

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “CAROL DAVILA” BUCUREȘTI

DEPARTAMENTUL ȘTIINȚE FUNCȚIONALE

DISCIPLINA FIZIOLOGIE ȘI NEUROȘTIINȚE FUNDAMENTALE

Teză de doctorat

MODIFICĂRI NEURO-COMPORTAMENTALE ÎN DIABETUL ZAHARAT

Conducător științific: Prof. univ. Leon Zăgrean

Doctorand: Silvia – Valentina – Iustina Bădescu



BUCUREȘTI, 2016

Incidența și prevalența diabetului zaharat la nivel mondial și în România

Diabetul zaharat și hiperglicemia sunt cauze importante de morbiditate și mortalitate la nivel mondial. Conform Federației Internaționale de Diabet (IDF): "diabetul reprezintă una dintre urgențele majore ale sănătății secolului 21 în întreaga lume" ¹. În 2015 prevalența diabetului la nivel mondial era de una din 11 persoane adulte, iar prevalența estimată a toleranței alterate la glucoză era de unul din 15 adulți. Aceste estimări sunt așteptate să crească, mai ales în populația urbană. Acest creșteri vor produce dificultăți atât medicale cât și economice, în condițiile în care deja 12% din cheltuielile globale din sănătate sunt acordate diabetului. Ca predicție, în 2040 se consideră că va exista o creștere cu 55% a prevalenței diabetului față de 2015 ¹. Complicațiile apărute la nivel micro și macrovascular asociază o mortalitate ridicată, a cărei tendință a fost în continuă creștere în ultima decadă. IDF estimează mortalitatea din 2015 la 5 milioane de persoane ¹.

Un studiu recent realizat asupra populației între 20 și 70 de ani din România arată că diabetul este una din problemele majore de sănătate din sistemul nostru medical, având o prevalență a diabetului de 11.6% și a prediabetului de 16.5% ².

DZ tip 2 reprezintă patologia cea mai frecventă, iar incidența sa este în creștere datorită schimbărilor la nivel social și cultural, cum ar fi îmbătrânirea populației, dezvoltarea economică și creșterea gradului de urbanism, diete nesănătoase și activitate fizică scăzută. În țările dezvoltate 91% din pacienții diabetici au diabet zaharat tip 2. DZ de tip 1 reprezintă patologia cronică cea mai frecventă la copii, în 2015 numărul copiilor cu această afecțiune a depășit jumătate de milion ¹, dar tendințele sunt de creștere a prevalenței DZ tip 2 la copii și adolescenți ³.

Depresia și anxietatea în diabetul zaharat

Depresia reprezintă o afecțiune frecventă și gravă, având o de-a lungul vieții unei persoane o prevalență ce variază între 11% în țările cu venituri mici și până la 15% în țările cu venituri mari ⁴. Riscul de a dezvolta o problemă de sănătate mentală de-a lungul unei vieți este de 50%, ceea ce are ca rezultat scăderea ratei de angajare, a productivității și a salariului ⁵. Depresia și anxietatea reprezintă a 4-a cauză, în timp ce diabetul este a 8-a cauză de "ani de viață ajustați cu invaliditate" (disability adjusted life years - DALYS) în țările dezvoltate ⁶.

Există dovezi ale unei prevalențe moderat crescute a depresiei la pacienții prediabetici și la cei cu diabet încă nediagnosticat, și a unei prevalențe foarte crescute la pacienții deja diagnosticați cu diabet, comparativ cu cei ce au un metabolism normal al glucozei ⁷. Ratele de prevalență ale depresiei pot fi chiar de trei ori mai mari la pacienții cu DZ tip 1 și de două ori mai mari la cei cu DZ tip 2 față de restul populației ⁸.

Anxietatea apare la 40% dintre pacienții cu DZ tip 1 sau 2 ⁹. Prezența depresiei și anxietății la diabetici, înrăutățește prognosticul diabetului, augumentând non-compliancea la tratament ¹⁰, scăzând calitatea vieții ¹¹ și crescând mortalitatea ¹².

De asemenea, prezența depresiei poate fi ea însăși un factor de risc, crescând cu 60% șansa de a dezvolta diabet tip 2 ¹³. Se pare că există un mecanism de asociere bidirecțională între diabet și depresie, o relație complexă care probabil împărtășește mecanisme biologice a căror înțelegere ar putea să ofere un tratament mai bun și să amelioreze rezultatele din aceste afecțiuni ^{14;15}.

Procesele cognitive și memoria în diabetul zaharat

Atât DZ tip 1, cât și DZ tip 2 au fost asociate cu scăderea performanțelor cognitive și cu apariția unor modificări structurale la nivelul creierului. DZ tip 2 a fost asociat cu o creștere de 50% a riscului de demență^{16;17}. Într-o populație al cărei procent de îmbătrânire este în creștere și în condițiile unei creșteri a prevalenței DZ, complicațiile DZ asupra SNC se estimează să crească. Durata DZ și controlul glicemic pot avea roluri importante în apariția alterărilor cognitive, dar mecanismul fiziopatologic rămâne încă puțin cunoscut^{16;17}. Devine important să înțelegem mecanismele acestei asocieri, astfel încât să putem preveni alterările cognitive, să creștem calitatea vieții pacientului și să scădem cheltuielile sistemului de sănătate.

În ceea ce privește DZ tip 1, există studii care au urmărit modificări ale testelor cognitive la pacienți între momentul înrolării în studiu (la o vârstă medie de 27 de ani) și 18 ani mai târziu. Rezultatele au arătat că pacienții al căror control metabolic a fost mai slab ($Hb A1c > 8.8\%$) au avut un declin moderat al vitezei de transmitere motorii și a eficienței psihomotorii comparativ cu diabeticii mai bine controlați ($Hb A1c < 7.4\%$)¹⁸. De asemenea, complicațiile microvasculare – cum sunt neuropatia și retinopatia – au fost asociate declinului cognitiv la pacienții cu DZ tip 1¹⁹.

Studiile asupra pacienților cu DZ tip 2 au arătat că aceștia au rezultate mai slabe decât subiecții din grupul de control în ceea ce privește diverse domenii ale cogniției, cum ar fi: viteza de procesare a informațiilor, memoria, capacitatea de atenție și funcția executivă²⁰. Afectarea funcției cognitive în DZ tip 2 a fost asociată cu creșterea duratei diabetului și cu un control glicemic deficitar²¹. Într-un studiu²² care a urmărit 3000 de pacienți cu DZ tip 2 pentru a determina dacă controlul glicemic influențează funcția cognitivă în timp, pacienții au fost împărțiți aleator în două grupuri: unul cu un control glicemic strict ($Hb A1c < 6\%$), celălalt grup cu un control glicemic standard ($Hb A1c$ între 7 - 7.9%). Concluzia studiului a fost că există o relație invers proporțională între funcția cognitivă și controlul glicemic, măsurat ca $Hb A1c$. Alt studiu a constatat că în ceea ce privește DZ tip 2, diminuarea funcției cognitive la acești pacienți se asociază cu comorbidități ca hipertensiunea arterială, dislipidemia și depresia²³.

Diabetul zaharat a fost corelat și cu demența din boala Alzheimer sau alte boli vasculare^{24;25}. Un studiu pe 20 de ani, arată că diabetul apărut la adult asociază un risc de declin cognitiv cu 19% mai mare față de subiecții nediabetici²⁵. Alt studiu a arătat că DZ tip 2, crește de două ori riscul de demență²⁴.

În cele din urmă, gradul în care diabetul afectează structura și funcționalitatea cerebrală rămâne neclar, dar apariția și progresia deficitelor de memorie au fost puternic corelate cu aceste modificări.

Retinopatia și neuropatia retiniană diabetică

Latența de apariție a retinopatiei diabetice la 10-30 de ani după debutul diabetului și recunoașterea modificărilor neuronale timpurii prin electrofiziologie a dus recent la nevoia unei reevaluări a proceselor care produc leziunile vasculare și pierderea vederii la persoanele diabetice. Astăzi se consideră că perioada de latență înainte de apariția vasculopatiei retiniene din diabet este, de fapt, o perioadă caracterizată de modificări active de tip neurodegenerativ la nivelul retinei care au început să apară la scurt timp de la instalarea diabetului²⁶. Multe dintre modificările neuronilor de la nivelul retinei și ale celulelor gliale preced apariția modificărilor

retiniene observate oftalmoscopic în diabet cu ani sau chiar decade, și definesc **neuropatia retiniană diabetică**. Acest nume ajută în diferențierea față de modificările care apar mai târziu și sunt recunoscute ca afectare vasculară retiniană în diabet, cum ar fi: pierderea intergității barierei hemoretiniene, ocluzii retiniene microvasculare și modificări retiniene ischemice ²⁶. Depistarea neuropatiei retiniene diabetice și inițierea unui tratament ar putea îmbunătății prognosticul vizual la pacienții diabetici pe termen lung.

Cafeina – generalități

De mai mult de 100 de ani, consumul de cafeină (1,3,7 - trimetilxantina) a fost un subiect controversat și mereu de actualitate. Se pare că mai mult de 80% din populație consumă cafeină zilnic, sub o formă sau alta, ceea ce o face să fie cea mai consumată substanță psihostimulatoare din lume ²⁷. Cafeina se găsește în multe produse (cafea, băuturi răcoritoare sau ceai, mâncare, suplimente alimentare, medicamente), dar cel mai frecvent, 75%, consumul ei provine din cafea. Este consumată în special pentru proprietățile psihoactive și stimulante, indivizii ajustându-și singuri conșmul de cafeină pentru a obține efectele dorite și a evita efectele adverse ²⁷.

Cafeina este consumată în doze moderate, având în populația SUA o estimare de aproximativ 180 mg/zi ²⁸. Consumul depinde de mulți factori, cum ar fi vârsta, sexul, mediul social, statusul nutrițional, personalitatea, gradul de cultură și nivelul de obișnuință. De asemenea, studii pe gemeni au arătat că variația genetică interindividuală este implicată în consumul de cafeină și influențează modul în care sunt percepute efectele cafeinei. A fost găsită o puternică corelație ereditară, între 30% și 77%, a comportamentelor ce țin de consumul cafeinei ²⁹.

Dintre motivele pentru care consumul cafeinei este atât de mare, un studiu din 2015 a găsit următoarele răspunsuri: sentimentul de trezire –"awakefulness"- (77%), gust (66%), aspecte sociale (38%), îmbunătățirea capacității de concentrare (30%), energizant fizic (26%), îmbunătățirea dispoziției (18%) și reducerea stresului (9%) ³⁰.

La doze fiziologice cafeina își realizează acțiunile asupra SNC prin antagonismul direct sau indirect al receptorilor de adenzină, deși la doze foarte mari cafeina poate fi un inhibitor neselectiv de fosfodiesterază ³¹. Adenzina este un neuromodulator în SNC, cu proprietăți de tip sedativ. Au fost identificate patru subtipuri (A1, A2A, A2B, A3) de receptori de adenzină cuplați cu proteine G. Deși contribuția fiecărui tip nu a fost stabilită cu exactitate, la nivel cerebral receptori A1 și A2A sunt responsabili pentru efectele neuro-comportamentale ale cafeinei ³².

Receptori de adenzină A1 sunt localizați în toate zonele creierului, având o densitate mai mare în hipocamp, cortex cerebelos și cerebral, și în anumiți nuclei talamici ³³. La nivelul nucleului accumbens și nucleului caudat - putamen găsindu-se în număr moderat.

Receptori de adenzină A2A sunt concentrați în zonele bogate în dopamină ale creierului: corpul striat, nucleul accumbens și tuberculii olfactivi ³⁴. Alte zone în care s-au evidențiat concentrații medii de receptori A2A sunt cortexul, amigdala, hipocampus, hipotalamusul, talamusul și cerebelul ³⁵.

1. Scopul lucrării

DZ este una dintre patologiiile cele mai frecvente atât în România, cât și în lume, asociind un număr mare de complicații. Modificările de comportament asociate DZ au fost mai puțin studiate și recunoscute ca o comorbiditate, deși prezența lor poate scădea semnificativ calitatea vieții pacientului diabetic și chiar aderența la tratament. În același timp, cafeina este substanța cu proprietăți psihoactive cea mai folosită la nivel mondial.

Lucrarea reprezintă un studiu pe animale de laborator (șobolani adulți Wistar cărora li s-a indus DZ), care a încercat să urmărească câteva aspecte ale comportamentului în DZ și afectarea nervoasă centrală care poate surveni în această afecțiune. De asemenea, am evaluat efectele administrării cronice de cafeină, într-un model care a încercat să se apropie cât mai mult de consumul uman. Pentru aceasta am împărțit experimentele urmărind trei direcții:

1. comportamentul locomotor;
2. comportamentul anxios, depresiv și cognitiv (memoria de scurtă, respectiv lungă durată);
3. neuropatia diabetică centrală (modificările potențialelor evocate vizuale).

Lucrarea de față este una din puținele care studiază efectele neuro-comportamentale ale administrării cronice de cafeină în DZ. Ea constituie unul dintre primii pași pentru înțelegerea modificărilor neuro-comportamentale în DZ și al efectelor cafeinei în această patologie.

Studiul doctoral s-a desfășurat în perioada 2012-2016 în cadrul Disciplinei de Fiziologie și Neuroștiințe Fundamentale de la Universitatea de Medicină și Farmacie "Carol Davila" București. S-a folosit numărul minim de animale necesar, acestea provenind din biobaza Universității.

Această lucrare a fost parțial sprijinită de către Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane (POSDRU), finanțat din Fondul Social European și de către Guvernul României prin contractul nr. POSDRU 141531. O parte din studiu a fost finanțată printr-o bursă doctorală de cercetare în cadrul Proiectului "Tineri Cercetători", numărul 28482/2012.

2. Efectele cafeinei asupra activității locomotorii la șobolanii cu diabet indus de streptozotocină

2.1 Scopul studiului

DZ este una dintre cele mai răspândite boli ale sec. XXI, cu o incidență în continuă creștere, care afectează întreaga populație umană. În momentul acesta se consideră că un adult din 11 are DZ¹. DZ se manifestă prin hiperglicemie cauzată de deficitul de insulină sau / și de rezistența crescută a receptorilor specifici la acțiunea insulinei. Pe lângă statusul hiperglicemic, diabetul produce modificări structurale în creier³⁶, iar pacienții prezintă variate consecințe neurologice, cum ar fi neuropatia periferică și creșterea riscului de demență³⁷. La pacienții cu boală Parkinson, DZ induce agravarea patologiei³⁸ și poate fi implicat în apariția instabilității posturale și dificultatea mersului³⁹. De asemenea, DZ exacerbează atrofia cerebrală și declinul funcțiilor cognitive la acești pacienți⁴⁰.

