

## Involvement of nitric oxide in the effect of caffeine on the pentylenetetrazole-induced seizure threshold in mice

Z. Esmaili<sup>1</sup>, A. Heydari<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Physiology Research Center, Student Research Committee, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Corresponding Address: Azhdar Heydari, Department of Medical Basic Sciences, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Tel: +98-31-55540021; Email: heydariazh@gmail.com

Received: 1 Aug 2018; Accepted: 11 Oct 2018

### \*Abstract

**Background:** Effect of caffeine on seizure is controversial in animal models of epilepsy. Caffeine is non-selective antagonist of A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> adenosine receptors. Meanwhile, nitric oxide-soluble guanylate cyclase-cyclic guanosine monophosphate (NO-sGC-cGMP) pathway is partly involved in the central effects of caffeine.

**Objective:** The aim of this study was to investigate the effect of acute caffeine administration on seizure threshold and levels of nitric oxide metabolites in pentylenetetrazole (PTZ) model in mice.

**Methods:** In this study, 35 NMRI mice (25-30 g) were divided into 5 groups (7 animals in each group). Clonic seizure threshold induced by PTZ was assessed in intact control group or 30 min after acute intraperitoneal administration of caffeine (5, 100, and 150 mg/kg) or saline. Nitric oxide metabolites (NOx) were measured in the brain tissues of all groups at the end of experiments. Data were analyzed by ANOVA and followed Tukey test for multiple comparisons.

**Findings:** Acute administration of 5 mg/kg of caffeine significantly decreased seizure threshold compared to saline (P<0.01). While 100 and 150 mg/kg of caffeine did not change seizure threshold. NOx levels significantly decreased following acute administration of caffeine (100 and 150 mg/kg) compared to saline (P<0.05).

**Conclusion:** The results of study showed that different doses of caffeine had different effects. It seems that effect of higher doses of caffeine is partly mediated through modulation of nitric oxide pathway.

**Keywords:** Seizure, Caffeine, Nitric oxide, Pentylenetetrazole

**Citation:** Esmaili Z, Heydari A. Involvement of nitric oxide in the effect of caffeine on the pentylenetetrazole-induced seizure threshold in mice. J Qazvin Univ Med Sci 2018; 22(5): 4-13.

## مداخله نیتریک اکساید در اثر کافئین بر آستانه تشنج ناشی از پنتیلین تترازول در موش

زهرا اسماعیلی<sup>۱</sup>، دکتر اژدر حیدری<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات فیزیولوژی کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

آدرس نویسنده مسؤل: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، گروه علوم پایه پزشکی، تلفن ۰۳۱ - ۵۵۵۴۰۰۲۱  
تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۹

### \*چکیده

**زمینه:** اثر کافئین بر تشنج در مدل‌های حیوانی صرع متناقض می‌باشد. کافئین آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌های  $A_1$  و  $A_{2A}$  آدنوزین است. از طرفی مسیر نیتریک اکساید- گوانیلات سیکلاز محلول- آدنوزین منوفسفات حلقوی (NO-sGC-cGMP) تا حدی در اثرهای مرکزی کافئین دخیل است.

**هدف:** مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر مواجهه حاد کافئین بر آستانه تشنج ناشی از پنتیلین تترازول و اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۳۵ سر موش سوری نژاد NMRI (وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم) به ۵ گروه (هر گروه ۷ حیوان) تقسیم شدند. آستانه تشنج کلونیک ناشی از انفوزیون داخل وریدی پنتیلین تترازول (PTZ) در گروه کنترل دست نخورده یا ۳۰ دقیقه بعد از تجویز حاد کافئین (۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یا سالین اندازه‌گیری شد. در پایان آزمایش‌ها، اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید در بافت‌های مغز همه گروه‌ها صورت گرفت. از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس آزمون توکی جهت مقایسه معنی‌داری گروه‌ها استفاده شد.

**یافته‌ها:** تجویز حاد دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کافئین آستانه تشنج را به نسبت گروه سالین به‌صورت معنی‌داری کاهش داد ( $P < 0/01$ ). در حالی که دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کافئین تغییری در آستانه تشنج ایجاد نکرد. سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید متعاقب تجویز حاد دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کافئین نسبت به گروه سالین به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که کافئین در دوزهای مختلف اثرهای متفاوتی داشته و این احتمال وجود دارد که اثر دوزهای بالای کافئین تا حدی به‌واسطه کاهش تولید نیتریک اکساید باشد.

