Archive of SID

بررسی استریولوژیکی تاثیر حاد عصاره قهوه بر روی گلومرول‌های کلیه در موش صحرایی نر

فرزانه دهقاني (Ph.D.)* عبدالرحمن دزفولیان (Ph.D.)** محمدرضا پنجه شاهین(Ph.D.)***
حیات ممبئیني(Ph.D.)**** سیدضیاء الدین‌تابعي(Ph.D.)***** شهلا ظهیري(Ph.D.)******

چکیده

سابقه و هدف : قهوه به عنوان یک نوشیدنی سنتی مورد استفاده مردم بسیاری از کشورهای جهان قرار دارد. این گیاه دارای خاصیت ادرار آور است و سبب گشادی عروق و کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می شود. شواهدی در دست است که نشان می دهد که قهوه سبب کاهش اوره و کراتینین سرم می شود. ولی مصرف بیش از حد آن موجب گلومرولواسکلروزیس در کلیه می گردد. در این بررسی تاثیر عصاره قهوه با غلظت های زیاد بر روی کلیه توسط روش های استریولوژیکی بررسی شد.

مواد و روش‌ها : ۶۰ موش صحرایی نر از نژاداسپراگو-داولی با وزن حدود ۲۳۰-۲۵۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. به گروه شاهد، آب وبه گروه‌های آزمون از عصاره آبی دانه قهوه با غلظت های (کیلوگرم/گرم ۱/۵و۰/۵و۰/۲۵) دو بار در روز خورانیده شد. بعد از ۴۸ ساعت، کلیه حیوان‌ها تحت بی‌هوشی برداشته شد. از هر کلیه قطعاتی به ضخامت 1mm تهیه و از هر قطعه پس از انجام مراحل آماده سازی بافتی یک جفت برش به ضخامت ۵ میکرون و با ارتفاع مشخص تهیه و با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی گردید. جفت برش های تهیه شده توسط اصل دیسکتورفیزیکی مطالعه شد.

یافته ها : بین تعداد گلومرول‌های کلیه در گروه‌های شاهد و آزمون هیچ ارتباط معنی داری وجود نداشت.

استنتاج : به نظر می‌رسد که غلظت زیاد قهوه تاثیری بر روی تعداد گلومرول‌ها ندارد. اما تصمیم گیری قطعی در مورد این نتایج، نیاز به مطالعات گسترده تری بر روی بیماری فوق در الگوهای تجربی و اندازه گیری اوره و کراتینین سرم دارد.

واژه هاي كليدي : استریولوژی، قهوه، گلومرول، دیسکتور، تعداد

* متخصص علوم تشریح و عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی شیراز ✉ شیراز: دانشگاه علوم پزشکی- دانشکده پزشکی- بخش علوم تشریحی
** عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی اهواز *** متخصص علوم تشریح و عضو هیأت علمی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی شیراز
**** عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی اهواز ***** متخصص علوم تشریح و عضو هیأت علمی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی شیراز
****** متخصص علوم تشریح و عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی شیراز

☜تاریخ دریافت:۱۳۸۲/۵/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات:۱۳۸۲/۸/۷ تاریخ تصویب:۱۳۸۲/۱۰/۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

قهوه یک نوشیدنی محرک است که از دیرباز مورد استفاده مردم جهان قرار داشته است. در طب سنتی ایران، جوشانده قهوه، تقویت کننده دستگاه اعصاب مرکزی بوده و موجب افزایش نیروی انقباض ماهیچه قلبی وضربان آن می شود.