Necesitatea de a dezvolta noi strategii în combaterea disfuncțiilor locomotorii a adus în atenție cafeina – cea mai folosită substanță psihoactivă la nivel mondial. Cafeina acționează prin blocarea receptorilor adenosinici A1 și A2A. Adenozina este implicată în funcțiile locomotorii

⁴¹. Receptorii A1 sunt co-localizați cu receptorii dopaminergici D1, iar receptorii A2A sunt co-localizați și comunică cu receptorii dopaminergici D2 ⁴². Cafeina poate avea valoare terapeutică datorită capacității sale de a interacționa cu receptorii dopaminergici, modificând transmiterea semnalului la neuronii striati. De asemenea, s-a sugerat că acționează ca agent neuroprotector prin compensarea efectelor datorate pierderii neuronilor dopaminergici ⁴³. Cafeina are un efect bifazic: în doze mici crește activitatea locomotorie ⁴¹, în timp ce dozele mari produc disfuncționalitate neuromotorie la rozătoare ⁴⁴.

Scopul acestui studiu a fost să investigheze legătura dintre DZ și activitatea locomotorie la animale de laborator cu DZ indus de streptozotocină și posibilele efecte ale cafeinei în această situație.

2.2 Materiale și metode

Experimentele s-au efectuat folosind șobolani masculi Wistar albino, cu greutate 300-350 g la începutul experimentului, ajunși la vârsta de 3-4 luni. Toate animalele au fost ținute în condiții standard de iluminare (cicluri de 12 ore lumina /intuneric), în cuști transparente de plastic, la o temperatură constantă de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, având acces liber la hrană și apă. Animalele au fost furnizate de biobaza Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila", București. Toate procedurile asupra animalelor au fost efectuate cu aprobarea Comitetului local de Etică, în acord cu Directiva 86/609/EEC a Consiliului European privind protecția animalelor folosite în scop științific.

2.2.1 Inducerea Diabetului

Pentru inducerea diabetului am folosit unul dintre modelele animale cu diabet zaharat care se obține prin administrarea streptozotocinei, aceasta având un efect distructiv asupra celulelor Beta-pancreatice, mimând diabetul tip 1 ⁴⁵.

Diabetul a fost indus printr-o singură injecție intraperitoneală cu streptozotocină (STZ – Sigma Aldrich) în doză de 50mg/kg corp, diluată în soluție salină 0,9%. Șobolani de aceeași vârstă din grupul control au fost injectați cu echivalent de soluție salină 0,9%. Eșantioane de sânge din vena cozii au fost recoltate la 7 zile după injectarea STZ / soluției saline. Șobolani cu o glicemie > 250 mg/dl au fost considerați diabetici și incluși în studiu. Șobolani cu glicemia >600 mg/dl au fost eliminați datorită unei afectări biologice marcante, cu potențial de viață scăzut, care nu ar asigura supraviețuirea pe termen lung. În final 19 animale au fost incluse în studiu: 9 în grupul de control și 10 în grupul cu DZ.

2.2.2 Administrarea Cafeinei

Cafeina (1,3,7-trimetilxantină) a fost administrată oral timp de 2 săptămâni, dizolvată în apă (20mg/kg corp/zi). Administrarea a început în ziua următoare celei în care am realizat ultimul test de comportament, la ambele grupe de animale, fiind administrată cronic în grupul cu DZ (N=5) și în grupul de control (N=5).

2.2.3 Open field test

La șase săptămâni după injectarea streptozotocinei, activitatea locomotorie a șobolanilor a fost evaluată cu testul "Open Field" (OFT), urmărind metodologia descrisă în "Current Protocols in Neuroscience, 2003". Animalele au fost aduse cu o săptămână înainte de teste în

camera de studiu pentru acomodare. Toate testările au fost făcute în același interval orar, între 8:00 - 12:00 și între 14:00 – 17:00, pentru a reduce modificările induse de ritmul circadian. Toate testele de comportament au fost repetate după 2 săptămâni de administrare zilnică a cafeinei.

Pentru a efectua OFT, animalul a fost plasat 10 minute într-o incintă (40 X 40 cm, cu pereți de 40 cm înălțime) supravegheată cu o cameră video plasată deasupra ei. Activitatea motorie a fost evaluată măsurând distanța totală parcursă de animal (cm), timpul de mișcare (s), viteza (cm/s), timpul petrecut în zona centrală a arenei (definită ca aria delimitată virtual la 10 cm de fiecare perete) și numărul de intrări în aria centrală. Suprafețele arenei au fost negre pentru a permite identificarea automată a animalului prin contrastul alb-negru.

A fost folosit sistemul de urmărire și înregistrare video “Noldus Ethovision XT 5” pentru achiziția datelor și analiza automată a comportamentului, respectiv a mișcării animalului. Rezultatele au fost analizate folosind SPSS 22.0.

2.3 Rezultate

După o săptămână de la administrarea STZ, nivelul mediu al glicemiei a crescut la 455.50 ± 90.30 mg/dl, de la 101.35 ± 6.20 mg/dl ($p < 0.001$). După 6 săptămâni de la STZ, șobolanii din grupul cu DZ au avut o glicemie medie de 517.40 ± 76.96 mg/dl. Cafeina nu a modificat valorile glicemiei după 2 săptămâni de administrare zilnică: glicemia medie la șobolanii diabetici tratați cu cafeină a fost 523.30 ± 75.71 mg/dl. La lotul de control, valorile glicemice nu au diferit: 103.60 ± 8.77 mg/dl la o săptămână după administrarea soluției saline și 102 ± 5.63 mg/dl după 6 săptămâni. După 2 săptămâni de administrare zilnică a cafeinei valoarea medie a glicemiei a fost 99.60 ± 7.65 mg/dl în lotul control.

La testul Open Field am comparat distanța totală parcursă, timpul de mobilitate, timpul petrecut de animal în centru și numărul de intrări în aria centrală. Am constatat o reducere semnificativă a perioadei de mobilitate și a distanței totale parcurse, între grupul cu DZ și grupul de control. Șobolanii din grupul de control au petrecut mai mult timp mișcându-se decât cei diabetici ($n_1=9$, $n_2=10$, timpul mediu de mișcare la grupul de control = 179.96 ± 78.28 s, timpul mediu de mișcare la grupul diabetic = 93.90 ± 45.29 s, $t(17)=2.975$, $p=0.008$, $95\%CI=[25.023, 147.097s]$) și au parcurs o distanță mult mai mare ($n_1=9$, $n_2=10$, distanța totală parcursă la grupul control = 1244.11 ± 423.86 cm, distanța totală parcursă la grupul diabetic = 743.96 ± 264.39 cm, $t(17)=3.122$, $p=0.006$, $95\%CI=[162.17, 838.12cm]$).

Nu au existat diferențe între numărul de intrări în aria centrală ($Z=53.5$, $n_1=9$, $n_2=10$, $p=0.497$) sau în durata de timp petrecută în centrul arenei OFT ($Z=50.5$, $n_1=9$, $n_2=10$, $p=0.661$) între grupul control și cel diabetic.

Timpul de imobilitate al șobolanilor diabetici a fost semnificativ mai mare decât a celor din grupul control ($n_1=9$, $n_2=10$, timpul mediu de imobilitate la grupul de control = 421.21 ± 79.69 s, timpul mediu de imobilitate la grupul diabetic = 506.46 ± 45.06 s, $p=0.009$).

În ceea ce privește numărul defecațiilor, șobolanii diabetici au avut mai multe defecații decât grupul control (numărul mediu de defecații în grupul control = 2, IQR=1, numărul mediu de defecații în grupul diabetic = 5, IQR=2, $Z=11.5$, $n_1=10$, $n_2=9$, $p=0.004$).

După administrarea cafeinei, șobolanii din grupul de control au fost mai puțin mobili decât înainte ($Z=-2.023$, $n=5$, $p=0.043$, timpul mediu de mișcare înainte de cafeină = 156.48 s, IQR=67.16 s, iar după cafeină = 62.8 s, IQR=60.56 s), remarcându-se și o reducere a distanței totale parcurse (Fig 1). Nu au fost observate diferențe între parametrii măsurați la grupul diabetic înainte și după administrarea cafeinei. Totuși, după administrarea cafeinei nu au mai apărut diferențe privind mobilitatea și distanța parcursă între grupul diabetic și cel de control (Fig 1).

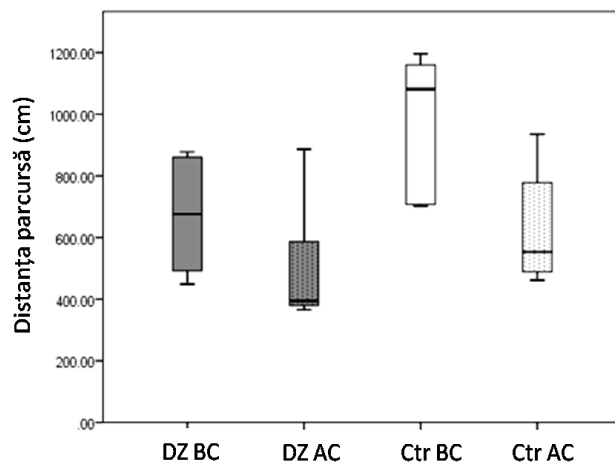


Fig 1. Boxplot al distanței totale parcurse (cm) la OFT în fiecare grup, înainte și după

administrarea cafeinei. Șobolanii din grupul de control s-au mișcat mai puțin după administrarea cafeinei decât înainte ($Z = -1.753$, $n=5$, $p=0.04$ (one-tailed), distanța medie parcursă înainte de administrarea de cafeină = 1081.21 cm, IQR = 472.81, distanța medie parcursă după administrarea de cafeină = 553.42, IQR=381.72). La șobolanii diabetici distanța parcursă nu s-a schimbat înainte și după administrarea cafeinei ($Z = -0.944$, $n=5$, $p=0.19$, distanța medie parcursă înainte de administrarea de cafeină = 675.72 cm, IQR=398.76, distanța medie parcursă după administrarea de cafeină=393.99cm, IQR=364.15).

2.4 Discuții

În prezentul studiu am investigat activitatea locomotorie la șobolanii adulți Wistar cu diabet zaharat și influența cafeinei în doză moderată administrată cronic asupra acestora. Rezultatele studiului arată că diabetul zaharat descrește activitatea locomotorie, iar expunerea cronică la cafeină afectează activitatea locomotorie la șobolanii din grupul control, dar nu și la cei diabetici.

Evaluarea activității locomotorii se face frecvent folosind testul “open field”^{44;46}. În timp ce majoritatea experimentelor pe rozătoare au folosit cafeina în administrare acută, noi am administrat-o cronic pentru a ne apropia mai mult de modelul uman de consum. Oamenii consumă cafeină în mod cronic, divizat de-a lungul zilei⁴⁷. Datorită diferențelor în metabolizarea cafeinei între oameni și șobolani, o doză de 10mg/kg corp administrată la șobolani este comparabilă cu aproximativ 250 mg cafeină la o persoană de 70kg – reprezentând 2-3 cești de cafea pe zi⁴⁷. Noi am folosit o doză moderată de cafeină, comparabilă cu consumul uman, măsurat de Frary și colab. la 160 – 336 mg/zi la adulții din SUA⁴⁸.

Studiile asupra activității locomotorii după administrarea cafeinei au remarcat un efect bifazic în relație cu mărimea dozei. La rozătoarele adulte, după administrarea unor doze mici-medii, cafeina a crescut activitatea locomotorie⁴¹, în timp ce după doze mari activitatea locomotorie a fost diminuată⁴⁴. Mai mult, Marin și colab. au arătat că există diferențe produse nu doar de doza administrată, dar și că există diferențe între răspunsul șobolanilor Wistar adulți sau adolescenți⁴⁹. În studiul de față, cafeina administrată cronic în doză moderată a produs un efect inhibitor asupra activității locomotorii la șobolanii din grupul de control, comparabil cu dozele mari administrate acut⁴⁴.

Cafeina are o acțiune în primul rând antagonică pe receptorii de adenzină A1 și A2A. Acești receptori leagă cafeina la concentrații joase⁴⁷. Acțiunea stimulantă a cafeinei a fost pusă în relație cu efectul ei asupra receptorilor A2A⁴¹, deoarece la șoarecii modificați genetic fără receptori A2A (A2A receptor knockout mice) s-a constatat reducerea activității locomotorii⁵⁰. S-

a sugerat că activitatea locomotorie scăzută indusă de cafeină este o consecință a antagonismului receptorilor A1⁵⁰: receptorii A1 ar putea fi blocați de dozele mari de cafeină sau ei ar putea să contracareze efectul indus de blocarea receptorilor A2A. Cu toate acestea, Halldner și colab., după studierea șoarecilor cărora le lipsesc receptorii A1 sau/și A2A – consideră că efectul inhibitor al cafeinei la doze mari este independent de acești receptori⁵¹. În timp ce receptorii A2A se găsesc în special în substanța striată⁵², o regiune a creierului bogată în dopamină, receptorii A1 sunt frecvenți în diferite zone cerebrale, mai ales în hipocamp, cortex, ganglioni bazali și cerebel⁵². Studiile la șoareci au arătat că ingestia cronică de cafeină a produs o creștere semnificativă a receptorilor A1 în neuronii corticali, în timp ce densitatea receptorilor A2A a rămas nemodificată^{53;54}. Creșterea numărului de receptori A1 poate explica scăderea locomoției pe care am observat-o la lotul de control după administrare cronică de cafeină.

