

تاثیر کافئین بر اختلالات حرکتی در مدل بیماری پارکینسون در موش صحرایی

سیامک ریحانی راد

گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند، مرند، ایران

rad.pharma@gmail.com

چکیده

پارکینسون یک بیماری نورودژنراتیو مزمن است که در اثر آسیب اعصاب دوپامینرژیک ناحیه جسم سیاه (substantia nigra pars compacta) و استریاتوم مغز ایجاد می شود. مطالعات نشان میدهند مهار سیستم عصبی آدنوزینرژیک می تواند در بهبود برخی از علائم بیماری پارکینسون موثر واقع شود. کافئین موجود در قهوه از عوامل طبیعی مهار کننده سیستم آدنوزینرژیک می باشد. بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر کافئین بر روی اختلالات حرکتی در موش های صحرایی مبتلا به پارکینسونیسم بود. بدین منظور موش های صحرایی توسط تزریق توکسین 6- هیدروکسی دوپامین ($8\mu\text{g}/\text{rat}$) به ناحیه جسم سیاه مغز اختلالات حرکتی شبیه به بیماری پارکینسون را نشان دادند. جهت ارزیابی اختلالات حرکتی و تاثیر کافئین بر روی آن از تست رفتاری روتارود (rotarod test) کمک گرفته شد. نتایج نشان داد که توکسین 6- هیدروکسی دوپامین با ایجاد اختلالات حرکتی مانند کندی حرکات (bradykinesia) و عدم تعادل (balance disturbance) موش های صحرایی، زمان صرف شده بر روی دستگاه روتارود را کاهش می دهد. تزریق کافئین با دوز 30 میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن بطور داخل صفاقی، زمان صرف شده بر روی روتارود را افزایش می دهد. ($P<0.01$) . بنابراین ما نشان دادیم که تجویز کافئین می تواند موجب بهبودی اختلالات حرکتی ناشی از پارکینسون شود. بنظر میرسد کاهش اختلالات حرکتی بیماری می تواند ناشی از مهار گیرنده های آدنوزینی در ناحیه جسم سیاه مغز توسط کافئین باشد.

کلمات کلیدی: کافئین، اختلالات حرکتی، بیماری پارکینسون، موش صحرایی

1. مقدمه

بیماری پارکینسون (PD) یک بیماری مزمن نورودژنراتیو می باشد که در نتیجه تخریب اعصاب دوپامینرژیک ناحیه جسم سیاه (SNC) و استریاتوم ایجاد می شود. این بیماری با علائمی مانند لرزش (tremor)، کندی حرکات (bradykinesia) و سفتی

عضلات (rigidity) همراه است (1). در حال حاضر مکانیسم های سلولی - مولکولی پاتوزنز بیماری پارکینسون بطور کامل مشخص نشده است ولی استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی در نورون های دوپامینرژیک از بحث های مطرح شده می باشد (2). نشان داده شده است که علاوه بر سیستم دوپامینرژیک سایر سیستم های عصبی از جمله سیستم آدنوزینرژیک نیز در بیماری پارکینسون نقش دارند. در دو دهه گذشته مطالعات پیش بالینی، بالینی و اپیدمیولوژیک نشان داده اند که گیرنده های آدنوزینی می توانند بعنوان یکی از اهداف درمانی غیر دوپامینی در درمان بیماری مذکور مطرح باشد. بعنوان مثال مهار گیرنده های آدنوزینی می تواند موجب افزایش فعالیت و افزایش حرکات در بیماران پارکینسونی و همچنین مدل های حیوانی آن شود (3). علاوه بر آن مطالعات نشان داده است که مصرف قهوه و نوشیدن چای تاثیر پیشگیرانه در ابتلا به بیماری پارکینسون دارد (4). کافئین موجود در قهوه از مواد محرک سیستم اعصاب مرکزی می باشد که برای اولین بار در سال 1820 از آن جدا شده است (5). این ماده اثرات مختلف با مکانیسم های عمل متعددی در بدن دارد که یکی از مهمترین آنها، اثر آنتاگونیستی بر روی گیرنده های آدنوزینی مغز می باشد، بطوریکه آنها را غیر فعال می کند. همچنین نشان داده شده است که کافئین خاصیت نوروپروتکتیوی (محافظت کنندگی سلول های عصبی) را دارا می باشد (6). بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر کافئین بر روی اختلالات حرکتی در موش های صحرایی مبتلا به پارکینسونیسم می باشد که با توجه به روش های درمانی فارماکولوژیک رایج، می تواند روش درمانی جدیدی را در بهبود اختلالات حرکتی بیماران پیشنهاد بکند.

