بررسی میزان تأثیر کافئین بر استخوانسازی استخوان تیبیای جنین موش صحرایی

احمد حسینی .Ph.D☆♦، مجتبی رضازاده .Ph.D★، منصوره موحدین .M.Sc★

☆ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۸۱-۱۹۸۳۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** بررسی آثار کافئین بر میزان غضروف جذب شده و استخوان ساخته شده در استخوان تیبیای جنین موش صحرایی به روش کمّی بافت‌شناسی.

* **مواد و روشها:** در این تحقیق، ۲۰۹ جنین موش صحرایی آزمایش شدند. به این منظور موشهای صحرایی ماده برای اولین بار بعد از بلوغ به صورت مونوگامی باردار شدند و به روش تصادفی در سه گروه قرار گرفتند. به گروه تجربی اول mg/kg ۱۷۵ کافئین یک درصد در روز ۱۴ بارداری و به گروه تجربی دوم، در هر یک از روزهای ۱۴ و ۱۵ و ۱۶ بارداری، mg/kg ۸۰ کافئین یک درصد تزریق شد. گروه آخر به عنوان شاهد بود. در روزهای ۲۰ و ۲۱ بارداری، موشهای صحرایی با کلروفرم بیهوش و جنینها از رحم آنها خارج شدند؛ اندام عقبی طرف چپ از بدن جنینها جداشد و درون محلول بوئن قرار داده شد. سپس مراحل کار عملی بافت‌شناسی عمومی بر روی آنها انجام شد. برشهای تهیه شده با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ شدند. حجم پریوست یا پری‌کندر، استخوان کولار، غضروف، استخوان ترابکولار و کل استخوان محاسبه شد. شکل برشهای رنگ شده توسط کامرالوسیدا به کاغذ منتقل شده و مساحت قسمتهای مختلف با روشهای رایانه‌ای محاسبه شد. توزیع نرمال داده‌ها به‌وسیلهٔ آزمون آماری بررسی و تأیید شد؛ سپس داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

* **یافته‌ها:** کافئین باعث کاهش حجم معنی‌دار پریوست، پری‌کندر، استخوان کولار، استخوانهای ترابکولار، حجم کل استخوان، حجم غضروف جذب شده و غضروف تشکیل شده در گروههای تجربی ۱ و ۲ شد. این کاهش در گروه تجربی یک، بیشتر بود.

* **نتیجه‌گیری:** تزریق کافئین به موش صحرایی موجب کاهش روند تشکیل ماده خارج سلولی استخوان جنین موش صحرایی و تأخیر در استخوانسازی می‌شود.

گل واژگان: کافئین، استخوانسازی، جنین موش صحرایی، غضروف جذب شده

مقدمه

کافئین با فرمول 1, 3, 7, Trimethylxanthine یکی از انواع متیل گزانتین‌ها است و به‌عنوان یک مادهٔ افزودنی به داروهای مختلف و نوشیدنیهای کولا، به‌کار می‌رود. کافئین تنها متیل گزانتینی است که در قهوه وجود دارد. در چای، تئوبرومین و با غلظت کمتری تئوفیلین (نوع دیگری از متیل‌گزانتین) موجود است. در کاکائو و شکلاتها نیز تئوبرومین با نسبت کمتری وجود دارد.

از زمانهای گذشته، مطالعاتی در مورد قدرت تراتوژنی کافئین صورت گرفته است. اولین کار تحقیقاتی توسط Nakai و Nishimura (۱)، با تزریق زیر جلدی ۲۵۰ mg/kg کافئین به موشهای باردار در روزهای نهم تا چهاردهم بارداری بود که منجر به ایجاد شکاف کام و نقصهایی در انگشتان جنینها شد.