În acord cu alte studii, am constatat o activitate motorie alterată la șobolanii diabetici⁵⁵. Totuși, după administrarea cafeinei locomoția s-a redus numai în grupul de control, nu și în cel diabetic, sugerând că în creierul diabetic există modificări ale receptorilor. Hiperglicemia cronică indusă de streptozotocină la șobolanii diabetici modifică metabolismul hipocampului⁵⁶, având drept consecință creșterea numărului de receptori A2 în această zonă și scăderea numărului de receptori A1⁵⁷. Pe de altă parte, nu am găsit studii care să urmărească posibile modificări ale receptorilor adenosinici în substanța striată la rozătoarele diabetice. Studiile asupra creierului supus unor noxe cronice au evidențiat un raport alterat între receptorii A1 și A2A – stimulii stresanți provocând creșterea densității receptorilor A1 și scăderea densității receptorilor A2A⁵⁸. Având în vedere modificările adaptative ale receptorilor adenosinici localizați în hipocampus șobolanilor diabetici și dereglările produse de stimulii stresanți asupra întregului creier – putem extinde aceste rezultate la șobolanii cu diabet indus de streptozotocină și putem oferi o posibilă explicație pentru activitatea locomotorie observată în studiul nostru. Există posibilitatea ca reducerea numărului de receptori A1 la șobolanii cu DZ să nu fie contrabalansată de creșterea numărului acestor receptori după administrarea cronică a cafeinei, iar densitatea receptorilor A2A să rămână crescută la cei cu DZ și nemodificată după expunerea cronică la cafeină.

2.5 Concluzii

Diabetul produce modificări morfologice și funcționale în sistemul nervos central, scăzând mobilitatea și activitatea locomotorie. Doze mici-medii de cafeină îmbunătățesc sau cel puțin mențin activitatea locomotorie, oferind un sprijin neuroprotector șobolanului diabetic. În lumina cercetărilor anterioare, rezultatele studiului nostru sugerează cafeina ca blocant al unui număr crescut de receptori A2A în diferite regiuni ale creierului animalului diabetic. Studii viitoare ar trebui să vizeze administrarea de diferite doze de cafeină la șobolanii diabetici în încercarea de a vedea dacă efectul bifazic observat la șobolanii din grupul control apare și la cei diabetici. Următorii pași în înțelegerea mai bună a creierului diabetic și a interacțiunii cafeină-diabet ar fi evaluarea modificărilor balanței receptorilor A1 – A2A la modelele animale cu diabet.

3. Efectele administrării cronice de cafeină asupra modificărilor comportamentale la șobolanii cu diabet indus de streptozotocină

3.1 Scopul studiului

Depresia apare frecvent ca o comorbiditate în bolile cronice, dar prevalența sa este de două ori mai mare la pacienții cu DZ tip 2 și de trei ori mai mare la cei cu DZ tip 1 în comparație cu populația generală⁵⁹. De asemenea, a fost raportată și o creștere a anxietății la pacienții diabetici⁶⁰. Drept consecință, depresia și anxietatea înrăutățesc prognosticul diabetului la această categorie de pacienți, în timp ce calitatea vieții și funcționarea globală a organismului acestora este în scădere⁶¹. Deși este recunoscut că diabetul produce modificări structurale la nivel cerebral⁶², asocieria dintre depresie și diabet rămâne încă neînțeleasă, existând posibile mecanisme etiopatogenice comune care ar putea-o explica⁶³. Studii recente arată că asocierea dintre depresie și diabet crește riscul de neuropatie⁶⁴, nefropatie, retinopatie și boli macrovasculare⁶⁵. Un declin progresiv al funcției cognitive, începând în special cu deteriorarea memoriei, este crescut la pacienții diabetici sau la cei ce au metabolismul glucozei modificat⁶⁶.

Cafeina este una din cele mai utilizate substanțe psihoactive în întreaga lume, fiind un antagonist neselectiv al receptorilor de adenzina A2A și A1. Există dovezi că aportul de cafeină în doză mică reduce anxietatea și depresia la oameni, în timp ce dozele mari exacerbează anxietatea⁶⁷. Adenzina pare să fie implicată în procesele cognitive de memorie și învățare: studii epidemiologice au arătat că utilizarea regulată a cafeinei de către oameni asociază o degradare mai mică a funcției cognitive cu vârsta, cât și la pacienții cu boală Alzheimer⁶⁸. Adenzina și substanțele care acționează pe receptorii săi ar putea reprezenta o nouă strategie în controlul degradării memoriei din bolile neuropsihiatrice⁶⁸.

Consumul de cafeină este asociat cu un risc mai mic de diabet⁶⁹, iar studii pe șobolani diabetici au arătat că doze crescute de cafeină scad glicemia și îmbunătățesc toleranța la glucoză⁷⁰.

Având în vedere faptul că literatura de specialitate oferă informații contradictorii asupra relației diabet – depresie, scopul acestui studiu a fost să evalueze modificările comportamentale care pot să apară la șobolanii cu diabet indus de streptozotocină și totodată să urmărească efectele cafeinei asupra comportamentului în acest model animal.

3.2 Materiale și metode

Experimentele au fost realizate folosind șobolani Wistar albino, masculi, în vârstă de 3-4 luni, având o greutate de 300-350 g la începutul experimentelor. Toate animalele au fost ținute în condiții standard de iluminare (un ciclu de zi/noapte de 12 ore), în cuști transparente. Temperatura mediului a fost menținută constantă ($22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$), iar animalele au avut acces liber la hrană și apă. Animalele au provenit din biobaza Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila", București. Toate procedurile asupra animalelor au fost efectuate cu aprobarea Comitetului local de Etică, în acord cu Directiva 86/609/EEC a Consiliului European privind protecția animalelor folosite în scop științific.

3.2.1 Inducerea Diabetului

Ca și în experimentul descris anterior, diabetul a fost indus printr-o singură injecție intraperitoneală cu streptozotocină (STZ – Sigma Aldrich) în doză de 50mg/kg corp, diluată în

soluție salină 0,9%. Șobolanii de aceeași vârstă din grupul control au fost injectați cu echivalent de soluție salină 0,9%. Eșantioane de sânge din vena cozii au fost recoltate la 7 zile după injectarea STZ / soluției saline. Șobolanii cu o glicemie > 250 mg/dl au fost considerați diabetici și incluși în studiu. Șobolanii cu glicemia > 600 mg/dl au fost eliminați datorită unei afecțiuni biologice marcante, cu potențial de viață scăzut, care nu ar asigura supraviețuirea pe termen lung. În final 19 animale au fost incluse în studiu: 9 în grupul de control și 10 în grupul cu DZ.

3.2.2 Administrarea cronică a cafeinei

Am folosit un model de administrare cronică, care să se apropie cât mai mult de modelul uman. Astfel, am preferat administrarea pe cale orală, în apa de băut. Șobolanii au primit cafeina (1,3,7-trimetilxantină) oral timp de 2 săptămâni, dizolvată în apă. Cantitatea de cafeină administrată a fost de 20 mg/kg corp/zi. Pentru a putea dizolva cafeina, s-a monitorizat cantitatea de apă băută de fiecare șobolan în parte cu o săptămână înainte de începerea administrării. Administrarea cafeinei a început în ziua urmatore celei în care am realizat ultimele teste comportamentale, la ambele grupe de animale. Cafeina a fost administrată la 5 șobolani diabetici și la 5 șobolani din grupul control.

3.2.3 Testele comportamentale

La șase săptămâni după administrarea streptozotocinei s-au efectuat testele care urmăresc diferite aspecte ale comportamentului:

- i. comportamentul anxios a fost evaluat folosind testul labirintului suspendat (Elevated Plus Maze - EPM)
- ii. comportamentul depresiv a fost evaluat folosind testul înotului forțat (Forced Swimmin Test – FST)
- iii. memoria de scurtă și cea de lungă durată au fost evaluate folosind testul de recunoaștere al obiectului nou (Novel Object Recognition Test - NOR)

Animalele au fost aduse cu o săptămână înainte de începerea testelor în camera de studiu, pentru a se acomoda cu noul spațiu. Toate testările au fost făcute în același interval orar, între 8:00 - 12:00 și între 14:00 – 17:00, pentru a reduce modificările induse de ritmul circadian. Toate testele de comportament au fost repetate după 2 săptămâni de administrare zilnică a cafeinei. După fiecare test, suprafețele labirintelor unde au avut loc testele (OFT, EPM, NOR) au fost șterse cu etanol 70% pentru a îndepărta mirosul lăsat de fiecare animal, pentru a nu influența comportamentul animalului ce urma să fie testat.

A fost folosit sistemul de urmărire și înregistrare video “Noldus Ethovision XT 5” pentru achiziția datelor și analiza lor automată. Înainte de analiza automată, datele au fost verificate, iar erorile îndepărtate. Rezultatele au fost analizate folosind SPSS 22.0

3.2.3.1 Testul “Elevated plus maze” (EPM)

Testul EPM (labirintului suspendat) este folosit frecvent pentru a aprecia comportamentul anxios al rozătoarelor. Testul a fost validat pentru stabilirea efectelor anxiolitice ai diversilor agenți farmacologici, cât și pentru a defini regiuni ale creierului și mecanisme care sunt implicate în comportamentele legate de anxietate ⁷¹.

Testul EPM a constat dintr-un labirint de culoare neagră cu patru brațe încrucișate, situate la 50 cm deasupra podelei. Lungimea fiecărui braț a fost de 50 cm, iar lățimea de 10 cm.

Două dintre brațe – numite brațe închise – aveau pereți laterali de 40 cm înălțime, celelalte două erau brațe deschise. Șobolanul era plasat la începutul testului la intersecția celor patru brațe, cu fața orientată spre unul din brațele deschise (întotdeauna spre același braț) și cu spatele spre examinator. Sistemul de înregistrare a fost pornit, iar animalul a fost lăsat să exploreze labirintul timp de 5 minute. În rara circumstanță în care șobolanul a căzut de pe brațul deschis, acesta a fost plasat de examinator imediat înapoi pe același braț. Următorii parametrii au fost ulterior evaluați: distanța totală parcursă (cm), timpul petrecut în brațele deschise / închise (s), numărul de intrări în brațele deschise / închise și numărul de defecații. Creșterea activității în brațele deschise, atât timpul petrecut, cât și numărul de intrări, reflectă un comportament mai puțin anxios⁷¹.

Achiziția datelor a început imediat după ce șobolanul a fost pus în labirint, astfel încât comportamentul fiecărui animal a putut fi înregistrat exact 5 minute. Sistemul Noldus a fost setat să înregistreze automat numărul de intrări într-un braț deschis când toate cele patru lăbuțe ale animalului se aflau în brațul deschis. Experimentatorul a rămas în liniște în aceeași încăpere.

3.2.3.2 Testul "Forced Swimming Test" (FST)

Testul FST (înotului forțat) este unul din testele de comportament cele mai utilizate pentru screeningul acțiunii medicației antidepressive. Puși să înoate, și lăsați în această condiție din care nu au scăpare, în cele din urmă animalele adoptă o poziție imobilă. Cu cât timpul de imobilitate este mai lung, cu atât se consideră că animalul are un comportament depresiv.

Pentru urmărirea eventualului comportament depresiv a fost utilizat testul FST descris de Porsolt și modificat pentru șobolan⁷². Șobolanul a fost pus într-un cilindru de sticlă de 45 cm înălțime și 30 cm în diametru. Nivelul apei a fost de aproximativ 30 cm înălțime, în așa fel încât șobolanul să poată înota fără să atingă fundul bazinului. Temperatura apei a fost constantă între 23-26 °C. Apa din bazin a fost schimbată la fiecare doi șobolani. Toate animalele au fost preconditionate cu 24 de ore înaintea evaluării, timp de 5 minute, pentru a învăța că nu pot scăpa din cilindrul respectiv. După fiecare experiment, șobolanul a fost șters cu hârtie și lăsat să se usuce într-o cutie deasupra căreia se afla o lampă.

Testul a durat 300 s, timp în care s-a evaluat statusul de mobilitate/imobilitate al animalului. S-a folosit atât o evaluare automată, cât și o evaluare făcută separat de un evaluator antrenat și "blind" din punct de vedere al șobolanilor testați, care a notat timpul de mobilitate (urmărind fenomenele de "swimming" – înotul animalului prin cilindru, fără să atingă pereții - și pe cele de "climbing" – tentativele de cățărare cu labele din față pe pereții cilindrului) și pe cel de imobilitate (mișcările minime pentru a pluti cu capul la suprafața apei). Deoarece a apărut înconstanță, numărul de scufundări nu a fost înregistrat. În evaluarea sa, observatorul a apreciat comportamentul șobolanului la fiecare 5 secunde pe toată durata testului, folosind protocolul descris de Detke și colab⁷³.

3.2.3.3 Testul "Novel Object Recognition" (NOR)

Testul NOR (recunoașterii unui nou obiect) evaluează memoria rozătoarelor, bazându-se pe faptul că un obiect deja cunoscut va incita mai puțin interesul animalului, decât un obiect nou⁷⁴. Folosind testul NOR am evaluat memoria de lucru a șobolanului adult. Testul a fost împărțit în două părți, fiecare având o durată de 4 minute. Atunci când am urmărit memoria de scurtă durată, distanța între cele două părți a fost de 5 minute. Când am urmărit memoria de lungă durată, distanța între cele două părți a fost de 24 de ore. Cu o zi înainte de test, șobolanul a fost

preconționat, fiind lăsat liber pentru 10 minute în arenă fără nici un obiect pentru a se obișnui cu aceasta.

În prima parte a testului, denumită și fază de familiarizare, șobolanul a fost lăsat să exploreze și să se familiarizeze cu o arenă închisă (ca cea de la OFT), cu pereți negri (40/40/40 cm), unde au fost lăsate două obiecte. În a doua parte a testului, denumită și fază de testare, șobolanul a fost pus înapoi în respectiva arenă împreună cu unul dintre obiectele vechi și cu un alt obiect nou, necunoscut. Am măsurat timpul pe care animalul l-a petrecut explorând fiecare obiect (cu obiectul vechi și cu cel nou). Zona de explorare a unui obiect a fost considerată în aria limitată la 2.5 cm distanță de obiectul respectiv. Dacă memoria de lucru a animalului funcționează normal, atunci, în a doua parte a testului, timpul petrecut explorând obiectul nou ar trebui să fie semnificativ mai lung, obiectul vechi fiind ușor recunoscut.

3.3 Rezultate

3.3.1 Șobolanii diabetici comparativ cu șobolanii non-diabetici

Nivelul glucozei plasmatice a crescut la toți șobolanii diabetici după injectarea de streptozotocină, cu o valoare medie a glicemiei de 455.50 ± 90.30 mg / dl, după o săptămână de la inducerea diabetului și 517.40 ± 76.96 mg / dl după 6 săptămâni ($p < 0.001$). Glicemia medie în lotul șobolanilor control nu a diferit pe durata studiului (media glicemiei la șobolanii de control a fost de 113.60 ± 8.77 mg / dl după o săptămână de la injectarea vehiculului, 102 ± 5.63 mg / dl după 6 săptămâni).

