

اثر دوز های مختلف نیکوتین بر شاخص میتوزی اپی تلیوم مری

دکتر سینا خواجه جهرمی*، دکتر فهیمه محمدقاسمی**

دریافت: ۹۴/۱۰/۲۰ پذیرش: ۹۵/۲/۲۱

چکیده:

مقدمه و هدف: نیکوتین می تواند مستقیماً به عنوان یک عامل پیش برنده سرطان عمل کند. هدف این مطالعه تعیین اثرات نیکوتین بر روی شاخص میتوزی اپی تلیوم مری می باشد.

روش کار: در مطالعه تجربی حاضر از ۳۰ سر موش بالغ نر استفاده شد. حیوانات بصورت تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. گروه A یا کنترل دریافت کننده حلال و گروه B و C که به ترتیب تحت تیمار با نیکوتین به صورت داخل صفاقی به میزان ۰/۲ mg/kg و ۰/۴ mg/kg به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. ارزیابی ها توسط روش ایمونوهیستوشیمیایی KI-67 و رنگ آمیزی هماتو کسلیلین- ائوزین به ترتیب جهت بررسی فعالیت تکثیری و بررسی مورفومتریک مخاط مری انجام شد.

نتایج: تجویز نیکوتین در گروه C نشان داد که شاخص KI-67 به طور معناداری ($P < 0/05$) نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($10/41 \pm 1/4$) در برابر ($34/15 \pm 2/5$) در برابر ($10/41 \pm 1/4$). پارامترهای دیگر شامل ضخامت اپی تلیوم، لامینا پروپریا، عضله مخاطی و مخاط در گروه های تحت درمان با نیکوتین متأثر نشده بودند. نیکوتین در دوز ۰/۲ mg/kg تغییراتی در شاخص میتوزی اپی تلیوم در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد.

نتیجه نهائی: این مطالعه نشان داد که نیکوتین در دوز ۰/۴ mg/kg می تواند فعالیت میتوزی در سلول های بازال اپی تلیوم مری را افزایش دهد.

کلید واژه ها: فعالیت تکثیری / مخاط مری / مورفومتری / نیکوتین

مقدمه:

از آن در مخاط دهان و بینی دیده شده است (۱). سیگار کشیدن با افزایش تعداد سلولهای لانگرهانس در مخاط گونه همراه است (۱). علاوه بر موارد ذکر شده مصرف سیگار باعث تغییرات کمی سلولها مانند افزایش سایز هسته و یا نسبت هسته به سیتوپلاسم در برخی مخاطها مانند زبان، گونه و کف دهان می شود (۱).

مصرف سیگار همچنین بر روی نواحی مختلف دستگاه گوارش اثرات مخرب و خطرناکی دارد. مصرف سیگار باعث شل شدن اسفنکتر کاردیا و در نتیجه افزایش ریفلاکس مری و سوزش سردل می شود. در سیگاری ها نه تنها مدت زمان لازم برای پاک شدن اسیدیته انتهای مری آنها در مقایسه با غیر سیگاری ها طولانی تر است بلکه بزاق آنها نیز اسیدی تر است. غلظت های بالاتر دود سیگار منجر به آسیب اپیتلیوم مری شده و آن را مستعد ریفلاکس

بخوبی ثابت شده است که مصرف سیگار باعث افزایش خطر بروز کانسر می شود. مصرف سیگار باعث ایجاد انواع مختلف بدخیمی ها مانند سرطان ریه، حلق، حنجره، مری و تقریباً یک سوم تمام سرطان های پانکراس، کلیه، مثانه و گردن رحم می شود. مطالعات نشان داده اند که بین سیگار و سرطان های کبد، کولون، معده و مری ارتباط وجود دارد (۱).

مصرف سیگار باعث خصوصیات غیر نرمال سلولهای اپی تلیال راههای هوایی مانند ایجاد موتاسیون در پروتئین p53 (۵۳)، و تغییر در متیلاسیون پروموتور سلولهای نامبرده می شود (۱). در مطالعات ژنتیکی انجام شده بر روی مخاطهای مختلف بافتهای برونش، دهان و بینی سیگاریها، بیشترین آسیب در مخاط بافت برونش و پس

* دستیار گروه داخلی بیمارستان ولایت دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

** دانشیار بافت شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران. (parsahistolab@gmail.com)

اسیدی می نماید (۱،۲).

