

## بررسی فعالیت تکثیری سلول‌های زایای موش نر بالغ تحت تیمار با دوزهای مختلف نیکوتین

سینا خواجه جهرمی **M.D. Student\***، فهیمه محمد قاسمی **Ph.D.\*\***، هادی حاجی زاده فلاح **M.D.\*\*\***

\* کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

\*\* مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

\*\*\* گروه پاتولوژی، بیمارستان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۹۰

### چکیده

**هدف:** ارزیابی فعالیت تکثیری سلول‌های زایای موش نر بالغ پس از تیمار با دوزهای متفاوت نیکوتین

**مواد و روش‌ها:** موش‌های نر بالغ NMRI به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه ششم - کنترل نرمال سالیین دریافت کردند و حیوانات در گروه‌های دو، سه و چهار به ترتیب تحت تزریق دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکوتین قرار گرفتند. نیکوتین به صورت داخل صفاقی و یکبار در روز به مدت ۱۴ روز تجویز شد. همه حیوانات در روز پانزدهم تشریح شده و ارزیابی‌ها توسط روش ایمونوهیستوشیمی Ki67 و نمره دهی جانسون به ترتیب برای بررسی فعالیت تکثیری سلول‌های زایای میتوتیک، میوتیک و ارزیابی کیفیت اسپرماتوژنز و همچنین آزمون الیزا برای بررسی سطح تستوسترون سرم انجام شد. داده‌ها با آزمون‌های Tukey و ANOVA تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** تیمار حیوانات توسط نیکوتین با دوزهای ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌داری نمره جانسون را نسبت به گروه ششم - کنترل کاهش داد ( $p < 0.05$ ). نیکوتین در دوز ۰/۴ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم میزان شاخص Ki67 را به طور معنی‌دار در سلول‌های میوزی لپتوتن و پاکتی تن در مقایسه با گروه کنترل، کاهش داد ( $p < 0.001$ ). در حالی که بر سلول‌های اسپرماتوگونی بی اثر بود. سطح سرمی تستوسترون در گروه ۳ و ۴ نیز نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد نیکوتین دارای آثار مضر روی فرایند اسپرماتوژنز است و این موضوع در غالب یک فرایند وابسته به دوز است. اگرچه در دوزهای پایین، در فعالیت تکثیری، تغییری رخ نمی‌دهد بنابراین این احتمال وجود دارد که مکانیسم‌های دیگری نیز در کاهش بلوغ و کیفیت اسپرماتوژنز به دنبال مصرف نیکوتین دخیل باشند.

**کلیدواژه‌ها:** نیکوتین، تکثیر، بیضه، کیفیت اسپرماتوژنز

### مقدمه

عملکرد اسپرم اثر گذاشته و آن را مختل نماید [۱]. یک سیگاری در حدود ۴۷۲۰ ماده سمی و جهش‌زا مانند مونوکسید کربن، هیدروکربن‌های آروماتیک و نیکوتین را

آثار مصرف سیگار به عنوان یکی از رایج‌ترین عادات در دنیا بر تولید مثل مردان، به میزان زیادی در گونه‌های مختلف پستانداران مورد مطالعه قرار گرفته است. سیگار می‌تواند بر

آدرس مکاتبه: رشت، کیلومتر ۱۰ جاده تهران-رشت، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، صندوق پستی: ۳۳۶۳

E-mail: parsahistolab@gmail.com

مجله علوم تشریح ایران، سال نهم، شماره ۳۶، پاییز ۹۰، صفحات ۲۴۰-۲۲۹

نیکوتینی استیل کولینی (nAChRs) اعمال می‌کند [۱۰]. این رسپتورها علاوه بر این که به طور گسترده در سلول‌های عصبی و محل اتصالات عصبی - ماهیچه‌ای وجود دارد [۱۰ و ۱۱]، در تعداد زیادی از سلول‌های غیر عصبی مانند سلول‌های اپی‌تلیالی برونش، آستروسیت‌ها و دستگاه تولید مثل نیز یافت می‌شود [۱۲].

در ارتباط با آثار نیکوتین بر بافت‌های مختلف مطالعات متعدد و در عین حال متناقضی در دسترس است. برای مثال بر اساس مطالعات انجام شده در محیط *In vivo* روی بافت‌های مختلف مانند تخمدان [۱۳]، ریه [۱۴]، پانکراس [۱۵]، مغز [۱۶]، سلول‌های عصبی مغز [۱۷] که روی هامستر، رت و موش صورت گرفته است نشان داده شده که نیکوتین دارای خاصیت آپوپتوتزی است. این در حالی است که نیکوتین در رت‌های تحت تیمار با LPS (لیپو پلی ساکارید) در محیط *In vivo* میزان بروز آپوپتوز در سلول‌های قلبی را کاهش داد [۱۸]. همچنین در محیط *in vitro* تیمار سلول‌های لنفوسیت انسانی [۱۹]، سلول‌های ایمنی موش [۲۰] و سلول‌های سرطانی ریه انسانی [۲۱] با نیکوتین، باعث مهار بروز آپوپتوز شد. همچنین در مطالعاتی اذعان شده است که نیکوتین به عنوان محافظ عصبی برای نورون‌های نخاعی است [۲۲]. همچنین در برخی مطالعات دیگر به آثار وابسته به دوز نیکوتین برای محافظت سلولی در سلول‌های فنوکروموسایتوما رت اشاره شده است [۲۳-۲۵]. در ارتباط با آثار نیکوتین بر تکثیر سلول‌های مختلف گزارش‌هایی متفاوت در دسترس است. در مطالعه‌ای که یانگ (Yang) و همکارانش انجام دادند نشان داده شد که نیکوتین دارای آثار القا، تکثیر و عروق زایی بر کشت سلول‌های اندوتلیالی ورید نافی انسانی است و این آثار نیز وابسته به دوز است [۲۶]. ویلابلانکا (Villablanca) نیز نشان داد که نیکوتین در دوزهای پایین می‌تواند سبب تکثیر سلول‌های اندوتلیالی شود ولی در دوزهای بالا سبب القای آپوپتوز می‌شود [۲۷]. ضمن این که ژانگ (Zhang) بیان