Greutatea șobolanilor a fost determinată la începutul studiului (înainte de injecția cu STZ / placebo), la 6 săptămâni de la administrarea de STZ / placebo și apoi - spre sfârșitul studiului - la 2 săptămâni de administrare cronică de cafeină. Greutatea șobolanilor din grupul diabetic a scăzut semnificativ după inducerea diabetului ($p < 0.001$). Greutatea în grupul control a crescut cu aproximativ 24% la 6 săptămâni, față de momentul inițial ($p < 0.001$).

La testul EPM au fost măsurate intrările pe brațele închise, intrările pe brațele deschise și durata de timp petrecută pe brațele deschise, precum și numărul de defecații. Șobolanii din grupul control au avut mult mai multe intrări atât în brațele deschise (în grupul de control, numărul mediu de intrări pe brațele deschise = 3, inter-quartile-range (IQR) = 5,5, iar în grupul cu diabet numărul mediu de intrările pe brațele deschise = 1, IQR = 3, $Z = 65.5$, $n_1 = 10$, $n_2 = 9$, $p = 0.047$ (one-sided)), cât și în brațele închise (în grupul de control, numărul mediu de intrări pe brațele închise = 6, IQR = 20, în grupul cu diabet zaharat numărul mediu de intrări pe brațele închise = 2, IQR = 4,25, $Z = 72.5$, $n_1 = 10$, $n_2 = 9$, $p = 0.022$).

Mai mult decât atât, la testul EPM, au existat diferențe între mobilitatea șobolanilor din cele două grupuri ($p = 0.022$, $Z = 73$, valoarea mediană a timpului de mobilitate în grupul control = 108.32 s, IQR = 103.36, valoarea mediană a timpului de mobilitate în grupul diabetic = 52,96 s, IQR = 24,82). Diferențele, atât dintre numărul de intrări în brațele închise, cât și în cele deschise, au rămas după ajustarea în funcție de starea de mobilitate (analiza ANCOVA – intrările în brațele închise $F(1) = 21.214$, $p < 0.001$, analiza ANCOVA-intrările în brațele deschise $F(1) = 9.407$, $p = 0.007$).

De asemenea, diferențele de mobilitate între cele două grupuri pot fi caracterizate și printr-o distanță totală parcursă de către grupul control, mai mare decât cea a grupului diabetic ($p = 0.018$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, distanța medie parcursă de grupul control = 931.74 ± 482.21 cm, distanța medie parcursă de grupul diabetic = 480.79 ± 244.66 cm).

Nu au existat diferențe semnificative în timpul petrecut în brațele deschise adaptat la starea de mobilitate (analiza ANCOVA $F(1) = 0,127$, $p = 0,726$, 95% CI = [1.107,14.890] în grupul cu diabet zaharat, respectiv, 95% CI = [2.497,17.150] în grupul de control).

FST nu a prezentat diferențe semnificative între cele două grupuri în ceea ce privește timpul de mobilitate. Testul NOR nu a evidențiat diferențe între grupul de control și cel cu diabet pentru memoria pe termen scurt. Cu toate acestea, la testul de memorie pe termen lung, șobolanii din grupul de control au petrecut mai mult timp la obiectul nou decât șobolanii diabetici (timpul median în grupul diabetic = 1,4 s, IQR = 4,42, timpul median în grupul de control = 76 s, IQR = 13.76, $Z = 71$, $n_1 = 10$, $n_2 = 9$, $p = 0,032$). În grupul cu diabet, timpul petrecut la obiectul nou a fost mai scurt decât cel petrecut la obiectul vechi (timpul mediu petrecut la obiectului nou = 1,4 s, IQR = 4,42, timpul mediu petrecut la obiectul vechi = 10,32 s, IQR = 41.28, $Z = 43$, $p = 0,015$).

3.3.2 Șobolanii diabetici și non-diabetici după administrarea de cafeină

După primele teste de comportament, la 10 dintre șobolani a fost administrată pe cale orală cafeină în apa de băut (5 șobolani de control, 5 șobolani diabetici). Toate testele comportamentale au fost repetate după 2 săptămâni de la administrarea de cafeină așa cum este descris mai sus în secțiunea materiale și metode. Rezultatele au fost analizate comparativ, folosind Mann-Whitney U și Wilcoxon's W, cu scopul de a evalua modificările induse de administrarea de cafeină și capacitatea de reacție a șobolanilor din diferitele grupuri.

Cu o săptămână înaintea începerii administrării de cafeină s-a monitorizat consumul zilnic de apă al șobolanilor pentru a stabili în ce cantitate de apă vom dizolva doza de cafeină. S-a observat un consum de aproximativ 4 – 5 ori mai mare la șobolanul diabetic, față de cel control ($p < 0.001$).

Administrarea de cafeină nu a modificat valorile glicemiei, nici în grupul de control, nici în cel cu șobolani diabetici (glicemia medie la șobolanii diabetici a fost de 523.30 ± 75.71 mg/dl, glicemia medie la șobolanii martor a fost $99,60 \pm 7,65$ mg / dl după 2 săptămâni de administrare cronică de cafeină).

La șobolanii diabetici, declinul ponderal apărut în urma inducerii diabetului nu a fost influențat de administrarea cafeinei ($p < 0.001$). La lotul control greutatea șobolanilor a ajuns să fie cu 31% mai mare față de momentul începerii studiului ($p < 0.001$). Nu s-a stabilit nici o corelație între administrarea cafeinei și variațiile ponderale.

La testul EPM, după administrarea de cafeină numărul de intrări în brațele închise a crescut pentru șobolanii diabetici ($Z = -1.753$, $p = 0,04$ (one-tailed)). Șobolanii din lotul control au avut încă mai multe intrări în brațele deschise după consumul de cafeină decât șobolanii diabetici ($Z = -1.702$, $p = 0,047$ (one-tailed)). Numărul de defecații a scăzut la șobolani diabetici după administrarea cafeinei ($Z = -2.041$, $p = 0,041$).

La testul FST, mobilitatea șobolanilor diabetici a scăzut în mod semnificativ după administrarea de cafeină. Șobolanii din grupul de control au avut timp de mobilitate similară după administrarea de cafeină ca și mai înainte, cu toate acestea, ei au fost semnificativ mai mobili decât șobolanii diabetici după administrarea de cafeină (Fig 2).

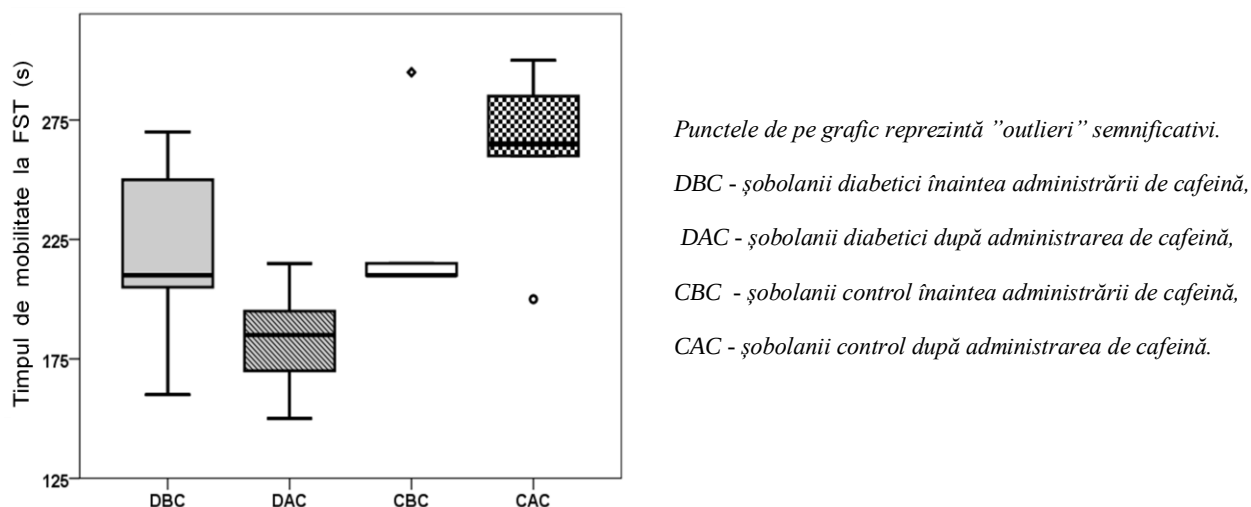


Fig 2. Box-plot al timpului de mobilitate la FST. Mobilitatea șobolanilor diabetici a scăzut semnificativ după administrarea cafeinei ($Z=-1.753$, $p=0.04$ (one-tailed), timpul mediu de mobilitate al șobolanilor diabetici înainte administrării de cafeină = 210 s, $IQR=77.5$, timpul mediu de mobilitate al șobolanilor diabetici după administrarea de cafeină = 185 s, $IQR=45$). Șobolanii din grupul control au avut timpi de mobilitate similari după administrarea de cafeină ca și înainte, totuși, mobilitatea a fost semnificativ mai mare decât a șobolanilor diabetici după cafeină ($Z=-2.402$, $p=0.016$, timpul mediu de mobilitate al șobolanilor diabetici după administrarea de cafeină = 185 s, $IQR=45$, timpul mediu de mobilitate al șobolanilor control după administrarea de cafeină = 265 s, $IQR=62.5$).

La testul de recunoaștere a obiectului –NOR-, șobolanii din grupul cu diabet zaharat, au petrecut mai mult timp cu obiectul nou decât cu cel vechi, la testarea memoriei pe termen lung, după administrarea de cafeină ($Z = -1.483$, $p = 0,049$, timpul petrecut cu obiectul nou după administrarea de cafeină = 9,68 s, $IQR = 10,52$, timpul petrecut cu obiectul vechi după administrarea de cafeină = 5,84 s, $IQR = 7,24$) (Fig 3A). Dimpotrivă, la testarea memoriei pe termen scurt, șobolanii diabetici au petrecut mai puțin timp cu obiectul nou, după administrarea de cafeină ($Z = -2.023$, $p = 0,043$, timpul petrecut cu obiectul nou, înainte de administrarea de cafeină = 8,4 s, $IQR = 67.68$, timp a petrecut cu obiectul nou după administrarea de cafeină = 2 s, $IQR = 6,92$) (Fig 3B). Șobolanii din grupul de control, au petrecut mai mult timp la obiectul nou doar la testarea memoriei pe termen lung ($Z = -2.023$, $p = 0,043$, timpul petrecut cu obiectul nou, înainte de administrare cafeină = 3,52 s, $IQR = 7,56$, timpul petrecut cu obiectul nou după administrarea de cafeină = 14.16 s, $IQR = 20,36$) (Fig 3A), dar nu și la testarea pe termen scurt a memoriei după administrarea de cafeină (Fig 3B). Șobolanii din grupul de control, de asemenea, au petrecut mai mult timp cu obiectul nou decât cu obiectul vechi după administrarea de cafeină la testarea pe termen lung a memoriei ($Z = -2.023$, $p = 0,043$, timpul petrecut cu obiectul nou după administrarea de cafeină = 14.16 s, $IQR = 20,36$, timpul petrecut cu obiectul vechi după administrarea de cafeină = 3,36 s, $IQR = 3,64$) (Fig 3A).

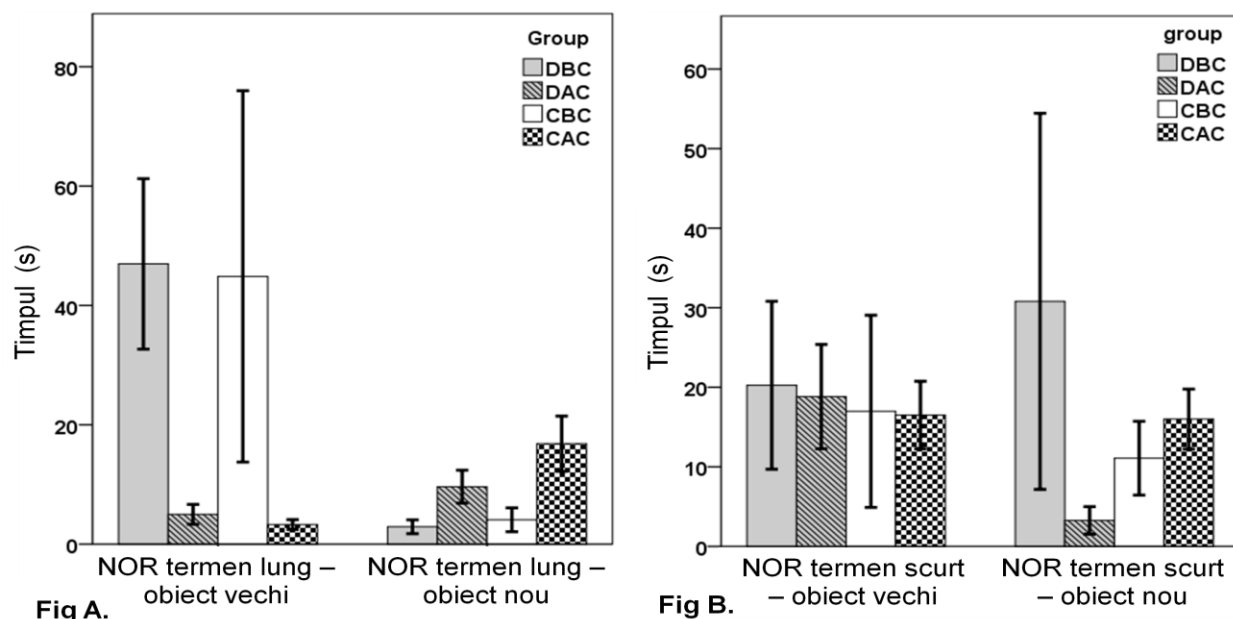


Fig 3. Testul NOR pentru memoria de lungă și de scurtă durată. Fig A. Bar-plot cu timpul petrecut lângă obiectul vechi și obiectul nou la testul NOR pentru memoria de lungă durată a fiecărui grup, înainte și după administrarea de cafeină. Fig B. Bar-plot cu timpul petrecut lângă obiectul vechi și obiectul nou la testul NOR pentru memoria de scurtă durată a fiecărui grup, înainte și după administrarea de cafeină.