**کلیدواژه‌ها:** کافئین، تشنج، نیتریک اکساید، پنتیلین تترازول

### \*مقدمه:

کافئین (۱، ۳، ۷ تری متیل گزانتین)، یک ترکیب آلکالوئید طبیعی و از رایج‌ترین محرک‌های سیستم عصبی مرکزی است که در سرتاسر دنیا مصرف می‌شود. در کشورهای توسعه یافته، ۹۰ درصد افراد روزانه کافئین مصرف می‌کنند که میزان مصرف روزانه آن به ۲۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر شخص می‌رسد. مقدار کافئین موجود در یک قوطی از این نوشیدنی‌ها حدود ۸۰ میلی‌گرم در ۲۵۰ میلی‌لیتر است. از این‌رو عوارض جانبی ناشی از مصرف بیش از حد این نوشیدنی‌ها هنوز یک موضوع مورد بحث باقی مانده است.<sup>(۳)</sup>

تشنج یک اختلال موقت عملکرد مغزی در اثر فعالیت الکتریکی غیرطبیعی نورونی است که اغلب از یک منطقه شروع می‌شود و به سایر نقاط گسترش می‌یابد. صرع از اختلال‌های رایج نورولوژیک جدی و شایع می‌باشد که با تشنج‌های مکرر مشخص می‌شود و موجب کاهش دوره‌ای سطح هوشیاری می‌گردد.<sup>(۱)</sup> صرع یکی از فراوان‌ترین اختلال‌های نورولوژیک بوده و شیوع آن یک درصد گزارش شده است. نزدیک به ۵۰ میلیون نفر مبتلا به صرع در جهان شناخته شده‌اند که حدود ۹۰ درصد این موارد مربوط به کشورهای در حال توسعه می‌باشد.<sup>(۲)</sup>

نمی‌دهد.<sup>(۱۱)</sup> همچنین در حیواناتی که کافئین را در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و طی ۱۴ روز دریافت نمودند تشنج ناشی از پنتیلین تترازول کاهش یافت.<sup>(۱۲)</sup> نتایج مطالعه‌ای بر روی موش‌های صحرایی آزمایشگاهی که در آب آشامیدنی خود کافئین دریافت کرده بودند نشان داد که این حیوانات در برابر اثرهای محرک ناشی از کافئین تحمل‌پذیری پیدا می‌کنند که این تحمل‌پذیری می‌تواند ناشی از کاهش بیان ژن گیرنده  $A_{2A}$  در ناحیه جسم مخطط مغز باشد.<sup>(۱۳)</sup>

با توجه به این که کافئین آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌های آدنوزین می‌باشد، به نظر می‌رسد که بخش عمده‌ای از اثرهای متناقض آن بر تشنج از طریق آنتاگونیسم کردن گیرنده‌های آدنوزینی باشد.<sup>(۱۴)</sup> آدنوزین تعدیل‌کننده عصبی است که نقش ضد تشنج آن از طریق گیرنده  $A_1$  به اثبات رسیده است. آدنوزین در غلظت‌های پایین در حد نانومولار سبب فعال کردن گیرنده  $A_1$  می‌گردد، در حالی که گیرنده  $A_{2A}$  آدنوزین یک گیرنده تحریکی است و از طریق G پروتئین تحریکی به آدنیلات سیکلاز متصل و فعالیت آن موجب تشدید حمله‌های تشنجی می‌گردد.<sup>(۱۵)</sup> کافئین علاوه بر گیرنده‌های آدنوزین از طریق سایر مسیرها از جمله تغییر در سطح نیتریک اکساید (NO) هم می‌تواند اثرهای خود را اعمال کند.

NO یک نوروترانسمیتر/نورومودولاتور در مغز می‌باشد و گازی است که تحت تأثیر آنزیم سازنده نیتریک اکساید (NOS) از اکسید شدن اسید آمینه ال-آرژنین به ال-سیترولین حاصل می‌شود. نقش و عملکرد NO در ایجاد یا مهار تشنج به‌طور کامل روشن نشده است. بعضی مطالعه‌ها نشان می‌دهند که NO اثر تشنج‌زا دارد، در حالی که مطالعه‌های دیگر NO را یک ماده ضد تشنج می‌دانند که در حفاظت مغز از آسیب‌های تشنج‌ای نقش می‌کند.<sup>(۱۶)</sup> شواهد واضحی وجود دارد که NO در اثر ضد تشنج آدنوزین دخیل است. در همین زمینه مهارکننده غیراختصاصی نیتریک اکساید سنتتاز (N-Nitro-L-arginine methylester; L-NAME)