استنشاق می‌کند [۲]. نیکوتین  $C_{10}H_{14}N_2$ ، به‌عنوان یک آلکالوئید بسیار فرار از اجزا مهم دود سیگار بوده و قادر به ایجاد بسیاری از آثار زیان آور در بدن است. مقدار نیکوتین موجود در گیاه تنباکو از ۰/۵ تا ۰/۸ در صد متغیر بوده و یک نخ سیگار بین ۲ تا ۲۴ درصد نیکوتین دارد [۳]. در حدود ۵۰ تا ۹۰ در صد نیکوتین که مهم‌ترین عامل ایجاد وابستگی به تنباکو است طی سیگار کشیدن جذب می‌شود [۲]. نیکوتین قادر است هموستاز سیستم‌های مختلف بدن مانند قلبی عروقی، آندوکراین و همچنین سیستم تناسلی را بر هم بزند [۲]. مصرف نیکوتین هم در زنان و هم در مردان با ایجاد اختلالات باروری همراه است. مطالعات *In vitro* روی سلول‌های تخمدان انسانی نشان داده‌اند، نیکوتین می‌تواند با مهار رهاسازی پروژسترون عاملی برای القای اختلال در فاز لوتئالی شود [۴]. ضمن این که نیکوتین دارای آثار مهاری روی تولید آندروژن توسط سلول‌های تکای داخلی در تخمدان است [۵]. از طرفی دیگر مطالعات *In vitro* در مردان نشان داده‌اند که تیمار اسپرم با نیکوتین نه تنها باعث کاهش حرکت اسپرم می‌شود [۶]، بلکه بر روی مراحل لقاح و اتصال اسپرم به اووسیت نیز اثر سوء می‌گذارد [۷]. همچنین مصرف نیکوتین با اختلال در کارکرد سلول‌های لیدیگ و کاهش میزان تستوسترون همراه است که نقش تنظیمی و نگهدارنده بسیار مهمی در روند اسپرماتوزن دارد [۲]. مصرف نیکوتین در حیوانات آزمایشگاهی مانند موش‌های بالغ [۸] و سگ‌ها [۹] نیز با کاهش وزن بیضه و اختلالات اسپرماتوزن، آتروفی غدد فرعی تناسلی و اپیدیدیم و مجرای دفران همراه است.

این که نیکوتین با چه مکانیسمی یا مکانیسم‌هایی باعث ایجاد اختلالات نامبرده در اسپرماتوزن می‌شود دقیقاً معلوم نیست. شاید یکی از مکانیسم‌ها، تغییر در سیکل سلولی یا تغییر در میزان بروز مرگ و تکثیر سلولی توسط نیکوتین باشد. نیکوتین آثار سلولی خود را از طریق گیرنده‌های

به صورت داخل صفاقی نیکوتین (Sigma) به میزان ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند.

برای رقیق سازی نیکوتین از نرمال سالین استفاده شد. بدیهی است که دوز نیکوتین و مدت زمان مصرف و آزمایش بر اساس مطالعات قبلی که روی موش و رت انجام شده انتخاب شده است [۳، ۸ و ۹]. در این مطالعه غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکوتین به عنوان غلظت ایتیم در نظر گرفته شده است و معادل سطح نیکوتین خون در حد ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر است [۲۹]. لازم به ذکر است که در انسان، متوسط سطح نیکوتین در خون به دنبال مصرف چند سیگار ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر است [۳۰]. به عبارت دیگر دوزهای انتخابی نیکوتین ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم در این مطالعه به ترتیب معادل مصرف ۵، ۱۰ و ۲۰ عدد سیگار در روز توسط یک فرد سیگاری است [۲۹ و ۳۰].

نظر به این که در موش‌ها، مراحل میتوز در سلول‌های اسپرماتوگونی A و بینابینی و B حدود ۵ روز طول می‌کشد و مراحل پروفاز میوز یک که نسبتاً طولانی است (شامل: لپتوتن (حدود ۲ روز)، زیگوتن (۱/۵ روز)، پاکیتن (۶ روز) و دیپلوتن و دیاکینز (کمتر از یک روز) است) جمعاً حدود ۱۰ روز طول می‌کشد [۳۱]؛ بنابراین ۱۵ روز پس از شروع درمان، همه حیوانات به طریق جابه‌جایی نخاع، کشته و بیضه راست آن‌ها از حفره شکم خارج شد. از ورید اجوف تحتانی هر حیوان ۱ میلی‌لیتر نیز خون‌گیری صورت پذیرفت. به منظور ثبوت بافتی، بیضه‌ها در داخل محلول تثبیت کننده فرمالدئید بافری ۱۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق غوطه‌ور شدند. پس از گذشت سه روز از ثابت نمودن و اطمینان از ثبوت بافتی بیضه‌ها، برای پاساژ بافتی از اتانول با درجات صعودی، گزینن و پارافین مذاب استفاده شد. بیضه‌ها در جهت محور طولی در پارافین قالب‌گیری شدند و سپس با استفاده از دستگاه

می‌کند که غلظت‌های بالای نیکوتین می‌تواند سبب تحریک پرولیفراسیون و محافظت در برابر آپوپتوز در سلول‌های سرطان ریه شود [۲۸]. با توجه به موارد ذکر شده در فوق به نظر می‌رسد که نیکوتین با تأثیر بر میزان بروز آپوپتوز یا تکثیر سلولی مربوط به چرخه سلول‌ها، در میزان بقاء یا مرگ سلول‌ها و جمعیت سلول‌های بافتی نقش داشته باشد و این آثار در دوزهای مختلف متفاوت است.

