Evaluation of inhibitory effect of caffeine on bone morphogenesis in pregnancy in a model of rat embryos

Zarei L., PhD[1], Moloodi-Tapeh M., MSc[2]
1. Assistant Professor, Department of Anatomical Science, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences ,Khorramabad, Iran.
2. Instructor, Department of Nursing, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran. (Corresponding Author), Tel:+44-3343745, moloody81@yahoo.com

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017

ABSTRACT

Background and Aim: High intake of caffeine and its side effects have attracted attention. Caffeine used by pregnant and breast-feeding women can enter the baby's body through placenta and milk. There have been many studies on the effects of caffeine on bone tissue with conflicting results. The purpose of this study was to assess the effects of caffeine on fetal rat femur bone.

Material and Methods: Fetuses of female N-MRI rats were selected and divided into control (n=84) and caffeine treated (n=89) groups. We selected randomly 4 fetuses of every rat, one for skeletal abnormalities, one for evaluation of femur bone, the third and 4th fetuses were used for histological examination (H & E staining and Alcianblue-Alizarin R/S), and morphometric and biochemical studies respectively.

Result: According to the findings of this study, fetal weights, rate of bone formation in the femur bone, concentration of phosphorus, zinc, magnesium and calcium in femur as well as the length of ossified bone and total area of the femur bone in the treatment group showed a significant decrease. Also we found a significant decrease in femoral bone length. Periosteum area/total area ratio in the cross section showed a slight increase in the treatment group which was not significant.

Conclusion: According to the results of this study, caffeine can cause detrimental effects on bone formation and factors such as duration, doses and time of consumption of caffeine can influence the occurrence of anomalies in the fetus.

Key words: Caffeine, Fetus, Bone formation, Histopathology.

Received: Aug 4, 2016 **Accepted:** Jan 25, 2017

Archive of SID

www.SID.ir

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / خرداد و تیر ۱۳۹۶/ ۳۱-۲۱

بررسی اثر مهارکنندگی کافئین در دوران بارداری برروی مورفوژنز استخوان ها در جنین موش صحرایی

لیلا زارعی [۱]، **مونس مولودی تپه** [۲]

۱. استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۲ . مربی، گروه پرستاری ومامائی، واحدارومیه، دانشگاه آزاداسلامی، ارومیه، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت: ۰۴۴-۳۳۴۳۷۴۵۰، moloody81@yahoo.com

چکیده

مقدمه: مصرف بالای کافئین و عوارض آن امروزه بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد. کافئین مصرف شده توسط مادران حامله و شیر ده بدون هیچ گونه سدی از جفت گذشته و حتی از شیر مادر هم وارد بدن نوزاد می شود در این راستا نیز تحقیقات فراوانی بر روی اثرات کافئین بر بافت استخوانی صورت گرفته و نتایج متناقضی بدست آمده است در نتیجه بررسی اثرات کافئین بر جنین ها بسیار اهمیت پیدا خواهد کرد.برای این منظور،اثر کافئین بر استخوان سازی فمور در جنین موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: رت های ماده از نژاد N-MRI انتخاب و بعد از حاملگی به دو گروه کنترل و تیمار با کافئین تقسیم شدند. ۸۹ جنین از گروه درمان شده با کافئین و ۸۴ جنین از گروه کنترل انتخاب شدند از هر رت مادر چهار جنین به صورت تصادفی انتخاب شد که یکی برای برسی ناهنجاری های اسکلتی ،جنین دوم برای برسی ناحیه فمور و جنین سوم و چهارم هم به ترتیب برای مطالعات هیستوپاتولوژی (رنگ آمیزی H&E و Alcianblue-Alizarin R/S)، مورفومتری و بیوشیمیایی (تخمین مواد) ناحیه فمور انتخاب شده و نتایج حاصل با آزمون واریانس یکطرفه و تست توکی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که وزن جنین ها، میزان استخوان سازی در فمور، غلظت املاح فسفر، روی، منیزیم و کلسیم در استخوان فمور و همچنین طول قسمت استخوانی شده و مساحت کلی فمور در گروه تیمار کاهش معنی داری را نشان داد به طوری که حتی در گروه تیمار طول استخوان فمور نیز کاهش معنی داری داشت. مساحت پریوست در برش عرضی در دوگروه مورد مطالعه حاکی از کاهش مختصر هر دو در گروه تیمار بوده و همچنین مقایسه نسبت مساحت پریوست به مساحت کل در برش عرضی حاکی از افزایش مختصر در گروه تیمار دارد که معنی دار نبود.

نتیجه گیری: با توجه به مطالعه حاضر، می توان به این نتیجه رسید که کافئین بر روی استخوان سازی اثرات زیان‌آوری داشته و البته عواملی همچون طول دوره، دوز و زمان مصرف بر وقوع انواع ناهنجاری ها در جنین تاثیر دارد.

