

## بررسی استریولوژیکی تاثیر حاد عصاره قهقهه بر روی گلومرول های کلیه در موش صحرایی نر

فرزانه دهقانی\*(Ph.D) \*\*\* عبد الرحمن دزفولیان (Ph.D)\*\* محمد رضا پنجه شاهین(Ph.D)  
سید ضیاء الدین تابعی.(Ph.D)\*\*\*\*\* شهلا ظهیری(Ph.D)\*\*\*\* حیات مبئینی(Ph.D)

### چکیده

**سابقه و هدف :** قهقهه 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 رادیکال های آزاد اکسیژن می شود. شواهدی در دست است که نشان می دهد که قهقهه 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 قهقهه با غلظت های زیاد بر روی کلیه توسط روش های استریولوژیکی بررسی شد.

**مواد و روشها :** ۶۰ موش صحرایی نر از نژاد اسپر اگو-داولی با وزن حدود ۲۳۰-۲۵۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. به گروه شاهد، آب و به گروه های آزمون از عصاره آبی دانه قهقهه با غلظت های (کیلو گرم/گرم ۱/۵ و ۵/۰ و ۲۵/۰) دو بار در روز خورانیده شد. بعد از ۴۸ ساعت، کلیه حیوان ها تحت بیهوشی برداشته شد. از هر کلیه قطعاتی به ضخامت ۱mm 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 دیسکتور فیزیکی مطالعه شد.

**یافته ها :** بین تعداد گلومرول های کلیه در گروه های شاهد و آزمون هیچ ارتباط معنی داری وجود نداشت. **استنتاج :** به نظر می رسد که غلظت زیاد قهقهه تاثیری بر روی تعداد گلومرول ها 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 های کلیدی :** استریولوژی، قهقهه، گلومرول، دیسکتور، تعداد

\* متخصص علوم تشريح و عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی شیراز

\*\* عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی اهواز

\*\*\* متخصص علوم تشريح و عضو هیأت علمی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی شیراز

\*\*\*\* عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی اهواز

\*\*\*\*\* متخصص علوم تشريح و عضو هیأت علمی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی شیراز

\*\*\*\* متخصص علوم تشريح و عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی شیراز

تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۰/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۸۲/۸/۷ تاریخ تصویب: ۱۳۸۲/۱۰/۱۰

## مقدمه

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 روش‌های استریولوژی استفاده می‌شود. یکی از این روش‌ها، اصل دیسکتور است که به عنوان یک روش استاندارد طلایی برای شمارش اجزاء، دریک عضو استفاده می‌شود<sup>(۱)</sup>. بنابراین هدف از این بررسی تخمین تعداد گلومرول‌های کلیه توسط روش‌های استریولوژی بعد از مصرف عصاره قهوة در غلظت‌های مختلف است.

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

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 قهوة و سلامتی فرد موجود می‌باشد

قهوة 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 از تکثیر سلول‌های سلطانی جلوگیری می‌کند<sup>(۲)</sup>. تاثیر قهوة بر روی کلیه متفاوت است؛ به طوری که سبب افزایش دفع ادرار می‌شود (۴). مصرف مداوم آن از تشکیل سنگ کلیه جلوگیری می‌کند و سبب کاهش میزان اوره و کراتینین سرم می‌شود<sup>(۴،۲)</sup>. مطالعات نشان می‌دهد که ترکیبات گزانتین دار موجود در قهوة 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 اوران کلیه می‌باشد<sup>(۸)</sup>. اما مطالعات دیگر نشان می‌دهد که زیاده روی در مصرف قهوة سبب اثرات سوء بر روی کلیه می‌شود و سختی و مقاومت شریان‌ها را افزایش می‌دهد<sup>(۹،۴)</sup>. با توجه به گزارش‌های فوق، بررسی اثرات مفید یا مضر قهوة بر روی کلیه ضروری به نظر می‌رسد. مطالعات نشان می‌دهد که میزان پالایش کلیه، ارتباط مستقیمی با تعداد و اندازه گلومرول‌ها دارد و غلظت‌های زیاد قهوة می‌تواند سبب گلومرولواسکلروزیس شود<sup>(۱۰،۴)</sup>. این امر سرانجام منجر

## مواد و روش‌ها

تعداد ۶۰ موش صحرایی از نژاد اسپراگو- داولی 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 دانه‌های قهوة از نوع عربی (Caffea Arabica) توسط متخصص گونه‌های گیاهی، شناسایی شد و برای تهیه عصاره مورداستفاده قرار گرفت. دانه‌های قهوة ابتدا به صورت پودر تهیه گردید. سپس ۵۰ گرم از این پودر با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطّر حل گردیده و به مدت ۲۴ 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 در دیسکاتور 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 قهوة غلظت‌هایی با میزان‌های (۰،۱/۰،۰۵/۲۵) و ۱/۵ گرم به ازای هر کیلوگرم تهیه گردید. تهیه گردید. به منظور انجام این تحقیق حیوانات به ۵ گروه ۱۲ تایی تقسیم