سیگار بیش از ۴۰۰۰ نوع ماده سمی دارد که نیکوتین یکی از اجزای اصلی آن می باشد و بیشتر اثرات فارماکولوژیکی دود سیگار را به این ماده نسبت می دهند. هر نخ سیگار حدود ۳۰-۱۵ میلی گرم نیکوتین دارد. این ماده سریعاً توسط غشای مخاطی، پوست، آلوئول و دستگاه گوارش جذب می شود. نیمه عمر این مولکول حدود ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در بدن انسان می باشد (۳،۴). نیکوتین به طور کاملاً فعالی بر روی بیماری های دستگاه گوارش به عنوان یک پاتوژن در بیماری هایی همچون بیماری زخم پپتیک و ترمیم آن اثر گذار است. مصرف نیکوتین در حیوانات میزان جریان خون دستگاه گوارش را کاهش می دهد. نیکوتین ممکن است در شروع و یا پیشرفت تومور در دستگاه گوارش نیز نقش داشته باشد (۲).

لازم به ذکر است که مصرف تنهای نیکوتین جنبه درمانی نیز دارد. نیکوتین به تنهایی جهت درمان برخی بیماری های نورولوژیک مانند آلزایمر، و پارکینسون (۲) و در برخی مدل های حیوانی جهت حمایت مالتی پل اسکروزیس (۵) و حتی در افراد سیگاری و یا زنان حامله سیگاری به عنوان درمان جایگزینی جهت قطع سیگار مورد استفاده قرار می گیرد (۶).

این که نیکوتین با چه مکانیسمی یا مکانیسم هایی باعث ایجاد اختلالات نامبرده می شود دقیقاً معلوم نیست. شاید یکی از مکانیسم ها، تغییر در میزان آنژیوژنز و ایمنی بواسطه سلول (۷) تغییر در سیکل سلولی یا تغییر در میزان بروز مرگ یا آپوپتوز و یا تغییر در میزان تکثیر سلولی (۷،۸) تولید رادیکالهای آزاد و کاهش آنتی اکسیدان های سلولی (۲،۷) توسط نیکوتین باشد. نیکوتین آثار سلولی خود را از طریق گیرنده های استیل کولینی اعمال می کند که این گیرنده ها به تعداد زیادی بر روی سلولهای عصبی دستگاه عصبی (۱). و همچنین سلول های غیر عصبی مانند محل اتصال عصب - عضله، کراتینوسیت های پوست، سلولهای بافت پوششی لثه، سلولهای پوششی راههای هوایی، ارگانهای تولید مثل مانند سلولهای گرانولوزای تخمدان، سلولهای اسپرماتوژنیک بافت بیضه و همچنین برخی انواع سلولهای سرطانی و دستگاه معدی - روده ائی موجود هستند (۱). مطالعات پیشین حاکی بر آنند که نیکوتین می تواند به طور مستقیم به عنوان پیش برنده سرطان عمل نماید. برای مثال نیکوتین باعث تحریک تکثیر رده سلولی

sw116 در سرطان کولون انسان می شود. ضمن این که رشد تومور را در محیط *in vivo* در موش های نود زئوگرافت افزایش می دهد (۲). نیکوتین علاوه بر تاثیر بر تکثیر سلول های اپیتلیالی بر روی تکثیر سلول های غیر اپیتلیالی مانند میلوما و هیبریدوما نیز موثر است (۲). آنتی ژن KI-67 که یک نوع پروتئین غیر هیستونی است برای اولین بار در دهه ۱۹۸۰ توسط محققین آلمانی شناخته شد. این پروتئین در طول چرخه های مختلف سیکل سلولی G1,S,G2,M بیان میشود. ولیکن وقتی سلول وارد فاز استراحت G0 می شود به سرعت ناپدید می شود. بیشترین میزان بیان این پروتئین در فاز M (میتوز) چرخه سلولی است. از این ویژگی در آسیب شناسی و تحقیقات سرطان به منظور برآورد و تعیین تقسیم رشدی در یک جمعیت سلولی استفاده می شود (۱).