تا کنون در ارتباط با آثار نیکوتین بر فعالیت تکثیری سلول‌های زایای بیضه گزارشی مشاهده نشده است، بنابراین هدف از مطالعه حاضر، تعیین فعالیت تکثیری سلول‌های میتوتیک و میوتیک بیضه موش نر بالغ تحت درمان با دوزهای مختلف نیکوتین در مدت کوتاه دو هفته است.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر روی ۳۲ موش بالغ نر ۸-۶ هفته، نژاد NMRI صورت گرفت. حیوانات از مؤسسه رازی خریداری شدند. موش‌ها در قفس‌هایی که دسترسی آزادانه به غذا و آب داشتند نگهداری شدند. همچنین شرایط محیطی استاندارد از نظر نور، دما و رطوبت به صورت یکسان برای همه آن‌ها ایجاد شد. پس از آن حیوانات به ۴ گروه (هر گروه شامل ۸ حیوان) تقسیم شدند.

گروه اول: (کنترل) روزی یک نوبت به مدت ۱۴ روز به صورت داخل صفاقی تحت تزریق نرمال سالین یک درصد قرار گرفتند.

گروه دوم: این گروه روزی یک نوبت به مدت ۱۴ روز به صورت داخل صفاقی نیکوتین (Sigma) به میزان ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند.

گروه سوم: این گروه روزی یک نوبت به مدت ۱۴ روز به صورت داخل صفاقی نیکوتین (Sigma) به میزان ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند.

گروه چهارم: این گروه روزی یک نوبت به مدت ۱۴ روز

### ارزیابی کمیت اسپر ماتوژنز

به منظور ارزیابی کمیت اسپر ماتوژنز از شمارش سلولی استفاده شد. بدین ترتیب که تعداد ۱۵ تا ۲۰ لوله سمی نیفروس در مقطع عرضی و در مراحل ۸ و ۷ اسپر ماتوژنز در هر حیوان انتخاب و در سطح ۱×۱ میلی متر مربع از هر لوله، تعداد سلول های اسپر ماتوگونی، اسپر ماتوسیت اولیه لپتوتن و پاکی تن، اسپر ماتیدهای گرد و اسپر ماتوزوا در هر لوله از نظر مورفولوژی شناسایی و شمارش شد. برای شمارش سلولی از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× استفاده شد.

### ارزیابی سلول های در حال تکثیر

بدین منظور از کیت تشخیصی (Dako, North America) Ki-67 استفاده شد. ابتدا برش های با ضخامت پنج میکرون تهیه و پس از آن مرحله پارافین زدایی با کمک گریلول در دو مرحله انجام و بافت در اتانول با درجات نزولی قرار گرفت. سپس لامها در محلول بافر فسفات حاوی اسید سیتریک با pH ۲/۶ در مایکروویو به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد تا زمانی که محلول به جوش آمد. پس از شستشو با فسفات بافر، با استفاده از آنتی بادی اولیه و سیستم ردیابی مربوط، رنگ آمیزی بر اساس دستورالعمل موجود در کیت انجام پذیرفت. لازم به ذکر است همراه با هر سری گذاشتن نشانگر یک لام که قبلاً از نظر نشانگر مربوط مثبت گزارش شده بود به عنوان کنترل با همان روش تحت رنگ آمیزی قرار گرفت تا از فرایند رنگ آمیزی اطمینان حاصل شود. به منظور رنگ آمیزی زمینه لامها از رنگ آمیزی هماتوکسیلین استفاده شد. سپس لامها با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۴۰۰× ارزیابی شد. سلولها با هسته قهوه ای رنگ به عنوان سلول های در حال تکثیر تلقی شدند. در هر حیوان ایندکس Ki-67 در هر رده سلولی اسپر ماتوگونی، اسپر ماتوسیت اولیه لپتوتن و اسپر ماتوسیت اولیه پاکی تن محاسبه شد. بدین ترتیب که در هر اسلاید ۲۰ لوله سمی نیفروس در مقطع عرضی

میکروتوم دوار (Leitz, Germany) مقاطعی به ضخامت ۵ μ تهیه شد. از هر بیضه ۴ تا ۵ اسلاید تهیه و به طریق هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و با بزرگنمایی ۴۰۰× مطالعه شد.

### ارزیابی کیفیت اسپر ماتوژنز با روش

#### جانسون

به منظور مطالعه کیفیت لوله های سمی نیفروس از روش "نمره دهی جانسون" استفاده شد [۳۲]. بدین منظور از مقطع عرضی ۱۰۰ لوله سمی نیفروس در هر حیوان استفاده شد و به هر لوله نمرات ۱ تا ۱۰ تعلق گرفت.

بر اساس معیارهای زیر به هر مقطع عرضی لوله سمی نیفروس، نمره داده شد.

۱۰: اسپر ماتوژنز کامل، تعداد زیادی سراسپریم که در حاشیه لومن گرد و منظم قرار دارند.

۹: تعداد زیادی اسپریم وجود دارد ولی لومن گرد و منظم دیده نمی شود.

۸: تعداد اسپریم خیلی کم است.

۷: اسپریم دیده نمی شود ولی تعداد زیادی اسپر ماتید گرد دیده می شود.

۶: تعداد کمی اسپر ماتید گرد دیده می شود.

۵: هیچ اسپریم و اسپر ماتید گردی دیده نمی شود. تعداد زیادی اسپر ماتوسیت اولیه دیده می شود.

۴: تعداد خیلی کمی اسپر ماتوسیت اولیه دیده می شود.

۳: هیچ اسپر ماتوسیت اولیه دیده نمی شود. فقط اسپر ماتوگونی دیده می شود.

۲: هیچ سلول زایا وجود ندارد. فقط سلول سرتولی دیده می شود.

۱: نه سلول زایا و نه سلول سرتولی دیده می شود و لوله ها آتروفیک هستند.