2. روش کار

این مطالعه تجربی بر روی موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 180-220 گرم انجام شد. حیوانات به طور تصادفی در گروه های هشت تایی جا گرفتند و هر چهار حیوان در یک قفس استاندارد در سیکل روشنایی و تاریکی 12 ساعته در دمای 25 ± 3 نگهداری شدند. در تمامی مراحل مطالعه، آب و مواد غذایی به میزان کافی در اختیار حیوانات قرار داشت. داروها شامل Caffeine (sigma) و 6-OHDopamine (sigma) بطور تازه در دوزهای مورد نظر تهیه و بروش داخل صفاقی تزریق می شدند. تزریق 6- هیدروکسی دوپامین به داخل هسته جسم سیاه (SNc) به روش جراحی با کمک دستگاه استرئوتاکسی و توسط پمپ انفوزیون انجام شد. برای این کار ابتدا حیوان را با استفاده از تزریق داخل صفاقی زایلازین (5 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و کتامین (50 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش نمودیم. بعد از بیهوشی کامل سر حیوان در دستگاه استرئوتاکسی (استولتینگ، آمریکا) ثابت گردید. سپس پوست جمجمه تراشیده شده و بعد از برش پوست آن ناحیه جمجمه حیوان نمایان شد. تزریق 6- هیدروکسی دوپامین به طور یک طرفه به ناحیه کمپکت جسم سیاه (Substantia nigra compact part; SNc) با مختصات AP: -5 mm, ML: -2/1 و DV: -7/9 بر اساس نقطه فرانس برگما انجام شد (7). برای این کار بعد از سوراخ کردن جمجمه توسط مته دستی به کمک سرنگ هامیلتون و پمپ میکرواینجکشن 6- هیدروکسی دوپامین به مقدار 8 میکروگرم در 2 میکرولیتر و با سرعت 0.6 میکرولیتر در دقیقه از طریق کانول شماره 23 کاشته شده استاینلس استیل به هسته مورد نظر تزریق شد (شکل 1). نیم ساعت قبل از تزریق 6- هیدروکسی دوپامین، داروی دزی پرامین به روش داخل صفاقی و با دوز 20 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن تزریق شد تا از ورود 6-OHDA به داخل اعصاب نورآدرنرژیک و آسیب آنها جلوگیری کند. پس از تزریق 6- هیدروکسی

دوپامین محل را بخیه زده و بعد از طی دوره ریکاوری 3 هفته‌ای موش‌ها جهت بررسی اختلالات حرکتی و تعادل به روش تست روتارود مورد ارزیابی قرار گرفتند (7). برای بررسی تعادل و اختلال حرکتی حیوان بر روی میله گردان از آزمون روتارود استفاده شد (8). (شکل 2) برای این منظور حیوان بر روی میله گردان با دور 18 دور در دقیقه قرار داده شد و مدت زمانی را که حیوان قادر به ایستادن و حفظ تعادل بر روی میله گردان بود برحسب ثانیه ثبت گردید. نتایج به صورت $Mean \pm SEM$ بیان شده اند. برای مقایسه تفاوت بین میانگین داده‌ها از آزمون ANOVA استفاده شد و در صورت وجود اختلاف معنی دار از پس آزمون Tukey استفاده شد. در تمام آزمون‌های آماری $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

