

تداخل اثر کافئین با استریتومایسین بر تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه و کبد موش صحرایی

حسین نجف زاده (PhD)*، بابک محمدیان (PhD)^۲، مریم رهبر (DVM)^۳، نسترن اکبری (DVM)^۲، محمد درویش خادم (DVM)^۲،
لیلا نیک روان (DVM)^۲

۱- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

دریافت: ۹۳/۶/۲۳، اصلاح: ۹۳/۹/۱۵، پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به احتمال افزایش سمیت کلیوی استریتومایسین بوسیله چای و قهوه که حاوی متیل گزانتین ها از جمله کافئین هستند، هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کلیه و کبد و برخی فاکتورهای سرمی موش صحرایی در مصرف همزمان استریتومایسین و کافئین می باشد. **مواد و روشها:** این مطالعه تجربی در مدل حیوانی و بر روی ۲۵ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰۰ گرم در ۵ گروه انجام شد. گروه اول بعنوان گروه شاهد، گروه های دوم تا پنجم به ترتیب استریتومایسین (۲۵ mg/kg)، کافئین (۵ mg/kg) + استریتومایسین، کافئین و استریتومایسین + ویتامین سی (۱۰۰ mg/kg) را به مدت ۲۱ روز و بصورت داخل صفاقی دریافت کردند. سپس موش ها با اثر بیهوش شدند و از قلب خونگیری شد و در سرم مقادیر کراتینین، ازت اوره، سدیم و پتاسیم اندازه گیری شد. از بافت کلیه و کبد برای بررسی پاتولوژیک به روش معمول نمونه گیری و مقطع تهیه شد و با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین و بوسیله میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

یافتهها: مقدار کراتینین و پتاسیم سرم در بین گروهها تفاوت نداشت در حالی که مقدار ازت در گروه ۵ (15 ± 0.7 mg/dl) نسبت به گروه ۱ و ۴ بطور معنی داری کمتر بود ($p < 0.05$). سدیم در گروه ۲ (139.8 ± 0.2) و ۴ (140 ± 0.447) افزایش و در گروه ۵ (137.25 ± 0.75 meq/l) کاهش معنی داری داشت ($p < 0.05$). آسیب بافت کبد و کلیه در مصرف همزمان استریتومایسین و کافئین شدیدتر بود. ویتامین سی این ضایعات را کاهش داد.

نتیجه گیری: کافئین آسیب کلیوی ناشی از استریتومایسین را میتواند تشدید نماید در حالی که ویتامین سی آن را کاهش دهد.

واژه های کلیدی: استریتومایسین، کافئین، کلیه، کبد، موش صحرایی.

مقدمه

مقدار اندکی افزایش می دهد و فعالیت عصبی را در بسیاری از مناطق مغز افزایش می دهد (۳ و ۴). بسیاری از اثرات کافئین از طریق آنتاگونیسم رقابتی با گیرنده های آدنوزین رخ می دهد. آدنوزین یک نورومودولاتور است که بر تعدادی از عملکردهای سیستم عصبی مرکزی مؤثر است. اثرات تسکینی متوسط زمانی اتفاق می افتد که آدنوزین رسپتورهای زیر گروه اختصاصی آدنوزین را فعال کند و اثر کافئین را خنثی نماید (۵ و ۶). سیتوتوکسیته کافئین ممکن است به واسطه توانایی آن در ایجاد آپوپتوز باشد. گونه های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده توسط کافئین باعث جراثحت سلول در آپوپتوز و نکروز می شود (۶). استریتومایسین ضد میکروب آمینوگلیکوزیدی است که با مهار پروتئین سازی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی می تواند آنها را از بین ببرد. استریتومایسین یکی از آنتی بیوتیک های مهم در درمان بروسلوز و سل محسوب می شود. عارضه مهم این دارو، سمیت کلیوی بخصوص در بیماران دچار نارسایی های کلیوی می باشد. همچنین این دارو می تواند سمیت شنوایی را حتی در جنین بدنبال داشته باشد (۷ و ۸). با توجه به اهمیت مصرف کافئین و احتمال تجویز استریتومایسین بدلیل بیماری های عفونی از قبیل بروسلوز و سل، این مطالعه به منظور ارزیابی تابلوی سرمی و