کافئین اثرهای فارماکولوژیک مختلفی دارد، از جمله اختلال‌های عصبی مانند آرایمر و پارکینسون یک نقش محافظتی سلول عصبی را دارد و همچنین بی‌دردی، بهبود فعالیت بدنی و عملکرد شناختی و همچنین افزایش هوشیاری نیز مؤثر است.<sup>(۴)</sup> مهم‌ترین اثر کافئین مهار گیرنده‌های آدنوزینی در مغز است. آدنوزین، تعدیل‌کننده عصبی است که محصول تجزیه آدنوزین تری فسفات می‌باشد و دارای چهار گیرنده متصل به G پروتئین شامل:  $A_1$ ،  $A_{2A}$ ،  $A_{2B}$  و  $A_3$  است. دو گیرنده  $A_{2A}$  و  $A_1$  نقش و اهمیت ویژه‌ای در مغز نشان می‌دهند.<sup>(۵)</sup> آدنوزین به‌عنوان یک ترکیب ضد تشنج با منشأ داخلی عمل می‌کند و این اثر عمدتاً به‌واسطه اثر برگیرنده  $A_1$  اعمال می‌شود.<sup>(۶)</sup> کافئین اثرهای فارماکولوژیک پیچیده‌ای دارد و مهم‌ترین اثر بیولوژیک آن به‌واسطه بلوک گیرنده‌های  $A_{2A}$  و  $A_1$  آدنوزین در مغز است. نتایج حاصل از مطالعه‌ها در زمینه اثر کافئین بر تشنج متناقض بوده به‌نحوی که برخی از گزارش‌ها نقش تشنج‌زایی برای کافئین در نظر می‌گیرند در حالی که گزارش‌های متضاد بسیاری نیز ارایه شده است. برخی از مطالعه‌های انسانی و حیوانی پیشنهاد می‌کنند که کافئین می‌تواند یک ماده تشنج‌زا باشد، اما اثر تشنج‌زایی آن هنوز مورد بحث باقی مانده است.<sup>(۷)</sup>

در مطالعه‌ای که به بررسی اثر دوزهای بالای کافئین پرداختند، مشاهده کردند که دوزهای بالای کافئین از جمله دوزهای بالاتر از ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند سبب بروز حمله‌های تشنجی در جوندگان گردد.<sup>(۹)</sup> همچنین تجویز حاد کافئین در برخی از مدل‌های مختلف صرع حیوانی مانند؛ صرع ناشی از پنتیلین تترازول (PTZ)، الکتروشوک و یا صرع ژنتیکی منجر به بروز تشنج و آسیب به قسمت‌هایی از مغز می‌شود.<sup>(۱۰)</sup> از طرفی در سال‌های اخیر نقش تشنج‌زایی کافئین مورد تردید قرار گرفته است. برای مثال در مطالعه‌ای بر روی تعدادی از خانم‌های جوان مشاهده شد که مصرف مقادیر متوسط تا بالای کافئین، خطر ابتلا به تشنج یا صرع را افزایش

تکثیر، انجام آزمایش‌ها و معدوم کردن حیوانات مطابق با قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی و اصول مصوب کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام گرفت.

داروهای استفاده شده در این مطالعه شامل؛ پنتیلین تترازول و کافئین می‌باشد که هر دو از شرکت دارویی سیگما آمریکا خریداری شدند. دوزهای انتخاب شده نیز براساس مطالعه‌های قبلی انتخاب گردید و از نرمال سالین ۰/۹ درصد به‌عنوان حلال PTZ و کافئین استفاده شد.<sup>(۱۹)</sup> در گروه‌های آزمایشی، کافئین ۳۰ دقیقه قبل از اندازه‌گیری آستانه تشنج کلونیک ناشی از PTZ به‌صورت داخل صفاقی و با حجم تزریق ۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم براساس وزن بدن حیوانات تزریق گردید. جهت ایجاد مدل حیوانی تشنج، PTZ در نرمال سالین حل شده و به حیوانات گروه‌های کنترل و گروه‌های دریافت‌کننده کافئین تزریق شد. تزریق به‌صورت داخل وریدی در ورید جانبی دم حیوان انجام گرفت.

در شروع هر آزمایش حیوان توزین شده و در زمان آزمایش، دم حیوان به‌مدت یک دقیقه در آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا وریدهای دم متسع شود. سپس حیوان را در مقیدکننده قرار داده و سر سوزن دندان‌پزشکی شماره ۳۰ متصل به لوله رابط پلی اتیلنی شماره ۱۰ را وارد ورید نموده و به پمپ تزریق وصل شد. در صورت مشاهده خون و تصدیق محل ورود، سوزن با چسب مخصوص به دم حیوان ثابت گشته و به حیوان اجازه داده می‌شد تا در محفظه مخصوص که برای مشاهده حیوان طراحی شده بود، آزادانه حرکت کند. تزریق پنتیلین تترازول توسط پمپ با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه شروع شده و تا مشاهده تشنج کلونیک ادامه یافت. حیوان در طول مدت آزمایش تحت نظر بوده و انفوزیون زمانی متوقف می‌شد که کلونوس عمومی (کلونوس اندام جلویی و متعاقب آن کلونوس کامل بدن) مشاهده می‌شد. با در نظر گرفتن زمان ثبت شده، غلظت پنتیلین تترازول و سرعت

اثر ضد تشنج آدنوزین را تقویت نمود و ال-آرژنین (پیش‌ساز نیتریک اکساید) سبب کاهش آستانه تشنج شد که تداخل مسیر نیتریک اکساید را به‌واسطه تعدیل گیرنده‌های آدنوزین نشان می‌دهد.<sup>(۱۷)</sup>