## یافته‌ها

بر اساس بررسی مشاهداتی که توسط میکروسکوپ نوری صورت پذیرفت در بیضه گروه کنترل در لوله‌ها اسپرماتوزن فعال بود (تمام رده سلول‌ها شامل سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه، اسپرماتیدهای گرد، اسپرماتیدهای دراز (اسپرماتوزا) و همچنین سلول‌های سرتولی مشاهده شدند. محدوده اغلب لومن‌ها که در فاز ۷ و ۸ اسپرماتوزن بودند، دارای حاشیه منظم و تعداد نسبتاً زیادی اسپرماتوزوید بود. در بافت بینابینی، بافت همبند سست حاوی عروق خونی و سلول‌های همبند به انضمام سلول‌های لیدینگ مشاهده شد. سلول‌های لیدینگ به صورت گروهی و توده‌ای اسیدوفیل مشاهده شدند. میانگین نمره جانسون در گروه کنترل  $9 \pm 0.30$  به دست آمد و در واقع بیانگر این نکته است که اسپرماتوزن به صورت فعال در لوله‌ها در جریان است. در مشاهده با میکروسکوپ نوری به نظر می‌رسید نیکوتین باعث اختلال در اسپرماتوزن شده است چرا که تعداد سلول‌های زایا و اسپرم بالغ کمتر به نظر می‌رسید این تغییرات در گروه سوم و به‌ویژه چهارم واضح‌تر دیده شد. با این حال تمام رده‌های سلولی زایا و سوماتیک در این لوله‌ها نیز مشاهده شد. در گروه چهارم به نظر می‌رسید که پارامترهای کمی لوله سمینفروس در مقایسه با کنترل کاهش واضح یافته باشند (شکل ۱). نیکوتین در دوزهای ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم یعنی گروه سوم و چهارم، سبب کاهش نمره جانسون به صورت معنی‌دار شد ( $p < 0.05$ )،  $8.5 \pm 1.50$  و  $8.1 \pm 1.60$  در مقابل  $9.0 \pm 0.30$  (جدول ۱).

نیکوتین در دوزهای ۰/۴ و ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲ هفته تاثیری بر ایندکس Ki67 سلول‌های اسپرماتوگونی نداشت. در حالی که ایندکس Ki67 در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه لپتوتن و پاکتی تن در گروه‌های سوم و چهارم به طور معنی‌دار در مقایسه با کنترل کاهش داشت. به عبارت دیگر تیمار با نیکوتین به مدت دو هفته بر میزان ایندکس Ki67 سلول‌های میتوتیک اسپرماتوگونی تاثیری

ارزیابی شد و سپس تعداد سلول‌های در حال تکثیر در هر رده سلولی شمارش و بر تعداد کل همان رده سلول‌های موجود در لوله تقسیم و پاسخ نهایی در عدد ۱۰۰ ضرب و به صورت درصد بیان شد.

## محاسبه حجم سلول‌های لیدینگ

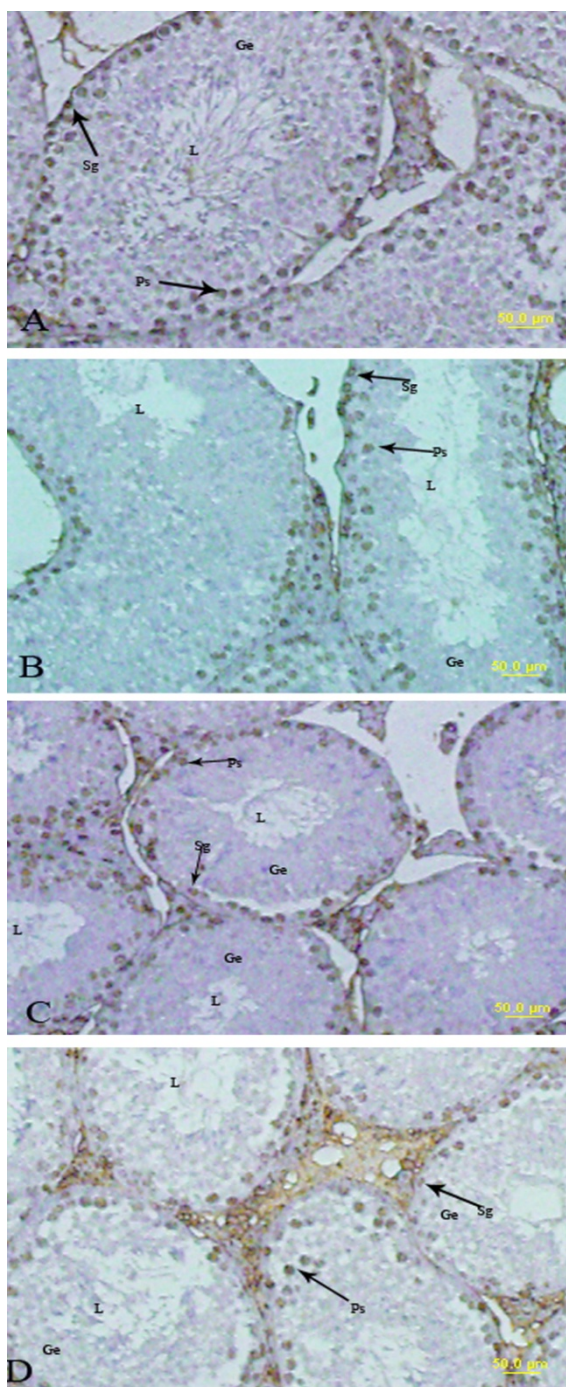
با کمک گرید خطی که روی لنز چشمی میکروسکوپ نصب شد و با بزرگنمایی  $\times 1000$ ، حجم هسته سلول‌های لیدینگ محاسبه شد. بدین ترتیب که در هر حیوان ۲۰ سلول مطالعه شد. ابتدا از فرمول  $R = \sqrt{(D_2 \times D_1) / 2}$  شعاع به دست آمد که در این فرمول R معادل شعاع  $D_1$  و  $D_2$  به ترتیب اقطار کوچک و بزرگ هسته است. همچنین برای مطالعه حجم از فرمول  $V = 4/3 \pi R^3$  استفاده شد.  $\pi = 3.14$  عدد ثابت بود [۳۳].

