اثر کافئین بر روند یادگیری و حافظه متعاقب القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین در موش صحرایی نر

ندا دشت بزرگی و شیوا خضری*

ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۶

چکیده

کافئین به عنوان آنتاگونیست رسپتورهای آدنوزینی بوده و می‌تواند باعث حفاظت سیستم عصبی شود. هدف از این مطالعه، بررسی اثر کافئین بر اختلال یادگیری و حافظه القا شده متعاقب تزریق درون هیپوکامپی لیزولسیتین در موش های صحرایی نر می‌باشد. حیوانات به سه گروه آزمایشی تقسیم شدند. ۱. کنترل، ۲. گروه بیمار که لیزولسیتین در ناحیه شکنج دندانه دار هیپوکامپ آنها برای ایجاد دمیلیناسیون تزریق شد ۳. گروهی تحت تیمار که بعد از تزریق لیزولسیتین در هیپوکامپ، کافئین را به صورت داخل صفاقی و با دوز ۳۰mg/kg به مدت ۲۸ روز دریافت کردند. مطالعه رفتاری توسط دستگاه ماز شعاعی طی سه دوره ۷ روزه انجام گرفت. لیزولسیتینن، باعث اختلال حافظه و یادگیری در رت‌ها شد که این اختلال در روزهای ۵ ام تا ۲۸ ام بعد از تزریق لیزولستین چشمگیر بود. تزریق روزانه کافئین باعث بهبود روند یادگیری و حافظه بویژه در روزهای ۱۴ام تا ۲۸ام شد. نتایج حاصل پیشنهاد می‌کند که تیمار با کافئین می‌تواند باعث بهبود حافظه در عارضه‌های نورولوژیکی مثل دمیلیناسیون باشد.

واژه های کلیدی: لیزولستین، کافئین، هیپوکامپ، حافظه، رت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۵۲۷۴۰، پست الکترونیکی: sh.khezri@urmia.ac.ir

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس(MS)، بیماری خودایمنی مربوط به سیستم عصبی مرکزی است که وقایعی همچون تخریب آکسونی، دمیلینه شدن سلول‌های عصبی، اختلال سدخونی مغزی، نفوذ ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها و التهاب سیستم عصبی را در پی دارد (۱۶). سلول‌های عصبی، از طریق ارسال پیام‌های الکتریکی در طول فیبر آکسونی که توسط غلاف میلین پوشیده شده است با یکدیگر ارتباط دارند. در بیماری MS، سیستم ایمنی بدن به غلاف میلین حمله می کند. با تخریب غلاف میلین یا خود فیبر عصبی، توانایی هدایت ایمپالس‌های الکتریکی از سیستم عصبی مرکزی به اندام و بالعکس مختل می‌شود و این عامل نشانه‌های مختلف مربوط به بیماری را در فرد ایجاد می‌کند (۲۳).

مالتیپل اسکلروزیس، یک بیماری غیرقابل پیش‌بینی است که در جوامع مدرن رو به افزایش است. معمولاً در افراد جوان با میانگین سنی۲۰-۴۰ سال رخ می‌دهد و در زنان شایع‌تر است (۲۷).

اگرچه علت دقیق بیماری MS ناشناخته مانده است، ایمنی اکتسابی شامل پاسخ سلول‌های T و B مراحل اولیه بیماری را تعیین می‌کند. لنفوسیت‌های B و T از سد خونی – مغزی عبور می‌کنند به طوریکه غلاف میلین را به عنوان ماده بیگانه شناسایی کرده و آن را تخریب می‌کنند و منجر به دمیلینه شدن آکسونها و فیبرهای عصبی می‌شوند (۱۰). مکانیسم‌های ایمنی ذاتی نیز همراه با فعالیت ماکروفاژها و میکروگلیا، نقش محوری در شروع و پیشرفت بیماری از

طریق آزاد کردن فاکتورهای التهابی مثل سیتوکین‌ها و کموکاین‌ها و نیز گونه‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن دارد (۹). از نشانه‌های شایع این بیماری، اختلال در عملکردهای شناختی از جمله حافظه، دقت و توجه، سرگیجه، افسردگی و عدم تعادل است.

تعدادی مدل آزمایشگاهی برای مطالعه عارضه دمیلینه کننده وجود دارد. مدل ویروسی، مدل التهاب مغزی خود ایمنی (EAE) و مدل آسیب شیمیایی (۱۹). در میان مدل‌های توکسیک و شیمیایی، استفاده از لیزولسیتین باعث دمیلینه شدن موضعی ماده سفید و خاکستری سیستم عصبی مرکزی می‌شود. لیزولسیتین‌ها، ترکیبات شیمیایی مشتق از فسفاتیدیل کولین‌ها می‌باشند که یکی از گروه‌های اسیدچرب در آن‌ها جابه‌جا شده است و برای سلول‌های میلین ساز سیستم عصبی سمی هستند (۶).

کافئین، یک آلکالوئید متبلور و تلخ و یکی از اعضای خانواده متیل گزانتین‌هاست که ذاتاً ضد التهاب بوده و در برگ های چای (سبز، سیاه، قرمز)، دانه‌های قهوه و تولیدات دارویی وجود دارد (۱۱). این ماده به طور گسترده در سراسر بدن منتشر می‌شود و در کبد به متابولیت‌های اصلی کافئین مثل پاراگزانتین، تئوبرومین و تئوفیلین متابولیزه می‌شود که این ترکیبات نیز اثرات عمده‌ای بر سیستم عصبی و ایمنی بدن دارند (۱۲). کافئین به علت دارا بودن خواص لیپوفیلیکی به راحتی از سد خونی مغزی عبور می‌کند و بعنوان آنتاگونیست گیرنده‌های آدنوزینی، اثرات بیوشیمیایی و رفتاری متعدد و پیچیده‌ای در سیستم عصبی مرکزی دارد، از جمله باعث افزایش سطح cAMP و نوروترانسمیترهای نورآدرنالین و استیل کولین و نیز مهار گیرنده‌های گابا وآنزیم فسفودی استراز می‌شود (۳۰). بسیاری از اثرات حفاظتی کافئین از طریق فعال کردن پروتئین کیناز A و افزایش cAMP اعمال می‌شود (۱۳). تعدادی از مطالعات حاکی از این است که کافئین به عنوان مهارکننده آنزیم فسفودی استراز و آنتاگونیست گیرنده‌های آدنوزینی، می‌تواند جنبه‌های متفاوت و متنوع پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی را تعدیل کند (۱۴)، از جمله تولید سیتوکاین‌های التهابی، تولید رادیکالهای آزاد، تکثیر لنفوسیت‌ها (۱۵) و نیز آپوپتوزیس را کاهش می‌دهد. کافئین بعنوان یکی از معمول‌ترین محرک های روانی شناخته می‌شود که بقا وتکثیر سلول‌های زایای عصبی را تحت تاثیر قرارداده و باعث افزایش نوروژنز در هیپوکامپ می‌شود (۳۳). هیپوکامپ، بخش مهمی از سیستم لیمبیک است که در یادگیری و انواع حافظه نقش دارد. این ساختار، شدیداً در مقابل عارضه‌های نورولوژیکی مختلف و تخریب اکسیداتیو آسیب‌پذیر است (۱۹). تزریق لیزولسیتین درون هیپوکامپ باعث تخریب میلین می‌شود (۲۰). وجود پروسه دمیلیناسیون براساس تزریق درون هیپوکامپی لیزولسیتین یک مدل مناسب برای بررسی اثر مواد موثر بر عارضه دمیلیناسیون مثل MS است. تحقیق حاضر به این سوال پاسخ می‌دهد که آیا تیمار با کافئین می‌تواند باعث بهبود اختلال یادگیری و حافظه فضایی موش صحرایی بعد از تزریق درون هیپوکامپی لیزولسیتین شود.

