

بررسی اثر نیکوتین در دوران بارداری و شیردهی بر تغییر بیان لامینین آلفا-۵ غشاء پایه در لوله‌های پیچیده دور و جمع کننده ادرار در موش

محمد محسن تقوی^۱، مهدی شریعتی کوهبنانی^۲، احمد شبانی زاده^۳، زهرا تقی پور^۳، حمیدرضا جعفری نوه^۴

دریافت مقاله: ۹۳/۳/۲۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۴/۱۴ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۵/۵ پذیرش مقاله: ۹۳/۵/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: در حال حاضر مشخص شده است مادرانی که در دوران بارداری سیگار مصرف می‌کنند، بیان فیبرونکتین و لامینین آلفا-۵ در بعضی از ارگان‌های جنین آن‌ها تغییر می‌یابد، به عنوان مثال بیان این پروتئین‌ها در پارانشیم ریه‌های نوزادان کاهش می‌یابد. در مطالعه حاضر، اثر نیکوتین در دوران بارداری و شیردهی بر تغییر بیان لامینین آلفا-۵ غشاء پایه در لوله‌های پیچیده دور و جمع کننده ادرار در موش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی بر روی ۲۸ سر موش حامله که به شکل تصادفی به چهار گروه هفت تایی تقسیم شده بودند، صورت گرفت. در گروه آزمایشی روز اول از روز ۷ حاملگی تا تولد نوزادان و در گروه آزمایشی روز چهاردهم از روز هفتم بارداری تا ۱۴ روز بعد از تولد نوزادان، نیکوتین به میزان ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و به صورت داخل صفاقی به مادران تزریق شد. در گروه‌های سوم و چهارم، به عنوان گروه‌های کنترل، به ترتیب مشابه با گروه‌های آزمایشی اول و دوم تحت تزریق میزان و مدت زمان معادلی از سالین قرار گرفتند. بعد از آخرین تزریق کلیه همه نوزادان (متوسط ۵۰ نوزاد در هر گروه) بعد از بیهوشی برداشت شده و با استفاده از روش‌های ایمنوهیستوشیمی و Real time PCR بیان لامینین مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون ناپارامتری Mann-Whitney و آزمون t مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیان mRNA لامینین آلفا-۵ در گروه آزمایش روز چهاردهم ($0/19 \pm 0/62$) نسبت به گروه کنترل روز چهاردهم ($0/14 \pm 0/95$) کاهش داشت ($p=0/043$). در روش ایمنوهیستوشیمی در لوله‌های جمع کننده گروه‌های آزمایش روز اول و چهاردهم نسبت به گروه‌های کنترل معادل بترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری از واکنش مشاهده شد ($p=0/039$)، در حالی که در لوله‌های پیچیده دور تنها اختلاف معنی‌داری از نظر شدت واکنش بین گروه آزمایش روز اول و گروه کنترل روز اول مشاهده شد ($p=0/041$).

نتیجه‌گیری: مصرف نیکوتین توسط مادر با اثر بر روی بیان لامینین به عنوان یکی از ترکیبات مهم غشاء پایه کلیوی، ممکن است یکی از عوامل مؤثر در افزایش بیماری‌های کلیوی در افراد سیگاری باشد.

واژه‌های کلیدی: نیکوتین، کلیه، لامینین آلفا-۵، لوله‌های پیچیده دور، لوله‌های جمع کننده

۱- دانشیار گروه آموزشی علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۲- نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

تلفن: ۰۳۴-۳۴۲۶۴۰۰۳، دورنگار ۰۳۴-۳۴۲۸۰۰۹۷، پست الکترونیکی: shariatik@gmail.com

۳- استادیار گروه آموزشی علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۴- مربی گروه آموزشی علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

مقدمه

در حال حاضر استفاده از سیگار به خصوص در بین زنان جوان که در اوج دوران باروری خود می‌باشند، در حال افزایش است [۱]. امروزه مشخص شده است مشکلات مختلف حاملگی از جمله سقط خودبخودی، مرگ جنینی و نوزادی، مرگ داخل رحمی جنین و زایمان زودرس با مصرف سیگار توسط مادر مرتبط است [۲-۳]. سه ترکیب عمده در سیگار وجود دارد که موجب صدمه به مادر و جنین می‌شود، که عبارتند از: نیکوتین، مونواکسیدکربن (CO) و سیانید. نیکوتین یک ترکیب آلی نیتروژن دار است که بیشتر در گیاهانی مانند تنباکو و به میزان کمتر در گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی، بادمجان و فلفل‌سبز یافت می‌شود. ۰/۳ تا ۰/۵٪ گیاه خشک تنباکو را نیکوتین می‌سازد [۴]. نیکوتین از جفت عبور کرده و وارد گردش خون جنینی شده و سبب اختلال در تحویل اکسیژن به جنین می‌شود، که نتیجه آن افزایش ضربان قلب جنین و کاهش حرکات تنفسی آن می‌باشد. نیکوتین و متابولیت‌های آن می‌توانند از سلول‌های اپی‌تلیال غده پستان وارد شیر شوند و از این طریق در دوران شیرخواری به نوزاد منتقل شوند، مطالعات انجام شده نشان داده است که نیمه عمر نیکوتین در شیر کمی بیشتر از نیمه عمر آن در سرم می‌باشد [۵-۶].

لامینین‌ها خانواده‌ای از گلیکوپروتئین‌ها هستند که در ماتریکس خارج سلولی حضور داشته و جزء اصلی لایه بازال در سرتاسر بدن مهره‌داران و بی‌مهره‌گان می‌باشند [۷]. این گلیکوپروتئین هترومر و از سه زنجیره آلفا (α)، بتا (β) و گاما (γ) ساخته شده است. این زنجیره‌ها می‌توانند با اتصال با یکدیگر حداقل ۱۷ نوع ایزوفورم

مختلف از لامینین را بسازند. این ایزوفورم‌ها در طی تکامل و در بافت‌های بالغ به طور اختصاصی توزیع می‌شوند، بنابراین اعمال اختصاصی آنها تنظیم ساختمان و رفتار سلول می‌باشد [۸-۱۰]. مطالعات انجام شده، نشان داده است که زنجیره آلفا-۵ لامینین در بافت‌های ریه، کلیه و قلب به شدت بیان می‌شود و می‌توان آن را اصلی‌ترین زنجیره لامینین در غشاء پایه به حساب آورد [۱۱].