## ارزیابی تستوسترون سرم

از هر حیوان در حین تشریح حدود یک میلی‌لیتر خون از ورید اجوف تحتانی تهیه و در میکروسانتروفیوژ با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. پس از جدا نمودن سرم، با استفاده از روش الیزا سطح سرمی تستوسترون تعیین شد.

## آنالیز آماری

نتایج ریخت‌شناسی و کیفی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های مورد مطالعه با هم مقایسه و همچنین کلیه پارامترهای کمی محاسبه شده با استفاده از برنامه آماری SPSS نسخه ۱۶ و آزمون واریانس یک طرفه تحلیل شد. یافته‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر  $p < 0.05$  معنی‌دار تلقی شد. همچنین برای ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون توکی استفاده شد.



شکل ۱. فوتومیکروگراف نوری از لوله های سمی نیفرس موش بالغ. A: کنترل، B: تحت تیمار با نیکوتین ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم، C: تحت تیمار با نیکوتین ۰/۲ میلیگرم بر کیلوگرم، D: تحت تیمار با نیکوتین ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم. سلول های قهوه ای رنگ معرف سلول های KI-67 مثبت یا در حال تکثیر هستند. (L) لومن، (PS) اسپرماتوسیت اولیه، (Ge) ایتلیوم ژرمینال، (Sg) اسپرماتوگونی. رنگ آمیزی: KI-67 و هماتوکسیلین. بار: ۵۰ میکرومتر

نداشت. و این اثر فقط در سلول های میوتیک و در گروه های سوم و چهارم دیده شد. (جدول ۱)

با این وجود در خصوص سطح سرمی تستوسترون، نتایج حکایت از کاهش سطح سرمی این هورمون در گروه ۳ و ۴ نسبت به گروه کنترل داشتند. بدین ترتیب که سطح سرمی تستوسترون در گروه کنترل  $3/5 \pm 0/06$  ng/ml به دست آمد اما در سه گروه تحت درمان با نیکوتین میلی گرم بر کیلوگرم ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ به ترتیب  $2/62 \pm 0/53$  ng/ml،  $2/53 \pm 0/06$  ng/ml و  $2/5 \pm 0/05$  ng/ml حاصل گردید. به عبارت دیگر این مساله نشان داد که تجویز نیکوتین در دوزهای ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم می تواند منجر به کاهش تستوسترون شود ( $p < 0.05$ ).

حجم هسته سلول های لیدیک نیز محاسبه شد که در گروه کنترل  $110/60 \pm 2/6$  میکرو متر مکعب بود. این متغییر در خصوص گروه دوم که ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم نیکوتین دریافت کردند  $104/52 \pm 3/4$  میکرو متر مکعب برآورد شد که تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. ولی در گروه سوم و چهارم که به ترتیب ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم نیکوتین به آنها تزریق شده بود، حجم هسته سلول های لیدیک  $100/23 \pm 3/80$  و  $98/48 \pm 9/8$  میکرو متر مکعب محاسبه شد که دارای تفاوت معنی داری با گروه کنترل بود و کاهش واضحی را نشان داد.

تیمار با ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم نیکوتین تاثیری بر شمارش سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت های اولیه لپتوتن، پاکی تن، اسپرماتیدهای گرد و اسپرماتوزوا نداشت (جدول ۲). هر چند که تجویز نیکوتین با دوزهای ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم به طور معنی داری تعداد سلول های اسپرماتوسیت های اولیه لپتوتن و پاکی تن، اسپرماتیدهای گرد و اسپرماتوزوا را به طور معنی دار در مقایسه با کنترل کاهش داد ( $p < 0.05$ ). تعداد اسپرماتوسیت های اولیه پاکی تن در کنترل  $32/21 \pm 2/20$  عدد بود که این رقم در گروه های سوم و چهارم  $24/12 \pm 4/02$  و  $20/31 \pm 3/60$  بود. (جدول ۲).

جدول ۱. نمره جانسون، ایندکس KI67، سطح تستوسترون و حجم هسته سلول‌های لیدیگ در بیضه موش نر بالغ تحت تیمار با دوزهای مختلف نیکوتین (Mean±SD)

گروه	نمره جانسون	سطح تستوسترون (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	حجم هسته سلول‌های لیدیگ (میکرومتر مکعب)	ایندکس KI67 اسپر ماتوگو نی (درصد)	ایندکس KI67 لپتوتن (درصد)	ایندکس KI67 پاکی تن (درصد)
کنترل	۹/۰۰±۳/۳۰	۳/۵۰±۰/۰۶	۱۱۰/۶۰±۲/۶۰	۷۲/۷۰±۳/۶۰	۸۳/۳۳±۲/۳۳	۸۷/۵۰±۳/۲۰
گروه دوم (نیکوتین ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۹/۲±۰/۲۰	۲/۶۲±۰/۰۳	۱۰۴/۵۲±۳/۴۰	۶۸/۴۰±۲/۴۰	۸۰/۱۴±۲/۸۰	۸۲/۸۰±۴/۴۱
گروه سوم (نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	*۸/۶±۱/۶۰	*۲/۵۳±۰/۰۶	۱۰۰/۲۳±۳/۸۰*	۶۶/۲۱±۴/۳	*۷۱/۲۴±۴/۱۱	*۷۴/۲۱±۲/۱۰
گروه چهارم (نیکوتین ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	*۸/۵±۱/۵۰	*۲/۵۰±۰/۰۵	*۹۸/۴۸±۲/۶۲	۶۵/۱۲±۳/۸	*۶۷/۲۰±۳/۲۰	*۷۱/۵±۳/۶

\* مقادیر معنی‌دار در مقایسه با کنترل (p<0.05).

