

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

فرزانه دهقانی (Ph.D.) * عبدالرحمن دزفولیان (Ph.D.) ** محمدرضا پنجه شاهین (Ph.D.) ***
حیات ممبئی (Ph.D.) **** سیدضیاء الدین‌تابعی (Ph.D.) ***** شهلا ظهیری (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 می‌شود. شواهدی در دست است که نشان می‌دهد که قهوه سبب کاهش اوره و کراتینین سرم می‌شود. ولی مصرف بیش از حد آن موجب گلمرولواسکلروزیس در کلیه می‌گردد. در این بررسی تاثیر عصاره قهوه با غلظت‌های زیاد بر روی کلیه توسط روش‌های استریولوژیکی بررسی شد.

مواد و روش‌ها : ۶۰ موش صحرایی نر از نژاد اسپراگو-داولی با وزن حدود ۲۳۰-۲۵۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. به گروه شاهد، آب و به گروه‌های آزمون از عصاره آبی دانه قهوه با غلظت‌های (کیلوگرم/گرم ۱/۵ و ۵/۵ و ۱۰/۲۵) دو بار در روز خورانیده شد. بعد از ۴۸ ساعت، کلیه حیوانات 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-ئوزین رنگ آمیزی گردید. جفت برش‌های تهیه شده توسط اصل دیسکتورفیزیکی مطالعه شد.

یافته‌ها : بین تعداد گلمرول‌های کلیه در گروه‌های شاهد و آزمون هیچ ارتباط معنی داری وجود نداشت. استنتاج : به نظر می‌رسد که غلظت زیاد قهوه تاثیری بر روی تعداد گلمرول‌ها 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.

واژه‌های کلیدی : استریولوژی، قهوه، گلمرول، دیسکتور، تعداد

* متخصص علوم تشریح و عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی شیراز
** 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 (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی شیراز
تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۵/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۸۲/۸/۷ تاریخ تصویب: ۱۳۸۲/۱۰/۱۰

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 و ضربان آن می شود.

در ضمن، نوشیدن آن ادرار را زیاد نموده و اثر ضد عفونی کننده دارد (۱). گزارش های 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 رادیکال های آزاد اکسیژن می شود. مصرف مداوم این نوشیدنی در درمان آسم، سیروز کبدی، پارکینسون و بیماری های قلبی-عروقی مؤثر است و از تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری می کند (۲،۳). تاثیر قهوه بر روی کلیه متفاوت است؛ به طوری که سبب افزایش دفع ادرار می شود (۴). مصرف مداوم آن از تشکیل سنگ کلیه جلوگیری می کند و سبب کاهش میزان اوره و کراتینین سرم می شود (۲،۴ تا ۷). مطالعات نشان می دهد که ترکیبات گزانتین دار موجود در قهوه مانند کافئین و تیوفیلین سبب گشاد شدن عروق خونی می شود. این عمل به علت تاثیر گذاشتن بر روی گیرنده های A1 و A2 موجود در عروق اوران کلیه می باشد (۸). اما مطالعات دیگر نشان می دهد که زیاده روی در مصرف قهوه سبب اثرات سوء بر روی کلیه می شود و سختی و مقاومت شریان ها را افزایش می دهد (۴،۹). با توجه به گزارش های فوق، بررسی اثرات مفید یا مضر قهوه بر روی کلیه ضروری به نظر می رسد. مطالعات نشان می دهد که میزان پالایش کلیه، ارتباط مستقیمی با تعداد و اندازه گلومرول ها دارد و غلظت های زیاد قهوه می تواند سبب گلومرولواسکلروزیس شود (۴،۱۰) این امر سرانجام منجر

به از بین رفتن گلومرول ها می شود. بنابراین اندازه گیری تعداد گلومرول ها می تواند به عنوان معیار مناسبی جهت سلامتی کلیه در نظر گرفته شود. برای اندازه گیری تعداد گلومرول ها از روش های استریولوژی استفاده می شود. یکی از این روش ها، اصل دیسکتور است که به عنوان یک روش استاندارد طلایی برای شمارش اجزاء، در یک عضو استفاده می شود (۱۱). بنابراین هدف از این بررسی تخمین تعداد گلومرول های کلیه توسط روش های استریولوژی بعد از مصرف عصاره قهوه در غلظت های مختلف است.