پس از آن، تحقیقات زیادی انجام شد و مواردی از قبیل سقط خودبه‌خودی، زایمان زودرس و نارس بودن نوزادان با مصرف بالای کافئین (بیش از ۶۰۰ میلی گرم در روز) در دوران بارداری گزارش شد (۲). بیشتر مطالعات بر روی موشهای آزمایشگاهی و موش صحرایی انجام شده است. از جمله موارد مشاهده شده در جنینها، می‌توان به ناهنجاریهای شکاف کام، اشکالاتی در اندام و انگشتان و ظهور هماتوم در انتهای انگشتان اشاره کرد (۳). به علاوه؛ ناهنجاریهایی از قبیل تأخیر استخوانسازی دنده‌ها و استخوانهای جمجمه، عدم تکامل لگنچه کلیه، کاهش وزن ارگانهایی مانند مغز، ریه و کبد نسبت به وزن کلی بدن، کاهش دانسیته استخوانی (۴) هیپوپلازی و دیس‌مورفوژنز جوانه اندام (۵) نیز دیده شده است.

به عقیدهٔ برخی از محققین، ناهنجاریهای زیاد حاصله در جانوران آزمایشگاهی، به دلیل استفاده از دوزهای بالا یا دور از واقع بودن روشهای به‌کارگرفته شده است؛ چراکه در تحقیقاتی که دوزها کمتر از ۱۰۰ mg/kg و از طریق خوراکی تجویز شده‌اند، اثرات تراتوژنی کافئین، مشاهده نشده است (۶).

بنابراین چگونگی تجویز کافئین روزانه، عامل مهمی در تعیین قدرت تراتوژن بودن آن محسوب می‌شود. این‌گونه آثار به دوز و نحوهٔ مصرف آن بستگی دارد. به بیان دیگر، دوز ۸۰ mg/kg، زمانی تراتوژن است که از طریق خوراکی و هر روز به موشهای صحرایی داده شود(۷).

در این مطالعه اثرات تراتوژنی کافئین روی روند استخوانسازی و جذب غضروف به صورت کمّی بررسی شد.

مواد و روشها

جهت بررسی آثار کافئین بر استخوانسازی، ۲۰۹ جنین مورد آزمایش قرار گرفتند. موشهای صحرایی ماده نژاد Albino Wistar با وزن بین ۱۷۰ الی ۲۰۰ گرم، که برای اولین بار بعد از بلوغ به صورت مونوگامی باردار شدند؛ انجام شد. درجهٔ حرارت حیوانخانه حدود ۲۰ الی ۲۲° سانتی‌گراد بود و موشهای صحرایی نر و ماده قبل از Coupling، ۱۲ ساعت در تاریکی و ۱۲ ساعت در روشنایی قرار گرفتند. سپس در ساعت ۲۰، موشهای صحرایی نر و ماده در یک قفس گذاشته شدند و ساعت ۸ روز بعد با مشاهده پلاک واژینال و تهیه اسمیر و مشاهده اسپرم، روز صفر بارداری تأیید شد. موشها به‌طور تصادفی، به سه گروه تقسیم شدند. به گروه اول در روز چهاردهم بارداری ۱۷۵ mg/kg کافئین یک درصد (یک گرم کافئین در ۱۰۰ cc سرم فیزیولوژی) و به گروه دوم در روزهای چهاردهم، پانزدهم و شانزدهم بارداری، ۸۰ mg/kg کافئین به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد و به گروه سوم، سرم فیزیولوژی تزریق شده و به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در روزهای بیستم و بیست‌ویکم بارداری، هر سه گروه با کلروفرم بیهوش شدند؛ جدار شکم و رحم بوسیله برش سزارین باز شد؛ ۱۰۵ جنین مربوط به گروههای آزمایش و ۱۰۴ جنین مربوط به گروه شاهد از رحم جدا شد و درون محلول ثابت کنندهٔ بوئن قرار گرفتند. سپس اندام عقبی طرف چپ از تنه جدا شده و به مدت ۴۸ ساعت درون محلول EDTA (۲۰ درصد) گذاشته شد تا کلسیفیکاسیون صورت گیرد. سپس ۴۸ ساعت دیگر در بافرفسفات غوطه‌ور شدند تا کاملاً نرم شوند. نمونه‌ها، پردازش بافتی و قالبگیری شدند و به‌وسیلهٔ میکروتوم با تیغه ثابت، برشهای عرضی نسبت به محور طویل استخوان تیبیای چپ جنین موشها به روش سریال و به ضخامت ۸ میکرون تهیه گردید. برشها به‌صورت یک به پنج جمع شده و به روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ شدند. برای تعیین حجم پریوست، پری‌کندر، استخوان کولار، غضروف، استخوان ترابکولار و کل حجم به ترتیب زیر عمل شد:

تصاویر همهٔ برشها به‌وسیلهٔ کامرالوسیدا کشیده شد و توسط اسکنر به کامپیوتر وارد و با برنامهٔ Paint Brush در محیط Windows رنگ‌آمیزی شد؛ مساحت هر یک از آنها توسط برنامهٔ Surface Computing محاسبه شد و با توجه به فاصله برشها از یکدیگر، حجم هر یک از اجزاء به دست آمد. در هر گروه برای محاسبه حجم غضروف جذب شده ($V.C._{abs}$)[1] در طی یک روز، افزایش حجم استخوان ترابکولار (V.T.B.)[2] در این فاصله زمانی محاسبه شد: به این منظور میانگین حجم استخوان ترابکولار در روز بیستم از حجم استخوان ترابکولار در روز بیست‌ویکم، کم شد:

$$V.C._{abs}=V.T.B.\ (day21)\ -\ mean\ V.T.B.\ (day\ 20)$$

در هر گروه برای محاسبه حجم غضروف تشکیل شده (V.C.F.)[3] در طی یک روز، افزایش حجم غضروف (V.C.) در این مدت به حجم غضروف جذب شده ($V.C._{abs}$) اضافه شد:

$$V.C.F.=[mean\ V.C.(day21)-mean\ V.C.(day\ 20)]+V.C._{abs}$$

ابتدا توزیع نرمال داده‌ها به‌وسیلهٔ روش آماری Kolmogorov-Smirnov بررسی و سپس توسط روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل آماری شدند.

1. Volume of Cartilage absorbed
2. Volume of Trabecular Bone
3. Volume of Cartilage Formation

یافته‌ها

* حجم پریوست / پری کندر

مقایسه حجم پریوست/پری‌کندر بین گروههای تحقیق، نشان می‌دهد که اختلاف در میزان این حجم میان گروه آزمایش ۱ و شاهد، همچنین میان گروه آزمایش ۲ و شاهد در روز بیستم از نظر آماری معنی‌دار است ($P<0.01$). بین گروههای آزمایش، تفاوت معنی‌دار آماری وجود ندارد (جدول ۱).

* حجم استخوان کولار

تجزیه و تحلیل آماری حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار آماری در حجم استخوان کولار در گروههای آزمایش و شاهد در روز بیستم است ($P<0.005$). در روز بیست ویکم این تفاوت مشخص‌تر است ($P<0.001$). بین گروههای آزمایش، تفاوت معنی‌دار آماری وجود ندارد(جدول ۲).

* حجم غضروف

در روز بیستم، تفاوت حجم غضروف میان گروههای آزمایش و شاهد به‌صورت قابل ملاحظه‌ای معنی‌دار است ($P<0.001$)، این تفاوتها در روز بیست‌ویکم هم معنی‌دار هستند ($P<0.05$). بین گروههای آزمایش، اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد (جدول ۳).

* حجم استخوان ترابکولار

مقایسه حجم استخوان ترابکولار در گروههای آزمایشی شاهد، دلالت بر آن دارد که در روز بیستم تفاوت حجم گروههای آزمایش با گروه شاهد معنی‌دار است ($P<0.05$) و این تفاوت در روز بیست‌ویکم مشخص‌تر است ($P<0.001$). بین دو گروه آزمایش اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد (جدول ۴).