در ضمن، نوشیدن آن ادرار را زیاد نموده و اثر ضد عفونی کننده دارد (۱). گزارش‌های علمی زیادی مبنی بر احتمال ارتباط مستقیم بین مصرف قهوه و سلامتی فرد موجود می باشد

قهوه حاوی ترکیبات پلی فنلی است که دارای خاصیت آنتی اکسیدان بوده و موجب کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. مصرف مداوم این نوشیدنی در درمان آسم، سیروز کبدی ، پارکینسون و بیماری‌های قلبی–عروقی مؤثر است و ازتکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند(۳،۲). تاثیر قهوه بر روی کلیه متفاوت است؛ به طوری که سبب افزایش دفع ادرار می‌شود (٤). مصرف مداوم آن از تشکیل سنگ کلیه جلوگیری می کند و سبب کاهش میزان اوره و کراتینین سرم می‌شود(٤،۲ تا ۷).مطالعات نشان می‌دهد که ترکیبات گزانتین دار موجود در قهوه مانند کافئین و تئوفیلین سبب گشاد شدن عروق خونی می‌شود. این عمل به علت تاثیر گذاشتن بر روی گیرنده‌های A1 و A2 موجود در عروق أوران کلیه می‌باشد.(۸). اما مطالعات دیگر نشان می‌دهد که زیاده روی در مصرف قهوه سبب اثرات سوء بر روی کلیه می شود و سختی و مقاومت شریان ها را افزایش می دهد(۹،٤).با توجه به گزارش‌های فوق، بررسی اثرات مفید یا مضر قهوه بر روی کلیه ضروری به‌نظر می رسد. مطالعات نشان می دهد که میزان پالایش کلیه، ارتباط مستقیمی با تعداد و اندازه گلومرول‌ها دارد و غلظت های زیاد قهوه می تواند سبب گلومرولواسکلروزیس شود(۱۰،٤) این امر سرانجام منجر به از بین رفتن گلومرول‌ها می‌شود. بنابراین اندازه گیری تعداد گلومرول‌ها می‌تواند به عنوان معیار مناسبی جهت سلامتی کلیه در نظر گرفته شود. برای اندازه گیری تعداد گلومرول‌ها از روش های استریولوژی استفاده می‌شود. یکی از این روش ها، اصل دیسکتور است که به عنوان یک روش استاندارد طلایی برای شمارش اجزاء، دریک عضو استفاده می شود(۱۱). بنابراین هدف از این بررسی تخمین تعداد گلومرول‌های کلیه توسط روش‌های استریولوژی بعد از مصرف عصاره قهوه در غلظت های مختلف است.

مواد و روش‌ها

تعداد ٦۰ موش صحرایی از نژاد اسپراگو- داولی با وزن حدود ۲۵۰-۲۳۰ گرم انتخاب گردید ودر شرایط استاندارد از نظر رطوبت، درجه حرارت، نور و دسترسی کافی به مواد غذایی وآب در قفس مخصوص حیوانات نگهداری شد. سپس دانه های قهوه از نوع عربی (Caffea Arabica) توسط متخصص گونه‌های گیاهی، شناسایی شد و برای تهیه عصاره مورداستفاده قرار گرفت. دانه‌های قهوه ابتدا به صورت پودر تهیه گردید. سپس ۵۰گرم از این پودر با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردیده و به مدت ٢٤ ساعت در هوای ازاد نگهداری شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب قرار داده شد و پس از صاف نمودن، آب آن توسط دستگاه Rotatory water bath خارج‌گردید. سپس محلول فوق در دسیگاتور قرار داده شد و به وسیله خلا قوی تمام آب آن گرفته شد. بدین ترتیب از دانه گیاه فوق پودری خشک به دست آمد. برای ۵۰ گرم ماده اصلی حدود ٥/٤ گرم پودر عصاره استخراج گردید. از عصاره دانه قهوه غلظت هایی با میزان های(۰،۱/۰،۵/۲۵ و ۱/۵ گرم به ازای هر کیلوگرم تهیه گردید.)تهیه گردید. به منظور انجام این تحقیق حیوانات به ۵ گروه ۱۲ تایی تقسیم

