

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

Zarei L., PhD<sup>1</sup>, Moloodi-Tapeh M., MSc<sup>2</sup>

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

### 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 4<sup>th</sup> 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

## بررسی اثر مهارکنندگی کافئین در دوران بارداری بر روی مورفوژن استخوان ها در جنین موش صحرایی

لیلا زارعی<sup>۱</sup>، مونس مولودی تپه<sup>۲</sup>

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

۲. گروه پرستاری و مامائی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران (مؤلف مسؤل)، تلفن ثابت: ۰۴۴-۳۳۴۳۷۴۵۰، moolody81@yahoo.com

### چکیده

**مقدمه:** مصرف بالای کافئین و عوارض آن امروزه بیشتر مورد توجه قرار می گیرد. 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 بررسی ناهنجاری های اسکلتی، جنین دوم برای بررسی 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 دو گروه 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 زیان آوری 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

**مقدمه**

انسان‌ها به طور روزمره و در تمام مراحل زندگی خود در حال مصرف مواد متیل‌گزانثینی هستند که کافئین یکی از این ترکیبات می‌باشد کافئین یک ترکیب آلکالوئیدی است که به وفور در چای، قهوه، انواع شکلات‌ها و انواع نوشابه‌ها وجود دارد و امروزه به مقدار زیادی از دانه‌های سبز قهوه به طریق شیمیایی سنتز و خالص‌سازی می‌شود (۱). امروزه ۸۰٪ مصرف کافئین به شکل قهوه یا چای بوده و میزان مصرف آن برای یک فرد بالغ حدود ۲۰۰ میلی‌گرم در روز می‌باشد که مصرف بیش از حد آن می‌تواند برای سلامت افراد مضر باشد. به دلیل اثرات زیان‌باری که در تحقیقات صورت گرفته بر روی کودکان و زنان باردار مشخص شده، توصیه می‌شود که در این قشر از افراد البته میزان مصرف آن از یک میلی‌گرم در روز بیشتر نشود چرا که باعث مشکلات متابولیسمی می‌شود (۲ و ۳).

کافئین به سرعت از طریق دهان، رکتوم و تزریق زیر جلدی جذب شده و در خون به پروتئین‌های پلاسما و عمدتاً آلبومین متصل می‌شود که بعد از ورود به سلول‌ها به طریق انتشار ساده به سایر سلول‌ها انتشار یافته و در طی متابولیسم خود به مشتقات متیل‌گزانثین تبدیل می‌شود (۴). مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهند که ترکیب کافئین توانایی بالایی در مهار فعالیت آنزیم فسفودی استراز (افزایش چشمگیر انرژی سلول)، تداخل در سوخت و ساز کلسیم، مهار فعالیت مونوآمین اکسیدازها (عدم تجزیه کاتکول آمین‌ها) داشته (۵) و نهایتاً به عنوان آنتاگونیست با رسپتور آدنوزین (مهار سنتز DNA) باعث تغییر فرآیند‌های متابولیسمی سلول می‌گردد (۶).

در مطالعاتی که بر روی انسان و سایر موجودات انجام شده است مشخص شده است که مافئین می‌تواند از سد خونی جفت عبور کرده و به جنین برسد (۷). طی مطالعه‌ای که در سال ۱۹۶۰ صورت گرفته متوجه شده‌اند که تزریق ۲۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم به موش‌های 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 می‌توانند باعث ایجاد ناهنجاری در جنین و نوزادان شده و می‌تواند حتی به عنوان عامل سرطان مطرح شده و ناهنجاری‌های مادرزادی را در پی داشته باشد (۱۰ و ۸).

خطر شکستگی استخوان‌ها و نیز استئوپوروز را در افرادی که کافئین بیش از اندازه مصرف می‌کنند، افزایش می‌دهد که توجیه استئوپوروز با دفع ادراری کلسیم به واسطه کافئین را می‌توان 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 می‌رسد که با مصرف بالای محصولات کافئینی لزوم بررسی‌ها 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 جنین‌ها برآورد نماییم چرا که تا کنون مطالعات زیادی در این زمینه صورت نگرفته و آسیب کافئین در استخوان‌سازی جنین‌هایی 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 می‌باشد که در آن ۴۰ سر موش‌های صحرایی نژاد N-MRI با وزن ۱۸۰ تا ۲۵۰ گرم از موسسه رازی ایران تهیه شده و در حیوان‌خانه به مدت دو هفته قبل از شروع آزمایش برای آداپتاسیون در قفس‌های مناسب و در محدوده دمایی ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتیگراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی

رنگ آمیزی نواحی استخوانی جهت توصیف جزئیات تکاملی در استخوان بکار رفته است. در این روش بعد از جدا کردن 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 بر میداریم و سپس 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 استرونوم و اکسی پیتال و همچنین ناهنجاری دنده مهره ای یا ناهنجاری انگشتان، طول فمور و میزان 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 گریتا کولیس 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 اسپکتروفوتومتری جذب اتمی (AA-6300 Shimadzu) 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 سانتیگراد 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.

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 نظر گرفته شدند.

گروه های مورد مطالعه:

رت های حامله از روز هشتم در دو گروه 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 بررسی 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

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 رنگ آمیزی مقاطع بافتی رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین 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 گزین و الکل انجام شد. در مراحل بعدی، بعد از رنگ آمیزی با رنگ های هماتوکسیلین و ئوزین مراحل آبیگری انجام شده و برای شفاف سازی هم از گزینول استفاده گردید.

مطالعات مورفومتری:

پس از تهیه مقاطع از Midshaft استخوان فمور سمت چپ، برای تعیین مساحت کل مقطع در برش عرضی فمور، مساحت پیوست و بدست آوردن نسبت این دو نمونه ها به روش زیر آماده شدند. ابتدا از تمام طول فمور برش های  $8\mu\text{m}$  تهیه شد و از ده برش وسطی برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ئوزین 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 (Integratph& 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  $P < 0.05$  و  $P < 0.001$  معنی دار در نظر گرفته شد و داده ها به صورت میانگین  $\pm$  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 دنیا آمدند و علائمی همچون هماتوم در ناحیه دست، پا، دهان و صورت در جنین های مرده دیده شد (شکل ۱) همچنین قطع شدگی ناحیه دمی در ۸٪ از جنین های گروه دریافت کننده کافئین مشاهده گردید. همچنین بررسی های وزنی، کاهش معنی داری ( $P < 0.05$ ) را در در جنین های حاصل از گروه تیمار میزان وزن جنین ها نسبت به گروه شاهد نشان دارد (جدول ۱).

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  $P < 0.05$  نسبت به گروه شاهد داشته باشد همچنین تجویز کافئین باعث کاهش معنی داری ( $P < 0.05$ ) در طول فمور نسبت به گروه شاهد شده است (جدول ۱-). ولی اندازه گیری عرض قسمت میانی دیافیز توسط کولیس و گریتا کولیس 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 ( $P < 0.05$ ) مقطع عرضی این ناحیه در گروه تیمار بود (شکل ۲).

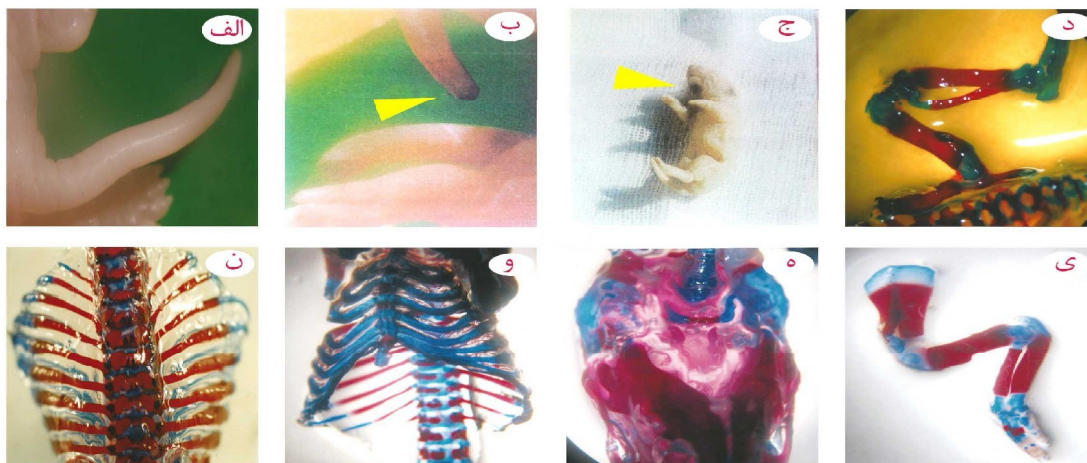
نتایج بررسی های هیستولوژیکی: مطالعات سریالی میکروسکوپی از مقاطع پروگزیمال فمور تا انتهای دیستال فمور نشان داد پس از اتمام اپی فیز فوقانی استخوان به مقطع غضروفی رسید که تا اپی فیز تحتانی ادامه داشته و بلافاصله بعد از اتمام نمای غضروفی و در قسمت دیافیز مقاطع به ترتیب به این شکل دیده شدند: پیوست که از دولایه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