جدول ۱: تأثیر کافئین روی حجم پریوست / پری کندر استخوان تیبیا (mm^3) در جنین موش صحرایی

آزمون‌معنی‌داری					گروه شاهد	گروه‌آزمایش ۲	گروه آزمایش۱	
معنی داری آزمایش ۱ و۲	معنی داری آزمایش۲ وشاهد	معنی داری آزمایش۱ وشاهد	سطح معنی داری	آماره آزمون	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار	روز
N.S.	**	**	۰/۰۰۷	۹/۰۳	۰/۳۵±۰/۰۹	۰/۲۰±۰/۰۲	۰/۱۹±۰/۰۵	۲۰
N.S.	***	***	۰/۰۰۰۹	۱۷/۱۰	۰/۶۲±۰/۱۶	۰/۳۵±۰/۰۲	۰/۲۲±۰/۰۶	۲۱

جدول ۲: تأثیر کافئین روی حجم Collar bone استخوان تیبیا (mm^3) در جنین موش صحرایی

آزمون‌معنی‌داری					گروه شاهد	گروه‌آزمایش ۲	گروه آزمایش۱	
معنی داری آزمایش ۱ و۲	معنی داری آزمایش۲ وشاهد	معنی داری آزمایش۱ وشاهد	سطح معنی داری	آماره آزمون	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار	روز
N.S.	*	*	۰/۰۲	۵/۴۸	۰/۲۱±۰/۱۱	۰/۰۷±۰/۰۱	۰/۰۸±۰/۰۳	۲۰
N.S.	***	***	۰/۰۰۰۴	۲۱/۵۰	۰/۵۲±۰/۱۶	۰/۲۲±۰/۰۱	۰/۱۱±۰/۲	۲۱

جدول ۳: تأثیر کافئین روی حجم غضروف استخوان تیبیا (mm^3) در جنین موش صحرایی

آزمون‌معنی‌داری					گروه شاهد	گروه‌آزمایش ۲	گروه آزمایش۱	
معنی داری آزمایش ۱ و۲	معنی داری آزمایش۲ وشاهد	معنی داری آزمایش۱ وشاهد	سطح معنی داری	آماره آزمون	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف * معیار	میانگین ±انحراف معیار	روز
N.S.	**	**	۰/۰۰۲	۱۰/۸۵	۰/۸۵±۰/۰۹	۰/۶۰±۰/۰۲	۰/۴۰±۰/۲۱	۲۰
N.S.	*	*	۰/۰۲	۵/۵۸	۰/۱۸±۰/۴۱	۰/۶۲±۰/۱۱	۰/۴۵±۰/۳۷	۲۱

* $P<0.05$

** $P<0.01$

*** $P<0.001$

N.S.: Not Significant

* حجم کل استخوان

نتایج آزمون آماری نشان می‌دهد که تفاوت حجم احاطه شده توسط پریوست/پری‌کندر در روز بیستم بین گروههای آزمایش ۱ و گروه شاهد معنی‌دار است ($P<0.01$) و این اختلاف در روز بیست‌ویکم هم وجود دارد. اما این اختلاف بین گروه شاهد و آزمایش ۲ از نظر آماری مشخص‌تر ($P<0.001$) است(جدول ۵).

* حجم غضروف جذب شده

براساس نتایج آزمون آماری، تفاوت معنی‌داری در حجم غضروف جذب شده در فاصله بین روزهای بیست و بیست‌ویکم بین گروههای آزمایش و شاهد وجود دارد (جدول ٦).

* حجم غضروف تشکیل شده

نتایج آزمون آماری حاکی از آن است که در حجم غضروف جذب شده که معادل استخوان تشکیل شده بین گروههای آزمایش و شاهد است، تفاوت معنی‌دار آماری وجود دارد (جدول ۷).