3. نتایج

در سه گروه هشت تایی از حیوانات که به ترتیب عبارتند از گروه دریافت کننده نرمال سالین (1 میلی لیتر به ازای هر کیلو گرم وزن)، گروه sham جراحی (تمامی مراحل جراحی بجز تزریق دارو انجام و در نهایت محل جراحی بخیه زده شد) و سم 6-OHDA (8) میکروگرم به ازای هر حیوان) اختلالات حرکتی به روش روتارود مورد بررسی قرار گرفت. همانطوریکه که در جدول 1 نشان داده شده است 6-OHDA در دوز مورد نظر توانست اختلال در تعادل ایجاد کند و کاهش زمان آزمون روتارود این گروه درمقایسه با گروه دریافت کننده سالین و Sham از نظر آماری در تمامی زمانها (5، 60، 120، و 180 دقیقه) معنی دار بود ($P < 0.001$).

بمنظور ارزیابی تاثیر دوزهای مختلف کافئین در موش‌های سالم غیرپارکینسونی، کافئین به میزان 10 و 30 میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن بصورت داخل صفاقی تزریق شد و نتایج تفاوت معنی داری را نشان نداد. (جدول 2). در حالیکه نتایج جدول 3 نشان می دهد که کافئین با دوزهای 10 و 30 میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن در زمانهای 60، 120 و 180 دقیقه بعد از تزریق باعث بهبود اختلال تعادل ناشی از 6-OHDA می گردد و زمان تست روتارود را بطور معنی داری ($P < 0/01$, $0/001$) در مقایسه با گروه 6-OHDA+Saline افزایش میدهد.

4. اشکال و جداول

شکل 1. تزریق 6-هیدروکسی دوپامین به داخل هسته سیاه (SNc) به روش جراحی با کمک دستگاه استرنوتاکسی و پمپ انفوزیون



شکل 2. آزمون روتارود برای بررسی تعادل در موش صحرایی



جدول 1- زمان صرف شده در تست روتارود در گروه کنترل، شم و گروه 6OHDA(8µg/2µl/rat). تعداد رت در هر گروه = 8. داده ها بصورت mean±SEM نشان داده شده اند. $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل و شم.

گروه 6-OHDA	گروه شم (جراحی)	گروه نرمال سالین (کنترل)	زمان (ثانیه)
180±10***	450±30	520±35	5
205±20***	500±25	420±20	60
220±15***	480±30	610±45	120
190±10***	590±40	450±30	180

جدول 2 - زمان صرف شده در تست روتارود در گروه کنترل، کافئین (10, 30 mg/kg/sc). تعداد رت در هر گروه = 8. داده ها بصورت mean±SEM نشان داده شده اند.

کافئین (30 mg/kg)	کافئین (10 mg/kg)	گروه نرمال سالین (کنترل)	زمان (ثانیه)
530±25	590±40	520±35	5
460±30	610±45	420±20	60
590±40	540±25	610±45	120
440±20	420±20	450±30	180

جدول 3 - زمان صرف شده در تست روتارود در گروه 6OHDA(8µg/2µl/rat). کافئین (10, 30 mg/kg/sc). تعداد رت در هر گروه = 8. داده ها بصورت mean±SEM نشان داده شده اند. $p < 0.05$ * و $P < 0.01$ ** در مقایسه با گروه 6OHDA.

کافئین (30 mg/kg)	کافئین (10 mg/kg)	گروه 6-OHDA	زمان (ثانیه)
390±25**	260±15*	180±10	5
300±35*	245±20	205±20	60
380±25*	280±20	220±15	120
320±15*	180±20	190±10	180