جدول ۲. تعداد سلول‌های زایای بیضه در لوله‌های سمی نیفروس موش نر بالغ تحت تیمار با دوزهای مختلف نیکوتین (Mean±SD)

گروه	اسپر ماتوگونی	اسپر ماتوسیت اولیه لپتوتن	اسپر ماتوسیت اولیه پاکی تن	اسپر ماتید گرد	اسپر ماتوزوا
کنترل	۱۱/۸۶±۲/۸۰	۲۴/۴۲±۳/۱۲	۳۲/۲۱±۲/۲۰	۱۲۰/۱۴±۸/۴۰	۸۸/۱۲±۸/۷۰
گروه دوم (نیکوتین ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۰/۳۲±۲/۴۵	۲۲/۴۰±۲/۱۰	۳۰/۴۱±۳/۱۴	۱۱۲/۴۰±۷/۲۰	۷۹/۸۰±۸/۰۰
گروه سوم (نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۱/۲۴±۱/۹۰	*۱۸/۲۲±۳/۱۴	*۲۴/۱۲±۴/۰۲	*۹۶/۳۱±۶/۴	*۷۱/۲۴±۶/۷
گروه چهارم (نیکوتین ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۹/۶۸±۲/۳۲	*۱۵/۱۲±۴/۳۶	*۲۰/۳۱±۳/۶۰	*۷۴/۶۲±۸/۰۷	*۵۸/۱۴±۸/۱

\* مقادیر معنی‌دار در مقایسه با کنترل (p<0.05).

## بحث

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که مصرف نیکوتین در دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز باعث کاهش معنی‌دار تستوسترون در مقایسه با کنترل می‌شود. تستوسترون مهم‌ترین هورمون دخیل در فرایند اسپرماتوژنز است و به وسیله سلول‌های لیدیگ ترشح می‌شود و در دوران بلوغ در مردان در ایجاد علائم مردانگی، حفظ رشد و کارکرد ارگان‌های وابسته به آندروژن نقش دارد. این هورمون بر رفتارهای جنسی در مردان مانند تمایلات جنسی، تحریک جنسی، نعوذ خودبه‌خودی طی خواب، انزال و پدیده ارگاسم طی فعالیت جنسی نقش دارد [۳۴]. گیرنده‌های

آندروژن نه تنها بر سلول‌های لیدیگ بلکه روی سلول‌های سوماتیک دیگر بیضه یعنی میوید و سرتولی نیز وجود دارد [۳۴] و می‌دانیم که اسپرماتوژنز یک فرایند ناشی از عملکرد متقابل سلول‌های زایا و سوماتیک است. تستوسترون یک هورمون مقلد و تحریک‌کننده آندوکراین و پاراکراین اسپرماتوژنز است و قادر به شروع اسپرماتوژنز، حفظ آن و تشکیل اسپرماتوزا است [۳۴]. بنابراین هرگونه تخریب یا اختلال در سلول‌های لیدیگ ممکن است باعث آتروفی بیضه، اختلال عملکرد گنادها، اختلال در نعوذ و در کل ناباروری مردان شود [۳۴]. در تأیید این یافته‌ها، این مطالعه نشان داد که حجم هسته سلول‌های لیدیگ در گروه‌های تحت درمان با

پاکی تن در گروه‌های سوم و چهارم کاهش یافت؛ در حالی که در سلول‌های اسپرماتوگونی در هیچ گروهی این شاخص تغییری نمود. به عبارت دیگر تیمار با نیکوتین در دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای مدت دو هفته بر سلول‌های میتوتیک بیضه اثری ندارد. احتمالاً این تفاوت اثر روی سلول‌های میتوتیک و میتوتیک ناشی از تفاوت در پراکندگی رسپتورهای نیکوتینی بر سلول‌های زایای بیضه است. در همین راستا نشان داده شده است که نیکوتین از طریق رسپتورهای استیل کولینی نیکوتینی اثر می‌گذارد و این نوع رسپتورها اغلب روی اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها یافت می‌شوند. ضمن این که نشان داده شده است که اسپرماتوزوا نیز دارای یک نوع رسپتور کلینرژیک نیکوتینی است [۳۸ و ۳۹]. در تأیید این یافته نشان داده شده که تعدادی از آگونست‌ها و آنتاگونست‌های کلینرژیکی بر تحرک اسپرم اثر دارد [۳۸ و ۳۹].

آزمایش حاضر نشان داد که اثر نیکوتین بر تکثیر سلول‌های زایای بیضه وابسته به دوز است. یعنی در دوزهای بالا اثر آنتی پرولیفراتیو دارد ولی در دوزهای پایین‌تر بی‌تأثیر است. احتمالاً مدت زمان مصرف نیکوتین نیز در این زمینه اثر خواهد داشت. نسیم (Nesseim) نشان داده است که افزایش دوز و زمان مصرف نیکوتین با تغییرات تخریبی بافت بیضه در رت‌ها ارتباط مستقیم دارد [۴۰]. مشابه با همین یافته دیده شده است که آثار نیکوتین بر تکثیر سلول‌ها در سلول‌های فنوکروموسایتمای رت [۲۵-۲۳]، سلول‌های اندوتلیالی [۲۶ و ۲۷] و سلول‌های سرطان ریه [۲۸] به صورت وابسته به دوز است.

این که چرا در این مطالعه تعداد اسپرماتیدهای گرد و همچنین اسپرماتوزوا نیز در گروه‌های سوم و چهارم کاهش داشتند را شاید بتوان به کاهش هورمون تستوسترون در این گروه‌ها ارتباط داد. هورمون تستوسترون یک فاکتور مهم در شروع و حفظ تقسیمات سلولی (اسپرماتوسیتوزنز) و همچنین

دوزهای ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش داشته است. در همین راستا نشان داده شده است که حجم هسته سلول‌های لیدیگ به دنبال هیپوفیزکتومی و قطع هورمون‌های FSH و LH [۲۷] و کریبتورکیدیسم [۲۸] و کاهش هورمون hCG کاهش می‌یابد [۳۵].