جدول ۴: تأثیر کافئین روی حجم Trabecular Bone استخوان تیبیا(mm^3) در جنین موش صحرایی

آزمون‌معنی‌داری				گروه شاهد	گروه‌آزمایش ۲	گروه آزمایش۱	
معنی داری آزمایش ۱ و۲	معنی داری آزمایش۲ وشاهد	معنی داری آزمایش۱ وشاهد	سطح معنی داری	آماره آزمون	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار	روز
N.S.	*	*	۰/۰۴	۴/۵۹	۰/۲۳±۰/۱۰	۰/۰۹±۰/۰۱	۲۰
N.S.	***	***	۰/۰۰۰۱	۳۰/۵۵	۰/۶۹±۰/۱۵	۰/۲۸±۰/۰۵	۲۱

جدول ۵: تأثیر کافئین روی حجم استخوان تیبیا (mm^3) در جنین موش صحرایی

آزمون‌معنی‌داری				گروه شاهد	گروه‌آزمایش ۲	گروه آزمایش۱	
معنی داری آزمایش ۱ و۲	معنی داری آزمایش۲ وشاهد	معنی داری آزمایش۱ وشاهد	سطح معنی داری	آماره آزمون	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار	روز
N.S.	**	**	۰/۰۰۳	۱۱/۴۲	۱/۶۵±۰/۳۴	۰/۹۹±۰/۰۴	۲۰
N.S.	***	***	۰/۰۰۱	۱۳/۶۴	۳/۰۲±۰/۸۸	۱/۴۷±۰/۱۰	۲۱

جدول ۶: تأثیر کافئین روی حجم غضروف جذب شده (mm^3) در جنین موش صحرایی

آزمون‌معنی‌داری				گروه شاهد	گروه‌آزمایش ۲	گروه آزمایش۱	
معنی داری آزمایش ۱ و۲	معنی داری آزمایش۲ وشاهد	معنی داری آزمایش۱ وشاهد	سطح معنی داری	آماره آزمون	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار	روز
N.S.	***	***	۰/۰۰۰۷	۱۸/۰۴	۰/۴۶±۰/۱۵	۰/۱۹±۰/۰۵	۲۰_۲۱

جدول ۷: تأثیر کافئین روی حجم غضروف تشکیل شده (mm^3) در جنین موش صحرایی

آزمون‌معنی‌داری				گروه شاهد	گروه‌آزمایش ۲	گروه آزمایش۱	
معنی داری آزمایش ۱ و۲	معنی داری آزمایش۲ وشاهد	معنی داری آزمایش۱ وشاهد	سطح معنی داری	آماری آزمون	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار	روز
N.S.	****	****	۰/۰۸	۳/۳۲	۰/۷۹±۰/۵۷	۰/۲۱±۰/۰۸	۲۰_۲۱

* P<0.05 ** P<0.01

*** P<0.001 **** P<0.1

N.S.: Not Significant

بحث

تجویز کافئین به موشهای صحرایی مادهٔ باردار موجب شد که در استخوانهای تیبیای جنینهای آنها، حجم غضروف جذب شده (معادل استخوان تشکیل شده) و همچنین حجم غضروف تشکیل شده، کاهش معنی‌داری آماری پیدا کند.

از آنجا که کافئین در گروه آزمایش ۱، تأثیر بیشتری بر حجمهای اندازه‌گیری شده دارد، به‌نظر می‌رسد چگونگی تجویز کافئین در بروز آثار آن مؤثر است. زیرا در گروه آزمایش یک، کافئین طی یک روز با مقدار بالا (روز چهاردهم) تجویز شد و در گروه آزمایش دو، مقدار بیشتری از کافئین، در طی سه روز تجویز شد. نتایج این تحقیق، تأییدکننده نظر Collin و همکارانش است که اعلام کرده بودند: «کافئین بسته به آنکه استخوانها در چه مرحله‌ای از تکامل خود باشند، اثر خود را بر روی آنها اعمال می‌کند». به‌عنوان مثال در استخوان تیبیا که مدل غضروفی آن کامل شده و استخوانسازی آن آغاز شده است، کافئین باعث تأخیر در نشست مواد معدنی می‌شود و مینرالیزاسیون را با تأخیر مواجه می‌کند (۷). در تحقیق حاضر هم که نمونه‌ها در دو روز بررسی شدند مشاهده شد که استخوانسازی متوقف نشده بلکه دچار مسیر کندتری گردیده است.