3.4 Discuții

Rezultatul principal al prezentului studiu este demonstrarea îmbunătățirii memoriei de lungă durată sub acțiunea cafeinei (în doză mică-medie) la șobolanii din grupul cu DZ și din grupul control. Hiperglicemia cronică produsă de streptozotocină afectează metabolismul hipocampului⁵⁷ și crește numărul de receptori adenozinici A2 în hipocampul șobolanilor diabetici⁷⁵. Blocarea acestor receptori de către cafeină poate explica beneficiile ei asupra memoriei și potențialul de prevenire a degenerescenței hipocampului.

Alte studii au dovedit efectul protectiv al cafeinei, care a scăzut glicemia⁷⁶ și a protejat celulele beta-pancreatice împotriva acțiunii streptozotocinei⁷⁷ când a fost administrată (cafeina) înaintea inducției diabetului⁷⁵. În designul actualului experiment, cafeina a fost administrată după provocarea diabetului și nu a modificat statusul glicemic, dar a îmbunătățit rezultatele la testul NOR pentru memoria de lungă durată.

Administrarea de lungă durată a cafeinei crește nivelul de dopamină și serotonină în hipocampul șobolanilor⁷⁸, astfel cafeina ar putea juca un rol ca agent antidepresiv. Chiar mai mult, aceasta poate explica de ce cafeina ajută consolidarea memoriei pe termen lung. FST este unul din testele de comportament cele mai folosite pentru screeningul acțiunii medicației antidepresive. Când șobolanii sunt forțați să înoate continuu, după o perioadă inițială de suprasolicitare ei adoptă o postură imobilă care reflectă un tonus psihic scăzut. Având în vedere că antidepresivele reduc perioadele de imobilitate la șobolani, această situație este considerată similară unei stări depresive⁷². În acest studiu șobolanii diabetici (după 6 săptămâni de hiperglicemie) au prezentat perioade de imobilitate similare comparativ cu cei din lotul control. Unele studii au notat diferențe semnificative între timpii de imobilitate la șobolanii cu diabet

indus de streptozotocină după 21 de zile ⁷⁹ sau după 28 de zile de la injectarea streptozotocinei ^{80;81}. Alte studii au raportat diferențe numai la 28 de zile după administrarea streptozotocinei ⁸¹.

Principalele diferențe între aceste cercetări și studiul actual constau în:

- doza de SZT administrată – 60 mg/kg corp ⁷⁹ vs 50 mg/kg corp;
- vârsta și greutatea animalelor la momentul injectiei de SZT – 200-250g ⁸¹ vs 300-350g.

Totuși, după 2 săptămâni de administrare a cafeinei, șobolanii diabetici au fost mai puțin mobili la FST decât înainte de cafeină, în timp ce mobilitatea la grupul de control a rămas neschimbată. Această reacție depresivă a șobolanilor diabetici, la 8 săptămâni după injecția cu STZ, poate fi o consecință a duratei mai lungi de acțiune a stresului hiperglicemic.

Mobilitatea la EPM a fost mai mare la grupul de control, în concordanță și cu alte studii în care s-a constatat o activitate locomotorie modificată la șobolanii diabetici ⁵⁵. Administrarea cafeinei a produs un impact negativ în grupul de control, scăzând activitatea de explorare, efect care nu a fost însă observat la lotul diabetic. Observațiile noastre se corelează cu un studiu foarte recent care a remarcat că efectul cafeinei în anxietate depinde de rasa de șobolan studiată, astfel că la șobolanii Wistar cafeina a micșorat atât distanța totală parcursă, cât și numărul de intrări în brațele închise ale EPM ⁸². Deci, cafeina are efect anxiogenic la șobolanii Wistar sănătoși. De asemenea, Marin și colab. au observat o stimulare locomotorie după administrarea acută de doze mici de cafeină și depresie locomotorie după doze mari, la șobolanii Wistar adulți ⁴¹. Chiar dacă nu am folosit doze mari de cafeină, noi am folosit doze mici-medii dar într-un model de administrare cronică. Studii anterioare au sugerat că dozele mici au un efect stimulant mediat de blocarea receptorilor A(2A), în timp ce efectul deprimant poate fi explicat prin blocarea receptorilor A(1) ⁸³.

Șobolanii din lotul de control au avut mai multe intrări atât în brațele deschise, cât și în cele închise la EPM față de șobolanii diabetici, dar ajustat cu statusul de mobilitate, timpul petrecut în brațele deschise a fost același. Șobolanii diabetici au arătat o capacitate de explorare redusă, și putem corela acest aspect cu un nivel mai ridicat de anxietate. Administrarea cronică de cafeină a mărit numărul de intrări în brațele închise și a scăzut numărul de defecații la șobolanii diabetici. Considerăm aceste efecte a fi datorate unei mici diminuări a gradului de anxietate. Totuși, efectul cafeinei asupra anxietății rămâne încă discutabil. În timp ce unele studii susțin un efect anxiolitic ^{83;84}, altele observă acțiuni anxiogene ⁸⁵. Noi am constatat un efect anxiogen al cafeinei la grupul de control și anxiolitic la grupul diabetic. Pornind de la prezumția că concentrații crescute de cafeină cresc anxietatea în timp ce dozele mici o reduc la oameni ⁸⁶, credem că substanța (cafeina) interacționează cu diferite tipuri de receptori implicați în controlul comportamental, în funcție de statusul rozatoarei – diabetic sau sănătos - și că diabetul poate interfera asupra expresiei numărului și tipului acestor receptori ⁵⁷.

În concluzie, cu cât a trecut mai mult timp de la provocarea diabetului la animalele de experiență, cu atât s-au manifestat mai multe modificări comportamentale: anxietate, depresie, afectări ale memoriei. Aceste modificări pot fi datorate schimbărilor metabolismului cerebral, care a afectat sistemul serotoninergic și adenozinic. Administrarea cafeinei:

- scade activitatea locomotorie la lotul de control dar nu și la lotul diabetic;
- are efect anxiolitic la șobolanii diabetici;
- îmbunătățește memoria de lungă durată la ambele loturi.

Acest studiu susține un efect benefic asupra comportamentului după administrarea cafeinei în doze mici-medii la șobolanii diabetici. Cercetările viitoare vor trebui să vizeze evidențierea rolului cafeinei asupra comportamentului șobolanilor diabetici tratați cu insulină.

4. Studiu Electrofizilogic asupra efectului cafeinei în apariția PEV la șobolanii cu diabet indus de streptozotocină

4.1 Scopul studiului

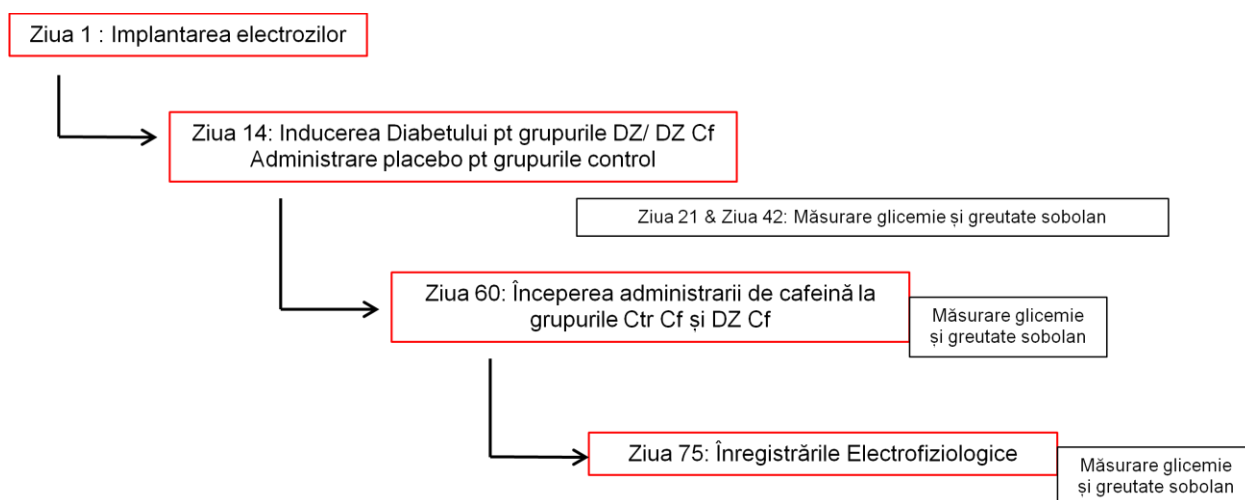
Scopul acestui studiu a fost să urmărească modificările produse de diabet asupra nervului optic și să evalueze un presupus efect neuroprotector al administrării cronice de cafeină la șobolanii Wistar cu diabet zaharat indus experimental. Studiarea EEG-ului și a potențialelor evocate vizual ne poate oferi o imagine asupra neuropatiei centrale indusă de diabet, aceasta fiind obiectul de interes în mult mai puține studii până la momentul actual comparativ cu neuropatia diabetică periferică. Posibilitatea de a detecta cât mai timpuriu modificările produse de diabet, ne va da posibilitatea unei conduite terapeutice ținute și cu rezultate mai bune pentru pacient.

4.2 Materiale și metode

În realizarea investigațiilor de electrofizilogie au fost înregistrate patru grupuri de șobolani Wistar, a câte 4 animale per grup; în total 16 animale. În plus de aceștia, au fost trei șobolani care au decedat în timpul / în urma procedurilor de implantare a electrozilor. S-au folosit șobolani masculi, cântărind în jur de 300-350 gr, în jurul vârstei de 3 luni, ceea ce a putut permite o supraviețuire de durată mai lungă în urma inducerii diabetului.

Animalele au provenit din biobaza UMF "Carol Davila". S-a permis un acces nerestricționat la apă și hrană, animalele fiind ținute pe durata experimentelor în cuști de polycarbonat. Animalele utilizate au fost apoi sacrificate, respectând regulile impuse de UMF "Carol Davila". Toate experimentele s-au desfășurat cu acordul Comisiei de Etica a UMF "Carol Davila". Animalele au fost împărțite aleator în următoarele patru grupe: Grupul șobolanilor Control (Ctr), Grupul șobolanilor Control +Cafeină (Ctr Cf), Grupul șobolanilor Diabetici (DZ), Grupul șobolanilor Diabetici +Cafeină (DZ Cf).

S-a folosit următoarea strategie a experimentelor:



4.2.1 Pasul 1: Implantul electrozilor

Implantul electrozilor s-a efectuat conform protocolului descris de Ghiță și colab.⁸⁷ și folosit în cadrul Laboratorului nostru de Neuroștiințe ca implant cronic. Se consideră ziua 1 a experimentului, ziua implantării. Înaintea implantului, șobolanul a fost bine anesteziat printr-o injecție intraperitoneală cu clorhidrat, doza folosită fiind de 0.4 g/kgc. După anestezierea șobolanului, părul de pe capul său a fost tuns, apoi s-a realizat incizia tegumentului pe aproximativ 3-4 cm și expunerea cutiei craniene. Cu o spatulă s-au îndepărtat resturile de țesut conjunctiv, osul fiind foarte bine curățat și uscat. Cu ajutorul stereotaxului capul șobolanului a fost imobilizat și s-au dat găurile unde au fost poziționați cei doi electrozi epidurali. Pentru fiecare electrod s-au dat două găuri la distanță de 1 mm una de cealaltă. Astfel, electrodul activ s-a situat la nivelul hemisferei drepte (contralateral față de ochiul unde s-a plasat sursa luminoasă, pentru a ține cont de decusația fibrelor nervului optic), la 6 mm posterior de bregma și 4 mm lateral, în timp ce electrodul referință a fost plasat anterior, la 7 mm de bregma. Electrodul activ s-a situat în zona corespunzătoare ariei vizuale 17, în timp ce electrodul referință a corespuns zonei bulbului olfactiv. Materialul din care au fost făcuți electrozii a fost un fir de nichel-crom (Ni80Cr20, Ø 0.15 mm, Goodfellow, UK) de aproximativ 4 cm lungime și un diametru de 0.15 mm. Pentru realizarea fiecărui electrod, un fir a fost trecut prin cele două găuri plasate la distanța de 1 mm, astfel încât capetele firului să poată fi apoi unite. Următorul pas a constat în suturarea tegumentului incizat. Prin dezinfectarea cu betadină 5% a plăgii s-a încercat împiedicarea infecțiilor.

4.2.2 Pasul 2: Inducerea DZ

La două săptămâni de la implantarea electrozilor, la 8 dintre șobolani s-a indus diabet zaharat, prin metoda descrisă în experimentele precedente. Pe scurt: injecție intraperitoneală de streptozotocină 50 mg/kgc diluată cu 1 ml de ser fiziologic. S-a considerat că diabetul zaharat a fost indus dacă la o săptămână de la injecție glicemiile au fost mai mari de 200mg/dl. În continuare glicemiile și greutatea animalelor au fost monitorizate în zilele 21, 42, 60 și 75 ale experimentului. Grupurilor control li s-a administrat o injecție intraperitoneală cu ser fiziologic.

4.2.3 Pasul 3: Administrarea de cafeină

Cantitatea de apă pe care a băut-o fiecare șobolan a fost monitorizată cu o săptămână înainte de începerea administrării de cafeină. Fiecare șobolan din grupurile Ctr Cf și DZ Cf au primit apoi dizolvată în apa de băut, începând cu ziua 60 și până în ziua 75 când au avut loc înregistrările, cafeină (1,3,7 - trimetilxantină) 20 mg/kgc/zi. Pentru a nu stresa animalele s-a preferat ca administrarea cronică de cafeină să se realizeze per os.

4.2.4 Pasul 4: Înregistrările electrofiziologice – Testarea efectelor DZ și cafeinei

4.2.4.1 Anestezia cu isofluran

Toate înregistrările electrofiziologice s-au efectuat sub anestezie cu isofluran. Pentru inducerea anesteziei, animalul a fost introdus într-un recipient ermetic conectat la un tub de ventilație cu isofluran.

În primă fază s-a realizat o ventilație cu un flux de 1.5 – 2 l/min, apoi s-a pornit vaporizatorul și s-a crescut concentrația de isofluran la 5% pentru 2 min. În urma inducerii anesteziei, animalul este luat din recipientul respectiv, urmând a fi ventilat pe mască. Pentru a

egaliza concentrațiile între aerul inspirat, sânge și creier, șobolanul a fost ventilat 10 min cu o concentrație de 1% de isofluran, și la un debit de 1.5-2 %. Ulterior s-a considerat că animalul este stabil și că se pot începe procedurile de înregistrări electrofiziologice.