کاملاً مشخص است که تعداد زیادی از سلول‌های بدن در زمان‌های مختلف فعالیت‌های سنتزی متفاوتی دارند که این فعالیت می‌تواند متناسب با پراکندگی کروماتین در هسته باشد. زمانی که تراکم کروماتین زیادتر باشد هسته کوچکتر و حجم آن نیز کمتر است، بر عکس در زمانی که تراکم کروماتین کمتر است هسته بزرگتر بوده و حجم هسته نیز افزایش می‌یابد [۳۳]. ضمن این که مطالعات نشان داده‌اند که تغییر در سایز سلول و سیتوپلاسم سلول‌های لیدیگ با تغییرات حجم هسته آن‌ها ارتباط مثبت دارد [۳۶ و ۳۷].

این نتایج احتمالاً بیانگر این است که فعالیت سنتزی سلول‌های لیدیگ در گروه‌های تحت درمان با ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافته است.

از طرف دیگر بر اساس چندین مطالعه انجام شده، محققین نشان داده‌اند که نیکوتین باعث مهار آزادسازی FSH و LH از هیپوفیز می‌شود و این عملکرد از طریق تأثیر مهاری بر هیپوتالاموس صورت می‌گیرد [۸ و ۲۹].

نتایج حاصل از این آزمایش همچنین نشان داد که با افزایش دوز نیکوتین، میزان فعالیت تکثیری سلول‌های زایای بیضه کاهش می‌یابد که شاید این خود یک مکانیسمی برای کاهش نمره جانسون باشد. نیکوتین می‌تواند به راحتی از غشای سلول‌های بدن عبور کرده و قابلیت واکنش با برخی از اجزای درون سلولی نظیر پروتئین‌های توبولین در سیتوپلاسم سلول‌های در حال تقسیم نظیر سلول‌های زایای جنسی را داراست و از این طریق می‌تواند منجر به اختلال در تقسیم سلولی شود [۳۲ و ۳۳]. در این آزمایش نشان داده شد که شاخص Ki67 در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه لپتوتن و



است که در گروه تحت تیمار با ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم نیکوتین، تستوسترون به طور معنی دار کاهش یافته است. این مطالعه نشان داد که تجویز نیکوتین به مدت ۲ هفته در دوزهای ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم با کاهش سطح تستوسترون سرم و کاهش شاخص ki67 در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و در نهایت کاهش نمره جانسون یا کیفیت اسپرماتوزن در موش‌ها همراه است. بررسی مولکولی و ژنی دخیل در سیکل سلولی، تکثیر و مرگ سلول‌های زایای بیضه به دنبال نیکوتین برای فهم دقیق‌تر مکانیسم برای مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود.

### تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی گیلان بابت حمایت مالی مطالعه حاضر تشکر و قدردانی می‌شود.

### References

1. **Wong WY, Thomas CMG, Merkus HMWM, Zielhuis GA, Doesburg WH, Steegers-Theunissen RPM.** Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil Steril* 2000; 74: 930-5.
2. **Carvalho CA, Favaro WJ, Padovani CR, Cagnon VH.** Morphometric and ultrastructure features of the ventral prostate of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to long term nicotine treatment. *Andrologia* 2006; 38: 142-51.
3. **Kavitharaj N, Vijayammal P.** Nicotine administration induced changes in the gonadal functions in male rats. *Pharmacology* 1999; 58: 2-7.
4. **Miceli F, Minici F, Tropea A, Catino S, Orlando M, Lamanna G, et al.** Effects of Nicotine on Human Luteal Cells In Vitro: A Possible Role on Reproductive Outcome for Smoking Women. *Biol Reprod* 2005; 72: 628-32.
5. **Sanders SR, Cuneo SP, Turzillo AM.** Effects of nicotine and cotinine on bovine theca interna and granulosa cells. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 795-800.
6. **Reddy A, Sood A, Rust P, Busby J, Varn E, Mathur R, et al.** The effect of nicotine on in vitro sperm motion characteristics. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12: 217-23.
7. **Pekarsky A, Rust PF, Varn E, Mathur RS, Mathur S.** Effects of nicotine on sperm attachment and penetration of zona-free hamster eggs. *Arch Androl* 1995; 34: 77-82.
8. **Reddy S, Londonkar R, Ravindra, Patil SB.** Testicular changes due to graded doses of nicotine in albino mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 1998; 42: 276-80.
9. **Londonkar R, Srinivasreddy P, Somanathreddy P, Patil S.** Nicotine induced inhibition of the activities of accessory reproductive ducts in male rats. *Ethnopharmacol* 1998; 60: 215-21.

در روند اسپرمیوزن یا تمایز مورفولوژیک اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتوزوا است. نشان داده شده است که در موش‌های hpG که فاقد آندروژن است، بیضه‌های آن‌ها فاقد اسپرماتید گرد و اسپرماتوزوا است [۴۱].