کلمات کلیدی: کافئین، جنین، استخوان سازی، هیستوپاتولوژی

وصول مقاله:۹۵/۵/۱۳ اصلاحیه نهایی:۹۵/۱۰/۵ پذیرش:۹۵/۱۱/۵

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017

مقدمه

انسان ها به طور روزمره و در تمام مراحل زندگی خود در حال مصرف مواد متیل گزانتینی هستند که کافئین یکی از این ترکیبات می باشد کافئین یک ترکیب آلکالوئیدی است که به وفور در چای، قهوه، انواع شکلات ها و انواع نوشابه ها وجود دارد و امروزه به مقدار زیادی از دانه های سبز قهوه به طریق شیمیایی سنتز و خالص سازی می شود (۱). امروزه ۵۰% مصرف کافئین به شکل قهوه یا چای بوده و میزان مصرف آن برای یک فرد بالغ حدود۲۰۰ میلی‌گرم در روز می‌باشد که مصرف بیش از حد آن می تواند برای سلامت افراد مضر باشد. به دلیل اثرات زیان باری که در تحقیقات صورت گرفته بر روی کودکان و زنان باردار مشخص شده، توصیه می شود که در این قشر از افراد البته میزان مصرف آن از یک میلی گرم در روز بیشتر نشود چرا که باعث مشکلات متابولیسمی می‌شود (۳و۲).

کافئین به سرعت از طریق دهان، رکتوم و تزریق زیر جلدی جذب شده و در خون به پروتئین های پلاسما و عمدتاً آلبومین متصل می‌شود که بعد از ورود به سلول ها به طریق انتشار ساده به سایر سلول ها انتشار یافته و در طی متابولیسم خود به مشتقات متیل گزانتین تبدیل می شود (۴). مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهند که ترکیب کافئین توانایی بالایی در مهار فعالت آنزیم فسفودی استراز (افزایش چشمگیر انرژی سلول)، تداخل در سوخت و ساز کلسیم، مهار فعالیت مونوآمین اکسیدازها (عدم تجزیه کاتکول آمین ها) داشته (۵) و نهایتا به عنوان آنتاگونیست با رسپتور آدنوزین (مهار سنتز DNA) باعث تغییر فرآیند های متابولیکی سلول می گردد (۶).

در مطالعاتی که بر روی انسان و سایر موجودات انجام شده است مشخص شده است که مافئین می تواند از سد خونی جفت عبور کرده و به جنین برسد (۷). طی مطالعه ایی که در سال ۱۹۶۰ صورت گرفته متوجه شده اند که تزریق ۲۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم به موش های باردار باعث ایجاد شکاف کام و لب و نقص‌هایی در انگشتان می‌شود بعد از این مقاله صدها مقاله به بررسی اثرات کافئین پرداختند و نشان دادند که دوزهای حاد می توانند باعث ایجاد ناهنجاری در جنین و نوزادان شده و می تواند حتی به عنوان عامل سرطان مطرح شده و ناهنجاری های مادرزادی را در پی داشته باشد (۱۰ ۸).

خطر شکستگی استخوان ها و نیز استئوپورز را در افرادی که کافئین بیش از اندازه مصرف می کنند، افزایش می دهد که توجیه استئوپروز با دفع ادراری کلسیم به واسطه کافئین را می توان گفت (۱۱) البته بسیاری از دانشمندان اظهار کرده‌اند که مصرف متوسط کافئین هیچ اثری بر دانسیته کل استخوانی نداشته و با مصرف مواد غذایی محتوی کلسیم کافی می‌توان احتمال خطر بالقوه کافئین را از بین برد (۱۲).

امروزه به نظر می رسد که با مصرف بالای محصولات کافئینی لزوم بررسی ها و مطالعات بیشتر در مورد اثرات احتمالی این ترکیبات را بیشتر می‌کند. لذا در مطالعه حاضر سعی بر آن شده که با بکارگیری یک دوز مناسب از ترکیب کافئین اثرات احتمالی آن را بر روی جنین ها برآورد نماییم چرا که تا کنون مطالعات زیادی در این زمینه صورت نگرفته و آسیب کافئین در استخوان سازی جنین هایی که مادرشان کافئین مصرف کرده باشند مشخص نشده است و در این مطالعه سعی شده است که با بررسی ساختارهای آناتومی اسکلت جنین و همچنین بررسی تغییرات املاح استخوان در گروه‌های تیمار تغییرات مورد نظر را مورد بررسی قرار دهیم.

روش بررسی

حیوانات و شرایط آزمایش:

این مطالعه از نوع مداخله‌ای- تجربی می باشد که درآن ۴۰ سر موش های صحرایی نژاد N-MRI با وزن ۱۸۰ تا ۲۵۰ گرم از موسسه رازی ایران تهیه شده و در حیوان خانه به مدت دو هفته قبل از شروع آزمایش برای آداپتاسیون در قفس های مناسب و در محدوده دمایی ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتیگراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017

نگهداری شدند و دسترسی به آب و غذا به صورت نامحدود بود. به ازای هر دو سر رت ماده یک سر رت نر در ساعت هشت شب تا هشت صبح فردا در قفس ها قرار داده شده که برای تایید جفت گیری، اسمیر از واژن تهیه و بعد از مشاهده اسپرم، رت های ماده از قفس جدا شده و به عنوان روز صفر حاملگی در نظرگرفته شدند.

گروه های مورد مطالعه:

رت های حامله ازروز هشتم در دوگروه تقسیم بندی شدند:

گروه تیمار: در این گروه محلول کافئین از روز ۸ تا روز ۲۲ هر روز یک بار به رت های ماده از طریق لوله معدی گاواژ شد. میزان کافئین تجویزی را با دوز ۲ میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن با حجم نهایی نیم سی سی بود.

گروه شاهد: در این گروه فقط نیم سی سی سرم فیزیولوژیک هر روز یک بار از روز ۸ تا ۲۲ گاواژ شد.

گاواژ حیوانات هر روز ۱۰ تا ۱۱ صبح انجام شده و دوز کافئین بر اساس مطالعات قبلی انتخاب گردید.