Prima înregistrare analizată s-a făcut la concentrația minimă alveolară (MAC) a isofluranului de 1 %, în ritm EEG de slow wave. Apoi s-a crescut concentrația progresiv la 2%. S-a așteptat 15 min pentru adaptarea și echilibrarea animalului, apoi s-a înregistrat șobolanul pentru 5 min. Profunzimea anesteziei a fost apreciată, de asemenea, și prin aspectul undelor EEG. În "slow wave" se observă unde cu frecvență scăzută și cu amplitudine mare.

În același timp animalul a fost monitorizat cardiac. Pentru aceasta s-a folosit o derivație electrocardiografică (EKG) anterioară, prin plasarea de electrozi la nivelul membrelor anterioare.

4.2.4.2 Înregistrările și prelucrarea Potențialelor Evocate Vizuale

La două luni de la inducerea DZ și două săptămâni de administrare cronică de cafeină, șobolanii au fost înregistrați electrofiziologic. În ziua 75 de la începutul studiului, s-au înregistrat potențialele evocate vizual (PEV) folosindu-se un stimul de tip Flash sub anestezie cu Isofluran, conform protocolului descris de Ghiță AM și Georgescu EL^{88,89}.

Înregistrările s-au desfășurat într-o încăpere izolată fonic și întunecoasă. PEV au fost induse prin folosirea de stimuli luminoși tip flash, sursa de lumină a fost dispusă la 1 cm de corneea, sub un unghi de 45° superior în raport cu planul orizontal al globului ocular. Ochiul contralateral a fost izolat cu o bandă opacă. Flashurile de lumină au fost produse cu o frecvență de 30 stimuli/min și au avut o durată de 15 ms.

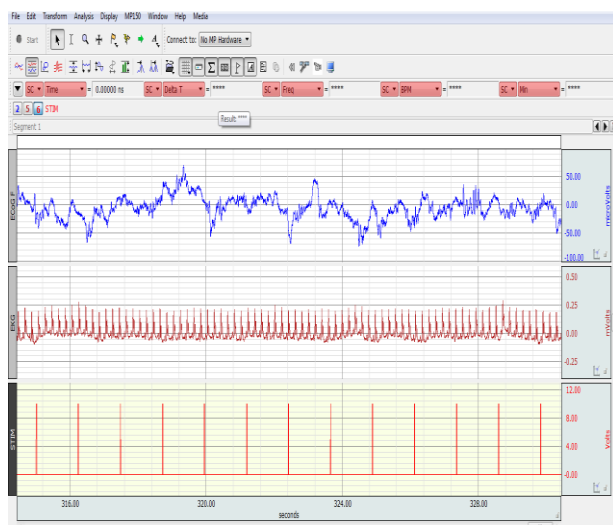


Fig 4. Achiziția datelor cu programul AcqKnowledge 4.2: se observă cele 3 canale de achiziție: unul pentru semnalul EEG (traseu albastru - sus), unul pentru EKG (traseu roz - mijloc) și unul pentru stimulul luminous (traseul roșu –jos).

Fiecare animal a fost înregistrat în ritm EEG de "slow wave" inițial la un MAC de 1% isofluran, apoi la un MAC de 2% isofluran. Fiecare înregistrare a durat 5 min, iar apoi pentru a obține PEV s-au mediat 300 de semnale.

Pentru a realiza înregistrările s-a folosit BIOPAC MP 150 format dintr-o unitate centrală și 2 module, unul pentru EEG și unul pentru EKG. S-a utilizat o derivație EKG anterioară și o derivație EEG occipitală pentru înregistrarea PEV (cu un electrod de referință anterior și unul activ posterior), o derivație pentru semnalul analog al sursei de lumină și electrodul de

împământare care a fost plasat fie la nivelul unui membru inferior, fie pe coadă. Toți acești electrozi au fost conectați la BIOPAC.

Pentru achiziția datelor sistemul BIOPAC MP150 a fost conectat la un calculator cu softwareul Acqknowledge 4.2 (Fig 4). Impedanța electrozilor a fost sub 100M Ω . Semnalul a fost amplificat de 5000 de ori; pentru suprimarea artefactelor și a interferențelor s-a aplicat un filtru cu bandă de trecere de 1-100 Hz. Semnalul analog a fost digitalizat cu 1000 de frame-uri pe secundă. Semnalul luminos a fost digitalizat la aceeași rată de secvențe sub forma unui semnal de 1 mV amplitudine^{88;89}.

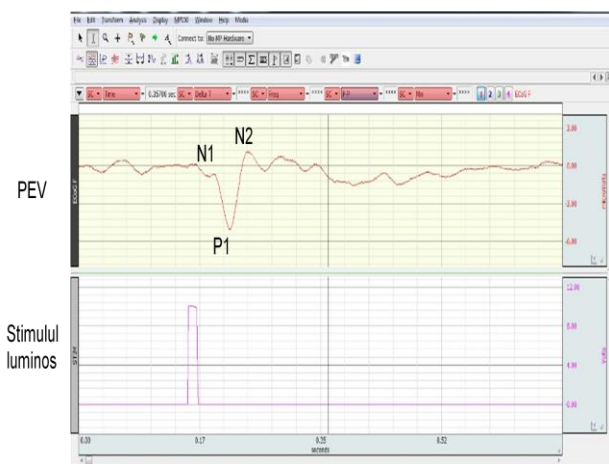


Fig 5. PEV obținut în urma analizei EEG cu programul AcqKnowledge 4.2; se observă undele N1, P1 și N2 apărute ca urmare a stimulului luminos.

Semnalul EEG a fost analizat ulterior. Folosind programul AcqKnowledge 4.2, s-au extras PEV din semnalul EEG prin împărțirea acestuia în epoci de 250-450 ms apărute după fiecare flash și suprapunerea lor. Astfel, s-a realizat o mediere ce a permis înlăturarea semnalului EEG de fond care nu avea legătură cu răspunsul la flash

Am obținut PEV (Fig 5): acesta prezintă 3 vârfuri constante, notate ca unde negative sau pozitive. Datorită variabilității primei unde pozitive, notarea undelor s-a făcut astfel: N1, prima undă apărută, P1, următoarea undă apărută și N2, a III-a undă. PEV a fost analizat urmărind latența de apariție a undelor N1, P1 și N2 și amplitudinea undelor N1-P1, respectiv P1-N2.

4.2.4.3 Măsurarea latențelor și amplitudinilor PEV

PEV a fost analizat urmărind latența de apariție a undelor N1, P1 și N2 măsurată de la debutul flashului până la vârful fiecărei unde. Pentru standardizare, măsurarea amplitudinii undelor s-a făcut de la vârf la vârf, obținând 2 amplitudini: N1-P1 și P1-N2, deoarece în înregistrare nu există "zero" absolut, ci acesta diferă de la o înregistrare la alta fiind suma potențialelor de la debutul înregistrării. Datorită unei variabilități și inconstanțe, undele P2 și N3 nu au fost analizate.

4.3 Rezultate

Rezultatele EEG și PEV au fost analizate cu programul AcqKnowledge 4.2. Analiza statistică a fost realizată cu programul Microsoft Office Excel 2007. Datele au fost exprimate ca medie $\pm$ eroarea medie standard (SEM), iar semnificația statistică s-a calculat cu testul "t student"; valori ale $p < 0.05$ au fost considerate ca diferențe semnificative.

4.3.1 Variațiile glicemiei în timp

Inducerea diabetului a modificat semnificativ valorile glicemice față de momentul inițial ($p < 0.001$). De-a lungul studiului se remarcă o tendință de creștere a glicemiei, pe măsură ce

afectarea diabetică avansează. Glicemia la o săptămână de la injecția cu streptozotocină a fost 473 mg/dl (SEM = 7.43), față de 100.5 mg/dl (SEM = 0.86) inițial, pentru ca la finalul studiului - la 2 luni de la inducerea diabetului - sa ajungă la 507 mg/dl (SEM = 7.62) în grupul diabetic. Valorile glicemice ale grupului DZ Caf nu au fost diferite semnificativ de cele ale grupului DZ. În grupul Ctr și în cel Ctr Cf glicemia nu a diferit între începutul și finalul studiului. Nu au existat diferențe între grupul Ctr și Ctr Cf.

4.3.2 Variațiile greutății în timp

Greutatea șobolanilor a fost determinată la începutul studiului (înainte de injecția cu STZ / placebo), și nu s-au constatat diferențe între cele patru grupuri de șobolani. Ulterior, după inducerea diabetului, șobolanii din grupul DZ și cei din DZ Cf au prezentat un declin ponderal, în timp ce șobolanii din grupul Ctr și Ctr Cf au avut o creștere ponderală. Aceste diferențe au devenit semnificative începând cu Ziua 42 a studiului ($p < 0.001$) și au crescut din ce în ce mai mult până în Ziua 75 a studiului. În ziua 75 s-a constatat că șobolanii diabetici (DZ și DZ Cf) au pierdut peste 20% din greutatea inițială, iar șobolanii control (Ctr și Ctr Cf) au luat cu peste 25% în greutate.

4.3.3 Consumul de apă

Cu o săptămână înaintea începerii administrării de cafeină s-a monitorizat consumul zilnic de apă al șobolanilor pentru a stabili în ce cantitate de apă vom dizolva doza de cafeină. S-a observat un consum de aproximativ 4 – 5 ori mai mare la șobolanul diabetic, față de cel control ($p < 0.001$).

4.3.4 Latențele undelor PEV

Analiza și urmărirea PEV la șobolanul adult Wistar a fost destul de dificilă, întrucât a existat o variabilitate destul de mare chiar și în cadrul aceluiaș grup de studiu. În Fig 6 (A, B) se poate observa aspectul PEV la un șobolan din grupul Ctr și la un șobolan DZ.

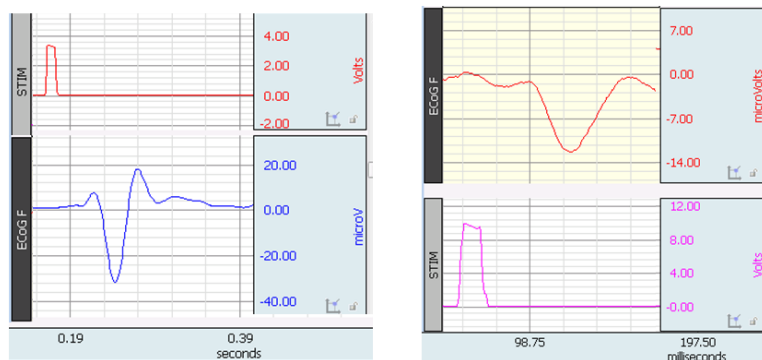


Fig 6. A. Aspectul PEV la un șobolan din grupul Ctr. B. Aspectul PEV la un șobolan din grupul DZ. Este prezentat canalul cu stimulul luminos, și canalul de achiziție EEG.

4.3.4.1 Latența undei N1

Latența undei N1 a fost crescută la șobolanul diabetic, față de cel control, atât la o profunzime a anesteziei cu MAC 1%, cât și cu MAC 2% ($n_1=4$, $n_2=4$, latența medie în grupul de control la MAC 1% = 40.03 ± 1.99 ms, latența medie în grupul diabetic la MAC 1% = 48.26 ± 1.07 ms, $p < 0.05$; latența medie în grupul Ctr la MAC 2% = 46.20 ± 2.10 ms, latența medie în

grupul DZ la MAC 2% = 52.10 ± 2.59 ms, $p < 0.05$). Creșterea concentrației anestezice prelungește latența de apariție a undelor N1 atât la grupul control, cât și la cel diabetic.

Administrarea cafeinei a dus la apariția unor latențe mai mici în cazul șobolanilor diabetici, indiferent de profunzimea anesteziei ($n_1=4$, $n_2=4$, latența medie în grupul DZ la MAC 1% = 48.26 ± 1.07 ms, latența medie în grupul DZ Cf la MAC 1% = 42.16 ± 2.05 , $p < 0.05$; latența medie în grupul DZ la MAC 2% = 52.10 ± 2.59 ms, latența medie în grupul DZ Cf la MAC 2% = 45.67 ± 1.87 ms, $p < 0.05$). În grupul Ctr Cf latențele nu au diferit față de grupul Ctr indiferent de profunzimea anesteziei ($n_1=4$, $n_2=4$, latența medie în grupul Ctr la MAC 1% = 40.03 ± 1.99 ms, latența medie în grupul Ctr Cf la MAC 1% = 38.21 ± 1.67 ms; latența medie în grupul Ctr la MAC 2% = 46.20 ± 2.10 ms, latența medie în grupul Ctr Cf la MAC 2% = 41.33 ± 4.35 ms).

4.3.4.2 Latența undei P1

Latența undei P1 a fost întârziată la șobolanii din grupul DZ comparativ cu grupul Ctr la o concentrație a MAC de 1% ($n_1=4$, $n_2=4$, latența medie în grupul de control la MAC 1% = 60.01 ± 2.11 ms, latența medie în grupul diabetic la MAC 1% = 71.13 ± 1.04 ms, $p < 0.05$). Creșterea profunzimii anestezice la MAC 2%, a crescut latențele și în grupul Ctr și în cel DZ, dar această creștere nu a atins semnificația statistică comparaiv cu latențele la MAC 1%. Totuși diferențele între grupul DZ și grupul Ctr s-au păstrat ($n_1=4$, $n_2=4$, latența medie în grupul Ctr la MAC 2% = 64.7 ± 1.95 ms, latența medie în grupul DZ la MAC 2% = 72.22 ± 1.47 ms, $p < 0.05$).

Grupul DZ Cf a avut o latență a undei P1 semnificativ mai mică decât grupul DZ ($n_1=4$, $n_2=4$, latența medie în grupul DZ la MAC 1% = 71.13 ± 1.04 ms, latența medie în grupul DZ Cf la MAC 1% = 63.09 ± 1.23 , $p < 0.05$; latența medie în grupul DZ la MAC 2% = 72.22 ± 1.47 ms, latența medie în grupul DZ Cf la MAC 2% = 66.18 ± 1.20 ms, $p < 0.05$). Administrarea cafeinei în grupul control nu a modificat latența de apariție a undei P1 ($n_1=4$, $n_2=4$, latența medie în grupul Ctr la MAC 1% = 60.01 ± 2.11 ms, latența medie în grupul Ctr Cf la MAC 1% = 59.10 ± 1.78 ms; latența medie în grupul Ctr la MAC 2% = 64.7 ± 1.95 ms, latența medie în grupul Ctr Cf la MAC 2% = 62.31 ± 1.78 ms).

