

بررسی میزان تأثیر کافئین بر استخوانسازی استخوان تیپایی 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 تیپایی جنین موش صحرایی به روش کمی 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 ۱۷۵ mg/kg کافئین یک درصد در روز ۱۴ بارداری و به گروه تجربی دوم، در هر یک از روزهای ۱۴ و ۱۵ و ۱۶ بارداری، ۸۰ mg/kg کافئین یک درصد تزریق شد. گروه آخر به عنوان شاهد بود. در روزهای ۲۰ و ۲۱ بارداری، موشهای صحرایی با کلروفورم بیهوش و جنینها از رحم آنها خارج شدند؛ اندام عقبی طرف چپ از بدن جنینها جدا شد 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 تراپیکولار و کل استخوان محاسبه شد. شکل برشهای رنگ شده توسط کامراسید با کاغذ منتقل شده و مساحت قسمتهای مختلف با روشهای رایانه‌ای محاسبه شد. توزیع نرمال داده‌ها به وسیله 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 تراپیکولار، 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.

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



مقدمه

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

از زمانهای گذشته، مطالعاتی در مورد قدرت تراتوزنی 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 خودبه خودی، زایمان زودرس و نارس بودن نوزادان یا 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 استخوانسازي دنده‌ها و استخوانهای جمجمه، عدم تکامل لگنچه کلیه، کاهش وزن ارگانهای مانند مغز، ریه و کبد نسبت به وزن کلی بدن، کاهش دانسیته استخوانی (۴) هیپوپلازی و دیس مورفوژنز جوانه اندام (۵) نیز دیده شده است.

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

بنابراین چگونگی تجویز کافئین روزانه، عامل مهمی در تعیین قدرت تراتوزن بودن آن محسوب می‌شود. این‌گونه آثار به دوز و نحوه مصرف آن بستگی دارد. به بیان دیگر، دوز ۸۰ mg/kg، زمانی تراتوزن است که از طریق خوراکی و هر روز به موشهای صحرایی داده شود (۷). در این مطالعه اثرات تراتوزنی کافئین روی روند استخوانسازي و جذب غضروف به صورت کمی بررسی شد.

مواد و روشها

جهت بررسی آثار کافئین بر استخوانسازي، 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. درجه 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 روشنائی 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 به صورت داخل صفاقی تزریق شد و به گروه سوم، سرم فیزیولوژی تزریق شده و به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در روزهای بیستم و بیست و یکم بارداری، هر سه گروه با کلروفورم 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 کننده 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 بافر فسفات غوطه‌ور شدند تا کاملاً نرم شوند. نمونه‌ها، پردازش بافتی و قالبگیری شدند و به وسیله میکروتوم با تیغه ثابت، برشهای عرضی نسبت به محور طولی استخوان تییبای چپ جنین موشها به روش سریال و به ضخامت ۸ میکرون تهیه گردید. برشها به صورت یک به پنج جمع شده و به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین رنگ شدند. برای تعیین حجم پریوست، پری کندر، استخوان کولار، غضروف، استخوان تراپیکولار و کل حجم به ترتیب زیر عمل شد:

تصاویر همه برشها به وسیله کامرالیسیداکشیده شد و توسط اسکنر به کامپیوتر وارد و با برنامه Paint Brush در محیط Windows رنگ آمیزی شد؛ مساحت هر یک از آنها توسط برنامه 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) در طی یک روز، افزایش حجم استخوان تراپیکولار (V.T.B.) در این فاصله زمانی محاسبه شد؛ به این منظور میانگین حجم استخوان تراپیکولار در روز بیستم از حجم استخوان تراپیکولار در روز بیست و یکم، کم شد:

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

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

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

ابتدا توزیع نرمال داده‌ها به وسیله روش آماري Kolmogorov-Smirnov بررسی و سپس توسط روش آماري آنالیز واریانس یک طرفه 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 غضروف

در روز بیستم، تفاوت حجم غضروف میان گروه‌های آزمایش و شاهد به صورت 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 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 بیست‌ویکم این تفاوت مشخص‌تر است ($P < 0.001$). بین گروه‌های آزمایش، تفاوت معنی‌دار آماری وجود ندارد (جدول ۲).

* حجم استخوان تراپکولار

مقایسه حجم استخوان تراپکولار 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 تیپیا (mm^3) در جنین موش صحرایی

روز	گروه آزمایش ۱ میانگین \pm انحراف معیار	گروه آزمایش ۲ میانگین \pm انحراف معیار	گروه شاهد میانگین \pm انحراف معیار	آزمون معنی‌داری				
				آماره آزمون	سطح معنی داری	معنی داری آزمایش ۱ و شاهد	معنی داری آزمایش ۲ و شاهد	معنی داری آزمایش ۱ و ۲
۲۰	۰/۱۹ \pm ۰/۰۵	۰/۲۰ \pm ۰/۰۲	۰/۳۵ \pm ۰/۰۹	۹/۰۳	۰/۰۰۷	**	**	N.S.
۲۱	۰/۲۲ \pm ۰/۰۶	۰/۳۵ \pm ۰/۰۲	۰/۶۲ \pm ۰/۱۶	۱۷/۱۰	۰/۰۰۰۹	***	***	N.S.