مطالعات آناتومی و مورفولوژیکی :

در روز ۲۲ بعد از بیهوشی رت های باردار توسط کلروفرم بیهوش شده و ۸۹ جنین از گروه کافئینه و ۸۴ جنین از گروه کنترل پس از خروج به وسیله سزارین توسط دستگاه توزین وزن شدند و سپس از نظر وجود ناهنجاری های ظاهری مورد برسی قرار گرفتند.

از هر رت مادر چهار جنین به صورت تصادفی انتخاب شد که یکی از آنها برای بررسی ناهنجاری های اسکلتی، جنین دوم برای بررسی ناحیه فمور و جنین سوم و چهارم هم به ترتیب برای مطالعات هیستوپاتولوژی و بیوشیمیایی ناحیه فمور انتخاب شدند.

بررسی ناهنجاری های اسکلتی با رنگ آمیزی دوگانه Alcianblue-Alizarin R/S :

رنگ آمیزی دوگانه اسکلت نوزاد برای غضروف و استخوان یک روش بسیار ارزشمند برای ارزیابی ناهنجاری های اسکلتی در حیوانات آزمایشگاهی است که Alcianblue نواحی غضروفی و Alizarin R/S برای رنگ آمیزی نواحی استخوانی جهت توصیف جزئیات تکاملی در استخوان بکار رفته است. در این روش بعد از جداکردن پوست و خالی کردن احشا آنها را در طول شب در سدیم کلرید چهار درصد قرار داده و سپس عضلات قسمت پشت و گردن را با استریومیکروسکوپ برمیداریم وسپس به ترتیب ۲۴ ساعت در رنگ اسیدی سپس ۶ ساعت در اتانول ۹۶ درصد و در نهایت با قرار دادن در رنگ بازی به مدت ۳۰ دقیقه بافت را رنگ شد و برای تثبیت نهایی از محلول حاوی ۷۰ درصد اتانول به همراه محلول ۷۰ و ۳۰ درصد گلیسرین استفاده شد. جنین ها بعد از رنگ آمیزی از نظر مراکز استخوان سازی استرنوم و اکسی‌پیتال و همچنین ناهنجاری دنده مهره ای یا ناهنجاری انگشتان، طول فمور ومیزان استخوانی شدن اندام ها در زیر استریومیکروسکوپ با گروه شاهد مقایسه شدند.

فمور سمت چپ نیز بعد از رنگ آمیزی به روش بالا در زیر استریومیکروسکوپ و با استفاده از گریتاکولیس و کولیس دیجیتال (مدل Electronic digital caliper YATO) بررسی و طول فمور از تروکانتر بزرگ تا اپی کوندیل میانی، طول قسمت استخوانی شده و قطر قسمت midshaft اندازه گیری و ثبت شد.

اندازه گیری عناصر روی، کلسیم، منیزیم و فسفر:

برای سنجش سه عنصر Ca، Mg و Zn از روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی (Shimadzu) AA-6300 استفاده شد بدین ترتیب که فمور جنین ها بعد از خشک کردن و توزین در یک میلی لیتر اسید نیتریک خالص حل شد و به مدت دو ساعت در بن ماری ۸۰ درجه سانتیگرد حرارت دید و بعد از حرارت حجم را با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسید. بعد از تهیه محلول های مورد نظر برای سنجش هر عنصر ابتدا منحنی استاندارد هر عنصر رسم و محلول ها طبق پروتوکل دستگاه برای تعیین جذب خطی عناصر به کار گرفته شد که با استفاده از این منحنی استاندارد مقدار عناصر نمونه تعیین شد.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017

برای اندازه گیری فسفر نیز از دستگاه کروماتوگراف (Metrohm) استفاده گردید که همانند روش بالا بعد از تهیه غلظت های مشخص و تعیین سطوح زیر منحنی نمونه های مجهول برای تعیین غلظت به دستگاه تزریق شد.

بررسی هیستوپاتولوژی نمونه ها:

معمول ترین روش برای رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی رنگ آمیزی هماتوکسیلین -ائوزین می باشد. در این روش هسته ها به رنگ آبی و سیتوپلاسم و بافت همبندی به رنگ صورتی تا قرمز در می آیند. بعد از خارج کردن بافت ها و شستشوی آنها با نرمال سالین مراحل پارافین زدایی و آبدهی با استفاده از گزیلن و الکل انجام شد. در مراحل بعدی، بعد از رنگ آمیزی با رنگ های هماتوکسیلین و ائوزین مراحل آبگیری انجام شده و برای شفاف سازی هم از گزیلول استفاده گردید.