به نظر می رسد آثار نیکوتین بر چرخه سلول بسته به نوع سلول و میزان مصرف نیکوتین متفاوت باشد. مطالعات در سالهای اخیر نشان داده اند که نیکوتین میتواند در سلولهای غیر عصبی مانند: سلولهای عضله صاف آئورت، سلولهای اپیتلیال برونش و سلولهای سرطانی ریه تکثیر سلولی را از طریق رسپتورهای نیکوتینی استیل کولینی افزایش دهد (۱). مطالعات قبلی همچنین نشان داده اند که نیکوتین در دوز پائین باعث افزایش تکثیر سلولهای آندوتلیال عروق بند ناف انسانی می شود در حالیکه در دوزهای بالاتر باعث افزایش آپوپتوز آنها می شود (۸،۹). مطالعات انجام شده بر روی بافت بیضه موشها نیز حاکی از آن است که تجویز نیکوتین در دوز پائین بر سلولهای میوزی لپتوتن و پاکی تن بی تاثیر است در حالیکه در دوز بالاتر باعث کاهش تکثیر سلولهای نامبرده می شود (۱). با توجه به موارد ذکر شده و این که گزارشی از اثر نیکوتین به تنهایی، بر شاخص میتوزی و مورفومتریک مخاط مری در دسترس نمی باشد لذا هدف از انجام این پژوهش بررسی و تعیین اثر نیکوتین بر شاخص های میتوزی و هیستومورفومتریک لایه مخاطی مری موش نر سوری می باشد.

روش کار:

مطالعه تجربی حاضر بر روی ۳۰ سر موش نر بالغ (۸-۶ هفته) و وزن (۳۰-۴۰ گرم) انجام شد. محیط همه حیوانات دارای شرایط یکسان نور: ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، دما: ۲۰ الی ۲۲ درجه سانتیگراد، رطوبت:

مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هر حیوان تعداد ۲۰ فیلد میکروسکوپی به مساحت $1 \times 1 \text{ mm}^2$ بصورت تصادفی انتخاب و سپس با کمک لنز مدرجی که بر روی میکروسکوپ نصب بود اقدام به اندازه‌گیری پارامترهای لایه مخاط یعنی ضخامت لایه اپیتلیوم، لامینا پروپریا و عضله مخاطی گردید. در نهایت ضخامت لایه مخاط از اپیتلیوم سطحی تا انتهای لایه عضله مخاطی بر مبنای میکرومتر محاسبه می‌شد. محاسبه ایندکس میتوزی لایه مخاطی مری: جهت ارزیابی سلول‌های در حال تکثیر از کیت تشخیصی ki-67 (Dako) ساخت دانمارک استفاده شد. دستور العمل کار بر اساس کیت بود. بطور خلاصه ابتدا جهت برداشت پارافین اضافی بافتها نمونه‌ها در فور در دمای ۷۵ درجه قرار داده می‌شدند. پس از آن به داخل ظرف حاوی گزین به مدت ۱۰ دقیقه و سپس بداخل ظروف حاوی الکل مطلق (۵ دقیقه) و الکل ۹۶٪ (۵ دقیقه) منتقل می‌شدند. به منظور باز یابی آنتی ژن از بافر سیترات ۱۰ میلی مول، PH=۶ استفاده می‌شد. نمونه به مدت یک ساعت در بن ماری در دمای جوش ۹۵-۱۰۰ و ده دقیقه در اتوکلاو در محلول اسیدی بافر تریز PH=۹ قرار داده می‌شد. پس از آن لامها به داخل بافر فسفات و سپس آب اکسیژنه به مدت ده دقیقه منتقل می‌شدند. در مرحله بعدی با استفاده از PBS شستشو صورت می‌گرفت. در مرحله بعد آنتی بادی KI-67 به مدت ۶۰ دقیقه بر روی لامها ریخته می‌شد. پس از شستشو با PBS لامها به مدت یک ساعت در محلول *envison&dual link system peroxidase* قرار داده می‌شدند. پس از شستشو در بافر فسفات از کروموژن دی آمینو بنزیدین هیدروکلراید به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق استفاده می‌شد. سپس جهت رنگ آمیزی زمینه از رنگ همتوکسیلین مایر استفاده می‌شد. پس از آن مراحل آبیگری با استفاده از الکل با درجات صعودی ۷۰ و ۹۶ و ۱۰۰ درصد انجام می‌شد. در آخرین مرحله با استفاده از چسب هیستولوژیک، لامل بر روی برش چسبانده می‌شد. در طی مرحله رنگ آمیزی از نمونه عقده لنفاوی به عنوان کنترل مثبت استفاده میشد. در پایان هسته سلول‌هایی که در مرحله تکثیر بودند و با ki-67 واکنش داده بودند به رنگ قهوه ای تیره واکنش نشان می‌دادند و بقیه سلول‌ها که منفی بودند به رنگ بنفش دیده می‌شدند. به منظور محاسبه تعداد سلول‌های در حال تکثیر در هر حیوان تعداد ۲۰ فیلد میکروسکوپی