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

روز	گروه آزمایش ۱ میانگین \pm انحراف معیار	گروه آزمایش ۲ میانگین \pm انحراف معیار	گروه شاهد میانگین \pm انحراف معیار	آزمون معنی‌داری				
				آماره آزمون	سطح معنی داری	معنی داری آزمایش ۱ و شاهد	معنی داری آزمایش ۲ و شاهد	معنی داری آزمایش ۱ و ۲
۲۰	۰/۰۸ \pm ۰/۰۳	۰/۰۷ \pm ۰/۰۱	۰/۲۱ \pm ۰/۱۱	۵/۴۸	۰/۰۲	*	*	N.S.
۲۱	۰/۱۱ \pm ۰/۰۲	۰/۲۲ \pm ۰/۰۱	۰/۵۲ \pm ۰/۱۶	۲۱/۵۰	۰/۰۰۰۴	***	***	N.S.

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

روز	گروه آزمایش ۱ میانگین \pm انحراف معیار	گروه آزمایش ۲ میانگین \pm انحراف معیار	گروه شاهد میانگین \pm انحراف معیار	آزمون معنی‌داری				
				آماره آزمون	سطح معنی داری	معنی داری آزمایش ۱ و شاهد	معنی داری آزمایش ۲ و شاهد	معنی داری آزمایش ۱ و ۲
۲۰	۰/۴۰ \pm ۰/۲۱	۰/۶۰ \pm ۰/۰۲	۰/۸۵ \pm ۰/۰۹	۱۰/۸۵	۰/۰۰۲	**	**	N.S.
۲۱	۰/۴۵ \pm ۰/۳۷	۰/۶۲ \pm ۰/۱۱	۰/۱۸ \pm ۰/۴۱	۵/۵۸	۰/۰۲	*	*	N.S.

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

*** $P < 0.001$

N.S.: Not Significant



جذب شده در فاصله بین روزهای بیست و بیست و یکم بین گروههای آزمایش و شاهد وجود دارد (جدول ۶).

*** 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 معنی دار آماری وجود دارد (جدول ۷).

*** حجم کل استخوان**

نتایج آزمون آماری نشان می دهد که تفاوت حجم احاطه شده توسط پروست/پری کندر در روز بیستم بین گروههای آزمایش ۱ و گروه شاهد معنی دار است ($P < 0.01$) و این اختلاف در روز بیست و یکم هم وجود دارد. اما این اختلاف بین گروه شاهد و آزمایش ۲ از نظر آماری مشخص تر ($P < 0.001$) است (جدول ۵).

*** حجم غضروف جذب شده**

براساس نتایج آزمون آماری، تفاوت معنی داری در حجم غضروف

جدول ۴: تاثیر کالنین روی حجم Trabecular Bone استخوان تیپیا (mm^3) در جنین موش صحرایی

روز	گروه آزمایش ۱	گروه آزمایش ۲	گروه شاهد	آزمون معنی داری				
				آماره آزمون	سطح معنی داری	معنی داری	معنی داری	معنی داری
۲۰	0.21 ± 0.06	0.09 ± 0.01	0.23 ± 0.10	۴/۵۹	۰/۰۴	*	*	N.S.
۲۱	0.15 ± 0.07	0.28 ± 0.05	0.69 ± 0.15	۳۰/۵۵	۰/۰۰۰۱	***	***	N.S.

جدول ۵: تاثیر کالنین روی حجم استخوان تیپیا (mm^3) در جنین موش صحرایی

روز	گروه آزمایش ۱	گروه آزمایش ۲	گروه شاهد	آزمون معنی داری				
				آماره آزمون	سطح معنی داری	معنی داری	معنی داری	معنی داری
۲۰	0.80 ± 0.31	0.99 ± 0.04	1.65 ± 0.34	۱۱/۴۲	۰/۰۰۳	**	**	N.S.
۲۱	0.93 ± 0.51	1.47 ± 0.10	3.02 ± 0.88	۱۳/۶۴	۰/۰۰۱	***	***	N.S.

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

روز	گروه آزمایش ۱	گروه آزمایش ۲	گروه شاهد	آزمون معنی داری				
				آماره آزمون	سطح معنی داری	معنی داری	معنی داری	معنی داری
۲۰-۲۱	0.03 ± 0.07	0.19 ± 0.05	0.46 ± 0.15	۱۸/۰۴	۰/۰۰۰۷	***	***	N.S.

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

روز	گروه آزمایش ۱	گروه آزمایش ۲	گروه شاهد	آزمون معنی داری				
				آماره آزمون	سطح معنی داری	معنی داری	معنی داری	معنی داری
۲۰-۲۱	0.08 ± 0.23	0.21 ± 0.08	0.79 ± 0.57	۳/۳۲	۰/۰۸	****	****	N.S.

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

*** $P < 0.001$

**** $P < 0.1$

N.S.: Not Significant

۴۰



بحث

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 به‌رحال 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 نشان‌دهنده 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.

اتفاق نظر 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 استخوانسازي پروژنیوتورهای 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 استخوانسازي را کاهش دهد. تزریق کافئین در دوران بارداری موش صحرایی باعث تأخیر در روند استخوانسازي جنین می‌شود.

تجویز کافئین به موشهای صحرایی ماده 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 استخوانسازي 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 استخوانسازي متوقف نشده بلکه دچار مسیر کندتری گردیده است.

اثر کافئین بر استخوانسازي 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

References

1. Nishimura H, Nakai KC: Congenital 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 extracellular 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