مطالعات مورفومتری:

پس از تهیه مقاطع از Midshaft استخوان فمور سمت چپ، برای تعیین مساحت کل مقطع در برش عرضی فمور، مساحت پریوست و بدست آوردن نسبت این دو نمونه ها به روش زیر آماده شدند. ابتدا از تمام طول فمور برش های 8µm تهیه شد و از ده برش وسطی برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین و Alizarin R/S استفاده شد که نمونه ها پس از عکس برداری با دوربین دیجیتال Canon مدل Power shot S40 همه تصاویر به کامپیوتر منتقل و مساحت مقاطع از طریق برنامه Smart skech (InTegraph& partners) محاسبه و مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

آنالیز آماری نتایج

داده های بدست آمده با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه و تست توکی و با کمک نرم افزار SPSS V20 مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت.سطح** P <۰/۰۵ و***P<۰/۰۰۱ معنی دار در نظر گرفته شد و داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی های مورفولوژیکی و آناتومی جنین ها: بعد از سزارین جنین ها در روز ۲۲، تمامی جنین های گروه شاهد سالم بوده و کاهش مختصری در تعداد جنین ها وجود داشت که این کاهش به صورت معنی دار نبوده ولی در گروه تیمار از کل جنین های بدست آمده ۸% مرده بدنیا آمدند و علائمی همچون هماتوم در ناحیه دست، پا، دهان و صورت در جنین های مرده دیده شد (شکل۱) همچنین قطع شدگی ناحیه دمی در ۸% از جنین های گروه دریافت کننده کافئین مشاهده گردید. همچنین بررسی های وزنی، کاهش معنی داری (P<۰/۰۵) را در در جنین های حاصل از گروه تیمار میزان وزن جنین ها نسبت به گروه شاهد نشان دارد (جدول۱).

تاثیرات کافئین بر استخوان فمور: مطالعات نشان داد تجویز کافئین باعث گردیده طول قسمت استخوانی شونده در گروه دریافت کننده کافئین کاهش معنی دار در سطح P<۰/۰۵ نسبت به گروه شاهد داشته باشد همچنین تجویزکافئین باعث کاهش معنی داری (P<۰/۰۵) در طول فمور نسبت به گروه شاهد شده است (جدول-۱). ولی اندازه‌گیری عرض قسمت میانی دیافیز توسط کولیس و گریتاکولیس در زیر استریومیکروسکوپ تفاوت معنی داری را از نظر پهنای استخوان فمور بین دو گروه شاهد و تیمار نشان نداد ولی اندازه گیری مساحت کل مقطع عرضی فمور توسط برنامه کامپیوتری مربوطه نشان دهنده کاهش معنی دار(P<۰/۰۵) مقطع عرضی این ناحیه در گروه تیمار بود (شکل۲).

نتایج بررسی های هیستولوژیکی : مطالعات سریالی میکروسکوپی از مقاطع پروگزیمال فمور تا انتهای دیستال فمور نشان داد پس از اتمام اپی فیز فوقانی استخوان به مقطع غضروفی رسید که تا اپی‌فیز تحتانی ادامه داشته و بلافاصله بعد از اتمام نمای غضروفی و در قسمت دیافیز مقاطع به ترتیب به این شکل دیده شدند: پریوست که از دولایه فیبریلار و سلولار تشکیل شده اطراف بافت را در مقطع

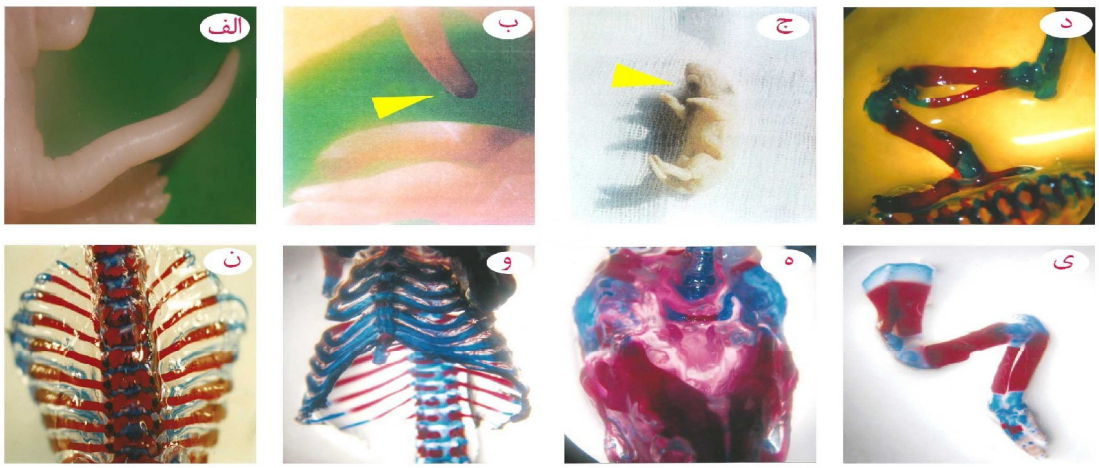
Archive of SID

www.SID.ir

عرضی پوشانده و در طرف داخلی آن تیغه های استخوانی تیغه های استخوانی به صورت شعاعی و نامنظم قرار داشت و در لابه لای آن بافت همبند و عروق مشاهده شد که کانال مغز استخوان در آنها تشکیل نشده بود، که این نماها در گروه تیمار و شاهد ظاهرا با شکلی یکسان دیده می شوند که درشکل۳ نیز این مراحل از الف تا ی نامگذاری شده است .

همچنین با مطالعات مورفومتری مساحت کل مقطع عرضی بافتی، مساحت پریوست و نسبت مساحت پریوست به مساحت کل حساب شد (بر حسب میلی متر مربع) که داده های حاصله به در جدول ۲ آورده شده است. مقایسه پهنای فمور در وسط ناحیه دیافیز و همچنین مقایسه مساحت پریوست در برش عرضی در دوگروه مورد مطالعه حاکی از کاهش مختصر هر دو در گروه تیمار را دارد . همچنین مقایسه نسبت مساحت پریوست به مساحت کل در برش عرضی حاکی از افزایش مختصر در گروه تیمار دارد که معنی دار نبود (جدول۲).