مطالعات نشان می‌دهد که مصرف سیگار توسط مادر باعث طیف وسیعی از اثرات روی کلیه نوزادان می‌شود که از جمله می‌توان به کاهش وزن کلیه، نفروپاتی، کیست پلی‌کیستیک، بدشکلی‌ها و عدم شکل‌گیری کلیه‌ها اشاره کرد [۱۲-۱۶]. علاوه بر آن بیان غیرطبیعی ژن کلاژن نوع IV [۱۶]، فیبرونکتین و لامینین [۲] به‌عنوان یک ساختار از غشاء پایه و ماتریکس خارج سلولی در نوزادان با مادران تحت تیمار با نیکوتین گزارش شده است [۱۶-۱۷].

غشاءهای پایه به عنوان ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی در تکامل و ارگانوژنز دارند. هر تغییری در غشاء پایه و ماتریکس خارج سلولی ممکن است تمایز سلولی در دستگاه مورد نظر را متأثر سازد. مطالعات نشان می‌دهد که زنجیره آلفا-۵ لامینین برای تکامل ریه‌ها در هر دو دوره جنینی و بلوغ ضروری هستند [۱۸]. به همین ترتیب تکامل طبیعی انواع سلول‌های عضلانی صاف، غشاء پایه عروق خونی [۱۶، ۲]، و لوله گوارشی [۲۱-۱۹] مربوط به این زنجیره است. همچنین لامینین آلفا-۵ برای انتشار (Propagation) و قطبی‌شدن (Polarization) سلول‌های اپیتلیال ضروری می‌باشد [۲۲-۲۳]. در طول دوره تکامل در موش، حذف ژن‌هایی که زنجیره آلفا-۵ لامینین را کد می‌نمایند، منجر به مرگ [۲۴-۲۶] و یا ناهنجاری‌های شدید در کلیه و لوله گوارشی خواهد شد [۲۷]. همچنان

آزمایشی اول و دوم به صورت داخل صفاقی تزریق شد. تزریقات در ساعت ۱۰ صبح توسط یک فرد در روزهای مطالعه صورت گرفت. در پایان مطالعه، نوزادان با اتر بیهوش و کلیه آنها جهت مطالعه ایمونوهیستوشیمی و Real time PCR به ترتیب در فرمالین ده درصد و RNA latter قرار داده شدند [۱۶، ۲]. دستورالعمل آزمایش و نگهداری حیوانات مورد تأیید کمیته پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان قرار گرفت.

در روش ایمنوهیستوشیمی، مطابق روش معمول آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی بافت‌ها، بافت‌های کلیه نوزادان برداشته در گروه‌های مختلف آماده و سپس برش‌های ۵ میکرون تهیه شد. بازیافت آنتی ژن با استفاده از بافر Tries/EDTA با pH:9 (Heat-induction) انجام شد. لام‌های با PBS محتوی تریتون X100 ۰/۰۲۵ برای ۵ دقیقه شستشو شده و به مدت دو ساعت در درجه حرارت اتاق در سرم نرمال ده درصد (goat, sigma, USA) با BSA یک درصد (Sigma, USA) بلوکه شدند. در مرحله بعد همه لام‌ها با مونوکلونال آنتی‌لامینین آنتی‌بادی (Abcam, 75344, USA) در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه گردیدند. در این مطالعه، آنتی‌لامینین به نسبت ۱ به ۱۵۰ در محلول PBS مورد استفاده قرار گرفت و به منظور خنثی‌سازی اندوژن پراکسیداز اسلایدها در پراکسیدهدروژن ۰/۰۳٪ (Merk, Germany) حل شده و در متانول (Bidestn, Iran) به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. سپس بافت‌ها برای ۲ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه (Abcam, 97051, USA) رقیق شده به نسبت یک به ۸۰۰ انکوبه شد. جهت تباین رنگ‌ها بعد از شستشو لام‌ها با آب جاری، از رنگ همتاتوکسیلین برای یک دقیقه استفاده شد. در نهایت همه مقاطع با درجات افزایش یابنده اتانول

که گفته شد، در دوران جنینی نیکوتین قادر است از سد جفتی عبور کرده و در تکامل بافت همبند جنینی اثر گذارد، چنین به نظر می‌رسد که نتیجه این تأثیر منفی بر روی کلیه نوزادان به وسیله تغییرات در اجزای بافت همبند مثل لامینین القاء می‌شود. لذا هدف از این مطالعه بررسی تأثیر نیکوتین در دوران بارداری و شیردهی بر روی بیان لامینین آلفا-۵ غشاء پایه لوله‌های پیچیده دور و لوله‌های جمع‌کننده ادرار کلیه نوزادان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۱ و در دانشکده پزشکی رفسنجان بر روی ۲۸ سر موش ماده بالغ Balbc/c با وزن ۲۵-۳۰ گرم، که قبلاً حاملگی نداشتند، انجام شد. بعد از جفت‌گیری و تعیین روز صفر حاملگی موش‌ها به شکل تصادفی به دو گروه آزمایشی، دریافت‌کننده نیکوتین، و دو گروه کنترل، دریافت‌کننده سالین تقسیم شدند. حیوانات در شرایط استاندارد حیوانخانه و اتاق تزریق شامل درجه حرارت 23 ± 2 °C و رطوبت 55 ± 5 درصد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شده و دسترسی کامل به غذا و آب داشتند. در هر صبح با بررسی واژن و تشکیل پلاک واژینال روز صفر حاملگی تعیین شد. نیکوتین (N 3876, Sigma) در نرمال سالین حل شده و محلول تزریق آماده شد. تزریق نیکوتین داخل صفاقی و به میزان ۲ mg/kg بود که در گروه آزمایشی اول (آزمایش روز اول) از روز ۷ بارداری تا تولد نوزادان و در گروه آزمایشی دوم (آزمایش روز چهاردهم) از روز ۷ بارداری تا دو هفته بعد از زایمان ادامه داشت. در گروه‌های کنترل سوم و چهارم (کنترل‌های روز اول و چهاردهم) حجم معادلی از محلول سالین به ترتیب مشابه با گروه‌های

آب‌گیری و با زایلین پاک شده و با چسباندن لامل آماده مطالعه شدند. بازیافت آنتی‌ژن نیز به روش گرمایی صورت گرفت [۱۶].