کافئین جزء خانواده ی متیل گزانتین ها می باشد. ترکیبات گزانتین فسفودی استراز را مهار کرده و سبب افزایش cAMP می شوند در نتیجه باعث انقباض عضلات صاف می گردند. ترکیبات گزانتینی با افزایش cAMP در قلب اثرات اینوتروپ و کرونتروپ مثبت را بجای می گذارند و تاکی کاردی ایجاد می کنند در حالی که در ریه مانع از ورود کلسیم به سلول ها شده و سبب انقباض عضلات صاف (برونکودیلاتاسیون) می گردند. متیل گزانتین ها به خصوص کافئین در مقادیر کم و متوسط با افزایش سطح هوشیاری و رفع خستگی، سبب برانگیختگی خفیف قشر مغز می شوند. مقادیر بالاتر متیل گزانتین ها برای اتساع برونش ها مورد نیاز می باشند که به طور معمول سبب عصبانیت و لرزش در برخی بیماران می گردند. متیل گزانتین ها نباید در آسم حاد استفاده شوند زیرا اتساع برونشی بیشتری را نسبت به درمان استاندارد فراهم نمی کنند و مصرف آن ها ممکن است با عوارض قابل توجهی همراه باشد (۱ و ۲). کافئین به عنوان یک محرک ملایم، گسترده ترین داروی روان گردان مورد استفاده در جهان است. کافئین در نوشیدنی های بدون الکل، قهوه، چای، کاکائو، شکلات و بسیاری از داروهایی که نیاز به نسخه دارند و یا نیاز به نسخه ندارند، حضور دارد. کافئین ترشح دوپامین و نوراپی نفرین را به

* مسئول مقاله: دکتر حسین نجف زاده

یافته ها

مقدار کراتینین و پتاسیم سرم در بین گروههای مختلف تحت مطالعه تفاوت آماری نداشت درحالیکه مقدار ازت اوره خون در گروه ۵ (دریافت کننده استرپتومایسین + ویتامین سی) از گروه ۱ (شاهد) و ۴ (دریافت کننده کافئین به تنهایی) بطور معنی داری کمتر بود ($P < 0.05$). بطوری که مقدار این شاخص در گروه اول $18/25 \pm 0.854$ میلی گرم در دسی لیتر بود و در گروه چهارم به $17/6 \pm 0.927$ میلی گرم در دسی لیتر رسید اما در گروه پنجم به 15 ± 0.707 میلی گرم در دسی لیتر کاهش معنی داری داشت (جدول ۱). مقدار سدیم سرم از نظر آماری در گروه ۲ (دریافت کننده استرپتومایسین به تنهایی) و گروه ۴ افزایش یافت ($P < 0.05$) و به ترتیب به $139/8 \pm 0.2$ و 140 ± 0.447 میلی اکی والان در لیتر رسید. در حالی که مقدار سدیم سرم در گروه ۵ یعنی گروه دریافت کننده استرپتومایسین به همراه ویتامین سی کاهش معنی داری پیدا کرد ($P < 0.05$) و به $137/25 \pm 0.75$ میلی اکی والان در لیتر رسید (جدول ۱). در بررسی بافت کلیه مشاهده شد که استرپتومایسین موجب تورم سلولی، نفرت بینابینی، التهاب و نکروز سلولی و تشکیل کست های هیالین در لوله های ادراری می شود. مصرف کافئین به همراه استرپتومایسین سبب تشدید ضایعات فوق شده و نکروز توبولی و پرخونی شدید را به همراه داشته است. در حالی که کافئین به تنهایی اثر کمی بر بافت کلیه داشته و شدت عوارض فوق را نداشت. ویتامین سی این ضایعات را کاهش داد و بافت تقریباً سالمی در کلیه ها مشاهده شد. (شکل ۱-الف تا ۱-ج). استرپتومایسین تغییرات بافتی چندانی را در کبد بدنال نداشت و کمی نکروز انعقادی و هجوم سلول های تک هسته ای مشاهده شد. ولی کافئین به تنهایی موجب تشکیل زیادواکوئل های چربی، تورم سلولی و کاهش فضای سینوزوئیدها شد که در مصرف همزمان با استرپتومایسین همین ضایعات مشاهده شد. ویتامین سی توانست این ضایعات را کاهش دهد (شکل ۱-الف و ۱-د و ۱-ه).

