

## 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 ۵/۰ 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 آماده‌سازی بافتی یک جفت برش به ضخامت ۵ میکرون و با ارتفاع مشخص تهیه و با هماتوکسیلین-انوزین رنگ آمیزی گردید. جفت برش‌های تهیه شده توسط اصل دیسکتور فیزیکی مطالعه شد.

یافته‌ها : بین تعداد گلمرول‌های کلیه در گروه‌های شاهد و آزمون هیچ ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. استنتاج : به نظر می‌رسد که غلظت زیاد قهوه تاثیری بر روی تعداد گلمرول‌ها ندارد. اما تصمیم‌گیری قطعی در مورد این نتایج، نیاز به مطالعات گسترده‌تری بر روی بیماری فوق در الگوهای تجربی و اندازه‌گیری 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  
\*\*\* عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی اهواز  
\*\*\*\* متخصص علوم تشریح و عضو هیأت علمی (استاد) 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 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 ۵/۴ 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

$a(F) =$  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 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 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 داشته اند  
 $\Sigma Q =$  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  $\pm$  انحراف معیار و ۹۵ درصد فاصله اطمینان مورد قبول و در سطح  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته ها

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

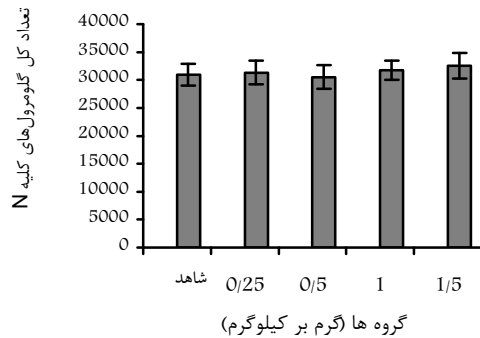
شدند. به گروه شاهد آب و به گروه های آزمون، از عصاره آبی دانه قهوه با غلظت های فوق ۲ بار در روز خورانیده شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت حیوانات تحت بیهوشی عمیق با اتر تشریح شده و کلیه راست آنها پس از انجام پرفوزیون عروقی با محلول فرمالین ۱۰٪ برداشته شد. سپس کلیه ها در قالب آگاری قرار داده شد و از هر کلیه توسط 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 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 تعداد آنها از شبکه هایی 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 گلومرولها در مقطع مرجع و عدم آن در مقطع شاهد، آن گلومرول شمارش می گردید، مشروط بر آن که 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 گلومرولها و تعداد کل گلومرولها از فرمول های زیر استفاده شد (۱۲).

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

تعداد گلومرولها در واحد حجم

$$\Sigma Q =$$

تعداد گلومرولها در واحد فریم



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

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

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

تعداد کل گلومرول‌های در گروه شاهد ۱۰۶۱۶/۲۲ و در گروه‌های آزمون بین ۳۰۵۱۵/۸۷ تا ۳۲۵۶۴/۱۰ تخمین زده شد. بین حجم قشر کلیه در گروه‌های شاهد و آزمون نیز اختلاف معنی‌داری در سطح  $P < 0.05$  مشاهده نگردید. حجم قشر کلیه در گروه شاهد ۲۲۰/۷۴ میلی‌متر مکعب تخمین زده شد.

اندازه‌گیری ضریب خطای آزمایش در هر دو گروه، پایین بود که این امر نشان‌دهنده 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 (Ntotal) در گروه‌های آزمون و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح  $P < 0.05$  مشاهده 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 CE	تعداد کل کلوامرول‌های کلیه N	ضریب خطا CE	حجم قسمت قشری کلیه (mm <sup>3</sup> )	ضریب خطا CE
میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین
شاهد	۱۴۶=۱۵	۰/۰۵	۳۰۹۶۹=۱۹۷۹	۰/۰۵	۳۲۰=۱۲	۰/۰۳
آزمون ۱	۱۵۳=۱۰	۰/۰۳	۲۱۳۳۸=۲۱۶۴	۰/۰۳	۲۰۹=۱۰۴	۰/۰۱
آزمون ۲	۱۴۸=۸۵	۰/۰۹	۳۰۵۱۵=۲۱۴۴	۰/۰۹	۲۱۷=۱۵	۰/۰۵
آزمون ۳	۱۴۵=۱	۰/۰۱	۳۱۷۸۹=۱۷۰۹	۰/۰۱	۳۱۱=۱۳	۰/۰۱
آزمون ۴	۱۵۷=۱	۰/۰۶	۳۲۵۶۴=۲۲۶۱	۰/۰۶	۲۰۷=۱۸	۰/۰۲

موش دارای تعداد متفاوتی گلو مروز هستند (۲۰). احتمال دیگری که مطرح می شود این است که اختلاف در تعداد گلو مروزهای 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 گلو مروزها 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 گلو مروزهای کلیه نسبت به گروه شاهد نداشت. هر چند Tofovic (۲۰۰۲) نشان داد که مصرف زیاد قهوه سبب اسکروزه شدن گلو مروزها 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 اسکروزه شدن، آتروفی و از بین رفتن گلو مروزها فراهم می شود. اما همان طور که در این تحقیق مشاهده گردید، غلظت های در نظر گرفته شده نتوانست تعداد گلو مروزها را کاهش دهد. اما احتمال داده می شود که با افزایش غلظت عصاره، تعداد گلو مروزها کم شود، زیرا این ساختمانها 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 مروزها است.

## بحث

یکی از روش های تشخیص نارسایی حاد کلیه، اندازه گیری میزان پالایش گلو مزولی است. این اندازه گیری به عوامل مختلفی مانند حجم گلو مروزها، تعداد گلو مروزها و ساختمان لوله های کلیه وابسته است. مطالعات نشان می دهد که با کاهش تعداد گلو مروزها، میزان پالایش کلیه نیز کم می شود (۱۳). در بسیاری از بیماری ها، تعداد گلو مروزهای کلیه کم می شود. بیماری دیابت وابسته به انسولین و فشارخون زیاد می تواند موجب کاهش تعداد گلو مروزها شود. Pereira (۲۰۰۱) در یک الگوی تجربی بر روی موش صحرایی نشان داد که افزایش فشار خون موجب کاهش تعداد گلو مروزها به میزان ۳۳ درصد می شود (۱۵). در تحقیق حاضر تعداد کل گلو مروزهای کلیه در گروه شاهد در یک موش صحرایی  $1979 \pm 30969/77$  تخمین زده شد. Cahill (۱۹۹۶) در طی تحقیقی تعداد کل گلو مروزها در موش صحرایی را در حدود  $4545 \pm 34376$  عدد تخمین زد (۱۶). Nyenggard (۱۹۹۳) نیز تعداد کل گلو مروزهای کلیه در این حیوان را  $3100 \pm 26500$  و Bertram (۱۹۹۲) حدود  $3367 \pm 31764$  عدد تخمین زد (۱۸، ۱۷). تعداد گلو مروزهای کلیه در موش صحرایی بالغ و سالم توسط محققین مختلف و به وسیله روش های متفاوت بین  $44000 - 24000$  عدد محاسبه گردید (۱۹). به نظر می رسد که اختلاف در تعداد گلو مروزها در موش صحرایی مربوط به جنس و نژاد حیوان باشد. Deway (۱۹۹۶) نشان داد که نژادهای مختلف

- فهرست منابع
1. جزایری غیاث الدین. زبان خوراکیها. چاپ چهارم. تهران: انتشارت 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 interuterine 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>st</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 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.

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. *APMIS* 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.