مواد و روشها

در این تحقیق از ۳۰ رأس رت نر بالغ از نژاد ویستار در محدوده وزنی (۲۵۰g–۲۰۰)، استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در دمای کنترل شده اتاق (۲±۲۳درجه سانتی گراد) با ۱۲ساعت تاریکی – روشنایی و غذا و آب کافی نگهداری می‌شدند. در این مطالعه کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین مصوب کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی رعایت شد.

موش‌ها به صورت عمیق با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰mg/kg) و زایلازین (۲ mg/kg) بیهوش شده و در دستگاه استرئوتاکس (Stoelting, USA) در موقعیت جمجمه مسطح مستقر گردیدند. پوست ناحیه سر به

حداقل میزان، برش داده شده، پس از کنار زدن بافت‌های پوششی اطراف، نواحی برگما و لامبدا شناسایی شده و براساس مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس ناحیه مربوط به شکنج دندانه‌دار هیپوکامپ در سطح جمجمه مشخص گردید و کانول‌گذاری انجام شد.

کانول‌های راهنما از سرسوزن‌های ۲۳G دندان‌پزشکی تهیه شدند که در ناحیه DG هیپوکامپ بر طبق اطلس پاکسینوس با مختصات ۲/۸- =AP نسبت به براگما، ۱/۸± =ML و ۲/۵ + =DV از سطح جمجمه قرارگرفتند. کانول ها توسط سیمان دندان‌پزشکی و بافر فوری بر روی جمجمه ثابت شدند. جهت تزریق درون مغز نیز از سر سوزن-های ۳۰G دندان‌پزشکی و لوله پلی‌اتیلن شماره ۱۰ با طول ۲۰ سانتی‌متر متصل به سرنگ همیلتون، استفاده شد. فرآیند تخریب میلین توسط تزریق ۲ میکرولیتر لیزولسیتین ٪۱ درسالین ٪۰/۹ با سرعت یک میکرولیتر در دقیقه در ناحیه DG هیپوکامپ انجام شد. رت‌ها به گروه های تحت آزمایش شامل: ۱- کنترل (که فقط جراحی شدند)، ۲- گروه‌های بیمار (LPC) که تحت جراحی قرار گرفتند و سپس ۲ میکرولیتر لیزولسیتین در ناحیه DG هیپوکامپ آن‌ها تزریق شد بدون اینکه تیماری دریافت کنند. ۳- گروه‌های تحت تیمار (LPC+CAF) که جراحی شدند و بعد از تزریق ۲ میکرولیتر لیزولسیتین در هیپوکامپشان، کافئین را با دوز ۳۰ mg/kg بصورت درون صفاقی به مدت ۲۸ روز دریافت کردند.

بررسی رفتاری: بعد از طی یک هفته دوره نقاهت، یعنی زمانیکه محل جراحی بهبود یافت، مراحل آموزش با استفاده از دستگاه ماز شعاعی ۸ بازویی انجام شد. این ماز از یک سکوی مرکزی با بازوهای شعاعی تشکیل یافته است که ۸، ۱۲ یا ۱۶ بازو از سکوی مرکزی به صورت شعاعی جدا می‌شوند. در این تست، پاداش (غذا) در انتهای یک بازو قرار داده می‌شود. این بازو در طول ترایل-ها، حاوی غذا باقی می‌ماند. بعد از محرومیت از غذا، رت در مرکز دستگاه قرار داده می‌شود و از آنجا به داخل تمام بازوها می‌رود تا پاداش را پیدا کند (۷). به آن ۵ دقیقه زمان داده می‌شود تا بتواند غذا را بیابد. در ترایل‌های بعدی باید بخاطر بیاورد کدام بازوها فاقد غذا بوده‌اند تا وارد آنها نشود.

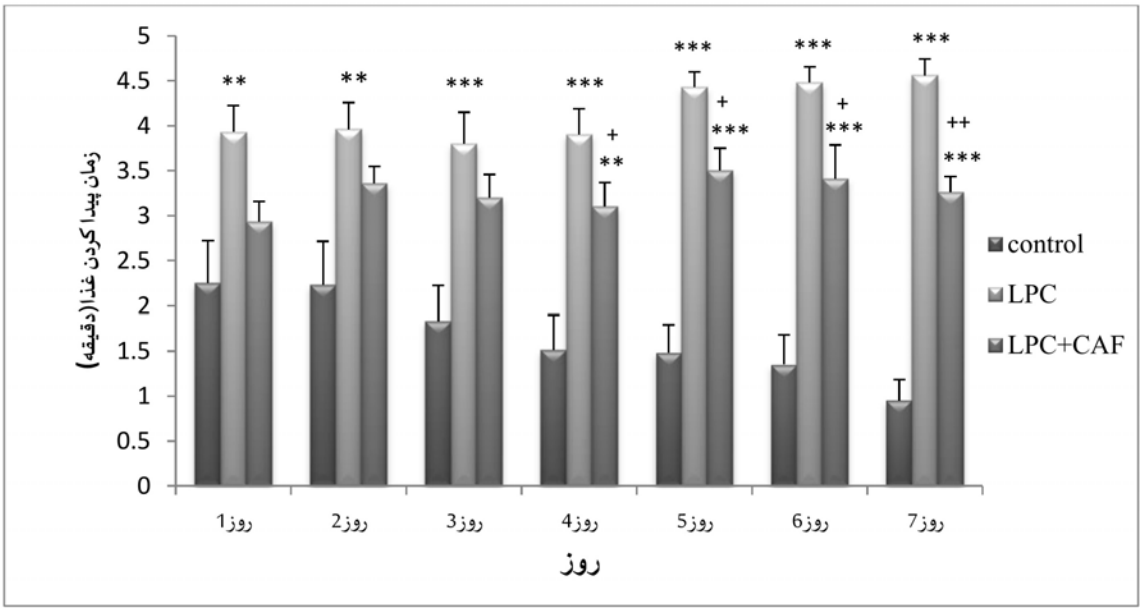
مطالعات رفتاری در یک اتاق ساکت و آرام بین۱۰صبح تا۴ بعدازظهر انجام شد و تمام رفتارها با دوربین ثبت گردید. ۵ روز اول شروع کار، شامل آشنایی و سازگاری رت‌ها با ماز شعاعی بود. رت‌ها طی سه دوره ۷ روزه جهت بررسی تغییر روند یادگیری و حافظه فضایی در دستگاه ماز شعاعی قرارگرفتند. بدین ترتیب که دوره اول مطالعه رفتاری، روزهای ۱ تا ۷ بعد از تزریق لیزولسیتین، دوره دوم روزهای ۱۲ تا ۱۸ بعد از تزریق لیزولسیتین و دوره سوم نیز روزهای ۲۲ تا ۲۸ بعد از تزریق لیزولسیتین را در برمی-گرفت. بین مراحل مطالعه رفتاری، چند روز جهت استراحت موش‌ها در نظر گرفته می‌شد تا بدلیل کم شدن غذای روزانه شان، از بین نروند.