www.SID.ir

Archive of SID

شدند. به گروه شاهد آب و به گروه‌های آزمون ، از عصاره آبی دانه قهوه با غلظت های فوق ۲ بار در روز خورانیده شد. پس از گذشت ٤٨ ساعت حیوانات تحت بیهوشی عمیق با اتر تشریح شده و کلیه راست آن‌ها پس از انجام پرفوزیون عروقی با محلول فرمالین ۱۰٪ برداشته شد. سپس کلیه ها در قالب آگاری قرار داده شد واز هرکلیه توسط ماکروتوم ابداعی بافت شناسی، حدود ۱۲ مقطع به ضخامت ۱ میلی متر تهیه و پس از انجام آماده سازی بافتی از هر مقطع ، یک جفت برش موازی به ضخامت ۵ میکرون با ارتفاع مشخص به دست آمد. ارتفاع دیسکتور یا فاصله بین دو برش موازی تقریبا" مساوی یک سوم یا ۳۰ درصد اندازه کوچک‌ترین گلومرول‌ها تعیین گردید.برای شمارش کل گلومرول‌های کلیه به روش فوق ابتدا دانسیته عددی گلومرول‌ها محاسبه شد . بدین منظور برش های زوج، همزمان با هم بر روی دو میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. بدین ترتیب که یک برش به عنوان شاهد و برش دیگر به عنوان مرجع در نظر گرفته شد. برای شمارش تعدادآن‌ها ازشبکه‌هایی متشکل از تعدادی Frame استفاده شد و برای هر زوج برش حداکثر چهار Frameبه صورت تصادفی منظم انتخاب گردید. روش کار به این ترتیب بودکه درصورت مشاهده گلومرول‌ها در مقطع مرجع و عدم آن در مقطع شاهد، آن گلومرول شمارش می گردید ، مشروط بر آن‌که در خارج از Frame های مزبور شمارش انجام نشده باشد . این عمل در صورتی بود که Frame ها به صورت تصادفی منظم بر روی تصاویر پرتاپ شوند(۱۱)

برای تعیین دانسیته عددی گلومرول‌ها و تعداد کل گلومرول‌ها از فرمول‌های زیر استفاده شد(۱۲).

$$NV=\frac{\Sigma Q}{a(F).\ h.\ \Sigma P}$$ تعداد گلومول‌ها در واحد حجم

$\Sigma Q =$ تعداد گلومرول‌ها در واحد فریم

$a(F) =$ مساحت هر فریم

$h =$ ارتفاع دیسکتور

$\Sigma P =$ تعداد فریم

$Ntotal = NV.Vcortex$ تعداد کل گلومرول‌ها

$NV =$ تعداد در واحد حجم

حجم قشر کلیه با استفاده از اصل کاوالیه و روش شمارش نقطه ای به دست آمد(۱۲).

$Vcortex = \Sigma p.t.a(p)$ حجم قشر کلیه

$\Sigma P =$ تعداد نقاط

$T =$ ضخامت قطعه

$a(p) =$ مساحت هر نقطه

برای اندازه گیری ضریب خطای استریولوژی برای شمارش گلومرول‌ها از فرمول زیر استفاده شد(۱۲).

$$CE_{NV}=\left[\frac{k}{k-1}\left(\frac{(\sum Pcort)^2}{\sum Pcort\times\sum Pcort}+\frac{(\sum Qglom)^2}{\sum Qglom\times\sum Qglom}-2\frac{\sum Pcort\times Qglom}{\sum Pcort\times\sum Qglom}\right)\right]^{\frac{1}{2}}$$

$\Sigma P=$ مجموعه فریم‌هایی‌که با فضای مرجع برخورد داشته‌اند

$\Sigma Q =$ مجموع تعداد گلومرول‌ها

بررسی های آماری با استفاده از نرم افزار Spss انجام شد . به منظور مقایسه تعداد گلومرول‌ها در گروه شاهد و آزمون از روش Mann-withney-u test استفاده شد، نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار و ۹۵ درصد فاصله اطمینان مورد قبول و در سطح $P<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