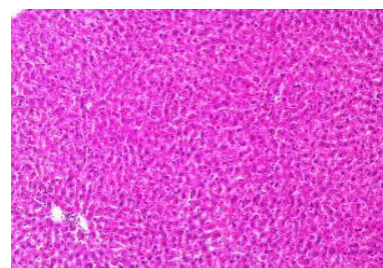
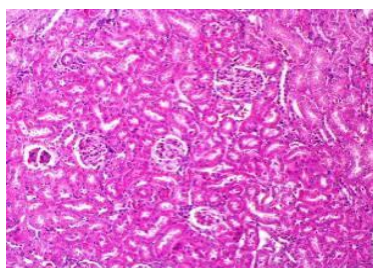
هیستوپاتولوژی بافت کلیه و کبد در موش های صحرایی انجام شد تا به این سوال پاسخ داده شود که تا چه اندازه در مصرف همزمان کافئین و استرپتومایسین بافت کلیه و احتمالاً کبد آسیب پذیر خواهد بود و ویتامین سی بعنوان آنتی اکسیدان چقدر در کاهش این آسیب های احتمالی موثر است.

مواد و روش ها

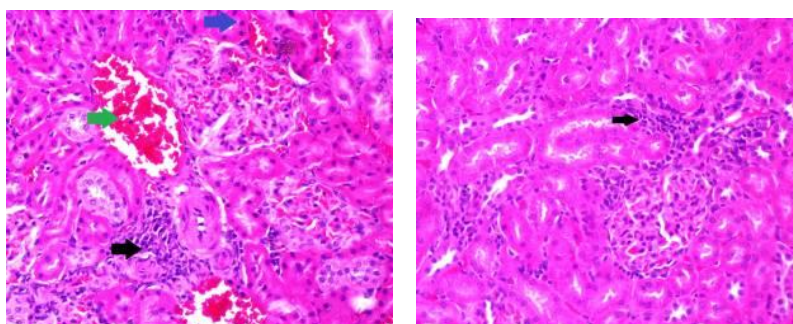
این مطالعه تجربی در مدل حیوانی بر روی ۲۵ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰۰ گرم انجام شد. موش ها به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول بعنوان گروه شاهد در شرایط مشابه تغذیه و دما با سایر گروه ها نگهداری شد. گروه های دوم تا پنجم به ترتیب استرپتومایسین 25 mg/kg ، کافئین + استرپتومایسین، 5 mg/kg و استرپتومایسین + ویتامین سی 100 mg/kg را دریافت کردند. داروها روزانه و به مدت ۲۱ روز و بصورت داخل صفاقی تجویز شدند. سپس موش ها با اثر بیهوش شدند و از قلب خونگیری شد تا سرم جدا شود. آنگاه با ادامه بیهوشی بوسیله اتر موشها آسان کشی شدند. محوطه شکمی موش ها باز شد و از بافت کلیه و کبد برای بررسی پاتولوژیک به روش معمول نمونه گیری گردید. به روش رایج تهیه مقاطع بافتی از کبد و کلیه مقطع تهیه شد. لام ها با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی و بوسیله میکروسکوپ نوری از نظر تغییرات پاتولوژیک از جمله نکروز، خونریزی و غیره مطالعه شدند. در سرم مقادیر کراتینین، ازت اوره، سدیم و پتاسیم بوسیله کیت آزمایشگاهی پارس آزموون و دستگاه اتوآنالایزر اندازه گیری شد. مقادیر سرمی فاکتورها بین گروه ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون LSD مقایسه شدند. اختلاف میانگین داده ها (\pm خطای استاندارد) با $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

جدول ۱. میانگین \pm خطای استاندارد برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی سرم موشها (حروف بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه هاست ($P < 0.05$ ، $n=6$).

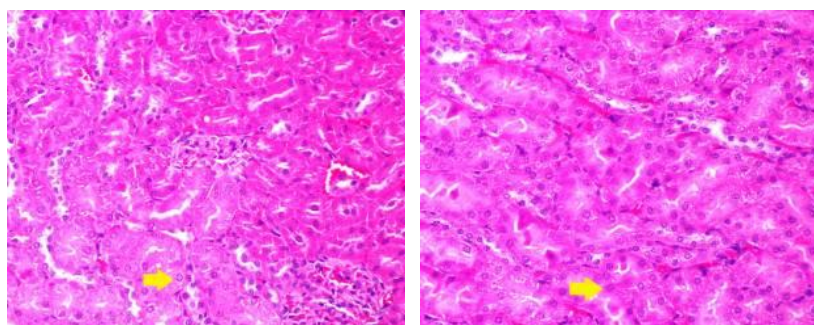
گروه	کراتینین (mg/dl)	ازت اوره خون (mg/dl)	سدیم (meq/l)	پتاسیم (meq/l)
شاهد	0.55 ± 0.05	$18/25 \pm 0.854a$	$137/5 \pm 0.289a$	$4/1 \pm 0.1826$
استرپتومایسین	0.56 ± 0.04	$17/2 \pm 0.735ac$	$139/8 \pm 0.2 b$	$4/26 \pm 0.51$
p-value	0.819	0.408	0.607	0.858
استرپتومایسین + کافئین	0.5 ± 0	$16/2 \pm 0.97ac$	$138/6 \pm 0.5 b$	$3/94 \pm 0.1778$
p-value	0.156	0.404	0.072	0.705
کافئین	0.56 ± 0.0245	$17/6 \pm 0.927ab$	$140 \pm 0.447 cd$	$5/58 \pm 1/2128$
p-value	0.156	0.247	0.39	0.064
استرپتومایسین + ویتامین سی	0.5 ± 0	$15 \pm 0.707c$	$137/25 \pm 0.75 b$	$4/125 \pm 0.2175$
p-value	1	0.05	0.001	0.116