پس از پایان آزمایشات رفتاری، نیم میکرولیتر ماده رنگی متیلن بلو به منظور رنگ‌آمیزی و مشخص نمودن موقعیت کانول‌ها، از طریق کانول‌های راهنما تزریق شد. سپس حیوانات کشته شده و مغزشان در فرمالین ٪۱۰ فیکس و برش هایی از مغز در در ناحیه رنگ‌آمیزی شده تهیه گردید تا از صحت جای گذاری مناسب در ناحیه **DG** هیپوکامپ اطمینان حاصل شود. تنها حیواناتی که ناحیه تزریق در هیپوکامپشان صحیح بود مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

آنالیزهای آماری: آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. از آنالیز واریانس تکراری برای تجزیه تحلیل داده‌ها استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد (Mean±SEM) ارائه شد و٪۵>P به عنوان حداقل سطح معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد.

نتایج

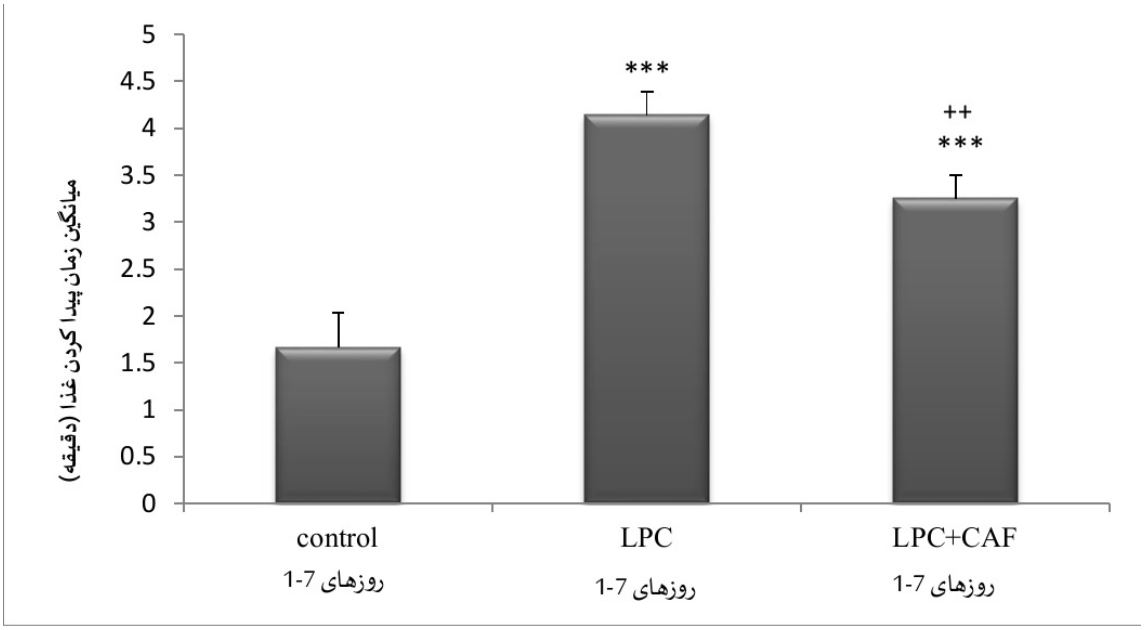
نتایج حاصل از مطالعه رفتاری طبق نمودار۱، نشان داد زمان یافتن غذا طی دوره اول (روزهای ۱ تا ۷ بعد از تزریق لیزولسیتین) در گروه بیمار به طور معنی‌داری (P<0.01, P<0.001) بالاتر از گروه کنترل بود. گروه بیمار در روزهای ۵ ام تا ۷ ام در زمان طولانی‌تری قادر به یافتن غذا در ماز بودند که احتمالاً به دلیل دمیلینه شدن هیپوکامپ می‌باشد که منجر به نقص حافظه شده است. گروه تحت تیمار با کافئین در روزهای ۱ تا ۴ در زمان کوتاه‌تری غذا را پیدا می‌کردند و در روزهای ۵ تا ۷ زمان پیدا کردن غذا افزایش یافت. زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی در گروه تحت تیمار طی ۷ روز به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود و در روزهای ۵ ام تا ۷ ام اختلاف معنی‌دار وجود داشت. مصرف کافئین، زمان یافتن غذا در گروه تیمار شده را در مقایسه با گروه بیمار طی دوره اول کاهش داد به گونه‌ای که در روزهای ۵ ام تا ۷ ام اختلاف معنی‌دار بود.



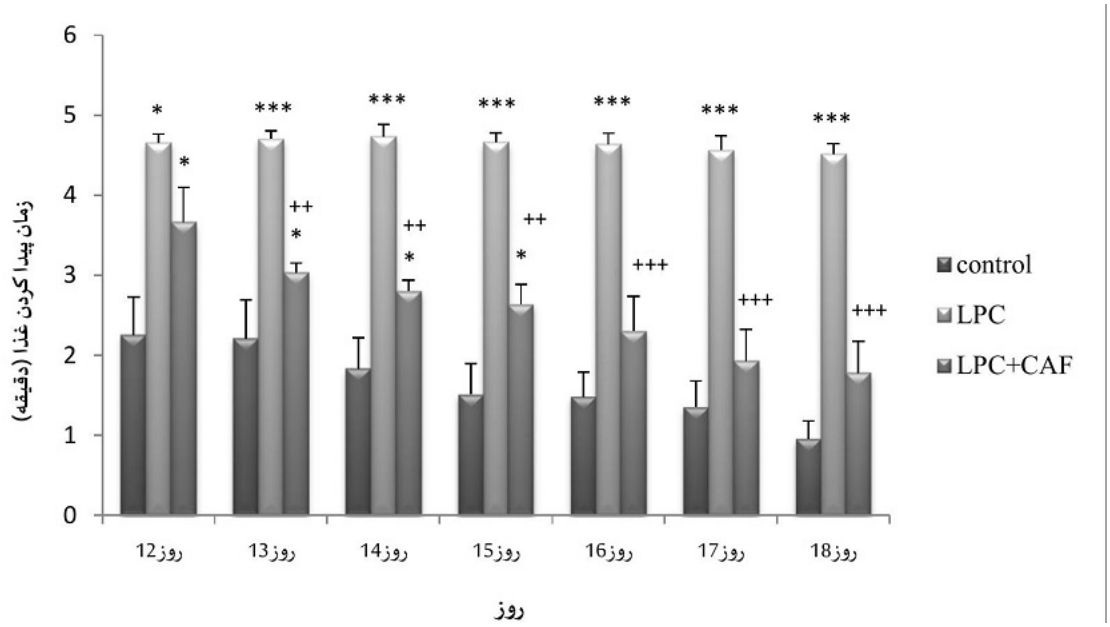
نمودار ۱- بررسی زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی در روزهای (۷-۱) بعد از تزریق لیزولسیتین (گروه کنترل، بیمار(LPC) و تیمار با کافئین (LPC+CAF)). داده‌ها به صورت mean ± SEM بیان شده‌اند. ** P<0.01 *** P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل، ++ P<0.01 +P<0.05 در مقایسه با گروه LPC در همان روز (n = ۷ -۱۰).