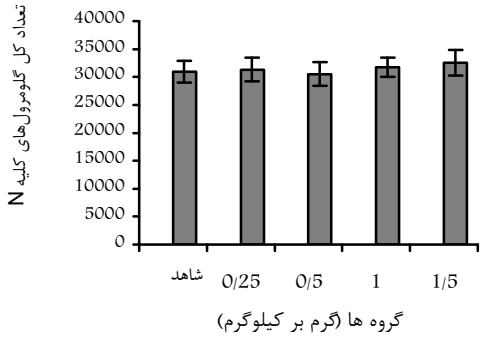
یـــافـــتـــه هـــا

از دیدگاه میکروسکوپ نوری ، تغییرات خاصی در ساختمان گلومرول‌ها و عروق کلیه مشاهده نگردید ولی اغلب گلومرول‌ها دچار بر هم افتادگی شده بودند؛ به‌طوری‌که فضای کپسول بومن ظاهراً وسیع به‌نظر

www.SID.ir

Archive of SID

می‌رسید. خیز و ادم در بعضی ازقسمت های بافت پارانشیمی در نواحی قشری ومرکزی به صورت آشکار مشاهده گردید. این تغییرات وابسته به غلظت عصاره است و با افزایش غلظت، مشخص تر است (تصویر شماره۱).



تصویر شماره۱: خیز و ادم در بافت پارانشیمی کلیه

نتایج حاصل از مطالعات سه بعدی نشان دادکه بین تعداد گلومرول‌ها در واحد حجم کلیه (NV) و تعداد کل گلومرول‌های کلیه (Ntotal) در گروههای آزمون و گروه شاهد اختلاف معنی داری در سطح $P<0.05$دیده نشد (نمودار شماره۱).

-

نمودار شماره۱: مقایسه تعدادکل گلومرول‌های کلیه بین گروه شاهد و گروه های مختلف مورد آزمایش

هر یک از ستون‌های نمایانگر میانگین ± خطای معیاراست.

تعداد کل گلومرول‌های در گروه شاهد ۱۰۶۱۶/۷۷ و در گروه‌های آزمون بین۳۰۵۱۵/۸۷ تا ۳۲۵۶۴/۱۰ تخمین زده شد. بین حجم قشر کلیه در گروه‌های شاهد و آزمون نیز اختلاف معنی داری در سطح $P<0/05$ مشاهده نگردید. حجم قشر کلیه در گروه شاهد ۲۲۰/ و در گروه‌های آزمون بین ۲۰۷/۹۳ تا ۲۱۷/۷۴ میلی‌متر مکعب تخمین زده شد.

اندازه‌گیری ضریب خطای آزمایش در هر دو گروه، پایین بود که این امر نشان دهنده دقت اندازه گیری در روش استریولوژی فوق محسوب گردید (جدول شماره۱).

جدول‌شماره ۱: میزان میانگین وانحراف معیار وضریب خطای تعداد گلومرول‌ها در واحد حجم کلیه وتعداد کل آن و محاسبه حجم قسمت قشری کلیه و ضریب خطای آن

نام‌متغیر فراوانی گروه‌ها	تعدادگلومرول‌ها در واحد حجم کلیه NV	ضریب خطا CE	تعداد کل کلومرول‌های کل N	حجم‌قسمت قشری کلیه (mm3)	ضریب خطا CE
	میانگین± انحراف معیار	میانگین	میانگین± انحراف معیار	میانگین± انحراف معیار	میانگین
شاهد	۱۴۶±۱۵	۰/۰۵	۳۰۹۶۹±۱۹۷۹	۳۲۰±۱۲	۰/۰۳
آزمون ۱	۱۵۳±۱۰	۰/۰۳	۲۱۳۳۸±۲۱۶۴	۲۰۹±۱۰۴	۰/۰۱
آزمون ۲	۱۴۸±۸۵	۰/۰۹	۳۰۵۱۵±۲۱۴۴	۲۱۷±۱۵	۰/۰۵
آزمون ۳	۱۴۵±۱	۰/۰۱	۳۱۷۸۹±۱۷۰۹	۳۱۱±۱۳	۰/۰۱
آزمون ٤	۱۵۷±۱	۰/۰۶	۳۲۵۶٤±۲۲۶۱	۲۰۷±۱۸	۰/۰۲