$a(F) =$	مساحت هر فریم
$h =$	ارتفاع دیسکتور
$\Sigma P =$	تعداد فریم
	$N_{total} = NV \cdot V_{cortex}$ تعداد کل گلومرول‌ها
$NV =$	تعداد در واحد حجم
	حجم قشر کلیه با استفاده از اصل کاوالیه و روش شمارش نقطه‌ای به دست آمد(۱۲).
	$V_{cortex} = Sp.t.a(p)$ 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).
	$CE_{NV} = \left[ \frac{k}{k-1} \left( \frac{(\sum P_{cort})^2}{\sum P_{cort} \times \sum P_{cort}} + \frac{(\sum Q_{glom})^2}{\sum Q_{glom} \times \sum Q_{glom}} - 2 \frac{\sum P_{cort} \times Q_{glom}}{\sum P_{cort} \times \sum Q_{glom}} \right) \right]^{\frac{1}{2}}$
$\Sigma P =$	مجموعه فریم‌هایی که با فضای مرجع برخورد داشته‌اند
	$\Sigma Q =$ مجموع تعداد گلومرول‌ها
	بررسی‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. به منظور مقایسه تعداد گلومرول‌ها در گروه شاهد، و آزمون از روش Mann-Whitney-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.

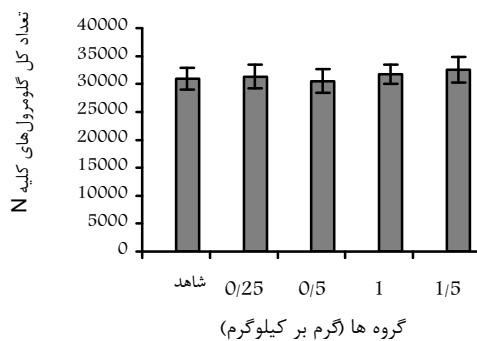
### یافته‌ها

از دیدگاه میکروسکوپ نوری، تغییرات خاصی در ساختمان گلومرول‌ها و عروق کلیه مشاهده نگردید ولی اغلب گلومرول‌ها دچار بر هم افتادگی شده بودند؛ به طوری که فضای کپسول بومن ظاهرًاً وسیع به نظر

شدند. به گروه شاهد آب و به گروه‌های آزمون، از عصاره آبی دانه قهقهه با غلظت‌های 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 پروفوژیون 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 میلی‌متر 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 گلومرول‌ها تعیین گردید. برای شمارش کل گلومرول‌ها کلیه به روش فوق ابتدا دانسیته عددی گلومرول‌ها محاسبه شد. بدین منظور برش‌های 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 مشکل از تعدادی Frame استفاده شد و برای هر زوج برش حداقل چهار Frame به صورت تصادفی منظم انتخاب گردید. روش کار به این ترتیب بود که در صورت مشاهده گلومرول‌ها در مقطع مرجع و عدم آن در مقطع شاهد، آن گلومرول شمارش می‌گردید، مشروط بر آن که در خارج از Frame‌های مذبور شمارش انجام نشده باشد. این عمل در صورتی بود که Frame‌ها به صورت تصادفی منظم بر روی تصاویر پرتاب شوند(۱۱). برای تعیین دانسیته عددی گلومرول‌ها و تعداد کل گلومرول‌ها از فرمول‌های زیر استفاده شد(۱۲).

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

$$\Sigma Q = \text{تعداد گلومرول‌ها در واحد فریم}$$



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

هر یک از ستون های نمایانگر میانگین  $\pm$  خطای معیار است.  
تعداد دل تومرهای در روده ساده ۷۷/۰۶/۱۶ و  
در گروه های آزمون بین ۳۰۵۱۵ / ۱۰ تا ۳۲۵۶۴  
تخمین زده شد. بین حجم قشر کلیه در گروه های شاهد  
و آزمون نیز اختلاف معنی داری در سطح  $P<0.05$   
مشاهده نگردید. حجم قشر کلیه در گروه شاهد / ۲۲۰ و  
در گروه های آزمون بین ۲۰۷/۹۳ تا ۲۱۷/۷۴ میلی متر  
مکعب تخمین زده شد.

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

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

ضریب خطای CE	حجم قسمت قشری کلیه (mm³)	تعداد کل گلومرول های کلیه N	ضریب خطای CE	تعداد گلومرول ها در واحد حجم کلیه NV	نام تغییر فراوانی گروه ها
+/۰.۳	۳۲±۱۲	۳۰۹۶۴±۱۹۷۹	+/۰.۵	۱۶۷±۱۵	شاهد
/۱	۲۰۴±۱۴	۲۱۳۸±۲۲۶۴	/۳	۱۵۵±۱۰	آزمون ۱
/۰.۵	۲۱۱±۱۵	۳۰۵۰±۲۱۴۴	/۱.۹	۱۴۸±۸۵	آزمون ۲
/۱	۳۱۱±۱۳	۳۱۷۸±۱۷۰.۹	/۱	۱۴۵±۱	آزمون ۳
/۰.۲	۲۰۷±۱۸	۳۲۰۶±۲۲۶۱	/۰.۶	۱۵۷±۱	آزمون ۴

می رسید. 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).