اثر کافئین بر استخوانسازی می‌تواند به علت اثر وابسته به دوزی باشد که بر روی سنتز کلاژن دارد. همان‌طور که Tassinari اعلام کرده است که عدم تشکیل ماتریکس به علت کاهش سنتز کلاژن است که باید قبل از نشست مواد معدنی، افزایش یابد (۵). به نظر می‌رسد که کافئین اثر خود را بر روی ماتریکس خارج سلولی اعمال می‌کند و شرایط لازم برای نشست مواد معدنی را تغییر می‌دهد؛ اما به‌هرحال این‌گونه تغییرات، ناهنجاری نبوده و برگشت‌پذیر هستند. Nakamoto و همکاران نشان دادند که وزن استخوان فک پایین و کلسیم موجود در آن در جنینهایی که مادران آنها روزانه ۱۰ mg/kg الی ۲۰ mg/kg کافئین دریافت کرده‌اند کمتر از گروه شاهد است که نشان‌دهندهٔ کاهش رشد استخوان و میزان مواد معدنی آن است (۸).

اطلاعات فوق نشان می‌دهد که اثر خالص کافئین بر استئوبلاستها، بر تشکیل ماتریکس خارج سلولی است که باعث تأخیر در مینرالیزاسیون می‌شود. بنابراین مشاهده کاهش غضروف جذب شده در مطالعه حاضر می‌تواند نتیجه کاهش تشکیل ماتریکس خارج سلولی تحت اثر کافئین باشد.

اتفاق‌نظر محققان بر آن است که کافئین آثار خود را با تغییر در میزان Catecholamines جریان خون اعمال می‌کند. زیرا این فاکتور میزان گردش خون را کاهش می‌دهد (۹). در استخوانسازی پروژنیتورهای استئوبلاستها، استئوکلاستها و مواد معدنی از طریق گردش خون به ناحیه انتقال می‌یابند؛ بنابراین کاهش جریان خون می‌تواند بر این روند اثر گذاشته و میزان استخوانسازی را کاهش دهد.

تزریق کافئین در دوران بارداری موش صحرایی باعث تأخیر در روند استخوانسازی جنین می‌شود.

References

1. Nishimura H, Nakai KC: Congential malformations in offspring of mice treated with caffeine. Proc Soc Exp Bio Med 1960; 104-140
2. Weathersbee P, Olsen L, Lodge Y: Caffeine and pregnancy. A retrospective survey postgrad. Med 1977; 62-64
3. William J, Scott JR: Description of malformations and quantitation of placental transfer. Teratology 1983; 18: 427-435.
4. Palm PE, Arnold EP, Rachwall pc, Leyczek JC, Teague KW, Kensler JC: Evaluation of the teratogenic potential of fresh-brewed coffee and caffeine in the rat. Toxicol Appl Pharmacol 1978; 44(1): 1-16
5. Tassinari MS, Gerstenfeld LC: Effects of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracelluar matrix in vitro. J Bone Mineral Res 1991; 6(10): 1029-1036
6. Palm PE, Thayer PS: A current assesment of the mutagenic and effects of caffeine. CRC Crit Toxicol 1975; 3: 345
7. Collins TFX, Welsh LJ, Black TN, Whitby KE, O D Onnell JWJR: Potential reversibility of skeletal effects in rats exposed in utero to caffeine. Food Chem Toxicol 1987; 25: 647-662
8. Nakamoto T, Grant S, Yazdian M: The effects of maternal caffeine intake during pregnancy on mineral contents of fetal rat bone. Res Exp Med 1989; 189: 275-280
9. Wilson JC, Scott WJ: The teratogenic potential of caffeine in laboratory animals: Perspective from recent research, Dews PB (ed). Berlin, Springer Verlag, 1984, pp 105-187