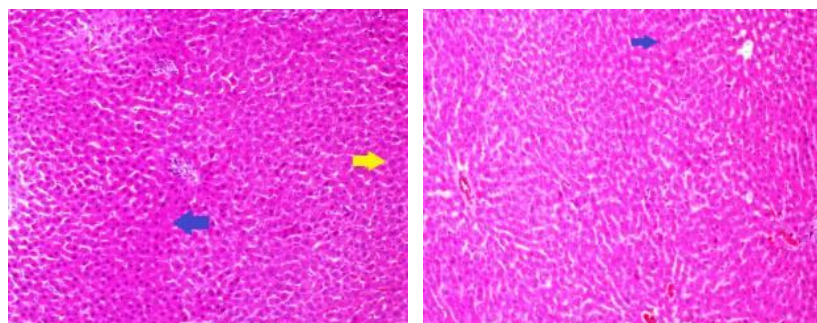
شکل ۱-الف. نمای میکروسکوپی کلیه (سمت چپ) و کبد (سمت راست) در موش های گروه اول (شاهد) ($\times 10$ H&E)



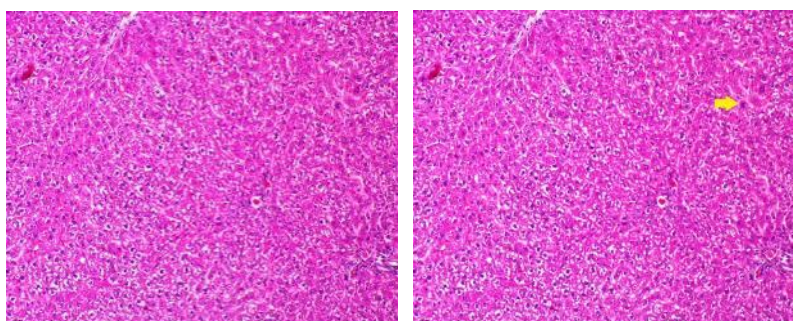
شکل ۱-ب. نمای میکروسکوپی کلیه در موش های گروه دوم (راست): فلش سیاه نشاندهنده نفریت بینابینی است و گروه سوم (چپ): فلش های آبی، سیاه و سبز به ترتیب بیانگر نکروز، نفریت بینابینی و پرخونی می باشند (H&E ×20)



شکل ۱-ج. نمای میکروسکوپی کلیه در موش های گروه چهارم (راست): فلش زرد نشاندهنده تورم سلولی است و گروه پنجم (چپ): فلش زرد نشاندهنده تورم سلولی است (H&E ×20)



شکل ۱-د. نمای میکروسکوپی کبد در موش های گروه دوم (راست): فلش آبی نشاندهنده نکروز است و گروه سوم (چپ): فلش آبی نشاندهنده نکروز ناحیه ای و فلش زرد بیانگر تورم سلولی است (H&E ×10)



شکل ۱-ه. نمای میکروسکوپی کبد در موش های گروه چهارم (راست): فلش زرد بیانگر تورم سلولی است و گروه پنجم (چپ) که بافت نرمال مشاهده می شود (H&E×10)

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر مصرف مداوم استرپتومايسين به مدت ۲۱ روز موجب تغييرات هيستوپاتولوژيك قابل ملاحظه ابي در كليه ها شد كه اين تغييرات بوسيله مصرف همزمان كافئين تشديد شد. در حالي كه كافئين به تنهائي تغييرات مهمي در بافت كليه ايجاد نكرد. از طرفي مصرف همزمان ويتامين سي با استرپتومايسين توانست عوارض كليوي استرپتومايسين را كاهش دهد.