شدت واکنش لامینین در محل واکنش به صورت طیف متفاوتی از قهوه‌ای کم‌رنگ تا قهوه‌ای پررنگ نمایان شد. این شدت توسط سه شخص و به شکل کور و مجزا از ۱ تا ۴ نمره‌دهی گردید. درصد میانه نمرات به عنوان شدت واکنش محاسبه شده و به شکل (چارک سوم، چارک اول) میانه گزارش گردید [۱۶، ۲].

در مطالعه Real Time PCR ابتدا برای استخراج RNA Total، به ۳۰ میلی‌گرم از بافت کلیه نوزاد موش ۱ cc تراپزول اضافه و سپس هموژنیزه گردید، محلول هموژنیزه را به یک لوله میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری منتقل و ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس (Vortex) نموده و سپس در درجه حرارت اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به محلول فوق اضافه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس محلول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید، فاز آبی را به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه گردید. مجدداً محلول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید، محلول رویی را دور ریخته و ۱ cc اتانل ۷۵٪ به آن اضافه شد و به آرامی ورتکس گردید، تا pellet ناپدید شود. مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتریفوژ انجام شد. محلول رویی را دور ریخته و پلت را در دستگاه وکیوم گذاشته تا خشک شود سپس pellet را با ۵۰ میکرولیتر آب DEPC (Diethylpyrocarbonate) حل نموده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۸].

برای ساخت cDNA به ازاء هر نمونه که قرار بود cDNA ساخته شود، ۰/۵ میکرولیتر DNase و ۰/۵ میکرولیتر 10 x Buffer استفاده شد. ۳ میکرولیتر RNA تام را با ۱ میکرولیتر از مخلوط بالا را در یک میکروتیوب ۰/۲ ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نموده، سپس به هر میکروتیوب ۱ میکرولیتر Oligo dt و ۸ میکرولیتر آب DEPC اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میکروتیوب‌ها را ۱ تا ۲ دقیقه در فریزر انکوبه نموده و آن‌ها را بر روی رک حاوی یخ منتقل و ۸ میکرولیتر از محلول‌های زیر (موجود در کیت) به آن‌ها اضافه گردید [۲۸].

یک میکرون Reverte، دو میکرون محلول ۱۰ میلی‌مول dntp Mix، یک میکرون Ribolock، و چهار میکرون از راکشن بافر ۵X میکروتیوب‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل و طبق برنامه ۴۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ دقیقه، ۷۰ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه یک سیکل دستگاه تنظیم شد، بعد از گذشت زمان فوق میکروتیوب‌ها از دستگاه خارج و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

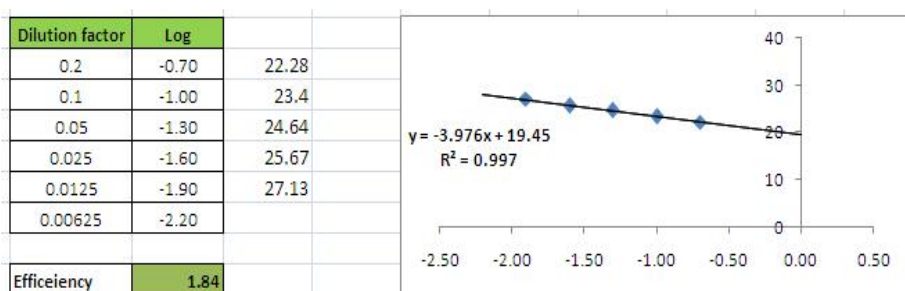
در این مطالعه طراحی پرایمر ژن‌های، Laminin و GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) در موش سوری نژاد Balb/C با استفاده از نرم‌افزار Beacon Designer صورت پذیرفت و ژن GAPDH به عنوان نرم‌الایزر مورد استفاده قرار گرفت. توالی ژن‌های مورد استفاده در این مطالعه عبارت بودند از:

GAPDH (forward) AACTCCCATTCCTTCCA
CCTTTG, (Revers) CTGTAGCCATATTCATT
GTCATACCAG

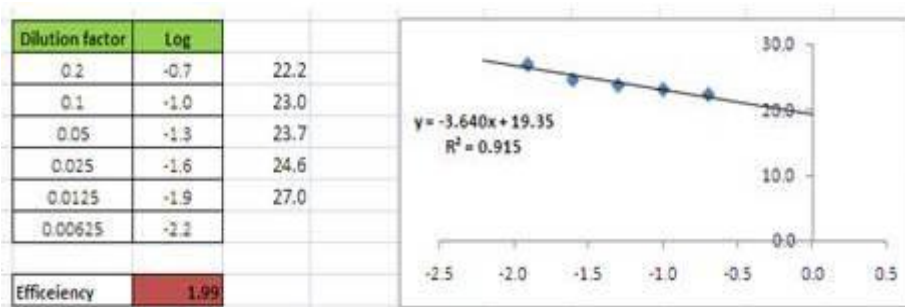
برای انجام این روش ابتدا منحنی استاندارد رسم گردید، پس از رسم منحنی استاندارد، Efficiency هر ژن بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید [۲۹] (شکل ۱).

Laminin (forward) CGTCCCACAGGAATAGG
CT, (Reveres) TACCAACGAAGGGCTGCG
برای انجام Real time PCR از دستگاه Startagene Max3000p (شرکت استارتاژن، آمریکا) و از روش نسبت بیان ژن براساس روش Pfaffl و همکاران استفاده شد.