۴۰-۵۰ درصد بود. حیوانات دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. کلیه موش‌ها از نژاد NMRI بوده و همگی از انستیتو پاستور واقع در کرج تهیه شدند. موش‌ها بصورت تصادفی در سه گروه به صورت زیر تقسیم بندی شدند:

A- گروه کنترل، تحت تیمار با نرمال سالین یک درصد ($n=10$)

B- گروه تحت تیمار با نیکوتین به میزان 0.2 mg/kg ($n=10$)

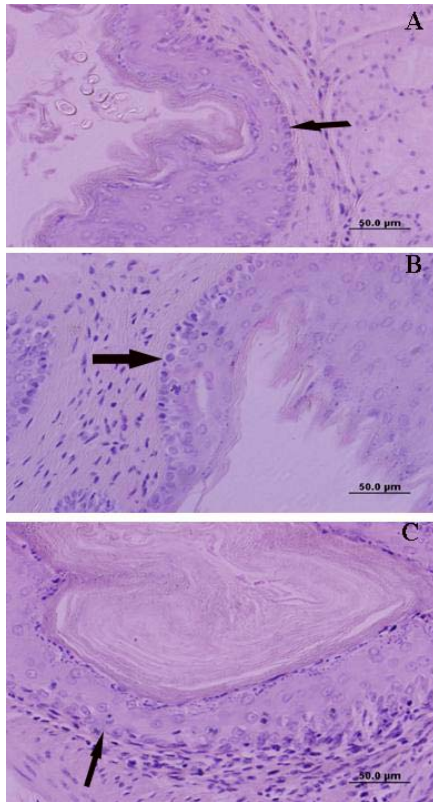
C- گروه تحت تیمار با نیکوتین به میزان 0.4 mg/kg ($n=10$)

همان‌گونه که در بالا اشاره شد به گروه کنترل نرمال سالین یک درصد، به گروه دوم، نیکوتین (سیگما- آمریکا) حل شده در نرمال سالین به میزان 0.2 میلی گرم به ازای 1000 گرم وزن بدن و به گروه سوم، نیکوتین حل شده در نرمال سالین به میزان 0.4 میلی گرم به ازای 1000 گرم وزن بدن تجویز شد. شیوه تجویز در همه حیوانات بصورت داخل صفاقی و به مدت ۱۴ روز بود. میزان نیکوتین مصرفی و مدت مصرف بر اساس مطالعاتی است که قبلا در رتها انجام شده است (۱۰، ۱۱).

۱۵ روز پس از شروع درمان، حیوانات با استفاده از کتامین- زایلازین بیهوش و در نهایت کشته شدند. مری حیوانات جدا و از انتهای دیستال آن نمونه برداری انجام شد. به منظور ثبوت بافت، از فرمالین بافری شده ۱۰ درصد استفاده می‌شد. جهت افزایش سرعت ثبوت بافتی ابتدا نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در فرمالین غوطه ور می‌شدند پس از آن به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق در داخل فرمالین غوطه ور می‌شدند. سپس بافت‌ها پس از طی مراحل پاساژ، در بلوک‌های پارافینی قالب گیری شده و پس از آن، اقدام به برش با استفاده از میکروتوم دوار می‌شد. ضخامت برش‌ها ۳-۵ میکرون و فاصله برش‌ها از هم ۵۰ میکرون می‌بود. در هر حیوان ۵ اسلاید برای ارزیابی با رنگ آمیزی روتین H&E و همچنین ۵ اسلاید برای رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمیایی Ki67 به منظور تعیین شاخص میتوزی مخاط مری تهیه می‌شد. لازم به ذکر است در صورتی که برشهای بافتی مناسب، صاف و یکدست بوده و فاقد چروکیدگی و یا پارگی بودند اقدام به رنگ آمیزی میشد.

ارزیابی هیستو مورفومتریک مخاط مری: پس از انجام مراحل رنگ آمیزی H&E، لام‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری

نه تنها در ردیف قاعده ایی بلکه در ردیف‌های بالاتر (سوپرا بازال) نیز به چشم می‌خوردند. شاخص میتوزی در گروه تحت درمان با 0.2 mg/kg نیکوتین تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت (شکل ۲ و جدول ۱).