مقایسه میانگین زمان پیدا کردن غذا در گروه‌های تحت آزمایش طی روزهای ۱ تا ۷ (نمودار ۲)، نشان داد که میانگین زمان در هر دو گروه بیمار (LPC) و تیمار (LPC+CAF)، بصورت معنی‌داری (P<0.001) بالاتر از گروه کنترل شده بود که حاکی از دمیلینه شدن هیپوکامپ و اختلال حافظه رت‌ها متعاقب تزریق LPC می‌باشد و تیمار با کافئین در کوتاه مدت اثر زیادی بر بهبود ترمیم میلین و اختلال حافظه ندارد. اگرچه میانگین زمان یافتن غذا در گروه تحت تیمار به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه بیمار بود. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه رفتاری در نمودار۳، زمان پیدا کردن غذا در گروه بیمار طی دوره دوم (روزهای ۱۲ تا ۱۸ بعد از تزریق لیزولسیتین) به طور معنی‌داری (P<0.05, P<0.001) بالاتر از گروه کنترل بود. تیمار با کافئین به مدت ۱۲ تا ۱۸ روز، باعث کاهش معنی‌دار (P<0.05, P<0.01, P<0.001) زمان رسیدن به غذا در ماز شعاعی طی این روزها نسبت به گروه بیمار شد. همچنین،

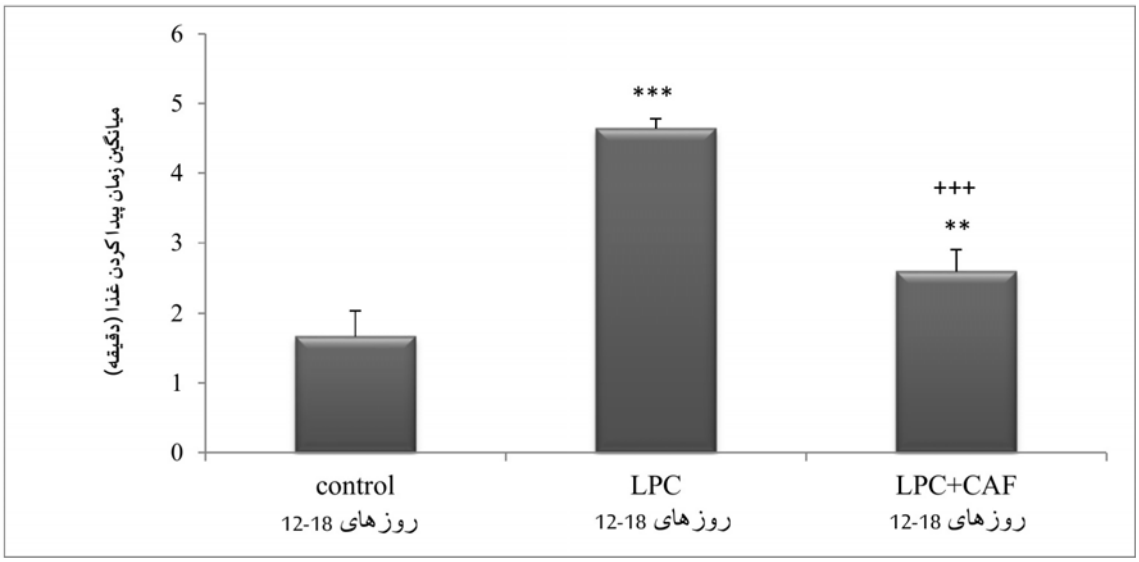
با وجودیکه در این دوره زمان پیدا کردن غذا در گروه تحت تیمار بالاتر از گروه کنترل بود، اما در روزهای ۱۶ تا ۱۸ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.



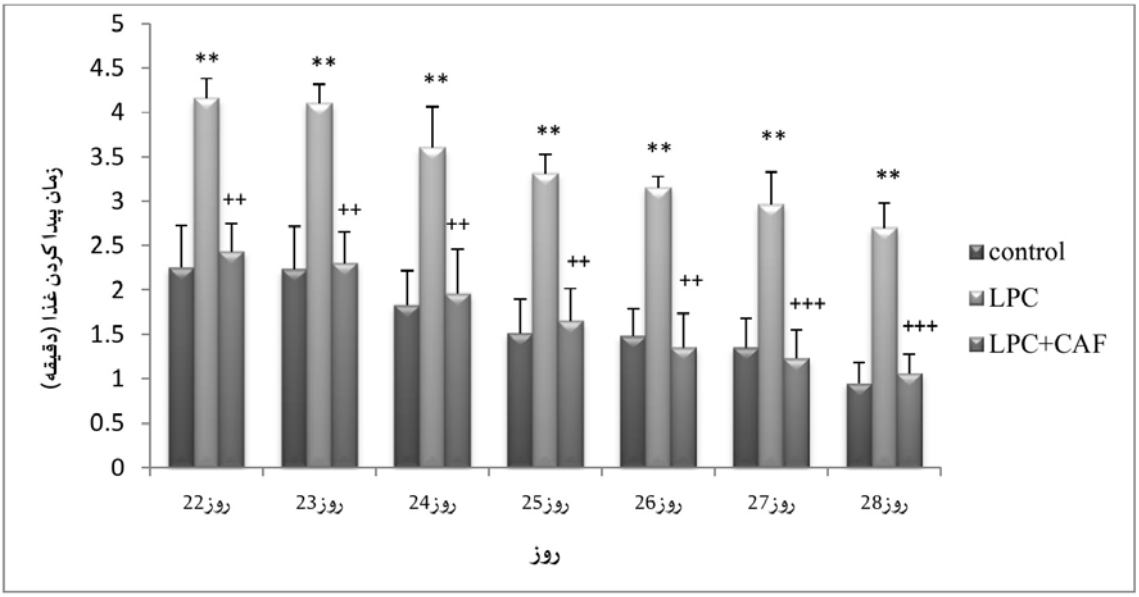
نمودار۲- مقایسه میانگین زمان پیدا کردن غذا در دوره اول بررسی رفتاری بین گروه کنترل، بیمار(LPC) و تیمار با کافئین (LPC+CAF) نشان داد بین گروه‌های تحت آزمایش در این دوره اختلاف معنی‌دار وجود دارد. داده‌ها به صورت mean±SEM بیان شده اند. ***P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل، ++P<0.01 در مقایسه با گروهLPC (n= ۷-۱۰).



نمودار۳- مقایسه زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی بین گروه کنترل، گروه بیمار(LPC) و تیمار با کافئین (LPC+CAF) نشان داد بین گروه های تحت آزمایش اختلاف معنی‌داری وجود دارد. داده‌ها به صورت mean ±SEM بیان شده‌اند. *P<0.05 ***P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل، ++P<0.01 +++P<0.001 در مقایسه با گروه LPC در همان روز (n = ۷ -۱۰).



نمودار۴- مقایسه زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی بین گروه کنترل، بیمار(LPC) و تیمار با کافئین (LPC+CAF) نشان داد بین گروه‌های تحت آزمایش اختلاف معنی‌دار وجود دارد. داده‌ها به صورت mean ± SEM بیان شده اند.***P<0.001 **P<0.01 در مقایسه با گروه کنترل، +++P<0.001 در مقایسه با گروه LPC (۱۰- ۷ = n).