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

یکی از روش‌های تشخیص نارسایی حاد کلیه، اندازه گیری میزان پالایش گلومرولی است . این اندازه‌گیری به عوامل مختلفی مانند حجم گلومرول‌ها، تعداد گلومرول‌ها و ساختمان لوله‌های کلیه وابسته است. مطالعات نشان می هد که با کاهش تعداد گلومرول‌ها، میزان پالایش کلیه نیز کم می شود (۱۳). دربسیاری از بیماری‌ها ، تعداد گلومرول‌های کلیه کم می شود. بیماری دیابت وابسته به انسولین و فشارخون زیاد می‌تواند موجب کاهش تعداد گلو مرول‌هاشود. Pereira (۲۰۰۱) در یک الگوی تجربی برروی موش صحرایی نشان داد که افزایش فشار خون موجب کاهش تعداد گلومرول‌ها به میزان ۳۳ درصد می شود(۱۵). در تحقیق حاضر تعداد کل گلومرول‌های کلیه در گروه شاهد در یک موش صحرایی۱۹۷۹ ± ۳۰۹۶۹/۷۷ تخمین زده شد. Cahill (۱۹۹۶) در طی تحقیقی تعداد کل گلومرول‌ها در موش صحرایی را در حدود ٤٥٤٥ ± ۳٤۳۷٦ عدد تخمین زد(۱٦). Nyenggard (۱۹۹۳) نیز تعداد کل گلومرول‌های کلیه در این حیوان را ۳۱۰۰±۲٦٥۰۰ وBertram (۱۹۹۲) حدود ۳٦٦۷± ۳۱۷٦٤ عددتخمین زد (۱۸،۱۷). تعداد گلومرول‌های کلیه در موش صحرایی بالغ و سالم توسط محققین مختلف و به‌وسیله روش های متفاوت بین ٤٤۰۰۰-۲٤۰۰۰ عدد محاسبه گردید (۱۹). به‌نظر می رسد که اختلاف در تعداد گلومرول‌ها در موش صحرایی مربوط به جنس و نژاد حیوان باشد.Deway (۱۹۹٦) نشان دادکه نژادهای مختلف موش دارای تعداد متفاوتی گلومرول هستند(۲۰). احتمال دیگری که مطرح می شود این است که اختلاف در تعداد گلومرول‌های کلیه در یک حیوان بالغ می تواند مربوط به مراحل آماده سازی بافتی باشد اما از آن‌جا که در این تحقیق از روش دیسکتور برای شمارش تعداد گلومرول‌ها استفاده شد واین روش تحت تاثیر چروکیدگی در حین مراحل آماده سازی بافتی قرار نمی‌گیرد فرضیه فوق منتفی می گردد(۲۱). نتایج این بررسی همچنین نشان داد که غلظت های مختلف عصاره قهوه هیچ تا ثیری برروی تعداد کل گلومرول‌های کلیه نسبت به گروه شاهد نداشت.هر چند Tofovic (۲۰۰۲) نشان داد که مصرف زیادقهوه سبب اسکلروزه شدن گلومرول‌ها می‌شود(٤). Mahmud (۲۰۰۱) نیز اعلام نمود که زیاده روی در مصرف قهوه سبب سختی شریان ها و افزایش مقاومت عروقی می‌شود(۹). بنا براین احتمال داده می شود که با افزایش غلظت عصاره قهوه، مقاومت عروقی زیاد شده و شرایط برای اسکلروزه شدن، آتروفی و از بین رفتن گلومرول‌ها فراهم می‌شود. اما همان‌طور که در این تحقیق مشاهده گردید، غلظت های در نظر گرفته شده نتوانست تعداد گلومرول‌ها را کاهش دهد. اما احتمال داده می شود که با افزایش غلظت عصاره، تعداد گلومرول‌ها کم شود، زیرا این ساختمان‌ها در بسیاری از نواحی دچار چروکیدگی شده بودند. برای رسیدن به یک نتیجه قطعی نیاز به انجام روش‌های استریولوژی برای اندازه گیری حجم گلو مرول‌ها است.

www.SID.ir

Archive of SID

فـهـرست مـنـابـع

۱. جزایری غیاث الدین. زبان خوراکیها. چاپ چهارم. تهران: انتشارت سپهر، ۱۳۵۹ : صفحات ۲۲۳-۲۲۲.