شکل ۱: فوتو میکرو گراف نوری از مخاط مری موش

A: گروه کنترل. B: گروه تحت درمان با 0.2 mg/kg نیکوتین، C: گروه تحت درمان با 0.4 mg/kg نیکوتین. پیکانها نمایشگر لایه قاعده ایی اپیتلیوم مری هستند. رنگ امیزی هماتوکسیلین-ائوزین. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر. بار ۵۰ میکرون

جدول ۱: تاثیر نیکوتین بر شاخص میتوتیک و

هیستومورفومتریک مخاط مری موش

نیکوتین	B: نیکوتین	C: نیکوتین	
گروه کنترل (A)	0.2 mg/kg	0.4 mg/kg	
ضخامت اپیتلیوم (μ)	$102/18 \pm 12/50$	$109/08 \pm 10/41$	$114/36 \pm 15/28$
ضخامت لامینا پروپریا (μ)	$27/10 \pm 2/63$	$22/32 \pm 1/60$	$23/10 \pm 2/36$
ضخامت عضله مخاطی (μ)	$11/42 \pm 0/20$	$10/50 \pm 0/34$	$11/00 \pm 0/18$
ضخامت مخاط (μ)	$136/60 \pm 12/02$	$142/71 \pm 11/23$	$144/10 \pm 21/30$
شاخص میتوزی اپیتلیوم (%)	$10/41 \pm 1/4$	$16/28 \pm 4/1$	$34/15 \pm 2/50^{ab}$

داده ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده اند.

a معنی دار نسبت به گروه کنترل. $P < 0.05$

b معنی دار نسبت به گروه تحت درمان با نیکوتین 0.2 mg/kg . $P < 0.05$

به مساحت 1×1 میلی متر مربع بصورت تصادفی انتخاب و سپس با کمک لنز مدرجی که بر روی میکروسکوپ نصب بود، اقدام به شمارش سلول‌های ki-67 مثبت می‌شد. بدین ترتیب که در هر فیلد تعداد سلول‌های مثبت محاسبه و بر تعداد سلول‌های مثبت و منفی تقسیم می‌شد و در نهایت در عدد ۱۰۰ ضرب می‌گردید و بدین ترتیب شاخص میتوزی بصورت درصد بیان می‌گردید.

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 و آزمون واریانس یک طرفه تحلیل شدند. همچنین جهت ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از تست توکی استفاده شد. یافته‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر $P \leq 0.05$ معنی‌دار تلقی گردید.

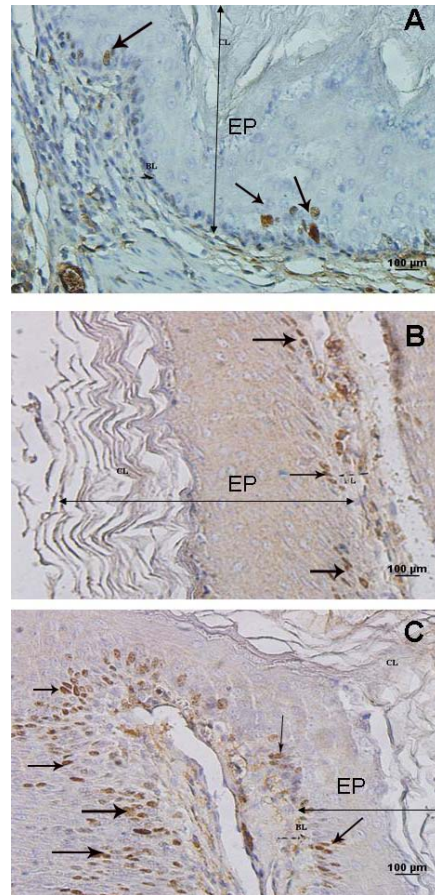
نتایج:

در گروه کنترل اپیتلیوم مطبق سنگفرشی شاخی دیده می‌شد. در لایه قاعده‌ای سلول‌ها عمدتاً استوانه‌ای شکل بودند و بر روی آنها چند ردیف سلول‌های مکعبی شکل قرار داشتند. در لایه‌های سطحی تر اپیتلیوم سلول‌ها، سنگفرشی شده و در نهایت در سطح آزاد سلول‌ها به صورت شاخی شده مشاهده می‌شدند که این برخلاف مورد مشاهده شده در انسان است که ناشی از اختلاف گونه و تفاوت رژیم غذایی در انسان و موش است (شکل ۱). ضخامت لایه مخاط در گروه کنترل $102/18 \pm 12/50$ و $136/60 \pm 12/02$ میکرون بود در گروه‌های آزمایش نیز چنین ساختار بافتی قابل ملاحظه بود و تفاوت خاصی با گروه کنترل مشاهده نمی‌شد. در گروه‌های تحت درمان با 0.2 و 0.4 نیکوتین، ضخامت لایه مخاط به ترتیب $142/71 \pm 11/23$ و $144/10 \pm 21/30$ میکرون بود که تفاوت معناداری بین آنها و کنترل و همچنین دیگر پارامترها مانند ضخامت اپی‌تلیوم، لامینا پروپریا و عضله مخاطی دیده نشد (جدول ۱).

در گروه کنترل سلول‌های در حال تکثیر قهوه‌ای رنگ KI-67 مثبت در لایه قاعده ایی یعنی عمقی‌ترین لایه اپی‌تلیوم بصورت پراکنده به چشم می‌خوردند. شاخص میتوزی در گروه کنترل $10/41 \pm 1/4$ درصد بود. در گروه تحت درمان با 0.4 mg/kg نیکوتین این شاخص به طور معنی‌دار در مقایسه با کنترل به میزان $34/15 \pm 2/50$ افزایش یافته بود. در گروه نامبرده سلول‌های KI-67 مثبت

انتظار نه تنها ضخامت پارامترهای لایه مخاطی بلکه ضخامت لایه اپیتلیوم نیز تغییر نکرده بود. احتمالاً این مسئله نشان‌دهنده این است که مکانیسم‌های دیگری نیز در این زمینه دخیل می‌باشند. شاید علاوه بر این که نیکوتین در گروه نامبرده شاخص میتوزی را افزایش داده است، میزان بروز آپپتوز در سلول‌های اپیتلیوم مری را نیز افزایش داده است. در نتیجه بدلیل افزایش آپپتوز ضخامت اپی تلیوم تغییر نکرده است. یا به عبارتی دیگر افزایش تکثیر سلول‌ها در پاسخ جبرانی به آپپتوز ایجاد می‌شود. در همین راستا نشان داده شده است که نیکوتین می‌تواند نسبت bcl2 به Bax را تغییر داده و کاسپاز ۳ را از طریق گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولینی تیپ ۲ و ۷ در بافت‌های مختلف فعال نماید (۱۳). همچنین نشان داده شده است که بدنبال واکنش با گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولینی اختصاصی موجب القا آپپتوز در بافت‌های متعدد می‌شود (۱۴). نیکوتین و مشتقات آن می‌توانند تکثیر سلولی و آپپتوز را بوسیله فعال کردن مسیر AKT تنظیم نمایند. AKT/PKB یک مسیر در سیگنال‌های سلولی است که منجر به تنظیم بقای سلول و یا بلوک آپپتوز، تنظیم بیان ژن و مهاجرت سلول می‌شود. در این زمینه گزارش شده است که اتصال نیکوتین به رسپتورهای نیکوتینی استیل کولینی موجود بر سلول‌های ماهیچه صاف موجود در راه‌های هوایی رت می‌تواند تکثیر سلولی را از طریق فعال کردن مسیر AKT تنظیم نماید (۱). همچنین نیکوتین می‌تواند باعث القاء آپپتوز در تخمدان، آندومتر رحم و لوله رحم از طریق فراگمانتاسیون هسته سلول‌های اپیتلیالی گردد (۱). در مطالعات انجام شده قبلی نشان داده شده است که نیکوتین می‌تواند آغاز کننده تومورژنز یا کارسینوژنز باشد که یکی از علائم آن افزایش شاخص میتوزی است که یافته ما را تأیید می‌نماید (۲).

ما در مطالعه خود از روش صفاقی جهت تجویز نیکوتین استفاده نمودیم چرا که روش‌های زیر جلدی و داخل صفاقی بالاترین میزان جذب نیکوتین حدوداً ۱۰۰ درصد را دارند در حالی که در روش خوراکی فقط ۴۵-۲۰ درصد این ماده جذب می‌شود که این امر ناشی از متابولیسم ناکامل در طی عبور از کبد می‌باشد (۱۴). مشابه با مطالعه ما نیکوتین می‌تواند باعث تکثیر سلول‌های موجود در آلونول ریوی (۱۵)، آنژیوژنز در معده (۱۵) و تکثیر سلول‌های آندوتلیال شود (۱۶).