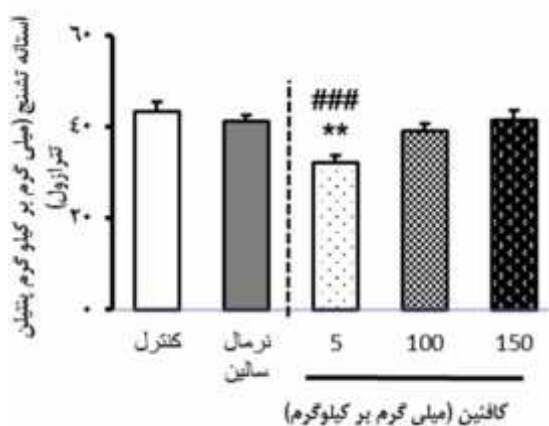
نتایج مطالعه‌های گذشته نشان داده است که مسیر NO-cGMP اثر تعدیل‌کننده‌ای بر فعالیت ضد تشنجی آدنوزین دارد. از طرفی تحریک گیرنده A<sub>1</sub> آدنوزین می‌تواند منجر به کاهش سطح NO شود. این فرضیه وجود داشت که اثر کافئین بر آستانه تشنج به‌واسطه مهار گیرنده A<sub>1</sub> و تغییر در سطح NO باشد، در حالی که فعال شدن گیرنده A<sub>2A</sub> می‌تواند منجر به افزایش NO شود.<sup>(۱۸)</sup> تاکنون مطالعه‌ای در جهت روشن نمودن بررسی اثر دوزهای بالای کافئین و نقش مسیر نیتریک اکساید در اثرهای کافئین بر آستانه تشنج انجام نشده است، نتایج فوق این احتمال را مطرح می‌کند که بخشی از اثرهای کافئین به‌واسطه تعدیل مسیر نیتریک اکساید باشد. در مجموع با توجه به نتایج مطالعه‌های مختلف، این مطالعه با هدف بررسی اثر تجویز حاد کافئین بر آستانه تشنج ناشی از پنتیلین تترازول در موش سوری و اندازه‌گیری سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید انجام گرفت.

### \* مواد و روش‌ها:

در این مطالعه تجربی از ۳۵ سر موش سوری نژاد NMRI در محدوده وزنی ۲۵ تا ۳۰ گرم و با سن حدود ۶ تا ۸ هفته استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی با دمای ۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۰ تا ۶۰ درصد و در قفس‌های مخصوص ۴ تایی با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. حیوانات به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۷ تایی شامل؛ گروه کنترل دست نخورده، گروه شاهد کنترل (نرمال سالین) و گروه‌های دریافت‌کننده کافئین با غلظت ۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. کلیه حیوانات مطالعه از حیوان‌خانه مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان تهیه شدند و همه مراحل آزمایش شامل؛

۳۲/۱۹±۱/۶۴، ۳۹/۰۶±۱/۶۴ و ۴۱/۴۴±۲/۰۲ میلی گرم بر کیلوگرم بود. آستانه تشنج در گروه‌های دریافت‌کننده کافئین با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه شاهد کنترل کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/01$ ) که نشان‌دهنده این است که کافئین در دوزهای پایین سبب کاهش آستانه تشنج شده و اثر تشنج‌زایی دارد، در حالی که آستانه تشنج در گروه‌های دریافت‌کننده کافئین با دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به نسبت گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت، همچنین بین این دو گروه نسبت به هم نیز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $P < 0/93$ ) (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- اثر تجویز حاد دوزهای مختلف کافئین (۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) یا سالین بر آستانه تشنج کلونیک ناشی از پنتیلین تترازول در موش سوری



$P < 0/01$  \*\*مقایسه با گروه شاهد کنترل (سالین)

$P < 0/001$  ###مقایسه با گروه کنترل

نتایج مربوط به میزان غلظت متابولیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغزی موش‌های دریافت‌کننده کافئین به صورت حاد با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی نشان می‌دهد سطح متابولیت‌های NO در نمونه‌های هموزنیزه بافت مغز در گروه کنترل ۶۰/۰۷±۳/۹۴، شاهد کنترل ۶۹/۸۲±۵/۲۰ و در گروه‌های دریافت‌کننده کافئین با غلظت‌های ۵، ۱۰۰ و

انفوزیون، میزان پنتیلین تترازول مورد نیاز برای ایجاد کلونوس عمومی محاسبه شده و به صورت آستانه تشنج گزارش شد.<sup>(۲۱)</sup>