2. Richelle M, Tavazzi I, Offord E. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyohenolic beverages (coffee, cocoa, tea) prepared per cup serving. ***J Argic Food Chem.*** 2001; 49(7): 3438-42.

3. Mukhopadhyay S, Poddarr MK. Caffeine inhibits the development of Ehlrich ascites carcinoma cells in female mice. ***Indian J Exp Biol***. 2001; 39(8): 735-41.

4. Tofovic SP, Kost CK, Jackson EK, Bastachy SI. Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, ZSF1 (Fa Facp) rats. ***Kidney Int***. 2002; 61(4): 1433-44.

5. Curhan GC. Prospective study of beverage use and the risk of kidney stones. ***American Journal of Epidemiology.*** 1996; 143:240-247.

6. Colussi G, De Ferrari ME, Brunati C, Civati G. Medical Prevention and treatment of urinary stones. ***J Nephrol.*** 2000; 13(3): 565-70.

7. Burdan F, Siezieniewska Z, Urbanowicz Z. Combined effects of acetaminophen, isopropylantipyrine and caffeine on pregnant and nonpregnant liver. ***Hum Exp Toxicol.*** 2001; 20(11): 569-75.

8. Richter A, Hammann M. Effect of adenosine rceptor agonists and antagonists in a genetic animal model of primary paroxsmal dystonia. ***Br J Pharmacol.*** 2001; 134(2): 343-52.

9. Mahmud A, Feely J. Acute effect of caffeine on atrial stiffness and aortic pressure waveform. ***Hypertension***. 2001; 38(2); 227-31.

10. Zeier M, Schonherr R, Amann K, Ritz E. Effect of testosterone on glomerular growth after uninephrectomy. ***Nephrol Dial Transplant.*** 1998; 13(9): 2234-40.

11. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV and Vanvelzen D. Human interauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. ***Lab Invest.*** 1991; 64: 777-784.

12. Howard CV,Reed MG. Unbiassed ***Stereology: Three-Dimensional Measurment in Microscopy***. 1rd ed. New York City. Bios Scientific; 1998.

13. Bendsten TF, Nyengaard JR. Unbiased estimation of particle number using Sectǒn historical perspectiv with Special reference to the stereology of glomeuli. ***J Micros.*** 1989; 153(1): 93-102.

14. Bilous Rw, Mauer SM, Sutherland DER, Steffes Mu. Mean glomerular volume and volume and rate of development of diabetic nephropathy. ***Diabetes***. 1989; 38:1142-47.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Pereira Lm, Manbarim-de-Lacerda CA. Glomerular profile numerical density per area and mean glomerular volume in rats submitted to nitric oxide synthase blockade. ***Histol Histophatol.*** 2001; 16(1): 15-2.
16. Cahill MM, Ryan GB, Bertram F. Biphasic glomerular hypertrophy in rats administered puromycin aminonucleoside. ***Kidney Int.*** 1996; 50:768-775.
17. Nyengaard JR. Number and dimension of rat glomerular capillaries in normal development and after nephrectomy. ***Kidney Int***. 1993; 43(5): 1049-56.
18. Bertram JF, Soosaipillai MC, Ricardo SD, Ryan GB. Total number of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. ***Cell Tissue Res.*** 1992; 270(1): 37-45.
19. Neyengaard JR, Bendsten TF, Christensen S, Ottonsenp The number and size of glomerular in long-Term Lithium-Induced nephropathy in rats. ***APMISS*** 1994; 102: 59-6-51.
20. Deway GC, Elias H, Appel KR. Stereology of the renal corpuscles of Desert and Swamp Deermice. ***Nephron***. 1996; 3: 352-365.
21. Marcussen N. The double dissector: Unbias stereological estimation of the number of particles inside other particles. ***J Microsc.*** 1992; 165(3): 417-26.

www.SID.ir