مواد و روش ها

تعداد ۶۰ موش صحرایی از نژاد اسپراگو- داوولی با وزن حدود ۲۵۰-۲۳۰ گرم انتخاب گردید و در شرایط استاندارد از نظر رطوبت، درجه حرارت، نور و دسترسی کافی به مواد غذایی و آب در قفس مخصوص حیوانات نگهداری شد. سپس دانه های قهوه از نوع عربی (Coffea Arabica) توسط متخصص گونه های گیاهی، شناسایی شد و برای تهیه عصاره مورد استفاده قرار گرفت. دانه های قهوه ابتدا به صورت پودر تهیه گردید. سپس ۵۰ گرم از این پودر با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردیده و به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد 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 خارج گردید. سپس محلول فوق در دیسگاتور 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 ۵/۴ گرم پودر عصاره استخراج گردید. از عصاره دانه قهوه غلظت هایی با میزان های (۵/۲۵، ۱/۱۰، ۱/۵ و ۱/۵ گرم به ازای هر کیلوگرم تهیه گردید). تهیه گردید. به منظور انجام این تحقیق حیوانات به ۵ گروه ۱۲ تایی تقسیم

$a(F) =$ مساحت هر فریم

$h =$ ارتفاع دیسکتور

$\Sigma P =$ تعداد فریم

$N_{total} = NV \cdot V_{cortex}$ تعداد کل

گلوله‌ها

$NV =$ تعداد در واحد حجم

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

$V_{cortex} = \Sigma p.t.a(p)$ حجم قشر کلیه

$\Sigma P =$ تعداد نقاط

$T =$ ضخامت قطعه

$a(p) =$ مساحت هر نقطه

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

$$CE_{NV} = \left[\frac{k}{k-1} \left(\frac{(\sum P_{cort})^2}{\sum P_{cort} \times \sum P_{cort}} + \frac{(\sum Q_{glom})^2}{\sum Q_{glom} \times \sum Q_{glom}} - 2 \frac{\sum P_{cort} \times Q_{glom}}{\sum P_{cort} \times \sum Q_{glom}} \right) \right]^{\frac{1}{2}}$$

$\Sigma P =$ مجموعه فریم‌هایی که با فضای مرجع برخورد داشته‌اند

$\Sigma Q =$ مجموع تعداد گلوله‌ها

بررسی های آماری با استفاده از نرم افزار Spss انجام شد. به منظور مقایسه تعداد گلوله‌ها در گروه شاهد و آزمون از روش Mann-withney-u test استفاده شد، نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و ۹۵ درصد فاصله اطمینان مورد قبول و در سطح $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

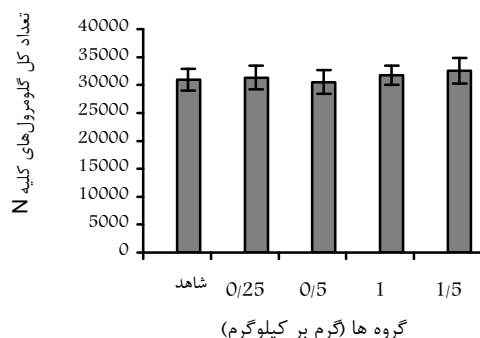
یافته‌ها

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

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 ۴۸ 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 کلیه‌ها در قالب آگاری قرار داده شد و از هر کلیه 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 تقریباً مساوی یک سوم یا ۳۰ درصد اندازه کوچک‌ترین گلوله‌ها تعیین گردید. برای شمارش کل گلوله‌های کلیه به روش فوق ابتدا دانسیته عددی گلوله‌ها 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 تعداد آن‌ها از شبکه‌هایی متشکل از تعدادی Frame استفاده شد و برای هر زوج برش حداکثر چهار Frame به صورت تصادفی منظم انتخاب گردید. روش کار به این ترتیب بود که در صورت مشاهده گلوله‌ها در مقطع مرجع و عدم آن در مقطع شاهد، آن گلوله‌ها 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 پرتاب شوند (۱۱). برای تعیین دانسیته عددی گلوله‌ها و تعداد کل گلوله‌ها از فرمول‌های زیر استفاده شد (۱۲).