4.3.4.3 Latența undei N2

Analiza latenței undei N2 nu a respectat modelul întâlnit în cazul latențelor undelor N1 și P1, valorile latențelor au scăzut la anestezii mai profunde. În cazul anesteziei mai superficiale, MAC 1%, latența N2 în grupul DZ a fost mai mare decât în grupul Ctr ($n_1=4$, $n_2=4$, latența medie în grupul de control la MAC 1% = 93.15 ± 1.96 ms, latența medie în grupul diabetic la MAC 1% = 99.45 ± 2.36 ms, $p < 0.05$). O dată cu aprofundarea anesteziei, la MAC 2%, se observă că latența în grupul DZ nu se modifică față de MAC 1%, în timp ce, paradoxal, latența grupului control scade. Între grupurile DZ și Ctr diferențele menținându-se și la MAC 2% ($n_1=4$, $n_2=4$, latența medie în grupul Ctr la MAC 2% = 88.7 ± 2.72 ms, latența medie în grupul DZ la MAC 2% = 98.05 ± 3.45 ms, $p < 0.05$).

Administrarea cafeinei la șobolanii diabetici a menținut în limite similare cu grupul control latența undei N2 în cazul MAC 1% ($n_1=4$, $n_2=4$, latența medie în grupul DZ la MAC 1% = 99.45 ± 2.36 ms, latența medie în grupul DZ Cf la MAC 1% = 96.24 ± 3.53 ms). În cazul MAC 2%, latența grupului DZ Cf a fost asemănătoare cu latența la MAC 1% (latența medie în grupul DZ Cf la MAC 2% = 96.01 ± 2.86 ms). În grupul Ctr Cf, administrarea cafeinei nu a

modificat latența față de grupul Ctr la MAC 1%. Cu toate acestea, la MAC 2% se observă o scădere a latenței undei N2 pentru grupul Ctr Cf, ca și în cazul grupului Ctr (n1=4, n2=4, latența medie în grupul Ctr Cf la MAC 2% = 87.32 ± 5.3 ms, latența medie în grupul Ctr la MAC 2% = 92.08 ± 2.18 ms).

4.3.5 Amplitudinile undelor PEV

Amplitudinea undelor ce constituie potențialul evocat nu pornește de la un zero absolut, punctual considerat de sistemul AcqKnowledge 4.2 drept "zero" fiind defapt rezultanta curenților din momentul la care s-a început înregistrarea. Pentru a putea aprecia amplitudinea am măsurat undele de la "vârf la vârf". Variabilitatea amplitudinilor a fost destul de mare între șobolani.

4.3.5.1 Amplitudinea undei N1-P1

La o concentrație a isofluranului de 1%, putem observa diferențele de amplitudine între grupurile diabetice, DZ, respectiv DZ Cf, față de grupurile control, Ctr, respectiv Ctr Cf (amplitudinea medie în grupul Ctr = 8.75 ± 1.89 μ V, amplitudinea medie în grupul Ctr Cf = 7.7 ± 1.62 μ V, amplitudinea medie în grupul DZ = 3.12 ± 2.3 μ V, amplitudinea medie în grupul DZ Cf = 3.45 ± 2.06 μ V). La concentrația de 2% a isofluranului, valorile amplitudinilor au crescut pentru toate grupurile de studiu, fiind relativ similare între ele (amplitudinea medie în grupul Ctr = 10.2 ± 2.43 μ V, amplitudinea medie în grupul Ctr Cf = 10.53 ± 2.84 μ V, amplitudinea medie în grupul DZ = 12.42 ± 1.56 μ V, amplitudinea medie în grupul DZ Cf = 11.36 ± 3.81 μ V).

4.3.5.2 Amplitudinea undei P1-N2

În ceea ce privește amplitudinile undei P1-N2 nu au existat diferențe în cadrul aceluiași grup pentru MAC 1% și 2%. Șobanii cu DZ, respectiv DZ Cf, au avut amplitudini mult mai mici decât grupul Ctr, respectiv Ctr Cf ($p < 0.05$). Valorile amplitudinilor pentru MAC 1% au fost: amplitudinea medie în grupul Ctr = 18.34 ± 2.32 μ V, amplitudinea medie în grupul Ctr Cf = 17.8 ± 2.71 μ V, amplitudinea medie în grupul DZ = 9.41 ± 1.74 μ V, amplitudinea medie în grupul DZ Cf = 12.04 ± 1.8 μ V. Valorile amplitudinilor pentru MAC 2% au fost: amplitudinea medie în grupul Ctr = 15.70 ± 2.34 μ V, amplitudinea medie în grupul Ctr Cf = 17.01 ± 2.83 μ V, amplitudinea medie în grupul DZ = 8.08 ± 2.79 μ V, amplitudinea medie în grupul DZ Cf = 10.04 ± 3.49 μ V. Administrarea de cafeină nu a produs modificări semnificative ale amplitudinii undei P1-N2, indiferent de profunzimea anesteziei.

4.4 Discuții

Principalul rezultat care se observă din analiza potențialelor evocate vizuale la șobolanul diabetic este modificarea latențelor undelor N1, P1 și N2 în sensul creșterii, sau mai bine zis întârzierii acestora în DZ comparativ cu lotul control. Aceste rezultate exprimă o întârziere a conducerii nervoase prin nervul optic, fiind un semn al prezenței neuropatiei diabetice centrale. Rezultatele acestui studiu se suprapun cu alte studii care au urmărit PEV în DZ⁸⁷. Ghiță și colab. au arătat, la șobolan, că instalarea unei hiperglicemii în mod brusc poate diminua propagarea informațiilor către cortexul vizual, măbind astfel latența PEV⁸⁷, pentru ca apoi aceste modificări să revină spre normal, deși durata de evoluție a patologiei diabetice crește. Totuși, în studiul lor Ghiță și colab. observă că dacă nivelele glicemice se mențin ridicate perioade lungi de timp, până la urmă apare o întârziere ireversibilă și progresivă în transmiterea semnalului vizual⁸⁷. Creșterea latenței în cazul studiului nostru a apărut la două luni de la inducerea diabetului cu

straptozotocină și a fost prezentă atât în cazul unei anestezii superficiale (MAC 1%), cât și mai profunde (MAC 2%).

Studiul de față a constatat și reducerea semnificativă a amplitudinii N1-P1, respectiv P1-N2 la șobolanii diabetici față de cei din lotul control. În literatura există însă și studii, la om, care nu au observat diferențe semnificative în amplitudinea undelor PEV^{90;91}.

Modificarea PEV în diabet poate avea diferite cauze. Studii mai vechi propun durata bolii ca principală corelație cu afectarea retiniană, maculară sau a căilor vizuale în cazul DZ fără asocierea semnelor obiective de retinopatie⁹². Modificările electrofiziologice încep cu afectarea timpurie a conducerii nervoase prin căile optice, continuând apoi cu straturile retiniene interne din maculă și spre final cu straturile retiniene mijlocii și externe⁹³. Ne putem gândi că afectarea PEV în diabet ar putea precede modificările electroretinogramei, investigarea PEV devenind astfel mai utilă în încercarea de a depista modificări nervoase precoce asociate diabetului. În cazul studiului nostru, durata diabetului de două luni la glicemii foarte mari a dus la timpi de latență prelungiți sugerând afectarea nervoasă a căii optice.

Administrarea cafeinei a îmbunătățit semnificativ latența undelor N1 și P1 indiferent de profunzimea anesteziei (MAC 1% sau 2%) la șobolanii diabetici. Latența undei N2 a fost și ea ușor mai mică în urma consumului cronic de cafeină fără să atingă însă valoare semnificativă statistic la șobolanii diabetici. Totuși, administrarea cafeinei la șobolanii diabetici a menținut în limite similare cu grupul control latența undei N2 în cazul MAC 1%, ceea ce ar putea fi considerat un efect pozitiv al consumului de cafeină. Grupul control a avut o reducere ușoară a timpilor de latență în urma administrării de cafeină, fără a avea semnificație statistică, indiferent de gradul de profunzime anestetic.

Din cunoștințele noastre acesta este primul studiu care testează efectul cafeinei asupra PEV în diabetul zaharat. Îmbunătățirea timpilor de latență în cazul șobolanilor diabetici sugerează un efect posibil neuroprotector al cafeinei în diabet. Există studii care au arătat că antagoniștii receptorilor A2A și cafeina au oferit neuroprotecție în câteva modele de boli neurologice cum ar fi: accidentul vascular cerebral, boala Parkinson, traumatismul cerebral și boala Alzheimer. Explicația pentru neuroprotecția dată de receptorii adenozinici ar putea fi controlul neuroinflamației, dacă ținem seama de activitatea receptorilor adenozinici în răspunsul inflamator și de contribuția substanțială a neuroinflamației mediată de citokine și de excitotoxicitatea glutamatului în amplificarea proceselor neurodegenerative⁹⁴.

Studiul electrofiziologic al căilor nervoase vizuale în diabet se poate corela cu modificările sistemului nervos central, oferind astfel informații prețioase asupra impactului DZ în funcționarea SNC. Se știe că neuropatia periferică se corelează cu durata de evoluție a diabetului și cu controlul glicemiei⁹², iar descoperirea de informații din căile nervoase centrale poate arăta prezența neuropatiei centrale cu mult înainte de apariția modificărilor microvasculare asociate retinopatiei diabetice și observate direct la examenul fundului de ochi⁹⁵. De asemenea, studiul PEV ar putea arăta eficacitatea tratamentului urmat de pacient⁹⁶.

În concluzie, creșterea timpilor de latență ai PEV, mai ales pentru N1 și P1, poate fi o manifestare a modificărilor structurale de la nivelul fibrelor mielinizate ale nervului optic sau chiar a celulelor ganglionare retiniene. Investigațiile electrofiziologice pot fi o metodă simplă și neinvazivă care ar putea detecta timpuriu o afectare preclinică dată de diabetul zaharat, îmbunătățind șansele de supraviețuire mai strictă a tratamentului, cât și prognosticul bolii la pacienții diabetici. Aportul moderat de cafeină la pacientul diabetic, pare să aibă un efect benefic asupra modificărilor datorate neuropatiei centrale.

5. Concluzii generale

Cele trei direcții de experimente din studiul doctoral au urmărit modificările neuro-comportamentale apărute în diabetul zaharat indus prin administrare de STZ la șobolanii masculi adulți Wistar. De asemenea, am evaluat efectele administrării cronice de cafeină, într-un model care a încercat să se apropie cât mai mult de consumul uman.

Principalele concluzii ale acestei lucrări de doctorat sunt:

1. Diabetul produce modificări morfologice și funcționale în SNC, scăzând mobilitatea și activitatea locomotorie a șobolanului Wistar. Doze mici-medii de cafeină îmbunătățesc sau cel puțin mențin activitatea locomotorie, oferind un sprijin neuroprotector șobolanului diabetic. În lumina cercetărilor anterioare, rezultatele studiului nostru sugerează cafeina ca blocant al unui număr crescut de receptori A2A în diferite regiuni ale creierului animalului diabetic.
2. Cu cât a trecut mai mult timp de la provocarea diabetului la animalele de experiență, cu atât s-au manifestat mai multe modificări comportamentale: anxietate, depresie, afectări ale memoriei. Aceste modificări pot fi datorate schimbărilor metabolismului cerebral, care a afectat sistemul serotoninergic și adenosinergic. Administrarea cafeinei:
 - scade activitatea locomotorie la lotul de control, dar nu și la lotul diabetic;
 - are efect anxiolitic la șobolanii diabetici;
 - îmbunătățește memoria de lungă durată la ambele loturi.
3. Studiul electrofiziologic al căilor nervoase vizuale în diabet se poate corela cu modificările sistemului nervos central, oferind astfel informații prețioase asupra impactului DZ în funcționarea SNC. Creșterea timpilor de latență ai PEV, mai ales pentru N1 și P1, poate fi o manifestare a modificărilor structurale de la nivelul fibrelor mielinizate ale nervului optic sau chiar a celulelor ganglionare retiniene. Investigația PEV s-a dovedit o metodă simplă și neinvazivă care poate detecta timpuriu o afectare preclinică dată de DZ. Aportul moderat de cafeină în diabet, pare să aibă un efect pozitiv asupra modificărilor datorate neuropatiei centrale, oferind o posibilă neuroprotecție.

În concluzie, acest studiu susține un efect benefic asupra comportamentului și neuropatiei retiniene după administrarea cafeinei în doze mici-medii la șobolanii diabetici. Cercetările viitoare vor trebui să vizeze evidențierea rolului cafeinei asupra comportamentului șobolanilor diabetici tratați cu insulină. De asemenea, studiile viitoare ar trebui să vizeze administrarea de diferite doze de cafeină la șobolanii diabetici în încercarea de a vedea dacă efectul bifazic observat la șobolanii din grupul control apare și la cei diabetici. Următorii pași în înțelegerea mai bună a creierului diabetic și a interacțiunii cafeină-diabet ar fi evaluarea modificărilor balanței receptorilor A1 – A2A la modelele animale cu diabet.

Lucrarea de față este una din puținele care studiază efectele neuro-comportamentale ale administrării cronice de cafeină în DZ. Ea constituie unul dintre primii pași pentru înțelegerea modificărilor neuro-comportamentale în DZ și al efectelor cafeinei în această patologie.