شکل ۲: فوتو میکرو گراف نوری از مخاط مری موش.

A: گروه کنترل. به سلول‌های در حال تکثیر قهوه‌ای در لایه قاعده‌ای اپیتلیوم دقت فرمائید. B: گروه تحت درمان با ۰/۲ mg/kg نیکوتین، C: گروه تحت درمان با ۰/۴ mg/kg نیکوتین. در تصویر C به افزایش واضح سلول‌های در حال تکثیر در لایه قاعده‌ای و لایه‌های بالاتر دقت فرمایید. پیکان‌ها سلول‌های Ki-67 مثبت (سلول‌های قهوه‌ای رنگ) اپی تلیوم را نشان می‌دهند. خطوط دو سر محدوده اپی تلیوم (EP) را نشان می‌دهند. به لایه شاخی (CL) در سطح اپیتلیوم توجه نمایید. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Ki-67. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر. بار ۱۰۰ میکرون.

بحث:

مطالعه حاضر نشان داد که مصرف نیکوتین در دوزهای ۰/۲ mg/kg و ۰/۴ به مدت دو هفته دارای آثار متفاوتی بر شاخص میتوزی اپیتلیوم مخاط مری است. به نظر می‌رسد که آثار نیکوتین وابسته به دوز می‌باشد. نیکوتین عمده اثرات خود را از طریق رسپتورهای نیکوتینی استیل کولینی القا می‌کند که در مری نیز این رسپتورها یافت می‌شوند (۱۲). احتمالاً اثر ملاحظه شده در این آزمایش نیز ناشی از تحریک رسپتور نیکوتینی استیل کولین در دوز ۰/۴ mg/kg بوده است. در این مطالعه هر چند که شاخص میتوزی در گروه تحت تیمار با ۰/۴ mg/kg نیکوتین افزایش یافته بود ولی بر خلاف

in vivo و یا in vitro، تفاوت در نوع بافت و یا سلول و همچنین نوع گونه مورد مطالعه باشد.

نتیجه نهایی:

بطور خلاصه این مطالعه نشان داد که تجویز داخل صفاقی نیکوتین در دوز ۰/۴ mg/kg به مدت دو هفته، منجر به افزایش شاخص میتوزی لایه اپیتلیوم مری بدون تاثیر بر ضخامت اپی تلیوم می شود که می تواند به عنوان زنگ خطری برای آغاز توموری شدن بافت مری برای سیگاری ها باشد.

سپاسگزاری:

بدینوسیله از مرکز تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی گیلان جهت حمایت مادی این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی باشد.

References

1. Massarrat S. Smoking and gut. Arch Iran Med 2008;11(3):293-305.
2. Wu WK, Cho CH. The pharmacological actions of nicotine on the gastrointestinal tract. J Pharmacol Sci 2004;94(4):348-58.
3. Etter JF, Schneider NG. An internet survey of use, opinions and preferences for smoking cessation medications: nicotine, varenicline, and bupropion. Nicotine Tob Res 2013;15(1):59-68.
4. George TP, Ziedonis DM, Feingold A, Pepper WT, Satterburg CA, Winkel J, et al. Nicotine transdermal patch and atypical antipsychotic medications for smoking cessation in schizophrenia. Am J Psychiatr 2000 ; 157(11): 1835-42.
5. Naddafi F, Reza Haidari M, Azizi G, Sedaghat R, Mirshafiey A. Novel therapeutic approach by nicotine in experimental model of multiple sclerosis. Innov Clin Neurosci 2013;10(4):20-5.
6. Myung SK, Seo HG. Authors' response to: Efficacy of nicotine replacement therapy in pregnancy. BJOG 2013b;120(3):374.
7. Sorensen LT. Wound healing and infection in surgery: the pathophysiological impact of smoking, smoking cessation, and nicotine replacement therapy: a systematic review. Ann Surg 2012 Jun;255(6):1069-79.
8. Villablanca AC. Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. J Appl Physiol 1998 ; 84(6):2089-98. PubMed PMID: 9609804.
9. Wong SH, Ogle CW, Cho CH. The influence of chronic or acute nicotine pretreatment on ethanol-induced gastric ulceration in the rat. J Pharm Pharmacol 1986;38(7):537-40.
10. Blommaert PJ, Ferwerda G, Kodde A, Tytgat