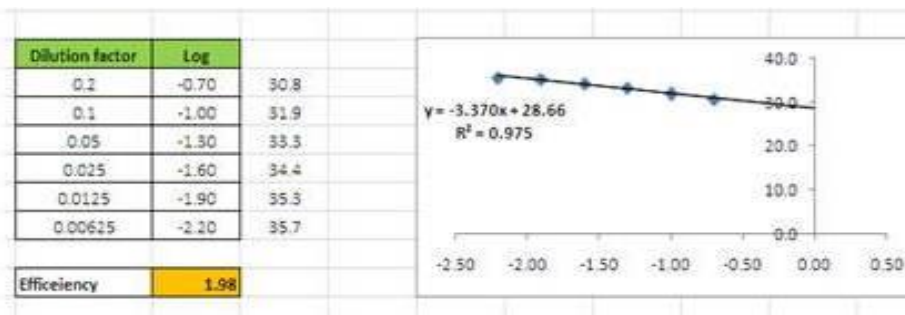
$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CT_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$



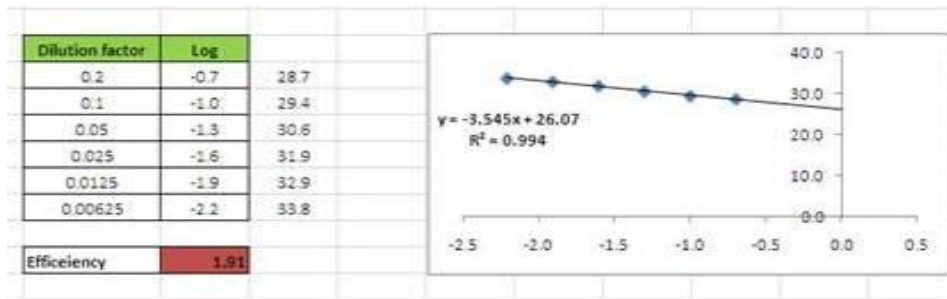
الف



ب



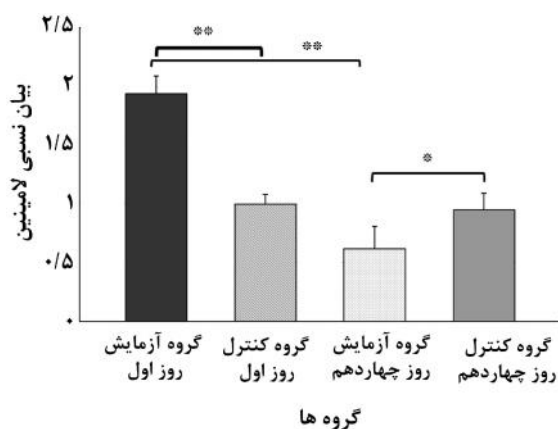
ج



د

شکل ۱- منحنی‌های استاندارد و Efficiency مربوط به ژن‌های لامینین (الف نوزادان یک روزه و ج نوزادان چهارده روزه) و GAPDH (ب نوزادان یک روزه و د نوزادان چهارده روزه) در گروه‌های آزمایشی روز اول و چهاردهم در مرحله بهینه‌سازی Real time PCR

خلاصه تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بیان لامینین الف-۵ در گروه‌های آزمایشی روز اول و چهاردهم به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل روز اول و چهاردهم مربوطه داشتند (نمودار ۱).



نمودار ۱- بررسی میزان بیان نسبی ژن لامینین در گروه‌های مختلف. آزمون آماری مورد استفاده t مستقل
* بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه آزمایش روز چهاردهم و گروه کنترل روز چهاردهم با $p=0.043$
** بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه آزمایش روز اول و گروه کنترل روز اول با $p=0.008$
*** بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش روزهای اول و چهاردهم با $p<0.001$

واکنش ایمنوهیستوشیمی بافت کلیه نوزادان با استفاده از مونوکلونال آنتی‌بادی خرگوشی در مقابل موشی برای

تجزیه تحلیل آماری

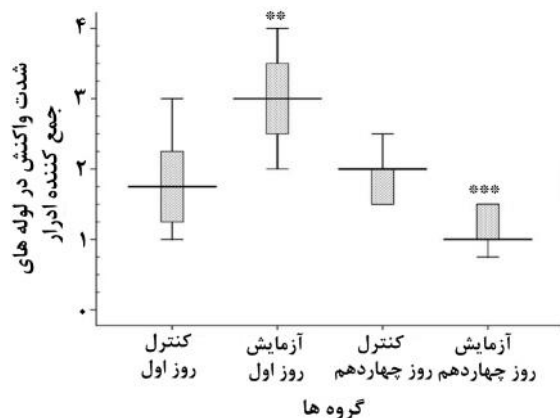
به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و از آزمون ناپارامتری من-ویتنی (Mann-Whitney U test) استفاده شد. برای Real time PCR از آزمون t مستقل استفاده شد. همه داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SE}$ گزارش شدند. $p < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج نشان داد که بیان ژن لامینین در سطح mRNA در کلیه نوزادان موش گروه آزمایشی روز اول 1.94 ± 0.15 بود. آزمون t نشان داد که بیان لامینین در این گروه نسبت به گروه کنترل معادل (روز اول) افزایش یافته است ($p=0.008$). نتیجه روز چهاردهم متضاد روز اول بود بدین ترتیب که بیان ژن لامینین در گروه آزمایشی مربوطه نسبت به گروه کنترل خود کاهش معنی‌داری داشت ($p=0.043$). بیان ژن لامینین در سطح mRNA در گروه آزمایشی روز چهاردهم 0.62 ± 0.19 محاسبه گردید. با توجه به مقادیر جای شکی نیست اختلاف زیادی بین دو گروه آزمایش وجود دارد ($p<0.001$). بنابراین به طور

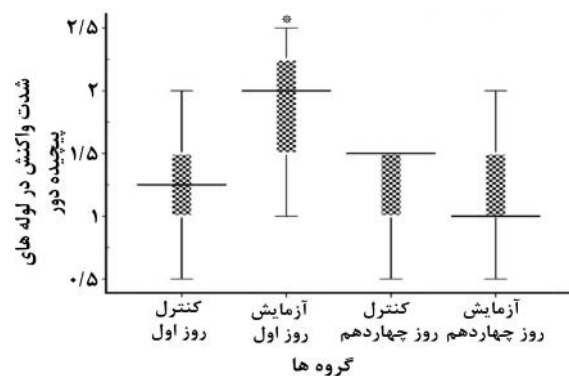
روز اول دارای میانه (۳/۵، ۲/۵) ۳ و در گروه کنترل روز اول که معادل گروه آزمایش روز اول بوده اما مادران آن‌ها بجای نیکوتین سالیین دریافت داشته‌اند، دارای میانه (۲/۲۵، ۱/۲۵) ۱/۷۵ بود. که افزایش قابل توجه معناداری را نشان داد ($p < 0.001$).