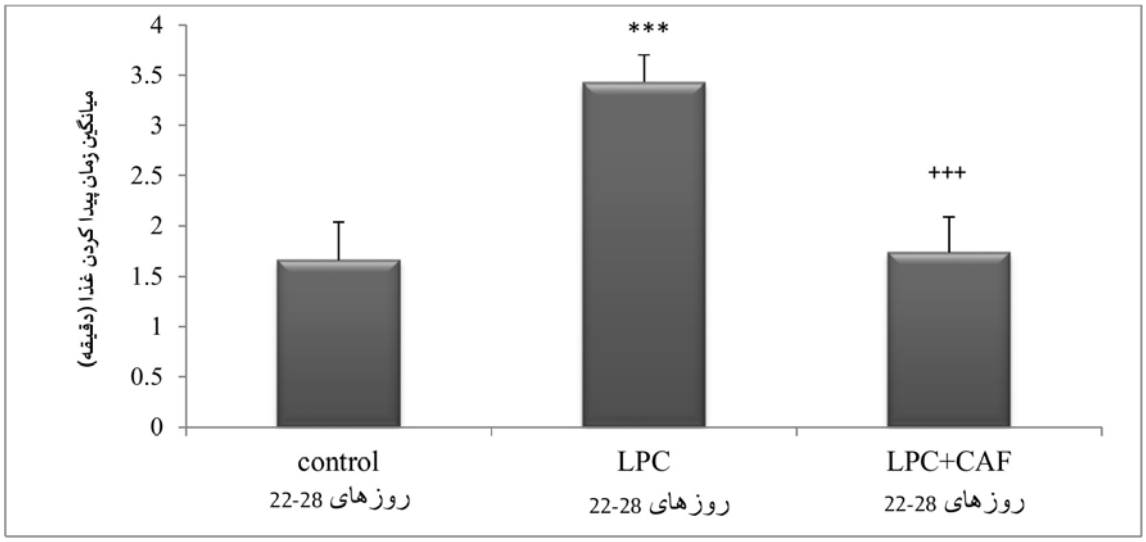


نمودار۵- مقایسه زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی بین گروه کنترل، بیمار(LPC) و تیمار با کافئین (LPC+CAF) نشان داد بین گروه های تحت آزمایش اختلاف معنی‌دار وجود دارد. داده‌ها به صورت mean ± SEM بیان شده‌اند. * P<0.05 ** P<0.01 در مقایسه با گروه کنترل، ++P<0.01 +++P<0.001 در مقایسه با گروه بیمار (LPC) (۱۰- ۷ = n).

در دوره دوم تست رفتاری، مقایسه بین گروه‌های تحت آزمایش طبق نمودار۴ نشان داد که میانگین زمان پیدا کردن غذا در گروه بیمار و تیمار به طور معنی‌داری (P<0.01, P<0.001)، بالاتر از گروه کنترل بود که حاکی از دمیلینه شدن هیپوکامپ رت‌ها در این دو گروه می‌باشد.

در گروه تیمار شده با کافئین به مدت ۱۲ تا ۱۸ روز، میانگین زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی به صورت معنی‌داری (P<0.001)، پایین‌تر از گروه LPC بود که نشان

دهنده اثر تیمار با کافئین در بهبود یادگیری و حافظه است. نتایج همچنین نشان داد که در دوره سوم (روزهای ۲۲ تا ۲۸ بعد از تزریق لیزولسیتین)، زمان یافتن غذا در گروه بیمار بصورت تدریجی کاهش یافت که احتمالاً بدلیل ترمیم داخلی و طبیعی میلین در هیپوکامپ است که البته اثر کمی در بهبود حافظه داشته است چرا که در تمام روزهای دوره سوم به طور معنی‌داری (P<0.01) بالاتر از گروه کنترل بود. مصرف کافئین در گروه تحت تیمار به مدت ۲۲ تا ۲۸ روز، زمان یافتن غذا را در ماز شعاعی بصورت معنی‌داری (P<0.01, P<0.001) در مقایسه با گروه بیمار کاهش داد. همچنین با وجودیکه زمان یافتن غذا در گروه تیمار با کافئین بالاتر از گروه کنترل بود، اما تفاوت معنی-داری مشاهده نشد (نمودار۵) که حاکی از بهبود روند یادگیری و حافظه در آن‌ها می‌باشد. میانگین زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی در دوره سوم نیز در گروه بیمار (LPC) بصورت معنی‌داری (P<0.001) بالاتر از گروه کنترل بود. گروه تحت تیمار طی این دوره عملکرد بهتری داشتند و میانگین زمان یافتن غذا در آن‌ها به طور معنی-داری (P<0.001) پایین‌تر از گروه بیمار بود. همچنین بین گروه تیمار و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۶).



نمودار۶- مقایسه میانگین زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی بین گروه کنترل، بیمار(LPC) و تیمار با کافئین(LPC+CAF) نشان داد بین گروه‌های تحت آزمایش اختلاف معنی‌دار وجود دارد. داده‌ها به صورت mean ± SEM بیان شده‌اند.*** P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل، +++P<0.01 در مقایسه با گروه LPC (n = ۷ -۱۰).

بحث و نتیجه گیری

یادگیری و حافظه، پروسه‌های شناختی متمایزی برای اکتساب، به رمز درآوردن، تثبیت و به یاد آوردن اطلاعات در مورد محیط اختصاصی می‌باشند (۱۷). ام اس، یکی از معمول‌ترین عارضه‌های نورولوژیکی در افراد جوان با میانگین سنی حدود ۳۰ سال است (۲۷) که مشخصه آن التهاب و دمیلینه شدن سیستم عصبی مرکزی که نقص‌های حافظه‌ای را بدنبال دارد. در سیستم عصبی مرکزی، فرایند تخریب میلین توسط حمله مستقیم سلول‌های ایمنی به الیگودندروسیت ها که غلاف میلین را ساخته و محافظت می‌کنند، انجام می‌شود (۳۱)، بنابراین می‌تواند یک جنبه تشخیصی برای بیماری MS باشد. الیگودندروسیت‌ها، سلول‌های میلین ساز اصلی سیستم عصبی هستند که از سلول‌های زایای منطقه تحت بطنی مشتق می‌شوند. خطوط سلولی الیگودندروسیتی هدایت الکتریکی در طول مسیرهای فیبری مرتبط را تشدید می‌کنند (۲۸).

لیزولسیتین‌ها، ترکیبات شیمیایی مشتق از فسفاتیدیل کولین‌ها می‌باشند که برای سلول‌های میلین ساز سمی هستند و باعث تحریک فعالیت سلول‌های فاگوسیت کننده سیستم عصبی وآپوپتوزالیگودندروسیت ها می‌شوند (۳۲).

هیپوکامپ، به عنوان یکی از مواد خاکستری مهم که شدیداً در مقابل عارضه‌های نورولوژیکی مختلف و بویژه تخریب اکسیداتیو آسیب پذیر است و تحت تاثیر دمیلیناسیون قرار می‌گیرد، شناخته می‌شود. مشخص شده که ۲۵ تا ۶۰ درصد بیماران مبتلا به MS، از ضایعات هیپوکامپ رنج می‌برند (۲۱).