به طور متفاوتی، برخلاف مطالعه ما نیکوتین در دوزهای مختلف در محیط in vitro باعث کاهش فاز سنتز سلولی و افزایش نسبت G_0 به G_1 در سلول های در حال استراحت می شود. عبارتی دیگر میزان تکثیر سلول های خونی محیطی تک هسته ایی را کاهش می دهد (۱۷). همچنین نیکوتین در دوزهای پایین تر فاقد اثر و در دوزهای بالاتر باعث کاهش تکثیر سلول های میوزی مرحله لپتوتن و پاکی تن در سلولهای زایای بیضه موش بالغ می شود (۱۸). ویلابلانکا نشان داده است که نیکوتین در دوزهای پایین باعث تکثیر سلول های آندوتلیال و در دوزهای بالاتر باعث القا آپوپتوز می شود (۸).

احتمالاً علت تفاوت های مشاهده شده در مطالعات مختلف بدنبال نیکوتین، می تواند ناشی از تفاوت در مدت زمان مواجهه، دوز، نحوه مصرف، تفاوت در محیط مطالعه

- GN, Boeckxstaens GE. Nicotinic acetylcholine receptor blocking effect of guanethidine in the rat gastric fundus. Br J Pharmacol 1999; 128(4): 903-8.
11. Nishikawa H, Taniguchi T, Ninomiya H, Fujiwara M. Nicotinic acetylcholine receptors in the rat stomach: I. (-)-[3H]nicotine binding. Eur J Pharmacol 1988;146(1):97-103.
12. Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndoye A, Jolkovsky DL, Webber RJ, et al. Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. J Dent Res 2000;79(4):939-49.
13. 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(3):610-7.
14. Hukkanen J, Jacob P, 3rd, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. Pharmacol Rev 2005;57(1):79-115.
15. Shin VY, Liu ES, Koo MW, Luo JC, So WH, Cho CH. Nicotine suppresses gastric wound repair via the inhibition of polyamine and $K(+)$ channel expression. Eur J Pharmacol 2002; 444(1-2):115-21.
16. 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(8):2208-17.
17. Aldhous MC, Prescott RJ, Roberts S, Samuel K, Waterfall M, Satsangi J. Does nicotine influence cytokine profile and subsequent cell cycling/apoptotic responses in inflammatory bowel disease? Inflamm Bowel Dis 2008; 14 (11):

1469-82.
18. Khajeh Jahromi S, Mohammadghasemi F,
Hajizadeh Fallah H. Evaluation of proliferative

activity of adult mouse male germ cells following
administration of different doses of nicotine. J
Iranian Anatomical Sci 2011; 9(36): 229-40.

*Original Article***Effect of Various Doses of Nicotine on Mitotic Index in Esophageal Mucosa**S. Khajeh Jahromi, M.D.^{*} ; F. Mohammadghasemi, Ph.D.^{**}

Received: 10.1.2016 Accepted: 10.5.2016

Abstract

Introduction & Objective: Nicotine could directly act as a cancer promoter. The purpose of this study was to evaluate effects of nicotine on mitotic index in esophagus epithelium.

Materials & Methods: In the present study 30 adult male mice were used. Animals were randomly divided into three groups. Group A or the control group received vehicle, groups B and C received nicotine intraperitoneally at doses of 0.2 and 0.4 mg/kg once daily for 14 days, respectively. Evaluations were made using KI-67 immunohistochemistry and Hematoxylin& Eosin for proliferative activity and morphometric study on esophagus mucosa, respectively.

Results: Administration of nicotine in group C, showed a significant increase ($P<0.05$) in KI-67 index 34.15 ± 2.50 vs. 10.41 ± 1.4 compared with the control subjects. The other parameters such as epithelial height, lamina propria, muscular mucosa and mucosa height in nicotine-treated groups were not affected. Nicotine at dose of 0.2 mg/kg did not change the mitotic index in epithelium when compared with the control group.

Conclusion: This study indicates nicotine at dose of 0.4 mg/kg increases mitotic activity in basal cells in esophagus epithelium.

(*Sci J Hamadan Univ Med Sci 2016; 23 (2):126-133*)

Keywords: Esophageal Mucosa / Morphometry / Nicotine / Proliferative Activity

^{*} Resident, Department of Internal Medicine, School of Medicine
Qazvin University of Medical Sciences & Health Services, Qazvin, Iran.

^{**} Associate Professor of Histology, Cellular and Molecular Research Center
Guilan University of Medical Sciences & Health Services, Rasht, Iran. (parsahistolab@gmail.com)