نتایج حاصل از بررسی مقایسه ای عناصر در استخوان فمور: بررسی میزان کلسیم و منیزیم در گروه های تیمار و شاهد نشان داد که این عناصر در گروه های تیمار کاهش معنی داری در سطح $P<۰/۰۰۱$ نسبت به گروه شاهد دارند. بررسی غلظت روی و فسفر در دو گروه مورد بررسی نشان داد مقدار این عناصر در گروه های تیمار در سطح معنی دار $P<۰/۰۵$ دچار کاهش شده است (جدول۳).



شکل۱: بررسی ساختارهای مورفولوژیکی و آناتومی در جنین ها. نتایج حاکی از این است که در گروه تیمار (شکل ۱-ب و ۱-ج) دم بریدگی و هماتوم بر خلاف گروه کنترل (شکل ۱-الف) به وضوح قابل مشاهده است و همچنین بررسی ها نشان داد که هیچگونه بد شکلی ای در اسکلت اندام قدامی (د)، قفسه سینه (ن)، ستون مهره هاواسترنوم (و)، اسکلت جمجمه (ه) و اسکلت اندام قدامی (ی) در گروه های کافئینه دیده نشده است.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017
www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017

جدول۱. تاثیر کافئین بر مورفولوژی و آناتومی جنین ها: نتایج نشان دهنده تاثیر چشمگیر کافئین بر روی استخوان فمور و شاخص های طولی طولی قسمت های مختلف آن می باشد به طوری که این کاهش در گروه کنترل در سطح معنی داری $p<0.05$** قرار دارد.

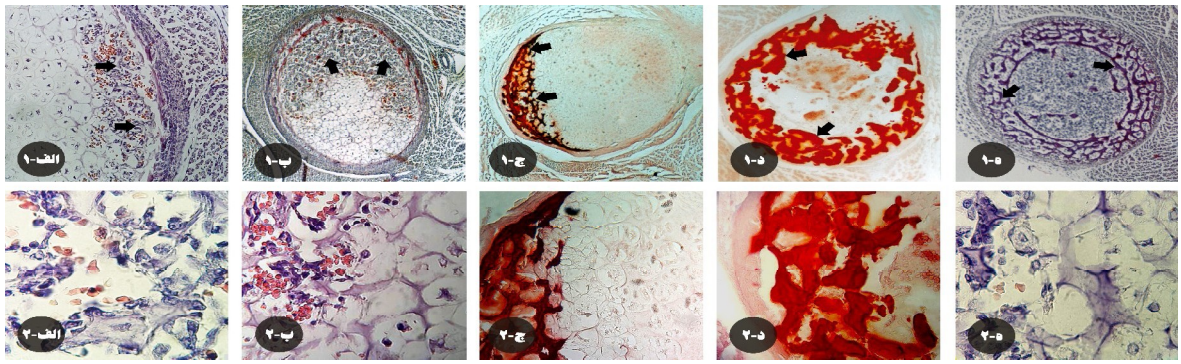
	کنترل	تیمار	سطح معنی داری
درصد تاثیر کافئین بر ناهنجاری های ماکروسکوپی	۸ درصد مرگ ۶ درصد هماتوم ۸ درصد دم کوتاه	صفر	
تاثیر کافئین بر وزن جنین ها (gr)	۵/۸ ± ۰/۰۸	۵/۱ ۰۲/۰±	P<۰/۰۵**
تاثیر کافئین بر طول استخوان فمور (mm)	۶/۵ ± ۰/۰۸	۵/۲ ± ۰/۰۳	P<۰/۰۵**
تاثیر کافئین بر طول بر طول قسمت استخوانی شده فمور (mm)	۳/۵ ± ۰/۰۴	۳/۲ ± ۰/۰۳	P<۰/۰۵**
تاثیر کافئین بر مساحت کل فمور در برش عرضی (mm^2)	۰/۹ ± ۰/۰۴	۰/۷۴ ± ۰/۰۲	P<۰/۰۵**

شکل۲: استخوان فمور سمت چپ در گروه کافئینه، رنگ آمیزی آلیسین بلو-آزارین رد اس. در گروه کافئینه و کنترل طول کل و طول قسمت استخوانی شده فمور سمت چپ با استفاده ار کولیس و گریتاکولیس در زیر استریومیکروسکوپ اندازه گیری شد.

جدول ۲. مطالعات مورفومتری: در این مطالعات با وجود کاهش در مسحت کل مقطع و مساحت پریوست ولی اختلاف معنی داری بین این دو مشاهده نشده است.

	کنترل	تیمار
مساحت کل مقطع در برش عرضی	۰/۸۷۲±۰/۰۲۶۸	۰/۸۳۹ ±۰/۰۳۸۵
مساحت پریوست	۰/۱۲۴۱ ± ۰/۰۰۹	۰/۱۲۲۶ ۰±/۰۰۷۴
نسبت مساحت پریوست به مساحت کل مقطع در برش عرضی	۰/۱۳۷۶ ± ۰/۰۰۶۹	۰/۱۵۰۲ ± ۰/۰۰۷