5. نتیجه گیری

این مطالعه با هدف بررسی اثرات کافئین بر روی اختلالات حرکتی و تعادل موش های صحرایی پارکینسونی شده انجام گرفت. ما نشان دادیم تجویز حاد کافئین با دوز 30mg/kg می تواند اختلالات تعادلی و کندی حرکات را که توسط تست روتارود ارزیابی می شود، در موش های پارکینسونی شده بهبود ببخشد. در دهه های اخیر مطالعات زیادی در ارتباط با کافئین و چای و نقش آنها در درمان بیماری های نورودژنراتیو مانند بیماری پارکینسون و بیماری آلزایمر صورت گرفته است (6 و 12). نتایج بالا و همچنین نتایج سایر مطالعات نشان می دهند ترکیبات مذکور ضمن اینکه خاصیت نوروپروتکتیوی و آنتی اکسیدانی دارند می توانند با بلاک یا مهار گیرنده های آدنوزینی موجب بهبود اختلالات حرکتی در بیماران پارکینسونی و همچنین در مدل های آزمایشگاهی حیوانات پارکینسونی شوند (10). این دست مطالعات، پایه نوروبیولوژیکی جدیدی مبنی بر ارتباط معکوس بین مصرف ترکیبات کافئینی و کاهش خطر بیماری پارکینسون فراهم می کند. ما نشان دادیم که غیرفعال کردن فارماکولوژیک گیرنده های آدنوزینی، اختلالات حرکتی ناشی از 6-هیدروکسی دوپامین را کاهش می دهد و این یافته ها، نتایج سایر مطالعات را که حاکی از افزایش فعالیت های حرکتی و کاهش اختلالات حرکتی در مدل های پارکینسونی است تایید می نماید (11 و 12). در نتیجه می توان گفت آنتاگونیزه کردن گیرنده های آدنوزینی توسط مهارکننده های آن یعنی کافئین موجب افزایش مهارتهای حرکتی در بیماریهایی مثل پارکینسون می شود که یکی از عوارض آن اختلالات حرکتی می باشد.

6. منابع

1. Feraco, P., Gagliardo, C., La Tona, G., Bruno, E., D'angelo, C., Marrale, M., ... & Monastero, R. (2021). Imaging of substantia nigra in parkinson's disease: A narrative review. *Brain Sciences*, 11(6), 769.
2. Hassanzadeh, K., & Rahimmi, A. (2019). Oxidative stress and neuroinflammation in the story of Parkinson's disease: could targeting these pathways write a good ending? *Journal of cellular physiology*, 234(1), 23-32.
3. Pinna, A., Serra, M., Morelli, M., & Simola, N. (2018). Role of adenosine A2A receptors in motor control: relevance to Parkinson's disease and dyskinesia. *Journal of Neural Transmission*, 125(8), 1273-1286.
4. Hong, C. T., Chan, L., & Bai, C. H. (2020). The effect of caffeine on the risk and progression of Parkinson's disease: A meta-analysis. *Nutrients*, 12(6), 1860.
5. Daly J W. Caffeine analogs: biomedical impact, cellular and molecular. *Life SCI*. 2007;64(16):2153-69. doi: 10.1007/s00018-007-7051-9.

6. Ikram, M., Park, T. J., Ali, T., & Kim, M. O. (2020). Antioxidant and neuroprotective effects of caffeine against Alzheimer's and Parkinson's disease: Insight into the role of Nrf-2 and A2AR signaling. *Antioxidants*, 9(9), 902.
7. Paxinos G., Watson C., 2007, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. , 6th edition.
8. Hamm R.J., Pike B.R., O'Dell D.M., Lyeth B.G., Jenkins L.W. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury, *J. Neurotrauma*., 1994, 11: 187-196.
9. Luo, M., Gan, R. Y., Li, B. Y., Mao, Q. Q., Shang, A., Xu, X. Y., ... & Li, H. B. (2021). Effects and mechanisms of tea on Parkinson's disease, Alzheimer's disease and depression. *Food Reviews International*, 1-29.
10. Preti, D., Baraldi, P. G., Moorman, A. R., Borea, P. A., & Varani, K. (2015). History and perspectives of A2A adenosine receptor antagonists as potential therapeutic agents. *Medicinal research reviews*, 35(4), 790-848.
11. Pinna, A., Serra, M., Marongiu, J., & Morelli, M. (2020). Pharmacological interactions between adenosine A2A receptor antagonists and different neurotransmitter systems. *Parkinsonism & Related Disorders*, 80, S37-S44.
12. Kanda, T., & Jenner, P. (2020). Can adenosine A2A receptor antagonists modify motor behavior and dyskinesia in experimental models of Parkinson's disease? *Parkinsonism & Related Disorders*, 80, S21-S27.