استرپتومايسين احتمالاً از طريق القاي استرس اكسيداتيوي با ايجاد آسيب در غشاي سلول هاي توبول كليوي و همچنين آسيب به ارگانل هايي از قبيل ميتوكوندري و ليزوزوم مي تواند عارضه كليوي ايجاد كند. اين تغييرات از آثار آنتي بيوتيك هاي آمينوگليكوزيدي است (۹و۱۰) در بعضي از مطالعات اثرات جنتاميسين در تغييرات استرس اكسيداتيوي و اثر محافظتي برخي از آنتي اكسيدان ها مثل ويتامين E و C و سيليمارين ارزايي شده است. مطالعه مشابه جهت مقايسه نتايج در دسترس نيست اما در يك مطالعه بيان شده است كه استرپتومايسين پتانسيل آسيب كيدي اندكي دارد ولي سميت كليوي آن مي تواند منجر به سميت كيدي شود و افراد دچار نارسايي كيدي زودتر سميت كليوي ناشي از استرپتومايسين را نشان مي دهند (۱۱). در مطالعه حاضر كافئين به تنهائي تاثيري بر بافت كليه ها نداشت اما اثر استرپتومايسين را افزايش داد. اين تقويت سميت كليوي براي بعضي از داروها بيان شد از جمله Champion و همكاران نشان دادند كه كافئين در موش صحرابي سميت كليوي مفايميك اسيد را با مكانيسم ناشناخته اي افزايش مي دهد (۱۲). اين در حالي است كه در برخي ديگر از مطالعات كافئين اثر محافظتي داشته است در مطالعه ابي در سال ۲۰۱۰ با

تجوز كافئين به تنهائي و به همراه فلورايد در مدت يك ماه در موش صحرابي مشاهده شد كه كافئين استرس اكسيداتيوي ناشي از فلورايد را در بافت هاي مختلف از جمله كليه ها را كاهش داده و بعنوان آنتي اكسيدان عمل مي كند. البته در مطالعه مذكور مصرف كافئين بصورت تجوزي در آب موش ها بوده است (۱۳) و نتيجه آن با مطالعه ما متضاد است كه شايد بدليل تفاوت نوع سميت (استرپتومايسين) يا روش مصرف (تزيقي) مطالعه ما باشد. در مطالعه حاضر استرپتومايسين تاثيري بر بافت كبد نداشت اما كافئين در بافت كبد موجب تشكيل زياد واكوتل هاي چربي، تورم سلولي و كاهش فضاي سينوزويدها شد. همسو با مطالعه ما، Ohta و همكاران در مطالعه اي نشان دادند كه كافئين مي تواند آسيب كيدي را در وضعيت تضعيف ايمني تشديد نمايد (۱۴). با اين حال مصرف همزمان استرپتومايسين و كافئين تاثيري بر ضايعات كيدي ناشي از كافئين نداشت اما ويتامين C اين آثار هيستوپاتولوژيك را كاهش داد. با توجه به مطالعه حاضر مي توان اظهار داشت كه آسيب بافت كبد و كليه در مصرف همزمان استرپتومايسين و كافئين شديدتر از هريك از آنها به تنهائي بود و ويتامين سي اين ضايعات را كاهش داد. بنا بر اين مي توان بيان كرد كه كافئين آسيب كليوي ناشي از استرپتومايسين را مي تواند تشديد نمايد.

تقدير و تشكر

بدينوسيله از معاونت پژوهشي دانشگاه شهيد چمران اهواز جهت حمايت مالي اين تحقيق تشكر و قدرداني مي گردد.

The Effects of the Concomitant Use of Caffeine and Streptomycin on Histopathological Changes in the Kidney and Liver of Rats

H. Najafzadeh (PhD)^{*1}, B. Mohammadian (PhD)², M. Rahbar (DVM)³, N. Akbari (DVM)³,
M. Darvishkhadem (DVM)³, L. Nikravan (DVM)³

1. Department of Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R.Iran

2. Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R.Iran

3. Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(6); Jun 2015; PP: 58-63

Received: Oct 6th 2014, Revised: Dec 6th 2014, Accepted: Feb 4th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Considering the possibility of increased renal toxicity induced by streptomycin in tea and coffee, which contain methylxanthines such as caffeine, we aimed to investigate the histopathological changes in the kidney and liver of rats. We also evaluated some serum parameters after the concurrent use of streptomycin and caffeine.