برعکس کاهش قابل توجهی بین دو گروه آزمایش روز چهاردهم و گروه کنترل روز چهاردهم محاسبه شد ($p < 0.001$). میانه شدت رنگ در لوله‌های جمع‌کننده ادرار کلیه نوزادانی که علاوه بر دوران جنینی، بعد از تولد نیز به مدت ۱۴ روز از طریق شیر نیکوتین دریافت داشته، یعنی در گروه آزمایش روز چهاردهم و کنترل روز چهاردهم به ترتیب مقادیر (۱/۵، ۱) و (۲، ۱/۵) بود (شکل ۴ و ۵). بدون شک در این حالت اختلاف معنی‌داری بین دو گروه آزمایش روزهای اول و چهاردهم وجود داشت، به عبارتی وقتی میانه‌های گروه آزمایش روز چهاردهم و کنترل مربوطه اختلاف معنی‌داری داشته، بین میانه گروه آزمایش روز چهاردهم و میانه بالاتر گروه آزمایش روز اول یعنی (۳/۵، ۲/۵) ۲ اختلاف معنی‌دار بیشتری مشاهده شد (نمودار ۳ و شکل ۲).



نمودار ۳- Boxplot نشان‌دهنده تأثیر نیکوتین در دوران بارداری و شیردهی بر شدت واکنش لامینین در لوله‌های جمع‌کننده ادرار کلیه نوزادان موش یک و چهارده روزه. میانه به صورت (۲/۵، ۱/۲۵) ۱/۷۵ بیان شده است. آزمون آماری مورد استفاده Mann- whitney

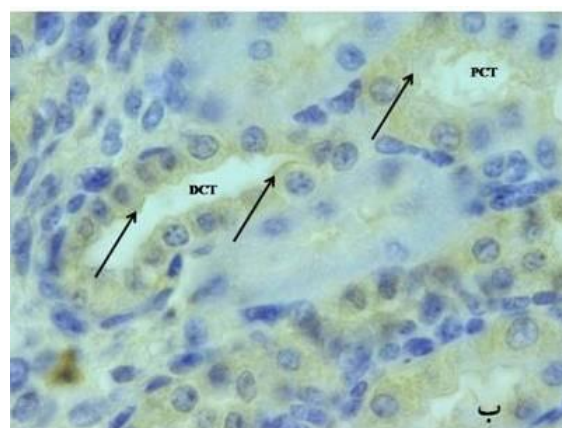
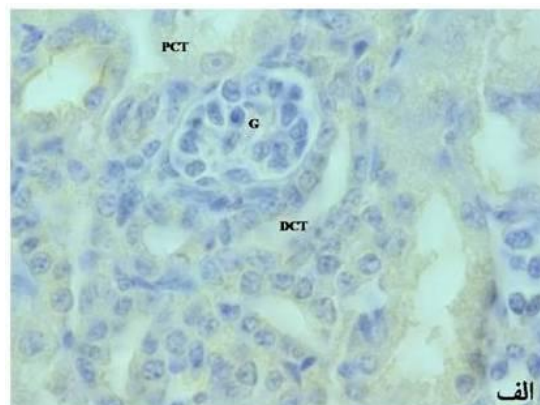
لامینین آلفا-۵ در لوله‌های پیچیده دور و لوله‌های جمع‌کننده اختصاصی بود. مناطق بیان لامینین آلفا-۵ در این قسمت‌های کلیه نوزادان مطابق با شدت رنگ تعیین شد. داده‌های ایمنوهایستوشیمی نشان داد که شدت واکنش لامینین آلفا-۵ در لوله‌های پیچیده دور گروه آزمایش روز اول دارای میانه (۲/۲۵، ۱/۵) ۲ و در گروه کنترل روز اول دارای میانه (۱، ۱/۵) ۱/۲۵ بود، که افزایش معناداری را نشان داد ($p = 0.002$). میانه شدت رنگ در لوله‌های پیچیده دور کلیه نوزادانی که علاوه بر دوران جنینی، بعد از تولد نیز به مدت ۱۴ روز از طریق شیر، نیکوتین دریافت داشته یعنی در گروه آزمایش روز چهاردهم و کنترل روز چهاردهم به ترتیب مقادیر (۱/۵، ۱) و (۱، ۱/۵) ۱/۵ بوده که نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین این دو گروه می‌باشد ($p = 0.283$) (نمودار و شکل ۲). البته اختلاف آماری معنی‌داری بین دو گروه آزمایش مشاهده شد ($p < 0.001$) (نمودار ۲).



نمودار ۲- Boxplot نشان‌دهنده تأثیر نیکوتین در دوران بارداری و شیردهی بر شدت واکنش لامینین در لوله‌های پیچیده دور کلیه‌های نوزادان موش یک و چهارده روزه. میانه به صورت (۲/۵، ۱/۲۵) ۱/۷۵ بیان شده است. آزمون آماری مورد استفاده Mann- whitney
* بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش روز اول و کنترل روز اول با $p = 0.043$

داده‌های ایمنوهایستوشیمی نشان داد که شدت واکنش لامینین آلفا-۵ در لوله‌های جمع‌کننده ادرار گروه آزمایش

***** بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه آزمایش روز اول و کنترل روز اول و گروه آزمایش روز چهاردهم و گروه کنترل روز چهاردهم و برای هر دو مورد با ($p < 0.001$)**



شکل ۲- مقطعی از کلیه نوزادان اتکوبه شده با آنتی‌بادی لامینین آلفا-۵. تصویر بالا (الف) گروه کنترل روز چهاردهم، تصویر پایین (ب) گروه آزمایش روز چهاردهم. PCT نشان‌دهنده لوله پیچیده نزدیک، DCT لوله پیچیده دور، G نشان‌دهنده گلومرول کلیوی می‌باشد.