اندازه‌گیری نیتریک اکساید به‌طور غیرمستقیم و از طریق اندازه‌گیری متابولیت‌های پایدار آن (نیترات و نیتريت) انجام پذیرفت. از روش میراندا و همکاران (۲۰۰۲) برای احیاء نیترات به نیتريت استفاده شد. اساس این روش واکنش و تشکیل یک کروموفور از دی‌آزوتاسیون یک سولفانیل‌امید به کمک نیتريت در محیط اسیدی و ترکیب آن با یک آمین دو حلقه‌ای مثل (1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEDD) است. برای اندازه‌گیری متابولیت‌ها در بافت مغزی، بافت مغز در بافر فسفات هموزنیزه شد. سپس پروتئین‌ها با اضافه کردن تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به سوسپانسیون هموزنیزه بافتی و سانتریفیوژ کردن رسوب داده شدند. در ابتدا به ۱۰۰ میکرولیتر نمونه پروتئین‌زدایی شده، ۱۰۰ میکرولیتر محلول وانادیم کلراید ( $VCl_3$ ) به منظور تبدیل شدن نیترات‌ها به نیتريت اضافه شد. در ادامه NEDD و سولفونامید (نسبت ۱ به ۱) افزوده گردید و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از انجام واکنش، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد.<sup>(۲۱،۲۰)</sup>

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و متعاقب آن توکی جهت مقایسه گروه‌های کنترل و آزمایش استفاده و سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

### \* یافته‌ها:

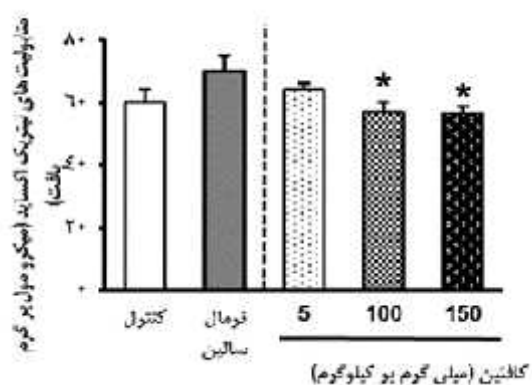
طبق نتایج به دست آمده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی، آستانه تشنج در گروه کنترل ۴۳/۳۹±۲/۰۹، شاهد کنترل (سالین ۹ درصد) ۴۱/۲۶±۱/۱۳ و در گروه‌های دریافت‌کننده کافئین با غلظت‌های ۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب

مطالعه‌های مختلفی اثر تشنج‌زای کافئین را گزارش کرده‌اند.<sup>(۲۵،۲۴)</sup> مکانیسم‌های متعددی در ارتباط با اثر حفاظتی غلظت‌های بالای کافئین بر تشنج وجود دارد. کافئین میل ترکیبی متفاوتی به دو گیرنده آدنوزینی A<sub>1</sub> و A<sub>2A</sub> دارد، از این رو اثرهای متناقض مشاهده شده در اثر کافئین بر تشنج می‌تواند در نتیجه اثرهای متفاوت آن بر گیرنده‌های A<sub>1</sub> و A<sub>2A</sub> آدنوزین باشد. این گیرنده‌ها در هیپوکامپ و قشر مغز یافت شده و هر دو این مناطق نیز در بروز تشنج درگیر هستند.<sup>(۲۶)</sup> با توجه به این که کافئین آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌های آدنوزین می‌باشد، به نظر می‌رسد که بخش عمده‌ای از اثر آن بر تشنج از طریق آنتاگونیزه کردن گیرنده آدنوزینی باشد. آدنوزین در غلظت‌های پایین در حد نانومولار سبب فعال کردن گیرنده A<sub>1</sub> می‌گردد. گیرنده A<sub>1</sub> آدنوزینی با مهار آدنیلات سیکلاز سیتوزولی منجر به مهار پتانسیل عمل می‌شود.<sup>(۲۷)</sup> آگونیست‌های این گیرنده از آدنوزین در ایسکمی، صرع، سکتة مغزی، دیابت، آریتمی قلبی نقش حفاظتی دارند. به نظر می‌رسد که ره‌ایش موضعی آدنوزین به‌واسطه فعال کردن گیرنده A<sub>1</sub> در محدود کردن ناحیه تشنج نقش داشته باشد.<sup>(۲۸،۲۹)</sup>

در همین راستا برخی از مطالعه‌ها نشان دادند که تجویز حاد کافئین در دوزهای پایین سبب تشنج تشنج از طریق بلوک گیرنده A<sub>1</sub> آدنوزین شد.<sup>(۲۷)</sup> از طرف دیگر، تجویز حاد غلظت‌های بالای کافئین آستانه تشنج ناشی از PTZ را تغییر نداد.<sup>(۱۹)</sup> بروز تشنج در موش‌هایی که گیرنده A<sub>1</sub> آن‌ها حذف شده بود، بیان‌گر نقش ضد تشنجی گیرنده A<sub>1</sub> می‌باشد.<sup>(۳۰)</sup> با توجه به این گزارش‌ها به نظر می‌رسد که اثر تشنج‌زای غلظت پایین کافئین تا حدی به‌واسطه مهار گیرنده A<sub>1</sub> باشد.<sup>(۳۱)</sup> از طرفی همان‌طور که در مقدمه اشاره شد، کافئین علاوه بر گیرنده‌های آدنوزین از طریق سایر مسیرها از جمله تغییر در سطح NO هم می‌تواند اثرهای خود را اعمال کند. اگرچه نقش نیتریک اکساید در پاتوفیزیولوژی صرع نامشخص است ولی مشاهده‌ها نشان می‌دهد که نیتریک اکساید سبب از بین

۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌ترتیب ۶۶/۹±۴/۰۱، ۵۶/۷۹±۳/۲۶ و ۵۶/۵±۲/۱۰ میکرومول در هر گرم بافت مغز بود. طبق نتایج، سطح متابولیت‌های NO به‌طور معنی‌داری در گروه دریافت‌کننده کافئین با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه شاهد کنترل کاهش یافت ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۲).