$$NV = \frac{\Sigma Q}{a(F) \cdot h \cdot \Sigma P}$$

$\Sigma Q =$ تعداد گلوله‌ها در واحد فریم



می‌رسید. خیز و ادم در بعضی از قسمت های بافت پارانشیمی در نواحی قشری و مرکزی به صورت آشکار مشاهده گردید. این تغییرات وابسته به غلظت عصاره است و با افزایش غلظت، مشخص تر است (تصویر شماره ۱).

نمودار شماره ۱: مقایسه تعداد کل گلومرول‌های کلیه بین گروه شاهد و گروه های مختلف مورد آزمایش

هر یک از ستون‌های نمایانگر میانگین $\pm$ خطای معیار است.

تعداد کل گلومرول‌های در گروه شاهد $10616/22$ و در گروه‌های آزمون بین $30515/87$ تا $32564/10$ 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 $220/$ و در گروه‌های آزمون بین $207/93$ تا $217/74$ میلی‌متر مکعب تخمین زده شد.

اندازه‌گیری ضریب خطای آزمایش در هر دو گروه، پایین بود که این امر نشان دهنده دقت اندازه‌گیری در روش استریولوژی فوق محسوب گردید (جدول شماره ۱).

تصویر شماره ۱: خیز و ادم در بافت پارانشیمی کلیه

نتایج حاصل از مطالعات سه بعدی نشان داد که بین تعداد گلومرول‌ها در واحد حجم کلیه (NV) و تعداد کل گلومرول‌های کلیه (N_{total}) در گروه‌های آزمون و گروه شاهد اختلاف معنی داری در سطح $P < 0.05$ دیده نشد (نمودار شماره ۱).

جدول شماره ۱: میزان میانگین و انحراف معیار و ضریب خطای تعداد گلومرول‌ها در واحد حجم کلیه و تعداد کل آن و محاسبه حجم قسمت قشری کلیه و ضریب خطای آن

نام متغیر	تعداد گلومرول‌ها در واحد حجم کلیه NV	ضریب خطا	تعداد کل گلومرول‌های کلیه N	ضریب خطا	حجم قسمت قشری کلیه (mm ³)	ضریب خطا
میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین
شاهد	146 $\pm$ 15	0/05	30496 $\pm$ 1979	0/03	320 $\pm$ 12	0/03
آزمون ۱	153 $\pm$ 10	0/03	21338 $\pm$ 2164	0/01	209 $\pm$ 104	0/01
آزمون ۲	148 $\pm$ 85	0/09	30515 $\pm$ 2144	0/05	217 $\pm$ 15	0/05
آزمون ۳	145 $\pm$ 1	0/01	31789 $\pm$ 1709	0/01	311 $\pm$ 13	0/01
آزمون ۴	157 $\pm$ 1	0/06	32564 $\pm$ 2261	0/02	207 $\pm$ 18	0/02