بحث

نتیجه این مطالعه فرضیه مطالعه را تأیید نموده و نشان داد که بیان لامینین آلفا-۵ به عنوان یک جزء مهم غشاء پایه تحت تأثیر نیکوتین در دوران بارداری و شیردهی تغییر می‌کند. مطابق تجزیه و تحلیل ایمنوهیستوشیمی در غشاء پایه هر دو ساختار مورد مطالعه یعنی لوله‌های پیچیده دور و جمع‌کننده ادراری، افزایش واکنش در گروه‌های آزمایش روز اول نسبت به گروه‌های کنترل روز

اول وجود داشت که نشان‌دهنده تغییر بیان این پروتئین مهم تحت تأثیر نیکوتین مصرفی مادر در دوران بارداری می‌باشد. برعکس افزایشی که در این دو گروه مشاهده شد، بیان لامینین در روز چهاردهم در گروه‌های آزمایش کاهش داشت. بعبارت دیگر نیکوتین موجود در شیر مادر برعکس نیکوتینی که از طریق جفت به جنین می‌رسد، موجب کاهش شدت واکنش ایمنوهیستوشیمی در غشاء پایه هر دو ساختمان فوق گردید. در روش Real time PCR، شدت واکنش‌ها در گروه‌های مختلف آزمایش نیز متفاوت بود. سطوح پروتئینی به دست آمده نیز تأییدکننده همین تغییرات در گروه‌ها بود و در واقع داده‌های به دست آمده از ارزیابی بیان mRNA و سطح پروتئین مربوطه دارای نتایج مشابه بود. به طور خلاصه، به نظر می‌رسد که نیکوتین مصرفی توسط مادر (دوران حاملگی) و نیکوتین موجود در شیر مادر (دوران شیردهی) به ترتیب دارای اثر تحریکی و مهارتی بر نسخه‌برداری لامینین دارد.

در مطالعه‌ای مشخص شد غلظت نیکوتین موجود در شیر مادر سیگاری می‌تواند ۱/۵ تا ۳ برابر نیکوتین موجود در پلاسمای خون همان مادر شود. نیکوتین موجود در شیر مادر به سرعت از طریق روده جنین جذب شده و در بعضی از بافت‌ها تجمع می‌یابد [۳۰]. کاهش بیان لامینین آلفا-۵ در گروه‌های روز چهاردهم ممکن است به دلیل غلظت بالای نیکوتین در شیر مادر و سپس در کلیه‌های نوزاد باشد.

علاوه بر بحث غلظت، شاید راه رسیدن نیکوتین به نوزادان به دو روش مختلف در این مطالعه موجب تغییرات معنی‌دار افزایش و کاهشی در بیان لامینین آلفا-۵ شده است. در مسیر اول نیکوتین تزریق شده از طریق جذب در

به طور موازی باعث کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدان، سرکوب گلیکولیز و افزایش cAMP شده که نتیجه همه این موارد تغییر در رشد ریه خواهد شد [۳۳].

ما نتوانستیم مطالعه‌ای بیابیم که به شکل دقیق و مستقیم به وجود گیرنده‌های نیکوتینی در کلیه و ساختارهای مختلف آن اشاره کند، اما تعداد محدودی مطالعه به شکل غیر مستقیم به حضور این گیرنده‌ها در کلیه اشاره می‌کنند [۳۴]. در هر صورت ساختارهای مثل عروق و اعصاب جدای از نوع بافتی که در آن وجود دارند، در همه بافت‌ها یکسان بوده و بنابراین اگر چه ممکن است در بافت اصلی کلیه این گیرنده‌ها نباشند، اما در عروق و اعصاب که این عضو را تغذیه و عصبدهی می‌نمایند، به احتمال زیاد این گیرنده‌ها هستند و این احتمال وجود دارد که تغییر بوجود آمده در بیان لامینین نتیجه تأثیر نیکوتین بر روی این گیرنده‌ها باشد.

در موارد دیگری مثل افراد دیابتی و بیماران با کلیه هیپراکتیو، تغییرات در غشاء پایه و ترکیبات آن گزارش شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به تغییر در ضخامت این غشاء و میزان کلاژن آن در این افراد اشاره کرد [۳۵]. به همین ترتیب از دست رفتن لامینین، افزایش در بیان زنجیره بتا-۲ و آلفا-۱ لامینین، کاهش در بیان لامینین آلفا-۵، در افراد مسن، سرطانی، آسمی، آلرژیک و حتی افراد با تغذیه نامناسب و افراد با کلیه دراز مدت فعال، گزارش شده است [۳۶-۳۷].

همه نتایج مطالعات بالا تأکید بر ساختار نرمال غشاء پایه برای تکامل طبیعی کلیه‌ها دارند، لذا ممکن است نیکوتین با تغییر در بیان لامینین در دوران جنینی و شیردهی، ساختار طبیعی غشاء پایه را مختل کند. چه بسا بسیاری از ناهنجاری‌های کلیوی گزارش شده در نوزادان با

روده‌ها و سپس جفت به نوزاد رسیده است، اما در روش دوم نیکوتین از طریق شیر مادر و تغلیظ در آن وارد بدن نوزاد گشته است. در هر صورت ما تصور می‌کنیم بسیار از گزارشات موجود در مورد ناهنجاریهای کلیه نوزادان با مادران سیگاری بویژه مواردی مثل بزرگ‌شدن غیرنرمال کلیه‌ها، کاهش وزن کلیه [۱۶، ۲]، و کاهش تعداد کورپوسکول‌ها [۲۶]، می‌تواند در اثر تغییر در بیان این پروتئین مهم غشاء پایه باشد و یا حداقل در این مورد سهیم باشد.