در این مطالعه، اثر تیمار مزمن کافئین بر بهبود حافظه و یادگیری در موش صحرایی بعد از تزریق لیزولسیتین (LPC)، بررسی شد. کافئین، از اعضای خانواده متیل گزانتین‌ها می‌باشد که دارای خواص ضد التهابی است. در بسیاری از عارضه‌های تخریب عصبی از جمله بیماری‌های آلزایمر، پارکینسون و ایسکمی نشان داده شده که کافئین اثرات حفاظت عصبی اعمال می‌کند (۲۴). همچنین، این ماده می‌تواند به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های آدنوزینی، اثرات بیوشیمیایی و رفتاری متعدد و پیچیده‌ای در سیستم عصبی داشته باشد.

نتایج بدست آمده از مطالعه رفتاری در دوره اول، نشان داد که رت‌های بیمار تا ۴ روز اول بعد از تزریق LPC، در زمان کوتاه‌تری غذا را پیدا می‌کردند و در روزهای ۵ ام تا ۷ ام زمان پیدا کردن غذا افزایش یافت. در این ۷ روز، زمان پیدا کردن غذا در گروه بیمار (LPC) بصورت معنی-داری بالاتر از گروه کنترل بود، همچنین زمان یافتن غذا در گروه تحت تیمار با کافئین در تمام روزهای دوره اول، بالاتر از گروه کنترل بود و در روزهای ۵ ام تا ۷ ام تفاوت معنی‌دار، مشاهده شد که نشان می‌دهد اثر لیزولسیتین بر دمیلینه شدن هیپوکامپ و اختلال حافظه در این روزها، بیشتر بوده است. نتایج همچنین نشان می‌دهد مصرف کافئین در کوتاه مدت اثر زیادی روی ترمیم میلین ندارد اگرچه در تمام روزهای این دوره زمان یافتن غذا در گروه تیمار (LPC+CAF)، بطور معنی‌داری، پایین‌تر از گروه بیمار بود.

در دوره دوم مطالعه رفتاری که روزهای ۱۲ام تا ۱۸ام بعد از تزریق لیزولسیتین را در بر می‌گرفت، زمان پیدا کردن غذا در گروه LPC، بیشتر از دوره اول و نیز بصورت معنی‌دار، بیشتر از گروه کنترل بود. بطوریکه در این روزها، رت های بیمار به کندی در ماز شعاعی حرکت می‌کردند و به میزان زیاد وارد بازوهای تکراری و یا فاقد غذا می‌شدند و در به یاد آوردن بازوی محتوی غذا با مشکل مواجه می-شدند. این موارد نشان می‌دهد تزریق لیزولسیتین در ناحیه هیپوکامپ، دمیلینه شدن این ناحیه و بیشترین اثر تخریبی را طی این روزها را در پی داشته که می‌تواند در نتیجه فعال شدن سیستم ایمنی بدن از جمله سلول‌های T باشد که سیتوکاین‌های التهابی و گونه‌های آزاد اکسیژن را تولید می-کنند که منجر به افزایش التهاب، تخریب غلاف میلین و آپوپتوزسلول‌های عصبی می‌شود (۲۰). بدین ترتیب در نتیجه از بین رفتن غلاف میلین و مرگ نورون‌ها و سلول-های میلین‌ساز، ارتباط سیناپسی بین سلول‌های عصبی در هیپوکامپ دچار مشکل شده و اختلال حافظه و یادگیری را بدنبال داشته است.

نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های Makinodan و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطابقت دارد. آنها با استفاده از تزریق موضعی لیزولسیتین، دمیلیناسیون را در ناحیه هیپوکامپ القا کردند. مطالعات رفتاری آن‌ها نشان داد که لیزولسیتین منجر به اختلال حافظه و یادگیری فضایی رت‌ها شده است و اعلام نمودند، متعاقب تزریق LPC، اثری از بلوغ الیگودندروسیت‌ها دیده نشد که حاکی از آزاد سازی فاکتورهای التهابی و اثرات تحریکی آن‌ها روی مرگ سلولی الیگودندروسیت‌ها بود که باعث شد میلین‌سازی با تاخیر صورت گیرد (۱۸).

طی روزهای ۱۲ام تا ۱۸ام (دوره دوم) بعد از تزریق لیزولسیتین، مصرف کافئین به مدت ۱۲ تا ۱۸ روز، باعث کاهش زمان پیدا کردن غذا در گروه (LPC+CAF) در مقایسه با گروه بیمار شد. رت‌های تیمار شده در این روزها، خطای کمتری در پیدا کردن غذا در ماز شعاعی داشتند. با وجودی که در این دوره زمان پیدا کردن غذا در گروه تحت تیمار بالاتر از گروه کنترل بود، اما در روزهای ۱۶ تا ۱۸ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این موارد نشان دهنده اثر مثبت کافئین در ترمیم میلین و بهبود روند یادگیری و حافظه است و نشان می‌دهد کافئین توانسته علیه عارضه دمیلینه کننده اثر حفاظت عصبی داشته باشد.

هیپوکامپ، مجموعه‌ای از ساختارها است که بطور نزدیک با هم در کسب و بقای اطلاعات فضایی شرکت دارند و غنی از رسپتورهای آدنوزینی بخصوص A1 و A2 می‌باشند (۱۴). کافئین بسیاری از اثرات حفاظت عصبی‌اش را از طریق آنتاگونیست بودن رسپتورهای آدنوزینی و مهار آنزیم فسفودی‌استراز اعمال می‌کند. تراکم گیرنده‌های آدنوزینی در هیپوکامپ که برای حافظه و یادگیری ضروری است، زیاد می‌باشد. این گیرنده‌ها متصل به سیستم کولینرژیک می باشند. مطالعات فارماکولوژیکی نشان می‌دهند که سیستم کولینرژیک مغز در یادگیری و حافظه دخیل می‌باشد. آزاد سازی استیل‌کولین در هیپوکامپ طی یادگیری فضایی افزایش می‌یابد و این افزایش استیل‌کولین با بهبود عملکرد فرد طی یادگیری رابطه مستقیمی دارد (۸).

Angelucci و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند، کافئین، تثبیت حافظه را بعد از آموزش در موش‌های صحرایی بهبود می‌بخشد (۴). آنها اعلام کردند که فعالیت رسپتورهای آدنوزینی، بطور قوی آزاد سازی استیل کولین از نورون های پیرامیدال هیپوکامپ مهار می‌نماید. در سال ۲۰۱۰ مطالعه دیگری توسط Botton و همکاران انجام گرفت که در آن نیز تخریب نورون‌های کولینرژیک به عنوان بخشی از کاهش عملکردهای شناختی مطرح شد (۵).

بنابراین با توجه به یافته‌ها در تحقیق حاضر می‌توان بلوکه شدن رسپتورهای آدنوزینی توسط کافئین و کمک به افزایش رها سازی استیل‌کولین را مکانیسم احتمالی آن در افزایش حافظه گروه تیمار نسبت به گروه بیمار دانست.