METHODS: This experimental study was performed on 25 female Wistar rats, with the average weight of 200 g; the rats were divided in five groups. Group I was regarded as the control group, group II received streptomycin (25 mg/kg), group III was administered streptomycin+caffeine (5 mg/kg), group IV received caffeine (5 mg/kg) and group V received streptomycin + vitamin C (100 mg/kg) for a period of 21 days. Afterwards, the rats were anesthetized with ether and blood samples were obtained from the heart. Serum creatinine, blood urea nitrogen, sodium and potassium levels were measured in rats. After preparing and sectioning renal and hepatic tissues for pathological examinations, they were stained by hematoxylin and eosin (H&E); the samples were examined, using a light microscope.

FINDINGS: Serum creatinine and potassium levels were not significantly different between the groups, while urea nitrogen level in group V (15±07 mg/dL) was significantly lower than the values reported in groups I and IV (p<0.05). Sodium level increased in group II (139. 8±0.2 mEq/L) and group IV (140±0.447 mEq/L), while a significant reduction was reported in group V (137.25±0.75 mEq/L) (p<0.05). According to the findings, hepatic and renal damages were severe after the concomitant use of streptomycin and caffeine. However, vitamin C reduced the induced damages.

CONCLUSION: As the results indicated, caffeine could aggravate renal injuries, induced by streptomycin, while vitamin C had an alleviating effect.

KEY WORDS: *Streptomycin, Caffeine, Kidney, Liver, Rats.*

Please cite this article as follows:

Najafzadeh H, Mohammadian B, Rahbar M, Akbari N, Darvishkhadem M, Nikravan L. The Effects of the Concomitant Use of Caffeine and Streptomycin on Histopathological Changes in the Kidney and Liver of Rats. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(6):58-63.

* Corresponding Author; H. Najafzadeh (PhD)

Address: Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R.Iran

Tel: +98 61 33330073

E-mail: najafzadeh@scu.ac.ir

References

- 1-Goodman LS, Limbird LE, Milinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A, Editors. Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. Mc Graw Hill (Tx);1996. p.396,592.
- 2- Waldman SA, Terzic A. Pharmacology and therapeutic: principles to practice. 1st ed. USA:Sanders/Elsevier; 2009. p.428-9.
- 3-Hoesch RE, Weinreich D, Kao JPY. A novel ca²⁺ influx pathway in mammalian primary sensory neurons is activated by caffeine. *J Neurophysiol.* 2001;86(1):190-6.
- 4-Marret S, Gressens P, Van-Maele-Fabry G, Picard J, Evrard P. Caffeine induced disturbance of early neurogenesis in whole mouse embryo cultures. *Brain Res.*1997;773(1-2):213-6.
- 5-He Z, Ma WY, Hashimoto T, Bode AM, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Res.* 2003;63(15):4396-401.
- 6-Lu PZ, Lai CY, Chan WH. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int J Mol Sci.* 2008;9(5):698-718.
- 7-Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:1003–12.
- 8-Brigas GG, Freeman RK, Yaffe SJ. Drug in pregnancy and lactation: A reference guide to fetal and neonatal risk. 8thed. USA:Lippincott Willims and Wilkins; 2008.p. 228-33.
- 9-Kumar M, Kakkar V, Mishra AK, Chuttani K, Kaur IP. Intranasal delivery of streptomycin sulfate (STRS) loaded solid lipid nanoparticles to brain and blood. *Int J Pharm.* 2014. 461(1-2):223-33.
- 10-Williams PD, Bennett DB, Gleason CR, Hottendorf GH. Correlation between renal membrane binding and nephrotoxicity of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(4):570-4.
- 11-Andrade RJ, Tulkens PM. Hepatic safety of antibiotics used in primary care. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(7): 1431-46.
- 12-Champion de Crespigny P, Hewitson T, Birchall I, Kincaid-Smith P. Caffeine potentiates the nephrotoxicity of mefenamic acid on the rat renal papilla. *Am J Nephrol.* 1990;10(4):311-5.
- 13-Inkielewicz-Stepniak I, Czarnowski W. Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(6):1607-11
- 14-Ohta A, Lukashev D, Jackson EK, Fredholm BB, Sitkovsky M. 1, 3, 7-trimethylxanthine (caffeine) may exacerbate acute inflammatory liver injury by weakening the physiological immunosuppressive mechanism. *J Immunol.* 2007; 179(11):7431-8.