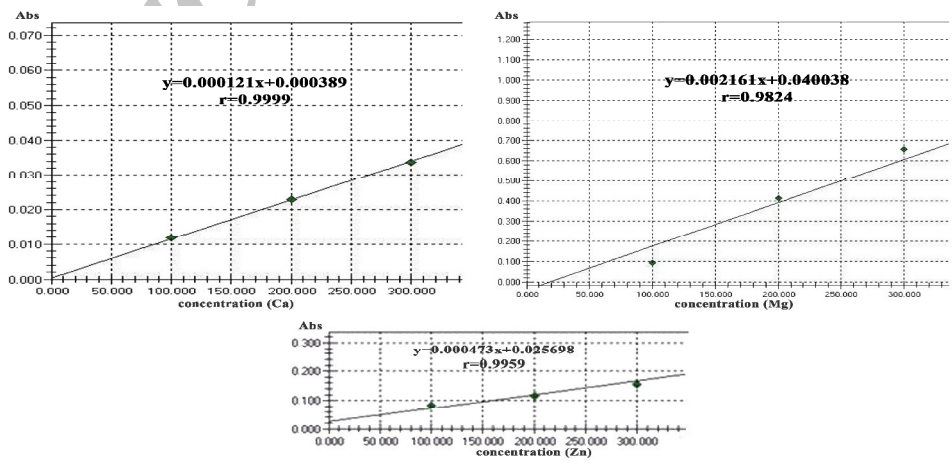
www.SID.ir



شکل۳: تکامل ترتیبی با دو بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ مراحل تشکیل حلقه کامل استخوان از اپیفیز تا ناحیه میانی دیافیز با رنگ آمیزی H&E و آلیزارین رد را نشان میدهد فلش ها نشان دهنده تیغه های استخوانی می باشد (فلش مشکی) و در شکل (د) عدم تکمیل حلقه استخوانی با فلش سیاه رنگ مشخص شده است. بزرگنمایی در تصاویر ردیف بالا ۴۰ بوده و در تصاویر ردیف پائین ۱۰۰ می باشد.

جدول ۳. غلظت املاح در قسمت استخوانی شونده فمور نشان می دهد میزان کاهش قابل توجه املاح در گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل در سطح معنی داری ***P< ۰/۰۰۱ و **P<۰/۰۵ می باشد. نمودار۱ استاندارد برای جذب اتمی سه عنصر که با روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی روش سنجیده شده اند را نشان می دهد.

	کنترل	تیمار	سطح معنی داری
غلظت کلسیم (mg)	۰/۰۳۴ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۲۴ ± ۰/۰۰۲	P<۰/۰۰۱***
غلظت منیزیم (mg)	۰/۰۰۵ ± ۰/۰۰۲	۰/۰۰۴ ± ۰/۰۰۳	P<۰/۰۰۱***
غلظت روی (mg)	۱/۷۵ ± ۰/۹	۰/۷ ± ۰/۲	P<۰/۰۵**
غلظت فسفر (µg)	۰/۰۲۵ ± ۰/۰۰۴	۰/۰۱۳ ± ۰/۰۰۳	P<۰/۰۵**



نمودار۱. استاندارد جذب اتمی سه عنصر که باروش اسپکتروفتومتری جذب اتمی سنجیده شده است.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017
Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017

بحث

هدف این مطالعه نشان دادن تاثیرات کافئین به عنوان یکی از نوشیدنی های پر مصرف، بر روی روند استخوان سازی جنین ها از طریق مطالعات آناتومی، هیستولوژی و تاثیر آن بر مقدار املاح استخوان می باشد. ارتباط بین مصرف قهوه به عنوان یکی از منابع سرشار کافئین با تشکیل بافت های استخوانی در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است و نشان داده شده که تاثیر زیادی بر روند استخوان سازی و ترمیم دارد (۱۴و ۱۳). در مطالعه حاضر کاهش وزن در گروه دریافت کننده کافئین در سطح معنی داری $P<۰/۰۵$ مشاهده شد که این نتایج در تایید سایر تحقیقات می باشد. در مطالعات انسانی نشان داده شده که مصرف ۳۰۰ میلی گرم کافئین در روز توسط مادران باعث ایجاد فرزندانی با وزن میانگین کمتر از ۳۷۹ میلی گرم نسبت به مادرانی که کمتر مصرف کافئین داشتند می شود. در دو مطالعه جداگانه که به ترتیب بروی ۳۸۹۱ زن و ۱۱۸۵۸ زن حامله صورت گرفت، نشان داد وزن نوزادان بدنیا آمده در گروه مصرف کننده کافئین دچار کاهش می شود (۱۵). ولی در مطالعه ای که بر روی موش های صحرائی باردار انجام گرفت هیچ رابطه ای بین مصرف کافئین و وزن نوزادان متولد شده گزارش نشد (۱۷و۱۶)که علت این امر را می توان چگونگی تجویز کافئین و دوز ترکیب مورد نظر دانست. به نظر می رسد کافئین با افزایش ترشح کاتکل آمین ها از آدرنال موجب تنگ شدن عروق خونی جفتی و رحمی شده و لذا موجب کاهش وزن و مرگ و میر نوزادان قبل از تولد می شود علاوه بر این کافئین با افزایش حساسیت عروق جفتی به ناقل Equilibrative nucleoside transporter 1(Ent-1) موجب کاهش جریان خون جفتی شده و درنتیجه تراکم و رشد استخوانی و وزن جنین کاهش می یابد(۱۸). در مطالعه ی دیگری که بر روی سلول های بنیادی مزانشیمی تحت تیمار کافئین انجام شد متوجه شدند که ترکیب مذکور توانایی این سلول ها را در تبدیل به سلول های استخوانی کاهش می دهد (۲۰و ۱۹).