احتمالاً مکانیسم‌های دیگری علاوه بر کاهش تکثیر سلول‌های زایای بیضه و کاهش تستوسترون در کاهش بلوغ اسپرماتوزن نقش دارد. شاید یکی از این مکانیسم‌ها القای آپوپتوز توسط نیکوتین باشد. در این رابطه کیم (Kim) و همکاران در سال ۲۰۰۵ در یک مطالعه *in vitro* که روی سلول‌های لیدینگ موش انجام شد، نشان دادند که نیکوتین دارای اثر آپپتوتیک است [۳۴]. نیکوتین در محیط *in vivo* در تخمدان نیز دارای آثار القا کنندگی آپپتوز بر سلول‌های گرانولوزا است [۱۵]. ضمن این که می‌دانیم یکی از عواملی که می‌تواند باعث القای آپپتوز در سلول‌ها شود تغییرات هورمونی

10. **Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, et al.** Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 2009; 124: 36-45.
11. **Dasgupta P, Rastogi S, Pillai S, Ordonez-Ercan D, Morris M, Haura E, et al.** Nicotine induces cell proliferation by  $\beta$ -arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. *J Clin Invest* 2006; 116: 2208-17.
12. **Dasgupta P, Chellappan SP.** Nicotine-Mediated Cell Proliferation and Angiogenesis. *Cell Cycle* 2006; 5: 2324-8.
13. **Hecht S.** Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol* 2002; 3: 461-9.
14. **Demiralay R, Gursan N, Erdem H.** The effects of erdosteine, N-acetylcysteine, and vitamin E on nicotine-induced apoptosis of pulmonary cells. *Toxicology* 2006; 219: 197-207.
15. **Holloway A, Lim G, Petrik J, Foster W, Morrison K, Gerstein H.** Fetal and neonatal exposure to nicotine in Wistar rats results in increased beta cell apoptosis at birth and postnatal endocrine and metabolic changes associated with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005; 48: 2661-6.
16. **Jang MH, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, et al.** Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport* 2002; 13: 1509-13.
17. **Mechawar N, Saghatelian A, Grailhe R, Scoriels L, Gheusi G, Gabellec M, et al.** Nicotinic receptors regulate the survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9822-6.
18. **Suzuki J, Bayna E, Molle ED, Lew W.** Nicotine inhibits cardiac apoptosis induced by lipopolysaccharide in rats. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 482-8.
19. **De-Rosa M, Esandi-Mdel C, Garelli A, Rayes D, Bouzat C.** Relationship between alpha 7 nAChR and apoptosis in human lymphocytes. *Neuroimmunol* 2005; 160: 154-61.
20. **Hakki A, Pennypacker K, Eidizadeh S, Friedman H, Pross S.** Nicotine inhibition of apoptosis in murine immune cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226: 947-53.
21. **Maneckjee R, Minna J.** Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth Differ* 1994; 5: 1033-40.
22. **Garrido R, Malecki A, Hennig B, Toborek M.** Nicotine attenuates arachidonic acid-induced neurotoxicity in cultured spinal cord neurons. *Brain Res* 2000; 861: 59-68.
23. **Sun X, Liu Y, Hu G, Wang H.** Protective effects of nicotine against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Biol Lett* 2004; 9: 409-22.
24. **Tohgi H, Utsugisawa K, Nagane Y.** Protective effect of nicotine through nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 on hypoxia-induced membrane disintegration and DNA fragmentation of cultured PC12 cells. *Neurosci Lett* 2000; 285: 91-4.
25. **Utsumi T, Shimoke K, Kishi S, Sasaya H, Ikeuchi T, Nakayama H.** Protective effect of nicotine on tunicamycin-induced apoptosis of PC12h cells. *Neurosci Lett* 2004; 370: 244-7.
26. **Yang YM, Liu GT.** Damaging effect of cigarette smoke extract on primary cultured human umbilical vein endothelial cells and its mechanism. *Biomed Environ Sci* 2004; 17: 121-34.
27. **Villablanca A.** Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J Appl Physiol* 1998; 84: 2089-98.
28. **Zhang T, Lu H, Shang X, Tian Y, Zheng C, Wang S, et al.** Nicotine prevents the apoptosis induced by menadione in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 928-34.
29. **Bordel R, Laschke MW, Menger MD, Vollmar B.** Nicotine does not affect vascularization but

- inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod* 2006; 21: 610-7.
30. **Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C.** Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br Med J* 1980; 280: 972-6.
  31. **Adler I-D.** Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res* 1996; 352: 169-72.
  32. **Ghasemi FM, Faghani M, Khajehjahromi S, Bahadori M, E EN, Hemadi M.** Effect of Melatonin on Proliferative Activity and Apoptosis in Spermatogenic Cells in Mouse under Chemotherapy. *J Reprod Contracept* 2010; 21: 79-94.
  33. **Redins CA, Redins GM, Novaes JC.** The effects of treatment with melatonin on the ultrastructure of mouse Leydig cells: a quantitative study. *Braz J Biol* 2002; 62: 517-23.
  34. **Kim KH, Joo KJ, Park HJ, Kwon CH, Jang MH, Kim CJ.** Nicotine induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells. *Fertil Steril* 2005; 83: 1093-9.
  35. **Mendis-Handagama SM, Watkins PA, Gelber SJ, Scallen TJ.** Leydig cell peroxisomes and sterol carrier protein-2 in luteinizing hormone-deprived rats. *Endocrinology* 1992; 131: 2839-45.
  36. **Sinha Hikim AP, Bartke A, Russell LD.** Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biol Reprod* 1988; 39: 1225-37.
  37. **Sinha Hikim AP, Chandrashekar V, Bartke A, Russell LD.** Sentinels of Leydig cell structural and functional changes in golden hamsters in early testicular regression and recrudescence. *Int J Androl* 1993; 16: 324-42.
  38. **Dwivedi C, Long NJ.** Effect of cholinergic agents on human spermatozoa motility. *Biochem Med Metab Biol* 1989; 42: 66-70.
  39. **Ibanez CF, Pelto-Huikko M, Soder O, Ritzen EM, Hersh LB, Hokfelt T, et al.** Expression of choline acetyltransferase mRNA in spermatogenic cells results in an accumulation of the enzyme in the postacrosomal region of mature spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 3676-80.
  40. **Nesseim WH, Haroun HS, Mostafa E, Youakim MF, Mostafa T.** Effect of nicotine on spermatogenesis in adult albino rats. *andrologia* 2011; 43: 398-404.
  41. **Handelsman DJ, Spaliviero JA, Simpson JM, Allan CM, Singh J.** Spermatogenesis without gonadotropins: maintenance has a lower testosterone threshold than initiation. *Endocrinology* 1999; 140: 3938-46.