تصویر شماره ۱: خیز و ادم در بافت پارانشیمی کلیه

نتایج حاصل از مطالعات سه بعدی نشان داد که بین تعداد گلومرول ها در واحد حجم کلیه (NV) و تعداد کل گلومرول های کلیه (Ntotal) در گروه های آزمون و گروه شاهد اختلاف معنی داری در سطح  $P<0.05$  دیده نشد (نمودار شماره ۱).

موش دارای تعداد متفاوتی گلومرول هستند(۲۰). احتمال دیگری که مطرح می شود این است که اختلاف در تعداد گلومرول های کلیه در یک حیوان بالغ می تواند مربوط به مراحل آماده سازی بافتی باشد اما از آن جا که در این تحقیق از روش دیسکتور برای شمارش تعداد گلومرول ها استفاده شد و این روش تحت تاثیر چروکیدگی در حین مراحل آماده سازی بافتی قرار نمی گیرد فرضیه فوق منتفی می گردد(۲۱). نتایج این بررسی همچنین نشان داد که غلظت های مختلف عصاره قهوه هیچ تاثیری بر روی تعداد کل گلومرول های کلیه Tofovic (۲۰۰۲) نشان داد که مصرف زیاد قهوه سبب اسکلروزه شدن گلومرول ها می شود(۴). Mahmud (۲۰۰۱) نیز اعلام نمود که زیاده روی در مصرف قهوه سبب سختی شریان ها و افزایش مقاومت عروقی می شود(۹). بنا بر این احتمال داده می شود که با افزایش غلظت عصاره قهوه، مقاومت عروقی زیاد شده و شرایط برای اسکلروزه شدن، آتروفی و از بین رفتن گلومرول ها فراهم می شود. اما همان طور که در این تحقیق مشاهده گردید، غلظت های در نظر گرفته شده نتوانست تعداد گلومرول ها را کاهش دهد. اما احتمال داده می شود که با افزایش غلظت عصاره، تعداد گلومرول ها کم شود، زیرا این ساختمان ها در بسیاری از نواحی دچار چروکیدگی شده بودند. برای رسیدن به یک نتیجه قطعی نیاز به انجام روش های استریولوژی برای اندازه گیری حجم گلو مرول ها است.

## بحث

یکی از روش های تشخیص نارسایی حاد کلیه، اندازه گیری میزان پالایش گلومرولی است. این اندازه گیری به عوامل مختلفی مانند حجم گلومرول ها، تعداد گلومرول ها و ساختمان لوله های کلیه وابسته است. مطالعات نشان می هد که با کاهش تعداد گلومرول ها، میزان پالایش کلیه نیز کم می شود(۱۳). در بسیاری از بیماری ها، تعداد گلومرول های کلیه کم می شود. بیماری دیابت وابسته به انسولین و فشارخون زیاد

می تواند موجب کاهش تعداد گلو مرول هاشود. Pereira (۲۰۰۱) در یک الگوی تجربی بر روی موش صحرایی نشان داد که افزایش فشار خون موجب کاهش تعداد گلومرول ها به میزان  $33 \pm 30.969$  درصد می شود(۱۵). در تحقیق حاضر تعداد کل گلومرول های کلیه در گروه شاهد در یک موش صحرایی  $1979 \pm 30.969 / 77$  تخمین زده شد. Cahill (۱۹۹۶) در طی تحقیقی تعداد کل گلومرول ها در موش صحرایی را در حدود  $4545 \pm 34376$  عدد تخمین زد(۱۶). Nyenggard (۱۹۹۳) نیز تعداد کل گلومرول های کلیه در این حیوان را  $3100 \pm 26500$  تخمین زد(۱۷). Bertram (۱۹۹۲) حدود  $31764 \pm 3667$  عدد تخمین زد(۱۸). تعداد گلومرول های کلیه در موش صحرایی بالغ و سالم توسط محققین مختلف و به وسیله روش های متفاوت بین  $24000 - 44000$  عدد محاسبه گردید(۱۹). به نظر می رسد که اختلاف در تعداد گلومرول ها در موش صحرایی مربوط به جنس و نژاد حیوان باشد. Deway (۱۹۹۶) نشان داد که نژادهای مختلف

3. Mukhopadhyay S, Poddar 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, Bastacky SI. Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, ZSF1 (Fa Fancp) 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.

## 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.
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 intrauterine 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.* 1<sup>rd</sup> 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 Microsc.* 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 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, Ottosenp 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.