فعالیت رسپتورهای آدنوزینی بخصوص A3، باعث مهار کردن آنزیم آدنیلیل سیکلاز می‌شود و در نتیجه ATP نمی تواند به cAMP تبدیل شود (۶). کافئین به عنوان مهارکننده قوی آنزیم فسفودی استراز شناخته شده است (۳) که علاوه بر آن، با بلوکه کردن گیرنده‌های آدنوزینی باعث افزایش cAMP درون سلولی می‌شود. cAMP با فعال کردن مسیر وابسته به پروتئین کیناز A هم اثرات ضد التهابی اعمال می‌کند و هم باعث افزایش حافظه و یادگیری می‌شود (۱). همچنین، فعالیت مسیر PKA/cAMP باعث مهار رها سازی فاکتورهای التهابی می‌شود (۱۳). بنابراین از آنجا که تزریق لیزولسیتین باعث کاهش یادگیری و حافظه در رت‌های بیمار شد، می‌توان تاثیر کافئین بر افزایش cAMP و نیز مهار فاکتورهای آپوپتوتیک را که توسط LPC فعال می‌شوند، از جمله مکانیسم‌های آن در بهبود روند یادگیری و ترمیم میلین گروه تحت تیمار دانست.

از آنجا که در اثر تزریق لیزولسیتین سلول‌های عصبی از بین می‌روند و روند یادگیری مختل می‌شود. بنابراین، نیاز به سلول‌های زایا می‌باشد تا جایگزینی برای سلول‌های از دست رفته ایجاد کنند. سلول‌های زایا در منطقه تحت بطنی (SVZ) و در میان دیواره بطن‌های جانبی می‌باشند که طی نوروژنز تکثیر یافته و به سایر نواحی مهاجرت می‌کنند و به انواع سلول‌های عصبی اختصاصی در مدارهای نورونی تثبیت شده متمایز می‌شوند. نوروژنز در جنبه‌های مربوط به یادگیری و انواع حافظه دخالت دارد. کافئین می‌تواند با کمک به روند تکثیر و تمایز سلول‌های زایا باعث افزایش سرعت نوروژنز شود (۳۳). بنابراین این ماده متیل گزانتینی به این دلیل می‌تواند هوشیاری و حافظه را افزایش دهد و اجرای رفتارهای نیازمند به دقت و توجه را بهبود بخشد.

در پژوهش حاضر، در دوره سوم تست رفتاری، زمان یافتن غذا در گروه بیمار، در تمام روزهای دوره سوم بصورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود و موش‌های صحرایی در یافتن غذا دچار خطا می‌شدند. مصرف کافئین در گروه تحت تیمار به مدت ۲۲ تا ۲۸ روز، زمان یافتن غذا را در ماز شعاعی بطور معنی‌داری نسبت به گروه بیمار، کاهش داد. همچنین با وجودی که زمان یافتن غذا در گروه (LPC+CAF) بالاتر از گروه کنترل بود اما تفاوت معنی-داری وجود نداشت. در این روزها، موش‌های تحت تیمار به ندرت وارد بازوهای فاقد غذا می‌شدند و در زمان بسیار کوتاهی در مقایسه با دوره دیگر غذا را پیدا می‌کردند. این موارد نشان می‌دهد که تیمار مزمن کافئین اثرات حفاظتی در مقابل دمیلینه شدن سلول‌های عصبی دارد و باعث بهبود روند حافظه فضایی و یادگیری وابسته به آسیب هیپوکامپ می باشد.

نتایج بدست آمده از این مطالعه با نتایج رفتاری Alhaider در زمینه اثر تیمار مزمن کافئین، مطابقت دارد. در سال ۲۰۱۰، مطالعه ای توسط Alhaider انجام شد که در آن، رت‌ها کافئین را با دوز ۳۰ mg/kg به مدت ۴ هفته دریافت کردند. مطالعه رفتاری آنها نشان داد رت‌های تیمار با کافئین که محرومیت از خواب داشتند، در سرعت یکسانی با گروه کنترل یاد می‌گرفتند در حالیکه رت‌های دچار محرومیت از خواب که کافئینی دریافت نکرده بودند به طور معناداری در ترایل‌های بعد از آموزش دچار خطا و اشتباه می‌شدند که نشان از اثر کافئین در بهبود حافظه و یادگیری فضایی بود (۳). وقایع پاتولوژیکی مثل استرس اکسیداتیو منجر به تولید بالای رادیکال‌های آزاد می‌شود که بطور معنی‌داری عملکردهای شناختی و یادگیری را کاهش می‌دهد (۲). طبق مطالعات، مصرف روزانه کافئین به دلیل اثرات حفاظتی‌اش روی سیستم آنتی‌اکسیدانتی داخلی بدن که موجب افزایش گلوتاتیون می‌شود می‌تواند اثرات سودمندی روی حافظه و یادگیری داشته باشد (۲). نشان داده شده که کافئین، غشا سلول‌های عصبی بخصوص در هیپوکامپ و قشر مغز را از استرس اکسیداتیو توسط توانایی آنتی‌اکسیدانتی‌اش حفاظت می‌کند (۱۵).

لیزولسیتین می‌تواند باعث آپوپتوزالیگودندروسیت‌ها شود. این سلول‌های گلیال به استرس اکسیداتیو حساس بوده و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی پایینی دارند. کافئین، احتمالاً با اعمال اثرات آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند مانع از آپوپتوز بیشتر سلول های عصبی شود و با مهار استرس اکسیداتیو و اختلال سیستم کولینرژیک و نیز اثرات ضد التهابی نقش مهمی در بهبود حافظه داشته باشد. هیپوکامپ به طور قوی در هر دو حافظه فضایی و مرجع نقش دارد. حافظه فضایی توسط نقص‌های گیرنده‌های NMDA نیز مختل می‌شود (۲۲).

در شرایط عادی، گلوتامات به عنوان یک نوروترانسمیتر خروجی در سیستم عصبی مرکزی عمل می کند و نقش مهمی درانتقال سیناپسی بر عهده دارد و باعث افزایش LTP (پتانسیل طولانی مدت) و در نتیجه افزایش حافظه می‌شود (۲۲). ثابت شده است که آدنوزین در هیپوکامپ، اثر مهاری روی LTP دارد (۲۶) و رهاسازی نوروترانسمیترخروجی مثل گلوتامات را از انتهاهای عصبی مهار می‌کند. بدین ترتیب آدنوزین پروسه‌های یادگیری و حافظه را در سطح سیناپسی مختل می‌کند. به علاوه، آدنوزین از طریق فعال کردن رسپتورهای آدنوزینی بخصوص A1 و A2، انعطاف‌پذیری سیناپسی در هیپوکامپ را مختل می‌کند (۳). غیرفعال کردن رسپتورهای آدنوزینی، نشان داده که نقص‌های شناختی و حافظه‌ای را می‌تواند خنثی کند (۲۵). بدین نحو، کافئین می‌تواند با بلوکه کردن رسپتورهای آدنوزینی باعث افزایش رها سازی نوروترانسمیتر گلوتامات و در نتیجه افزایش پتانسیل طولانی مدت شود. نتیجه گرفته می‌شود که کافئین با اعمال اثرات ضد التهابی و ضد آپوپتوتیک همراه با افزایش نوروژنز و رها سازی نوروترانسمیترهای دخیل در افزایش حافظه، باعث مهار اثرات ایجاد شده با لیزولسیتین و

هدایت صحیح پیام‌های الکتریکی شود که این موارد افزایش حافظه و یادگیری را بدنبال دارد. بنابراین کافئین، می تواند به عنوان یک ماده موثر در بهبود عارضه های دمیلینه کننده پیشنهاد شود.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه ارومیه به انجام رسیده است. بدین وسیله از مساعدت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Aandahl, E. M., Moretto, W. J., Haslett, P. A., Vang, T., Bryn, T., Tasken, K., and et al, editors, 2002. Inhibition of antigen-specific, T., cell proliferation and cytokine production by protein kinase a type 1, J Immunol. 169, PP: 802−808.