نمودار ۲- اثر تجویز حاد دوزهای مختلف کافئین (۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) یا سالین بر سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغز



\* $P < 0.05$  مقایسه با گروه شاهد کنترل

### \*بحث و نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق حاد دوز پایین کافئین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اثر تشنج‌زا داشته و آستانه تشنج کلونیک ناشی از PTZ را در مقایسه با گروه شاهد کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش داد، در حالی که دوزهای بالای کافئین (۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تأثیر معنی‌داری بر آستانه تشنج نداشت. مطالعه‌های مختلفی بر روی انسان‌ها و حیوانات جهت بررسی اثر کافئین بر صرع انجام شده و نتایج حاصل از این مطالعه‌ها نیز متناقض بوده است، به نحوی که برخی از گزارش‌ها نقش تشنج‌زای کافئین را گزارش کرده‌اند. در حالی که برخی مطالعه‌ها نشان می‌دهند کافئین ممکن است آستانه تشنج را تغییر ندهد و تشنج‌زا نباشد.<sup>(۳۲،۳۳)</sup>

در مطالعه‌ای بر روی موش‌هایی که به صورت ژنتیکی دچار صرع کوچک شده بودند، تجویز حاد کافئین تعداد و مدت زمان بروز امواج و تکانه‌های حاصل از تشنج را کاهش داد.<sup>(۱۴)</sup> در مطالعه‌های انسانی نیز گزارش‌هایی در همین زمینه وجود دارد. سامسونسن و همکاران در سال ۲۰۱۳ با مطالعه بر روی ۱۵۴ نفر از افراد نروژی نشان دادند که در وقوع تشنج، در افرادی که به صورت مکرر و روزانه کافئین مصرف می‌کنند و دچار وابستگی به مصرف آن شده‌اند با افرادی که فقط در روز وقوع تشنج کافئین مصرف کرده بودند اختلاف معنی‌داری وجود نداشته و کافئین در بروز ناگهانی تشنج تأثیری نداشت.<sup>(۳۴)</sup> همچنین در بررسی اخیری که بر روی تعدادی از کودکانی که کافئین و سایر متیل‌گزانتین‌ها را بیش‌تر مصرف می‌کردند انجام شد، محققان دریافتند که در آن‌ها نسبت به سایر کودکان، مصرف کافئین در وقوع صرع کوچک تأثیر به‌سزایی نداشته است.<sup>(۳۵)</sup> با توجه به این‌که دوز پایین کافئین تشنج‌زا بود ولی دوزهای بالاتر کافئین تغییری در آستانه تشنج ایجاد نکرد. این احتمال مطرح می‌شود که احتمالاً دوزهای کافئین به‌صورت متفاوتی گیرنده‌های آدنوزین را مهار می‌کنند. با توجه به این‌که گیرنده A<sub>2A</sub> آدنوزین یک گیرنده تحریکی می‌باشد، این احتمال وجود دارد که غلظت‌های بالاتر کافئین با اثر مهاری بر این گیرنده اثر ضد تشنج خود را اعمال کرده باشد. از طرف دیگر اندازه‌گیری متابولیت‌های NO نشان داد که کافئین در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم سبب کاهش معنی‌داری در سطح متابولیت‌های NO شد. این نتایج در تأیید این فرضیه می‌باشد که اثر مهاری کافئین در غلظت‌های بالا به‌واسطه مهار گیرنده A<sub>2A</sub> و همچنین نشان‌دهنده نقش تعدیل‌کنندگی NO بر اثر مرکزی کافئین می‌باشد.<sup>(۱۸)</sup>

در مجموع نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اثر کافئین بر آستانه تشنج می‌تواند وابسته به غلظت باشد، به گونه‌ای که غلظت‌های پایین آن اثر تشنج‌زایی داشته و مواجهه حاد با دوزهای بالا تغییری در آستانه تشنج ایجاد

