حالی‌که سطح متابولیت‌های NO نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد. تحقیق حاضر اوّلین مطالعه‌ای است که در مورد اثر کافئین و مسیر NO در درد نوروپاتیک انجام شده‌است. کافئین آلکالوئیدی گیاهی است و آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌های $A1,A2_a,A2_b$ آدنوزین می‌باشد که به‌علت اثرات محرک بر سیستم عصبی و متعاقباً رفع خواب‌آلودگی، خستگی و افزایش هوشیاری مصرف گسترده‌ای دارد [۱۸]. مطالعاتی نشان داده‌اند که تجویز حادّ کافئین در برخی از دوزها عمدتاً در دوزهای ۱۰۰-۲۵ گرم اثرات ضدّدردی دارد [۳]، از سوی دیگر تجویز حادّ کافئین در دوزهای پایین سبب تشدید درد نوروپاتیک در برخی از مدل‌های حیوانی درد شده است [۱۰]. مطالعه‌ی انجام‌شده توسط Wei-Ping wu و همکاران نشان داده است که مصرف مزمن کافئین در دوزهای ۲۷ و ۶۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به‌مدت ۱۴ روز سبب کاهش تظاهرات رفتاری درد نوروپاتیک القاشده در مدل partial sciatic nerve injury (PSNL) می‌شود [۱۰]. مکانیسم‌های مختلفی در مورد اثرات محافظتی غلظت‌های بالای کافئین و مصرف طولانی‌مدت آن وجود دارد [۳]، کافئین میل ترکیبی متفاوتی به گیرنده‌های A2 و A1 آدنوزین دارد [۱۸]، گیرنده‌های A2 و A1 در شاخ خلفی نخاع در نورون‌های پس‌سیناپسی آوران‌های اوّلیه و به‌صورت محیطی در سلول‌های گلیال، آستروسیت‌ها و سلول‌های ایمنی وجود دارند، گیرنده‌های A_1 عمدتاً در ماده‌ی ژلاتینی شاخ خلفی (Substansia gelatinosa) متمرکز شده‌اند [۸،۷]. از آن‌جایی‌که

گیرنده‌ی A_1 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 $A2_b$ و $A2_a$ که یک گیرنده‌ی تحریکی است، منجر به کاهش درد شود، همچنین این احتمال وجود دارد که اثر مهارکنندگی بر گیرنده‌های A_1 و تشدید درد به واسطه‌ی اثر مهارکنندگی بر گیرنده‌های $A2_b$ و $A2_a$ پوشیده و سبب کاهش هیپرآلژزیا شود [۳]، مطالعاتی دیگر نشان داده‌است که موش‌های سوری که گیرنده‌ی آدنوزینی $A2_b$ و $A2_a$ آن‌ها حذف شده است، هیپوآلژزیک هستند [۱۰]. بنابراین از آن‌جایی‌که اثرات مصرف مزمن کافئین نظیر حذف گیرنده‌ی $A2_b$ و $A2_a$ است، به احتمال قوی اثرات محافظتی کافئین در پدیده‌ی درد از طریق مهار گیرنده-های A_2 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 تعدیل‌کنندگی بر مسیر NO نیز می‌تواند دخیل باشد [۱۱،۱۰]. NO یک میانجی عصبی گازی‌شکل و قابل انتشار در سیناپس‌های مغز و نخاع است که به‌روش آنزیمی 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 حسّی 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 به‌صورت پیش‌سیناپسی باعث آزادسازی گلوتامات و افزایش حساسیت مرکزی و محیطی و متعاقباً افزایش هیپرآلژزیا شود [۱۹،۱۳،۱۲]. از سوی دیگر مطالعاتی نشان داده‌اند تجویز مقادیر کم ال-آرژینین به‌عنوان پیش‌ساز NO و یا ترکیباتی که سبب رهایش مستقیم NO از سیناپس‌ها می‌شود، سبب کاهش هیپرآلژزیای حرارتی در برخی از مدل‌های حیوانی درد شده‌است [۱۹]. باتوجه به نقش تعدیل‌کننده‌ی کافئین بر مسیر NO در تحقیق حاضر سطح متابولیت‌های NO در بافت نخاع حیوانات مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که سطح متابولیت‌های NO در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کافئین نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشته است. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، تحریک گیرنده‌ی $A2_b$ و $A2_a$ آدنوزین می‌تواند سبب افزایش تولید NO و تحریک گیرنده‌ی A1 سبب کاهش سطح NO شود. باتوجه به این‌که اثر محافظتی دوزهای بالای کافئین بر درد نوروپاتیک از طریق مهار گیرنده‌ی $A2_b$ و $A2_a$ انجام می‌شود، این احتمال مطرح بود که اثر محافظتی کافئین بر درد در مدل CCI تاحدّی به واسطه‌ی کاهش سطح NO انجام شود، ولی بر خلاف انتظار سطح متابولیت‌های 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، بااین‌وجود به این علت که سطح متابولیت‌ها با وجود عدم معنی‌داری نسبت به گروه کنترل روند کاهشی نشان داده‌است، اندازه‌گیری بیان آنزیم NOS، یا روش‌های اندازه‌گیری دقیق‌تر از روش گریس که در این تحقیق استفاده‌شد، می‌تواند شواهد محکم‌تری در مورد تعامل کافئین و مسیر NO به‌دست دهد؛ هرچند در تحقیق حاضر امکان این بررسی‌ها وجود نداشت.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که مصرف مزمن کافئین به‌مدت ۲۸ روز اثر محافظت‌کننده در برابر درد نوروپاتیک دارد و سبب کاهش هایپرآلژزیای حرارتی می‌شود، با توجه به عدم معنی-داری در سطح متابولیت‌های 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 کارشناسی‌ارشد با شماره‌ی (۹۷۶۵) می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان 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 pentetrazole-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.

[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 signaling mechanisms in pathological pain. ***Trends Neurosci*** 2016; 39(12): 862-79.