برای توجیه جنین های مرده که در گروه دریافت کننده کافئین مشاهده شد می توان به این نکته اشاره کرد که کافئین با مهار آنزیم فسفودی استراز مانع از شکستن cAMP شده وافزایش آن می‌تواند باعث تغییراتی در غضروف‌زایی و تکامل جنین شود در واقع کافئین به عنوان آنتاگونیست آدنوزین با آزاد سازی مستقیم کاتکول آمین ها از انتهای اعصاب سمپاتیک و آدرنال موجب تنگ شدن عروق و کم خونی جنین می شود که می تواند باعث مرگ و یا برخی ناهنجاری ها در جنین گردد (۲۲و ۲۱). در مطالعات صورت گرفته نیز نشان داده شده تزریق مستقیم کاتکول آمین ها به جنین می تواند باعث ادم، خونریزی ، هماتوم و حتی نکروز در جنین گردد که در مطالعه حاضر نیز کافئین از طریق همین مکانیسم عامل ایجاد هماتوم در ۸ درصد جنین های مورد مطالعه شد (۲۳). نتایج نشان دادند که هیچ بدشکلی در هیچ یک از گروه ها مشاهده نشد که این مطلب به میزان کافئین مصرفی در مطالعه بر میگردد . مطالعات قبلی نیز نشان داده که حداقل دوز مناسب برای ایجاد بدشکلی در اندام (مالفورماسیون) در رت ها ۸۰-۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز می‌باشد (۲۵و ۲۴).

نتایج حاکی از اندازه گیری املاح نشان داد که میزان املاح در جنین های گروه کافئین کاهش یافته است که این کاهش می تواند به علت اثرات کافئین بر سطح استئوکلسین و بیان ژن های مربوط به کلاژن نوع یک و دو را باشد و کافئین از تبدیل سلول های نمایز نیافته مزانشیمال به سلول های غضروفی جلوگیری نموده و با تاخیر مینرالیزاسیون در تشکیل استخوان، موجب مهار استخوان سازی می شود (۲۶) و علاوه بر این کافئین باعث افزایش برونده ادراری کلسیم می شود (۲۷) که با افزایش دفع ادراری کلسیم، میزان ترشح هورمون PTH از پاراتیروئید افزایش یافته و این هورمون نیز باعث فراخوانی کلسیم از استخوانها می شود که در نتیجه کاهش مینرالیزاسیون در استخوان ها مشهود می شود (۲۸) همچنین در مطالعه ای دیگر اثبات شده که سلول های استئوبلاست که در معرض کافئین بودند میزان تشکیل

Archive of SID

www.SID.ir

کلاژن و ماتریکس خارج سلولی در این سلول ها به شدت کاهش می یابد (۳۰و ۲۹) که کاهش مساحت معنی دار کل استخوان در ناحیه midshaft در گروه تیمار در مطالعه حاضر نشان دهنده دخالت تمامی عوامل فوق در این فرآیند را داشته است.

نتیجه گیری

امروزه اگرچه اظهارات متفاوتی از اثرات کافئین ارائه گردیده است ولی آنچه که این تحقیق بدان دست یافته حاکی از افزایش دفع کلسیم و منیزیم بواسطه مصرف کافئین می‌باشد که این دو ماده معدنی نقش بسیار مهمی در شکل گیری استخوان ها دارد و با توجه به مطالعه حاضر، می توان به این نتیجه رسید که کافئین بر روی استخوان سازی جنین ها اثرات زیان‌آوری داشته و البته عواملی همچون طول دوره، دوز و زمان مصرف بر وقوع انواع ناهنجاری ها در جنین تاثیر دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی ازپایان نامهء کارشناسی ارشد بافت شناسی پزشکی تحت عنوان بررسی اثرکافئین براستخوانسازی فمور درجنین رت در دانشکدهءپزشکی کرمانشاه است وعملیات بافت شناسی آن درآزمایشگاه بافت شناسی دانشکدهء پزشکی کرمانشاه انجام گرفته است.بدینوسیله ازجناب آقای دکترقربانی ودکترخزائی اساتیدمحترم علوم تشریح ومسئول آزمایشگاه بافت شناسی سرکارخانم فاضلی که درکارهای عملی وهماهنگی های لازم کمک فراوانی نمودند کمال تقدیروتشکررادارایم.

Reference

1.Fujioka K, Shibamoto T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. Food Chemistry 2008;106:217-21.
2.Choi HK, Curhan G. Coffee, tea, and caffeine consumption and serum uric acid level: the third national health and nutrition examination survey. Arthritis Care & Research 2007;57:816-21.
3.Heckman MA, Weil J, Mejia D, Gonzalez E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters .Journal of Food Science 2010;75:R77-R87.
4.Lopez-Garcia E, van Dam RM, Rajpathak S, Willett WC, Manson JE, Hu FB. Changes in caffeine intake and long-term weight change in men and women. The American Journal of Clinical Nutrition 2006;83:674-80.
5.Vlok N, Malan SF, Castagnoli N, Bergh JJ, Petzer JP. Inhibition of monoamine oxidase B by analogues of the adenosine A 2A receptor antagonist (E)-8-(3-chlorostyryl) caffeine (CSC). Bioorganic & Medicinal Chemistry 2006;14:3512-21.
6.Brito R, Pereira-Figueiredo D, Socodato R, Paes-de-Carvalho R, Calaza K. Caffeine exposure alters adenosine system and neurochemical markers during retinal development. Journal of Neurochemistry 2016; 138:557-570.
7.Grosso LM, Triche EW, Belanger K, Benowitz NL, Holford TR, Bracken MB. Caffeine metabolites in umbilical cord blood, cytochrome P-450 1A2 activity, and intrauterine growth restriction. American Journal of Epidemiology 2006;163:1035-41.
8.Browne ML. Maternal exposure to caffeine and risk of congenital anomalies :a systematic review. Epidemiology 2006;17:324-31.
9.Morgan S, Koren G, Bozzo P. Is caffeine consumption safe during pregnancy? Canadian Family Physician 2013;59:361-2.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017
Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017