Referințe

- (1) Diabetes Atlas, International Diabetes Federation, 7th edition, 2015.
- (2) Mota M, Popa SG, Mota E et al. Prevalence of diabetes mellitus and prediabetes in the adult Romanian population: PREDATORR study. *J Diabetes* 2015.
- (3) Fagot-Campagna A, Narayan KM, Imperatore G. Type 2 diabetes in children. *BMJ* 2001;322:377-378.
- (4) Bromet E, Andrade LH, Hwang I et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. *BMC Med* 2011;9:90.
- (5) OECD. OECD(2014), *Making Mental Health Count: The Social and Economic Costs of Neglecting Mental Health Care*, OECD Health Policy Studies, OECD Publishing, Paris. 2014.
- (6) National Institute of Health Metrics Evaluation. National Institute of Health Metrics Evaluation, "Global Burden of Disease," 2015, <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>. 2016.
- (7) Chen S, Zhang Q, Dai G et al. Association of depression with pre-diabetes, undiagnosed diabetes, and previously diagnosed diabetes: a meta-analysis. *Endocrine* 2016.
- (8) Roy T, Lloyd CE. Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. *J Affect Disord* 2012;142 Suppl:S8-21.
- (9) Grigsby AB, Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. Prevalence of anxiety in adults with diabetes: a systematic review. *J Psychosom Res* 2002;53:1053-1060.
- (10) Gonzalez JS, Peyrot M, McCarl LA et al. Depression and diabetes treatment nonadherence: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2008;31:2398-2403.
- (11) Baumeister H, Hutter N, Bengel J, Harter M. Quality of life in medically ill persons with comorbid mental disorders: a systematic review and meta-analysis. *Psychother Psychosom* 2011;80:275-286.
- (12) Egede LE, Nietert PJ, Zheng D. Depression and all-cause and coronary heart disease mortality among adults with and without diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:1339-1345.
- (13) Rubin RR, Ma Y, Marrero DG et al. Elevated depression symptoms, antidepressant medicine use, and risk of developing diabetes during the diabetes prevention program. *Diabetes Care* 2008;31:420-426.
- (14) Berge LI, Riise T. Comorbidity between Type 2 Diabetes and Depression in the Adult Population: Directions of the Association and Its Possible Pathophysiological Mechanisms. *Int J Endocrinol* 2015;2015:164760.
- (15) Moulton CD, Pickup JC, Ismail K. The link between depression and diabetes: the search for shared mechanisms. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3:461-471.
- (16) Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006;5:64-74.
- (17) Moheet A, Mangia S, Seaquist ER. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Ann N Y Acad Sci* 2015;1353:60-71.
- (18) Jacobson AM, Musen G, Ryan CM et al. Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *N Engl J Med* 2007;356:1842-1852.
- (19) Ryan CM, Williams TM, Finegold DN, Orchard TJ. Cognitive dysfunction in adults with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus of long duration: effects of recurrent hypoglycaemia and other chronic complications. *Diabetologia* 1993;36:329-334.
- (20) van den Berg E, Reijmer YD, de BJ, Kessels RP, Kappelle LJ, Biessels GJ. A 4 year follow-up study of cognitive functioning in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2010;53:58-65.
- (21) Kanaya, A.M. 2004. Change in cognitive function by glucose tolerance status in older adults: a 4-year prospective study of the Rancho Bernardo study cohort. *Arch. Intern. Med.* **164**: 1327–1333. 2004.
- (22) Cukierman-Yaffe, T., H. Gerstein, J. Williamson, et al. Relationship between baseline glycemic control and cognitive function in individuals with type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors: the action to control cardiovascular risk in diabetes-memory in diabetes (ACCORD-MIND) trial. *Diab. Care*, **2009**, **32**: 221-226. 2009.
- (23) Kivipelto, M., E.L. Helkala, T. Hänninen, et al. 2001. Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: a population-based study. *Neurology* **56**: 1683–1689. 2001.
- (24) Ott, A., R.P. Stolk, F. van Harskamp, et al. 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia—the Rotterdam study. *Neurology* **53**: 1937–1942. 1999.

- (25) Rawlings, A.M., A.R. Sharrett, A.L.C. Schneider, *et al.* 2014. Diabetes in midlife and cognitive change over 20 years: a cohort study. *Ann. Intern. Med.* **161**: 785–U68. 2014.
- (26) de MG, Layton CJ. Therapeutic targeting of diabetic retinal neuropathy as a strategy in preventing diabetic retinopathy. *Clin Experiment Ophthalmol* 2016.
- (27) Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999;51:83-133.
- (28) Fulgoni VL, III, Keast DR, Lieberman HR. Trends in intake and sources of caffeine in the diets of US adults: 2001-2010. *Am J Clin Nutr* 2015;101:1081-1087.
- (29) Yang A, Palmer AA, de WH. Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology (Berl)* 2010;211:245-257.
- (30) Lieberman HR, Marriott BP, Williams C, Judelson DA, Glickman EL, Geiselman PJ *et al.* Intake of caffeine from all sources including energy drinks and reasons for use in US college students. *FASEB J.* 29 (Suppl.):392.1. 2015.
- (31) Ferre S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem* 2008;105:1067-1079.
- (32) Doepker C, Lieberman HR, Smith AP, Peck JD, El-Sohemy A, Welsh BT. Caffeine: Friend or Foe? *Annu Rev Food Sci Technol* 2016;7:117-137.
- (33) Fastbom J, Pazos A and Palacios JM: The distribution of adenosine A1 receptors and 59-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience* **22**:813-826. 1987.
- (34) Svenningsson P, Le MC, Fisone G, Fredholm BB. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol* 1999;59:355-396.
- (35) Moreau JL, Huber G. Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;31:65-82.
- (36) van HB, de Leeuw FE, Weinstein HC, Scheltens P, Biessels GJ. Brain imaging in patients with diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 2006;29:2539-2548.
- (37) Degen C, Toro P, Schonknecht P, Sattler C, Schroder J. Diabetes mellitus Type II and cognitive capacity in healthy aging, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Psychiatry Res* 2016;240:42-46.
- (38) Xu Q, Park Y, Huang X *et al.* Diabetes and risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care* 2011;34:910-915.
- (39) Kotagal V, Albin RL, Muller ML, Koeppe RA, Frey KA, Bohnen NI. Diabetes is associated with postural instability and gait difficulty in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19:522-526.
- (40) Petrou M, Davatzikos C, Hsieh M *et al.* Diabetes, Gray Matter Loss, and Cognition in the Setting of Parkinson Disease. *Acad Radiol* 2016;23:577-581.
- (41) El YM, Ledent C, Menard JF, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. *Br J Pharmacol* 2000;129:1465-1473.
- (42) Fredholm BB, Svenningsson P. Adenosine-dopamine interactions: development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. *Neurology* 2003;61:S5-S9.
- (43) Morelli M, Frau L, Simola N. Alteration in the progression of dopamine neuron degeneration: may caffeine offer new perspective? *Exp Neurol* 2012;237:218-222.
- (44) Lopez-Cruz L, Pardo M, Salamone JD, Correa M. Differences between the nonselective adenosine receptor antagonists caffeine and theophylline in motor and mood effects: studies using medium to high doses in animal models. *Behav Brain Res* 2014;270:213-222.
- (45) Kumar S, Singh R, Vasudeva N, Sharma S. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:9.
- (46) Dunne F, O'Halloran A, Kelly JP. Development of a home cage locomotor tracking system capable of detecting the stimulant and sedative properties of drugs in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:1456-1463.
- (47) Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999;51:83-133.
- (48) Frary CD, Johnson RK, Wang MQ. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *J Am Diet Assoc* 2005;105:110-113.
- (49) Marin MT, Zancheta R, Paro AH, Possi AP, Cruz FC, Planeta CS. Comparison of caffeine-induced locomotor activity between adolescent and adult rats. *Eur J Pharmacol* 2011;660:363-367.

- (50) Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN et al. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 1997;388:674-678.
- (51) Halldner L, Aden U, Dahlberg V, Johansson B, Ledent C, Fredholm BB. The adenosine A1 receptor contributes to the stimulatory, but not the inhibitory effect of caffeine on locomotion: a study in mice lacking adenosine A1 and/or A2A receptors. *Neuropharmacology* 2004;46:1008-1017.
- (52) Svenningsson P, Hall H, Sedvall G, Fredholm BB. Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse* 1997;27:322-335.
- (53) Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA, Daly JW. Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cell Mol Neurobiol* 1993;13:247-261.
- (54) Shi D, Daly JW. Chronic effects of xanthines on levels of central receptors in mice. *Cell Mol Neurobiol* 1999;19:719-732.
- (55) Haider S, Ahmed S, Tabassum S, Memon Z, Ikram M, Haleem DJ. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. *Acta Neurol Belg* 2013;113:35-41.
- (56) Duarte JM, Carvalho RA, Cunha RA, Gruetter R. Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurochem* 2009;111:368-379.
- (57) Duarte JM, Oliveira CR, Ambrosio AF, Cunha RA. Modification of adenosine A1 and A2A receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem Int* 2006;48:144-150.
- (58) Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. *Purinergic Signal* 2005;1:111-134.
- (59) Roy T, Lloyd CE. Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. *J Affect Disord* 2012;142 Suppl:S8-21.
- (60) Grigsby AB, Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. Prevalence of anxiety in adults with diabetes: a systematic review. *J Psychosom Res* 2002;53:1053-1060.
- (61) Badescu SV, Tataru C, Kobylinska L et al. The association between Diabetes mellitus and Depression. *J Med Life* 2016;9:120-125.
- (62) van HB, de Leeuw FE, Weinstein HC, Scheltens P, Biessels GJ. Brain imaging in patients with diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 2006;29:2539-2548.
- (63) Berge LI, Riise T. Comorbidity between Type 2 Diabetes and Depression in the Adult Population: Directions of the Association and Its Possible Pathophysiological Mechanisms. *Int J Endocrinol* 2015;2015:164760.
- (64) Bartoli F, Carra G, Crocamo C et al. Association between depression and neuropathy in people with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Int J Geriatr Psychiatry* 2016.
- (65) Ishizawa K, Babazono T, Horiba Y et al. The relationship between depressive symptoms and diabetic complications in elderly patients with diabetes: Analysis using the Diabetes Study from the Center of Tokyo Women's Medical University (DIACET). *J Diabetes Complications* 2016;30:597-602.
- (66) Crane PK, Walker R, Hubbard RA et al. Glucose levels and risk of dementia. *N Engl J Med* 2013;369:540-548.
- (67) Yamada K, Kobayashi M, Kanda T. Involvement of adenosine A2A receptors in depression and anxiety. *Int Rev Neurobiol* 2014;119:373-393.
- (68) Chen JF. Adenosine receptor control of cognition in normal and disease. *Int Rev Neurobiol* 2014;119:257-307.
- (69) Sartorelli DS, Fagherazzi G, Balkau B et al. Differential effects of coffee on the risk of type 2 diabetes according to meal consumption in a French cohort of women: the E3N/EPIC cohort study. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1002-1012.
- (70) Urzua Z, Trujillo X, Huerta M et al. Effects of chronic caffeine administration on blood glucose levels and on glucose tolerance in healthy and diabetic rats. *J Int Med Res* 2012;40:2220-2230.
- (71) Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007;2:322-328.
- (72) Porsolt RD, Le PM, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977;266:730-732.

- (73) Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;121:66-72.
- (74) Westbrook SR, Brennan LE, Stanton ME. Ontogeny of object versus location recognition in the rat: acquisition and retention effects. *Dev Psychobiol* 2014;56:1492-1506.
- (75) Ozmen O, Topsakal S, Haligur M, Aydogan A, Dincoglu D. Effects of Caffeine and Lycopene in Experimentally Induced Diabetes Mellitus. *Pancreas* 2016;45:579-583.
- (76) Abunasef SK, Amin HA, Abdel-Hamid GA. A histological and immunohistochemical study of beta cells in streptozotocin diabetic rats treated with caffeine. *Folia Histochem Cytobiol* 2014;52:42-50.
- (77) Kagami K, Morita H, Onda K, Hirano T, Oka K. Protective effect of caffeine on streptozotocin-induced beta-cell damage in rats. *J Pharm Pharmacol* 2008;60:1161-1165.
- (78) Pechlivanova DM, Tchekalarova JD, Alova LH, Petkov VV, Nikolov RP, Yakimova KS. Effect of long-term caffeine administration on depressive-like behavior in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Behav Pharmacol* 2012;23:339-347.
- (79) Wayhs CA, Manfredini V, Sitta A et al. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. *Metab Brain Dis* 2010;25:297-304.
- (80) Caletti G, Olguins DB, Pedrollo EF, Barros HM, Gomez R. Antidepressant effect of taurine in diabetic rats. *Amino Acids* 2012;43:1525-1533.
- (81) de MH, de Souza CP, da Silva LM et al. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behav Brain Res* 2014;258:52-64.
- (82) Hughes RN, Hancock NJ. Strain-dependent effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in PVG/c, Long-Evans and Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2016;140:51-61.
- (83) Hughes RN, Hancock NJ, Henwood GA, Rapley SA. Evidence for anxiolytic effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in male and female rats tested with and without bright light. *Behav Brain Res* 2014;271:7-15.
- (84) Sweeney P, Levack R, Watters J, Xu Z, Yang Y. Caffeine increases food intake while reducing anxiety-related behaviors. *Appetite* 2016;101:171-177.
- (85) Bhattacharya SK, Satyan KS, Chakrabarti A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *J Psychopharmacol* 1997;11:219-224.
- (86) Cunha RA, Ferre S, Vaugeois JM, Chen JF. Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des* 2008;14:1512-1524.
- (87) Ghita AM, Parvu D, Sava R, Georgescu L, Zagrean L. Electrophysiological changes in optic neuropathy of streptozotocin induced diabetic rats. *J Med Life* 2013;6:340-348.
- (88) Georgescu EL. Electroretinografia în diabetul zaharat experimental. Lucrare de licență. București. 2014.
- (89) Ghita AM. Modificări electrofiziologice în diabetul zaharat. Lucrare de doctorat. București. 2013.
- (90) Pierzchala K, Kwiecinski J. [Blood flow in ophthalmic artery and visual evoked potentials in diabetic patients]. *Wiad Lek* 2002;55:183-188.
- (91) Verrotti A, Lobefalo L, Trotta D et al. Visual evoked potentials in young persons with newly diagnosed diabetes: a long-term follow-up. *Dev Med Child Neurol* 2000;42:240-244.
- (92) Gupta S, Gupta G, Deshpande V. Visual evoked potential changes in patients with diabetes mellitus without retinopathy. *Int J Res Med Sci.* 2015; 3(12): 3591-3598. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20151405. 2015.
- (93) Parisi V, Uccioli L, Monticone G et al. Electrophysiological assessment of visual function in IDDM patients. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1997;104:171-179.
- (94) Chen JF. Adenosine receptor control of cognition in normal and disease. *Int Rev Neurobiol* 2014;119:257-307.
- (95) Yalrkaya K, Balkan S, Baysal AI. Visual evoked potentials in diabetes mellitus. *Acta Neurol Scand* 1988;77:239-241.
- (96) Sivakumar R, Ravindran G, Muthayya M, Lakshminarayanan S, Velmurughendran CU. Diabetic Retinopathy Analysis. *J Biomed Biotechnol* 2005;2005:20-27.