بحث

یکی از روش‌های تشخیص نارسایی حاد کلیه، اندازه‌گیری میزان پالایش گلومرولی است. این اندازه‌گیری به عوامل مختلفی مانند حجم گلومرول‌ها، تعداد گلومرول‌ها و ساختمان لوله‌های کلیه وابسته است. مطالعات نشان می‌دهد که با کاهش تعداد گلومرول‌ها، میزان پالایش کلیه نیز کم می‌شود (۱۳). در بسیاری از بیماری‌ها، تعداد گلومرول‌های کلیه کم می‌شود. بیماری دیابت وابسته به انسولین و فشارخون زیاد می‌تواند موجب کاهش تعداد گلومرول‌ها شود. Pereira (۲۰۰۱) در یک الگوی تجربی بر روی موش صحرایی نشان داد که افزایش فشار خون موجب کاهش تعداد گلومرول‌ها به میزان ۳۳ درصد می‌شود (۱۵). در تحقیق حاضر تعداد کل گلومرول‌های کلیه در گروه شاهد در یک موش صحرایی $1979 \pm 30969/77$ تخمین زده شد. Cahill (۱۹۹۶) در طی تحقیقی تعداد کل گلومرول‌ها در موش صحرایی را در حدود 4545 ± 34376 عدد تخمین زد (۱۶). Nyenggard (۱۹۹۳) نیز تعداد کل گلومرول‌های کلیه در این حیوان را 3100 ± 26500 و Bertram (۱۹۹۲) حدود 31764 ± 3667 عدد تخمین زد (۱۸، ۱۷). تعداد گلومرول‌های کلیه در موش صحرایی بالغ و سالم توسط محققین مختلف و به وسیله روش‌های متفاوت بین ۴۴۰۰۰-۲۴۰۰۰ عدد محاسبه گردید (۱۹). به نظر می‌رسد که اختلاف در تعداد گلومرول‌ها در موش صحرایی مربوط به جنس و نژاد حیوان باشد. Deway (۱۹۹۶) نشان داد که نژادهای مختلف

موش دارای تعداد متفاوتی گلومرول هستند (۲۰). احتمال دیگری که مطرح می‌شود این است که اختلاف در تعداد گلومرول‌های کلیه در یک حیوان بالغ می‌تواند مربوط به مراحل آماده‌سازی بافتی باشد اما از آنجا که در این تحقیق از روش دیسکتور برای شمارش تعداد گلومرول‌ها استفاده شد و این روش تحت تاثیر چروکیدگی در حین مراحل آماده‌سازی بافتی قرار نمی‌گیرد فرضیه فوق منتفی می‌گردد (۲۱). نتایج این بررسی همچنین نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره قهوه هیچ تاثیری بر روی تعداد کل گلومرول‌های کلیه نسبت به گروه شاهد نداشت. هر چند Tofovic (۲۰۰۲) نشان داد که مصرف زیاد قهوه سبب اسکروزه شدن گلومرول‌ها می‌شود (۴). Mahmud (۲۰۰۱) نیز اعلام نمود که زیاده روی در مصرف قهوه سبب سختی شریان‌ها و افزایش مقاومت عروقی می‌شود (۹). بنا بر این احتمال داده می‌شود که با افزایش غلظت عصاره قهوه، مقاومت عروقی زیاد شده و شرایط برای اسکروزه شدن، آتروسی و از بین رفتن گلومرول‌ها فراهم می‌شود. اما همان‌طور که در این تحقیق مشاهده گردید، غلظت‌های در نظر گرفته شده نتوانست تعداد گلومرول‌ها را کاهش دهد. اما احتمال داده می‌شود 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 اندازه‌گیری حجم گلومرول‌ها است.

- فهرست منابع
1. جزایری غیاث الدین. زبان خوراکیها. چاپ چهارم. تهران: انتشارات سپهر، ۱۳۵۹: صفحات ۲۲۲-۲۲۳.
 2. Richelle M, Tavazzi I, Offord E. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, tea) prepared per cup serving. *J Agric Food Chem.* 2001; 49(7): 3438-42.
 3. Mukhopadhyay S, Poddarr MK. Caffeine inhibits the development of Ehrlich 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 receptor agonists and antagonists in a genetic animal model of primary paroxysmal 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 interauricular 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. Unbiased *Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. 1st ed. New York City. Bios Scientific; 1998.
 13. Bendsten TF, Nyengaard JR. Unbiased estimation of particle number using Section historical perspective with Special reference to the stereology of glomeruli. *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.

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 Histopathol.* 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 disector: Unbias stereological estimation of the number of particles inside other particles. *J Microsc.* 1992; 165(3): 417-26.