رفتن نورون‌ها شده و سبب تکثیر گلیاها به‌طور واکنشی می‌گردد که می‌تواند در پاتوژنز صرع دخیل باشد.<sup>(۳۳)</sup> نتایج مطالعه‌های گذشته نشان داده است که مسیر NO-cGMP اثر تعدیل‌کننده‌ای بر فعالیت ضد تشنجی آدنوزین دارد، از طرفی تحریک گیرنده A<sub>1</sub> آدنوزین می‌تواند منجر به کاهش سطح NO شود. بنابراین این فرضیه وجود داشت که اثر کافئین بر آستانه تشنج به‌واسطه مهار گیرنده A<sub>1</sub> و تغییر در سطح NO باشد.<sup>(۱۸)</sup> با این وجود اندازه‌گیری متابولیت‌های NO نشان داد که غلظت ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کافئین علی‌رغم اثر تشنج‌زایی که نشان داد، تغییر معنی‌داری در سطح متابولیت‌های NO ایجاد نکرد. در توجه این مکانیسم می‌توان گفت که احتمال دارد اثر تشنج‌زایی کافئین در غلظت پایین مستقل از مسیر NO و از طریق سایر مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی باشد. از طرف دیگر ممکن است تغییر NO و اثر بر مسیرهای سیگنال داخل سلولی نظیر فعال کردن آنزیم گوانیلات سیکلاز محلول (Soluble guanylyl cyclase; sGC) در سطحی کم‌تر از حساسیت روش اندازه‌گیری مطالعه حاضر صورت گرفته باشد. در همین زمینه نشان داده شده است که تنها ۲ میکرومول در لیترا افزایش در سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید سبب کاهش فعالیت و بیان sGC شد.<sup>(۳۳)</sup> نتایج حاصل از دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کافئین گزارش‌های قبلی در خصوص این‌که برخی دوزهای کافئین می‌تواند تشنج‌زا نباشد را تأیید کرد. این دوزها بسیار پایین‌تر از دوز تشنج‌زای غلظت‌های بالای کافئین (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در جوندگان می‌باشد.<sup>(۳۰)</sup> نتایج مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای نیست که نشان می‌دهد کافئین می‌تواند اثر تشنج‌زا نداشته باشد. قبلاً گزارش شده بود که دوزهای ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کافئین آستانه تشنج ناشی از پنتیلن تترازول را تغییر نداد.<sup>(۳۳)</sup> در مطالعه دیگری، تجویز حاد کافئین در دوزهای ۴۶/۲ و ۹۲/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم تشنج ناشی از الکتروشوک حداکثر را تغییر نداد.<sup>(۱۹)</sup>

bbamem.2010.12.018.

6. El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Bertorelli R, Ongini E, Costentin J, et al. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A<sub>2A</sub> receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 2001; 134(1): 68-77. doi: 10.1038/sj.bjp.0704240.

7. Bonilha L, Li LM. Heavy coffee drinking and epilepsy. *Seizure* 2004; 13(4): 284-5. doi: 10.1016/S1059-1311(03)00079-7.

8. Loscher W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *Eur J Pharmacol* 2009; 610(1-3): 1-11. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.03.025.

9. Iyadurai SJ, Chung SS. New-onset seizures in adults: possible association with consumption of popular energy drinks. *Epilepsy Behav* 2007; 10(3): 504-8. doi: 10.1016/j.yebeh.2007.01.009.

10. Luszczki JJ, Zuchora M, Sawicka KM, Kozinska 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.

11. Dworetzky BA, Bromfield EB, Townsend MK, Kang JH. A prospective study of smoking, caffeine, and alcohol as risk factors for seizures or epilepsy in young adult women: data from the Nurses' Health Study II. *Epilepsia* 2010; 51(2): 198-205. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02268.x.

12. El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. Evidence for the involvement of the adenosine A(2A) receptor in the lowered susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures produced in mice by long-term treatment with caffeine. *Neuropharmacology* 2008; 55(1): 35-40.

نکرد. این احتمال وجود دارد که اثر ضد تشنج کافئین در غلظت‌های بالا از طریق کاهش تولید نیتریک اکساید باشد.

### \* سپاس‌گزاری:

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان "اثر تجویز حاد کافئین بر آستانه تشنج کلونیک ناشی از پنتیلین تترازول و متابولیت‌های نیتریک اکساید در موش سوری" مصوب دانشگاه علوم پزشکی کاشان در سال ۹۶ با شماره ۹۶۷۰ و کد اخلاق IR.KAUMS.MEDNT.REC.1396.18 می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی کاشان اجرا شده است. بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه برای حمایت از این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

### \* مراجع:

1. Forsgren L, Beghi E, Oun A, Sillanpaa M. The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review. *Eur J Neurol* 2005; 12(4): 245-53. doi: org/10.1111/j.1468-1331.2004.00992.x.
2. Scott RA, Lhatoo SD, Sander JW. The treatment of epilepsy in developing countries: where do we go from here? *Bull World Health Organ* 2001; 79(4): 344-51.
3. Butt MS, Sultan MT. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011; 51(4): 363-73. doi: 10.1080/10408390903586412.
4. Gonzalez de Mejia E, Ramirez-Mares MV. Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 25(10): 489-92. doi: 10.1016/j.tem.2014.07.003.
5. Wei CJ, Li W, Chen JF. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808(5): 1358-79. doi: 10.1016/j.



- doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.04.007.
13. Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *J Neurosci* 1999; 19(10): 4011-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-10-04011.1999.
14. Germe K, Faure JB, Koning E, Nehlig A. Effect of caffeine and adenosine receptor ligands on the expression of spike-and-wave discharges in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS). *Epilepsy Res* 2015; 110: 105-14. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2014.11.022.
15. Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 2002; 14(2): 99-108. doi: 10.1016/S0898-6568(01)00235-2.
16. Carmeli E, Beiker R, Morad M. Nitric oxide and interleukin-6 levels in intellectual disability adults with epilepsy. *Res Dev Disabil* 2009; 30(3): 567-71. doi: 10.1016/j.ridd.2008.08.004.
17. Akula KK, Dhir A, Kulkarni SK. Nitric oxide signaling pathway in the anti-convulsant effect of adenosine against pentylentetrazol-induced seizure threshold in mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 587(1-3): 129-34. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.03.038.
18. Bruce C, Yates DH, Thomas PS. Caffeine decreases exhaled nitric oxide. *Thorax* 2002; 57(4): 361-3. doi: 10.1136/thorax.57.4.361.
19. Jargiello-Baszak M, Chroscinska-Krawczyk M, Andres-Mach M, Luszczki JJ, Czuczwar SJ. Influence of caffeine on the protective activity of gabapentin and topiramate in a mouse model of generalized tonic-clonic seizures. *Pharmacol Rep* 2016; 68(4): 680-5. doi: 10.1016/j.pharep.2016.03.011.
20. Miranda KM, Espey 20. MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5(1): 62-71. doi: 10.1006/niox.2000.0319.
21. Heydari A, Davoudi S. The effect of sertraline and 8-OH-DPAT on the PTZ-induced seizure threshold: Role of the nitrenergic system. *Seizure* 2017; 45: 119-24. doi: 10.1016/j.seizure.2016.12.005.
22. Esmaili Z, Heydari A. Effect of acute caffeine administration on PTZ-induced seizure threshold in mice: Involvement of adenosine receptors and NO-cGMP signaling pathway. *Epilepsy Res* 2019; 149: 1-8. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2018.10.013
23. Bankstahl M, Bankstahl JP, Bloms-Funke P, Loscher W. Striking differences in proconvulsant-induced alterations of seizure threshold in two rat models. *Neurotoxicology* 2012; 33(1): 127-37. doi: 10.1016/j.neuro.2011.12.011.
24. De Sarro A, Grasso S, Zappala M, Nava F, De Sarro G. Convulsant effects of some xanthine derivatives in genetically epilepsy-prone rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 356(1): 48-55. doi: 10.1007/PL00005027
25. Marangos PJ, Martino AM, Paul SM, Skolnick P. The benzodiazepines and inosine antagonize caffeine-induced seizures. *Psychopharmacology (Berl)* 1981; 72(3): 269-73. doi: 10.1007/BF00431829.
26. Ongini E, Fredholm BB. Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17(10): 364-72.
27. Jacobson KA. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handb Exp Pharmacol* 2009(193): 1-24. doi: 10.1007/978-3-540-89615-9\_1.

28. Fedele DE, Li T, Lan JQ, Fredholm BB, Boison D. Adenosine A1 receptors are crucial in keeping an epileptic focus localized. *Exp Neurol* 2006; 200(1): 184-90. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.02.133.
29. Gouder N, Fritschy JM, Boison D. Seizure suppression by adenosine A1 receptor activation in a mouse model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44(7): 877-85. doi: 10.1046/j.1528-1157.2003.03603.x.
30. Chroscinska-Krawczyk M, Jargiello-Baszak M, Walek M, Tylus B, Czuczwar SJ. Caffeine and the anticonvulsant potency of antiepileptic drugs: experimental and clinical data. *Pharmacological Rep* 2011; 63(1): 12-8. doi: 10.1016/S1734-1140(11)70394-2.
31. Borowicz KK, Luszczki J, Czuczwar SJ. 2-Chloroadenosine, a preferential agonist of adenosine A<sub>1</sub> receptors, enhances the anticonvulsant activity of carbamazepine and clonazepam in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002; 12(2): 173-9. doi: 10.1016/S0924-977X(02)00009-3.
32. Riazi K, Roshanpour M, Rafiei-Tabatabaei N, Homayoun H, Ebrahimi F, Dehpour AR. The proconvulsant effect of sildenafil in mice: role of nitric oxide-cGMP pathway. *Br J Pharmacol* 2006; 147(8): 935-43. doi: 10.1038/sj.bjp.0706680.
33. Weber M, Lauer N, Mülsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(11): 1360-67. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00706-7
34. Samsonsen C, Brathen G, Reimers A, Helde G, Brodtkorb E. Is dietary caffeine involved in seizure precipitation? *Epilepsy Behav* 2013; 28(2): 147-50. doi: 10.1016/j.yebeh.2013.05.003.
35. Boison D. Methylxanthines, seizures, and excitotoxicity. *Handb Exp Pharmacol* 2011(200): 251-66. doi: 10.1007/978-3-642-13443-2\_9.