10.Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP, Kovacs EM. Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. Obesity Research 2005;13:1195-204.
11.Rapuri PB, Gallagher J, Nawaz Z. Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1, 25 (OH)2 D3 stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2007;103:368-71.
12.Wetmore C, Ichikawa L, LaCroix A, Ott S, Scholes D. Association between caffeine intake and bone mass among young women :potential effect modification by depot medroxyprogesterone acetate use. Osteoporosis International 2008;19:519-27.
13.Hallstr?m H, Byberg L, Glynn A, Lemming EW, Wolk A, Michaëlsson K. Long-term coffee consumption in relation to fracture risk and bone mineral density in women. American Journal of Epidemiology 2013;178:898-909.
14.Andrade A, Sant'Ana D, Mendes Junior J, Moreira M, Pires G, Santos M, et al. Effects of cigarette smoke inhalation and coffee consumption on bone formation and osseous integration of hydroxyapatite implant. Brazilian Journal of Biology 2013;73:173-7.
15.Bech BH, Obel C, Henriksen TB, Olsen J. Effect of reducing caffeine intake on birth weight and length of gestation: randomised controlled trial. BMJ 2007;334:409.
16.Hiroshige S, Cheuk SL, Wink CS, Koji H, Rossowska MJ, Tetsuo N. Alteration of femoral structure in later life by chronically feeding caffeine during rapid growing period in newborn female rats. Toxicology Letters 1994;73:55-64.
17.Reis AMS, Ribeiro LGR, de Melo Ocarino N, Goes AM, Serakides R. Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. BMC Musculoskeletal Disorders 2015;16:1.
18.Chen L-W, Wu Y, Neelakantan N, Chong MF-F ,Pan A, van Dam RM. Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with risk of low birth weight: a systematic review and dose–response meta-analysis. BMC Medicine 2014;12:1.
19.Reis AMS, Ocarino NdM, Boeloni JN, Gomes DA, Goes AM, FerreiraAdF, et al. Inhibition of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from the offspring of rats treated with caffeine during pregnancy and lactation. Connective Tissue Research 2015(just-accepted).
20.Zhou Y, Guan X, Zhu Z, Guo J ,Huang Y, Hou W, et al. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. British Journal of Pharmacology 2010;161:1542-52.
21.Acevedo J, Santana-Almansa A, Matos-Vergara N, Marrero-Cordero LR, Cabezas-Bou E, D?az-R?os M. Caffeine stimulates locomotor activity in the mammalian spinal cord via adenosine A 1 receptor-dopamine D 1 receptor interaction and PKA-dependent mechanisms. Neuropharmacology 2016;101:490-505.
22.Zhou Y, Zhu Z-L ,Guan X-X, Hou W-W, Yu H-Y. Reciprocal roles between caffeine and estrogen on bone via differently regulating cAMP/PKA pathway: The possible mechanism for caffeine-induced osteoporosis in women and estrogen's antagonistic effects. Medical Hypotheses 2009; 73:83-5.
23.Wu Y-m, Luo H-w, Kou H, Wen Y-x, Shen L, Pei L-g, et al. Prenatal caffeine exposure induced a lower level of fetal blood leptin mainly via placental mechanism. Toxicology and Applied Pharmacology 2015;289:109-16.
24.Li Z-X, Gao Z-L, Wang J-N, Guo Q-H. Maternal coffee consumption during pregnancy and neural tube defects in offspring: A meta-analysis. Fetal and Pediatric Pathology 2015; 35:1-9.

Archive of SID

www.SID.ir

25.Peck JD, Leviton A, Cowan LD. A review of the epidemiologic evidence concerning the reproductive health effects of caffeine consumption: a 2000–2009 update. Food and Chemical Toxicology 2010;48:2549-76.
26.Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. Journal of Orthopaedic Research 2011;29:954-60.
27.Areco V, Rivoira MA, Rodriguez V, Marchionatti AM, Carpentieri A, de Talamoni NT. Dietary and pharmacological compounds altering intestinal calcium absorption in humans and animals. Nutrition Research Reviews 2015;28:83-99.
28.Moreira A, Swischuk L, Malloy M, Mudd D, Blanco C, Geary C. Parathyroid hormone as a marker for metabolic bone disease of prematurity. Journal of Perinatology 2014;34:787-91.
29.Tsuang Y-H, Sun J-S, Chen L-T, Sun SC-K, Chen S-C. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. Journal of Orthopaedic Surgery and Research 2006;1:1.
30.Wang H, Guan W, Yang W, Wang Q, Zhao H, Yang F, et al. Caffeine inhibits the activation of hepatic stellate cells induced by acetaldehyde via adenosine A2A receptor mediated by the cAMP/PKA/SRC/ERK1/2/P38 MAPK signal pathway. PloS one 2014;9:e92482.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 12:21 +0430 on Tuesday September 19th 2017

Archive of SID

www.SID.ir