2. Abreu, R. V., Silva-Oliveira, E. M., Morales, M. F, Pereira, G. S, and Moraes-Santos, T., 2011. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and Antioxidant system of rat brains, Pharmacol Biochem Behav. 99, PP: 659-664.

3.Alhaider, A., Aleisa, A. M., Tran, T. T., Alzoubi, K. H., and Alkhadi, K. A., 2010. Chronic Caffeine treatment prevents sleep deprivation-induced impairment of cognitive function and synaptic plasticity, Sleep. 33, PP: 437-444.

4. Angelucci, M., Cesario, C., Hiroi, R. H., Rosalen, P. L., and Da Cunha, C., 2002. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze, Braz J Med Biol Res. 35, PP: 1201-1208.

5. Botton, P. H., Costa, M. S., Ardais, A. P., and Mioranz, O., 2010. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult miceul, Behav Brain Res. 214, PP: 254-259.

6. Dixon, A. K., Gubitz, A. K., Sirinathsinghji, D. J., Richardson, P. J., and Freeman, T. C., 1996. Tissue Distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat, Br J Pharmacol. 118, PP: 1461-1468.

7. Dubreuil, D., Tixier, C., Dutrieux, G., and Edeline, J. M., 2003. Does the radial arm maze necessarily test spatial memory, Neurobiol Learn Mem. 79, PP: 109-117.

8. Fadda, P., Robinson, L., Pertwee, R. G., and Riedel, G., 2006. Scopolamine and MK801-inducrd working memory deficits in rats are not reversed by CBD-rich cannabis extracts, Behav Brain Res. 168, PP:307-11.

9. Frederic, T. J., and Miller, S. D., 2006. Future of multiple sclerosis therapy: combining antigen-specific immunotherapy with strategies to promote myelin repair, Future Neurol. 1, PP: 489-503.

10. Holmoy, T., and Hestvik, I. L., 2008. Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause, Curr Opin Infect Dis. 21, PP: 271-8.

11. Horrigan, L. A., Kelly, J. A., and Conno, T. J., 2006. Immunomodulatory effects of caffeine: Friend or foe? Pharmacol Ther. 111, PP: 877–892.

12. Horrigan, L. A., Kelly, J. P., and Connor, T. J., 2005. Caffeine and its major metabolite paraxanthine suppress human lymphocyte function, Ir J Med Sci. 174, PP: 26-42.

13. Horrigan, L. A., Kelly, J. P., and Connor, T. J., 2004. Caffeine suppresses TNF alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase, A., pathway, Int Immuno pharmacol. 4, PP: 1409−1417.

14. Jarrard, L. E., 1993. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat, Behav Neural Biol. 60, PP: 9–26.

15. Jaya, R. P., Dasari, B., Marwarha, G., Larson, T., Chen, X., and Geiger, G., 2010. Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched die, Biol Med. 49, PP: 1212-122.

16. Keegan, B. M., and Noseworthy, J. H., 2002. Multiple sclerosis, Annu Rev Med. 53, PP: 285-302.

17. Lynch, M. A., 2004. Long-term potentiation and memory, Physiol Rev. 84, PP: 87-136.

18. Makinodan, M., and Tatsumi, K., 2008. Lysophosphatidyl choline induces delayed myelination in the juvenile ventral hippocampus and behavioral alterations in adul, Neurochem Int. 53, PP: 374–38.

19. McMohon, E., 2005. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse modeles of multiple sclerosis, Nat Med. 11, PP: 335-9.

20. Mozafari, S., Javan, M., Sherafat, M. A., Mirnajafi-zade, J.,Heibatollahi, M., and Pour-Beiranvand, S., 2011. Analysis of Structural and Molecular Events Associated multiple sclerosis, J., Clin Invest. 116, PP: 905–91.

21. Nakafuku, M., Nakatomi, H., and Kuriu, T., 2002. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors, Cell. 110, PP: 429–44.

22. Niewoehner, B., Single, F. N, and Hvalby, Q., 2007. Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus, Eur, J., Neurosci. 25, PP: 837-846.

23. Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, D. G., 2000. Multiple sclerosis, Science. 22, PP: 117-39.

24. Prediger, R., 2010. Effects of Caffeine in Parkinson's Disease: From Neuroprotection to the Management of Motor and Non-Motor Symptoms, J AD Dis. PP: 20, 205-220.

25. Rahman, A., 2009. The role of adenosine in Alzheimer's disease. Cur Neuropharmacol. 7, PP: 207-216.

26- Ribeiro J. A, Sebastiao A. M. (2010). Caffeine and adenosine. J AD Dis. 20: 3-15.

27. Rosati, G., 2001.The relevance of multiple sclerosis in the world, an update neurolSci. 22, PP: 117-34.

28. Salzer, J. L., 2003. Polarized domains of myelinated axons, Neuron. 40, PP: 297–318.

29. Shivane, A. G, and Chakrabarty, A., 2007. Multiple sclerosis and demyelination, Curr Diagnos Pathol. 13, PP: 193–202.

30. Smith, A., Brice, C., Nash, J., Rich, N., and Nutt, D. J., 2003. Caffeine and central noradrenaline: effects on mood, cognitive performance, eye movements and cardiovascular function, J., Psychopharmacol. 17, PP: 283–92.

31. Tomassini, V., and Pozzilli, C., 2009. Sex hormones, brain damage and clinical course of multiple sclerosis, J., Neurol Sci. 286, PP: 35–39.

32. Vela, J. M., Molina-Holgado, E., Arevalo-Martin, A., Almazan, G., and Guaza, C., 2002. Interleukin-1 regulates proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells, Mol Cell Neurosci. 20, PP: 489–502.

33- Wentz, C.T., Magavi, S.P. (2009). Caffeine alters proliferation of neuronal precursors in the adult hippocampus, Neuropharmacol, 56, 994-1000.

The effect of caffeine on learning and memory following demyelination induction by lysolecithin in male rats

Dasht bozorgi N. and Khezri Sh.

Biology Dept., Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Caffeine is an adenosine receptor antagonist that has neuroprotective effect. The aim of this study is investigation of the caffeine effect on learning and memory impairment following intrahippocampal lysolecithin injection. Animals were divided into 3 groups, control, suffering group that 2µl lysolecithin was injected into their DG area of hippocampus for demyelination induction and treatment group which received 30 mg/kg.i.p caffeine for 28 days after demyelination induction by lysolecithin. Subsequently, Behavioral study was performed by using Radial Arm Maze into 3 periods. Lysolecithin was caused impairment of learning and spatial memory in rats. This impairment was noticeable on days 5th to 28th. Caffeine injection for 14 and 28 days recovered learning and memory. The results of this study suggest that the chronic treatment with caffeine can improve memory in neurological disorders following demyelination.

Key words: Lysolecithin, Caffeine, Hippocampus, Memory, Rat