مدارکی از مطالعات قبلی این فرضیه را مطرح می‌کند که شاید تغییر در بیان لامینین و نسخه‌برداری ژن لامینین در اثر تغییر در بیان ژن مربوط به گیرنده‌های نیکوتینی کولینرژیک آلفا-۷ ایجاد شده است. این مدارک نشان می‌دهند که نیکوتین با مهار یا فعال کردن سیگنال‌های داخل سلولی تغییر در بیان گیرنده‌ها را باعث می‌گردد. از جمله این مدارک که به طور غیر مستقیم فرضیه بالا را مطرح می‌سازد می‌توان به مطالعات زیر اشاره کرد: نیکوتین بر روی گیرنده‌های nAChR که به عنوان کانال‌های دروازه‌دار یون‌ها (Ligand-gated ion channels) محسوب شده عمل می‌کنند. این کانال‌ها ورود یون‌های سدیم و کلسیم را بدخل سلول کنترل می‌کنند [۲۸]. تجویز نیکوتین به میمون‌های رسوس حامله سبب افزایش در بیان گیرنده‌های کلونرژیک نیکوتینی آلفا-۷ در شش‌ها گشته که این خود موجب افزایش در میزان کلاژن در دیواره راه‌های هوایی شش‌ها می‌شود [۳۱]. گیرنده‌های عصبی نیکوتینی در اپی‌تلیوم برونش‌ها، سلول‌های اندوتلیال عروقی و اعصاب کولینرژیکی که عضلات صاف برونش‌های را عصبدهی می‌کنند، وجود دارند [۳۲]. نیکوتین تولید رادیکال‌های آزاد در ریه را افزایش داده و

تغییر می‌کند و ممکن است اثرات مضر القاء شده توسط نیکوتین از طریق تغییر در بیان لامینین اعمال گردد. مسلم است مطالعات تجربی محدودیت‌های خاص خود را دارند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به هزینه‌های مربوطه، عدم امکان استفاده از چند روش و حیوانات مختلف و نمونه‌های انسانی اشاره کرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان به خاطر حمایت‌های مالی تقدیر و تشکر می‌گردد.

مادران سیگاری نتیجه تغییر در این پروتئین بوده است. با توجه به مدت مطالعه پیشنهاد می‌شود تزریق نیکوتین تا پایان دوره شیردهی ادامه یابد همچنین بیان این گلیکوپروتئین توسط روش وسترن‌بلات نیز مورد مطالعه قرار گیرد و روش‌های دیگر تجویز نیکوتین نیز مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه ما نتیجه‌گیری می‌کنیم دو دوره جنینی و شیردهی دورانی بسیار مهم و حساس در تکامل کلیه ارگان‌های بدن می‌باشد. با ورود نیکوتین به بدن جنین یا نوزاد، بیان لامینین غشاء پایه

References

- [1] WHO. The facts about smoking and health. *WHO Fact sheets*. 30 May 2006.
- [2] Jalali M, Nikravesh MR, Moeen AA, Mohammadi S, Karimfar MH. Effects of Maternal Nicotine Exposure on Expression of Collagen Type IV and its Roles on Pulmonary Bronchogenesis and Alveolarization in Newborn Mice. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2010; 9(3): 169-73.
- [3] Stein RT, Holberg CJ, Sherrill D, Wright AL, Morgan WJ, Taussig L and Martinez FD. Influence of parental smoking on respiratory symptoms during the first decade of life: The Tucson Children's
- [4] Ren N, Timko MP. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* 2001; 44(4): 559-71.
- [5] Chen CM, Wang LF, Yeh TF. Effects of maternal nicotine exposure on lung surfactant system in rats. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39(2): 97-102.

- [6] Zevin S, Gourlay SG, Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Clin Dermatol* 1998; 16(5): 557-64.
- [7] Belkin AM, Stepp MA. Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech* 2000; 51(3): 280-301.
- [8] Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 2000; 218(2): 213-34.
- [9] Coraux C, Meneguzzi G, Rousselle P, Puchelle E, Gaillard D. Distribution of laminin 5, integrin receptors, and branching morphogenesis during human fetal lung development. *Dev Dyn* 2002; 225(2): 176-85.
- [10] Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(17): 2879-95.
- [11] Miner JH, Lewis RM, Sanes JR. Molecular cloning of a novel laminin chain, alpha 5, and widespread expression in adult mouse tissues. *J Biol Chem* 1995; 270(48): 28523-6.
- [12] Shannon MB, Patton BL, Harvey SJ, Miner JH. A hypomorphic mutation in the mouse laminin $\alpha 5$ gene (Lama5) causes polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(7): 1913-22.
- [13] Kallen K. Maternal smoking and urinary organ malformations. *Int J Epidemiol* 1997; 26(3): 571-4.
- [14] Lampl M, Kuzawa CW, Jeanty P. Growth patterns of the heart and kidney suggest inter-organ collaboration in facultative fetal growth. *Am J Hum Biol* 2005; 17(2): 178-94.
- [15] Jaimes EA, Tian RX, Joshi MS, Raij L. Nicotine augments glomerular injury in a rat model of acute nephritis. *Am J Nephrol* 2009; 29(4): 319-26.
- [16] Jalali M, Nikravesh MR, Karimfar MH, Saidinejat S, Mohammadi S, Rafighdoost H. Inductive role of collagen type IV during nephrogenesis in mice. *Urol J* 2009; 6(4): 289-94.
- [17] Suzuki N, Yokoyama F, Nomizu M. Functional sites in the laminin alpha chains. *Connect Tissue Res* 2005; 46(3): 142-52.
- [18] Gullberg D, Ekblom P. Extracellular matrix and its receptors during development. *Int J Dev Biol* 1995; 39(5): 845-54.
- [19] Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(17): 2879-95.
- [20] Aumailley M, Smyth N. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat* 1998; 193 (Pt 1): 1-21.
- [21] Bolcato-Bellemin AL, Lefebvre O, Arnold C, Sorokin L, Miner JH, Kedinger M, et al. Laminin alpha5 chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev Biol* 2003; 260(2): 376-90.
- [22] Nguyen NM, Miner JH, Pierce RA, Senior RM. Laminin alpha 5 is required for lobar septation and visceral pleural basement membrane formation in the