پریوست در برش عرضی در دو گروه 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 (جدول ۲).

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  $P < 0.001$  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  $P < 0.05$  دچار کاهش شده است (جدول ۳).

عرضی پوشاننده و در طرف داخلی آن تیغه های استخوانی تیغه های استخوانی به صورت شعاعی و نامنظم قرار داشت و در لایه 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 در شکل ۳ 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 دیافیر و همچنین مقایسه مساحت



شکل ۱: 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 هاواسترونوم (و)، اسکلت جمجمه (ه) و اسکلت اندام قدامی (ی) در گروه های کافئینه دیده نشده است.

جدول ۱. 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.

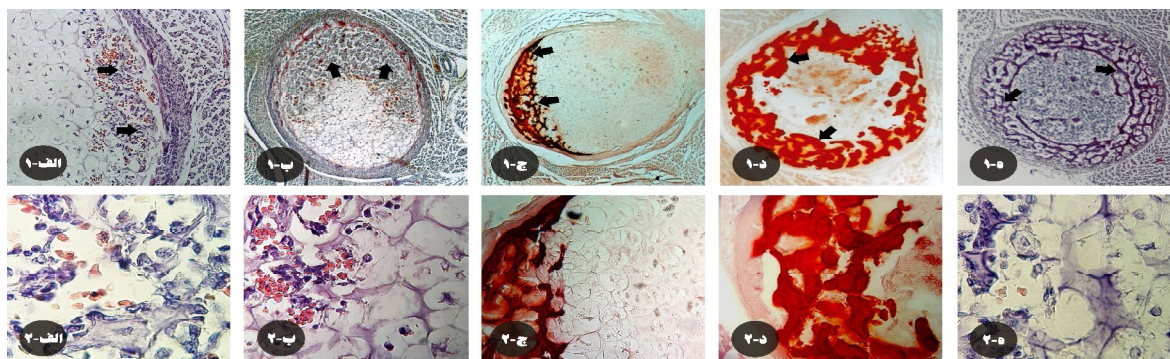
سطح معنی داری	تیمار	کنترل	
	صفر	۸ درصد مرگ ۶ درصد هماتوم ۸ درصد دم کوتاه	درصد تاثیر کافئین بر ناهنجاری های ماکروسکوپی
$P < 0.05^{**}$	$5/102 \pm 0.02$	$5/8 \pm 0.08$	تاثیر کافئین بر وزن جنین ها (gr)
$P < 0.05^{**}$	$5/2 \pm 0.03$	$6/5 \pm 0.08$	تاثیر کافئین بر طول استخوان فمور (mm)
$P < 0.05^{**}$	$3/2 \pm 0.03$	$3/5 \pm 0.04$	تاثیر کافئین بر طول بر طول قسمت استخوانی شده فمور (mm)
$P < 0.05^{**}$	$0/74 \pm 0.02$	$0/9 \pm 0.04$	تاثیر کافئین بر مساحت کل فمور در برش عرضی (mm <sup>2</sup> )



شکل ۲: 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 از کولیس و گریتاکولیس در زیر استریومیکروسکوپ اندازه گیری شد.

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

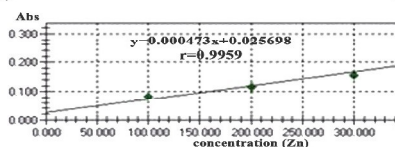
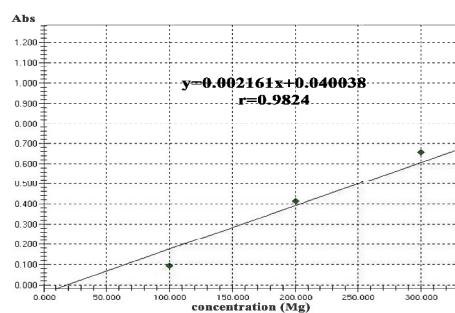
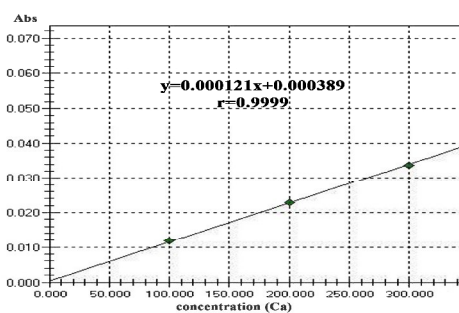
تیمار	کنترل	
$0/839 \pm 0/0385$	$0/872 \pm 0/0268$	مساحت کل مقطع در برش عرضی
$0/1226 \pm 0/0074$	$0/1241 \pm 0/009$	مساحت پریوست
$0/1502 \pm 0/007$	$0/1376 \pm 0/0069$	نسبت مساحت پریوست به مساحت کل مقطع در برش عرضی



شکل ۳: 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. فلش‌ها نشان دهنده تیغه‌های استخوانی می‌باشد (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 پایین ۱۰۰ می‌باشد.

جدول ۳. غلظت املاح در قسمت استخوانی شونده فمور نشان می‌دهد میزان کاهش قابل توجه املاح در گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل در سطح معنی داری  $P < 0.001$ \*\*\* و  $P < 0.05$ \*\* می‌باشد. نمودار ۱ استاندارد جذب اتمی سه عنصر که با روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی روش سنجیده شده اند را نشان می‌دهد.

کنترل	تیمار	سطح معنی داری	
$0.34 \pm 0.01$	$0.24 \pm 0.02$	$P < 0.001$ ***	غلظت کلسیم (mg)
$0.05 \pm 0.02$	$0.04 \pm 0.03$	$P < 0.001$ ***	غلظت منیزیم (mg)
$1/75 \pm 0/9$	$0/7 \pm 0/2$	$P < 0.05$ **	غلظت روی (mg)
$0.25 \pm 0.04$	$0.13 \pm 0.03$	$P < 0.05$ **	غلظت فسفر ( $\mu$ g)



نمودار ۱. استاندارد جذب اتمی سه عنصر که با روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی سنجیده شده است.

## 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 (۱۴ و ۱۳). در مطالعه حاضر کاهش وزن در گروه دریافت کننده کافئین در سطح معنی داری  $P < 0.05$  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 فرزندان با وزن میانگین کمتر از ۳۷۹ میلی گرم نسبت به مادرائی 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 (۱۷ و ۱۶) 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 در نتیجه 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 (۲۰ و 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 و افزایش آن می تواند 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 (۲۲ و 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 می باشد (۲۵ و 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 تمایز 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 برون ده 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

دوره، دوز و زمان مصرف بر وقوع انواع ناهنجاری ها در جنین تاثیر دارد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان نامهء کارشناسی ارشد بافت شناسی پزشکی تحت عنوان بررسی اثر کافئین بر استخوانساز فمور در جنین رت در دانشکدهء پزشکی کرمانشاه است و عملیات بافت شناسی آن در آزمایشگاه بافت شناسی دانشکدهء پزشکی کرمانشاه انجام گرفته است. بدینوسیله از جناب آقای دکتر قربانی و دکتر خزائی اساتید محترم علوم تشریح و مسئول آزمایشگاه بافت شناسی سرکار خانم فاضلی که در کارهای عملی و هماهنگی های لازم کمک فراوانی نمودند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

کلاژن و ماتریکس خارج سلولی در این سلول ها به شدت کاهش می یابد (۳۰ و 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 می باشد 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 زیان آوری داشته و البته عواملی همچون طول

### 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<sub>2A</sub> 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.

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)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 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. Hallström 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, Díaz-Ríos M. Caffeine stimulates locomotor activity in the mammalian spinal cord via adenosine A<sub>1</sub> receptor-dopamine D<sub>1</sub> 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.

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.