- developing mouse lung. *Dev Biol* 2002; 246(2): 231-44.
- [23] Nguyen NM, Kelley DG, Schlueter JA, Meyer MJ, Senior RM, Miner JH. Epithelial laminin alpha5 is necessary for distal epithelial cell maturation, VEGF production, and alveolization in the developing murine lung. *Dev Biol* 2005; 282(1): 111-25.
- [24] Vainionpaa N, Kikkawa Y, Lounatmaa K, Miner JH, Rousselle P, Virtanen I. Laminin-10 and Lutheran blood group glycoproteins in adhesion of human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(3): 764-75.
- [25] Fukumoto S, Miner JH, Ida H, Fukumoto E, Yuasa K, Miyazaki H. Laminin alpha5 is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape. *J Biol Chem* 2006; 281: 5008-16.
- [26] Miner JH, Cunningham J, Sanes, JR. Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *J Cell Biol* 1998; 143(6): 1713-23.
- [27] Lefebvre O, Sorokin L, Kedinger M, Simon-Assmann P. Developmental expression and cellular origin of the laminin alpha2, alpha4, and alpha5 chains in the intestine. *Dev Biol* 1999; 210(1): 135-50.
- [28] Mahdi Shariati K, Mohammad Reza N, Mehdi J, Alireza F, Mojtaba S, Bideskan AE. Effects of maternal nicotine exposure on expression of laminin alpha 5 in lung tissue of newborn. *Pak J Biol Sci* 2012; 15(24): 1168-75.
- [29] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): 45.
- [30] Liaquet H, Pichini S, Joya X, Papaseit E, Vall O, Klein J, et al. Biological matrices for the evaluation of exposure to environmental tobacco smoke during prenatal life and childhood. *Anal Bioanal Chem* 2010; 396(1): 379-99.
- [31] Akaike A, Takada-Takatori Y, Kume T, Izumi Y. Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of alpha4 and alpha7 receptors in neuroprotection. *J Mol Neurosci* 2010; 40(1-2): 211-6.
- [32] Maritz GS. Nicotine and lung development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008; 84(1): 45-53.
- [33] Sekhon HS, Proskocil BJ, Clark JA, Spindel ER. Prenatal nicotine exposure increases connective tissue expression in foetal monkey pulmonary vessels. *Eur Respir J* 2004; 23(6): 906-15.
- [34] Maritz GS. Are nicotine replacement therapy, varenicline or bupropion options for pregnant mothers to quit smoking? Effects on the respiratory system of the offspring. *Ther Adv Respir Dis* 2009; 3(4): 193-210.
- [35] Yamashita M, Mori T, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T. Isoflurane modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in human

- embryonic kidney cells. *Anesthesiology* 2005; 102(1): 76-84.
- [36] Funabiki K, Makita Y, Yamamoto M, Shike T, Fukui M, Sumiyoshi Y, et al. Dissociated expression of collagen type IV subchains in diabetic kidneys of KKAY mice. *Nephron* 1998; 80(2): 208-13.
- [37] Gubler MC. Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4(1): 24-37.

Effects of Maternal Nicotine Exposure on Laminin Ipha 5 Expression Change of the Basal Membrane in the Distal Convoluted and Collecting Tubules in Mice

M.M. Taghavi¹, M. Shariati Kohbanani², A. Shabanizadeh³, Z. Taghipour³, H.R. Jafari Naveh⁴

Received: 11/06/2014 Sent for Revision: 05/07/2014 Received Revised Manuscript: 27/07/2014 Accepted: 02/08/2014

Background and Objective: It is obviously approved that Fibronectin and Laminin α -5 (LAMA5) expression will change, in some organs of fetuses that their mothers were smoking during pregnancy period. For example, the expression of mentioned proteins in newborns decreases in parenchyma of their lungs. In present study, we evaluated the effects of maternal nicotine exposure on LAMA5 expression change of the basal membrane in the distal convoluted and collecting tubules in Mice.

Materials and Methods: The present experimental study was performed on 28 pregnant mice which were randomly divided into four groups (n=7). Pregnant mice in experimental day 1 group received 2 mg/kg nicotine from gestation day 7 (GD7) to last day of pregnancy and experimental day 14 group received the same amount of nicotine from GD7 to post natal day 14(GD14). Control groups 3 and 4 were injected with the same volume of normal saline parallel to experimental groups (Con). After the last injection, all the newborns (average 50 newborns in each group), were anesthetized in order to remove their kidneys and become prepared for Immunohistochemical method and real-time polymerase chain reaction to detect the expression of Laminin. Data were analyzed using non-parametric Man-Whitney U test and t-test.

Results: Our results show that LAMA5 mRNA expression in the kidneys of newborns treated with nicotine, Exp D1 increased about 2-fold in comparison with Control day 1 group, but decreased in Exp D14 (0.62 ± 0.19) comparing to Control day 14 (0.95 ± 0.14) ($p=0.043$). Lama5 Immunoreactivity in collecting tubules respectively increased and decreased in the Exp day1 and day 14 groups in comparison with Control groups ($p=0.039$). In the distal convoluted tubules, only a significant difference was found between the experimental day 1 group and Control day 1 group ($p=0.041$).

Conclusion: Maternal nicotine exposure may induce abnormal Laminin expression as a main component of renal base membrane, which may cause defects in kidney function and structure during life time.

Key words: Nicotine, kidney, Laminin Alpha-5, Distal convoluted tubules, Collecting tubules

Funding: This research was funded by Rafsanjan University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Rafsanjan University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Taghavi MM, Shariati Kohbanani M, Shabanizadeh A, Taghipour Z, Jafari Naveh HR. Effects of Maternal Nicotine Exposure on Laminin Alpha 5 Expression Change of the Basal Membrane in the Distal Convoluted and Collecting Tubules in Rats Mice. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2014; 13(6): 509-22. [Farsi]

1- Associate Prof., Dept. of Anatomy, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

2 Assistant Prof., Dept. of Anatomy, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

(Corresponding Author): Tel: (034) 34264003, Fax:(034) 34280097, E-mail: shariatik@gmail.com

3 Assistant Prof., Dept. of Anatomy, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

4 Academic Member of Faculty., Dept. of Anatomy, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran