مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره دوازدهم، شماره تیر، ۱۳۹۲، ۲۷۰-۲۵۹

اثر نیکوتین در دوره بارداری بر بیان فیبرونکتین در پارانشیم ریه نوزادهای موش

مهدی شریعتی کوهبنانی[۱]، محمدرضا نیکروش[۲]، مهدی جلالی[۲]، مجتبی سنکیان[۳]، علیرضا فاضل[۲]، علیرضا ابراهیم‌زاده بیدسکان[۴]

دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۲۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۱/۲/۱۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۱/۴/۱۷ پذیرش مقاله: ۹۱/۵/۳

چکیده

زمینه و هدف: نیکوتین به آسانی از سد جفتی گذشته، در جنین و نوزاد مادرانی که در طی بارداری و شیردهی در معرض آن می باشند ، رشد کرده و تکامل ریه را تحت تأثیر قرار می دهد. در این مطالعه اثر نیکوتین در دوره بارداری و شیردهی بر بیان فیبرونکتین ریه نوزادهای موش مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی موش های باردار Balb/C به طور تصادفی به دو گروه تجربی و دو گروه کنترل تقسیم شدند. گروه تجربی۱ از روز هفتم بارداری تا زمان تولد روزانه ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکوتین به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند گروه تجربی۲ همین میزان نیکوتین را از روز هفتم بارداری تا دو هفته بعد از زایمان دریافت نمودند. گروه‌های کنترل نیز حجم مشابهی از نرمال سالین در زمان‌های مشابه دریافت کردند(n= ۶). در پایان دوره وزن نوزادان و وزن ریه‌ها در روزهای مورد مطالعه اندازه‌گیری شد، سپس بافت ریه نوزادان، مورد مطالعه هیستولوژی و ایمونوهیستوشیمی قرار گرفته و سپس با استفاده از آزمون‌های تی مستقل و من‌ویتنی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که نسبت وزن ریه و وزن نوزادان تازه متولد شده در گروه‌هایی که در معرض نیکوتین قرار گرفته بودند در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود (p<۰/۰۵). مطالعه هیستولوژیک کاهش تمایزسلول های پنوموسیت نوع۱ و قطر آلوئولها را در گروه تجربی۱ نشان داد. شدت واکنش ایمنی (Immunoreactivity) فیبرونکتین در قسمتهای مختلف ریه شامل آلوئول‌ها، برونشیول‌ها و عروق ریه متفاوت بود. مطالعه ایمونوهیستوشیمی بافت ریه در گروه تجربی۲ افزایش بیان فیبرونکتین در ماتریکس خارج سلولی آلوئول‌ها را نشتن داد، اما برونشیول‌ها و عروق ریوی در هر دو گروه آزمایشی کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در معرض نیکوتین قرار گرفتن مادران باردار به سبب القاء بیان غیرطبیعی فیبرونکتین گردیده این موضوع احتمالاً عمل طبیعی ریه را در طول حیات بعد از جنینی می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد .

واژه های کلیدی: نیکوتین، فیبرونکتین، ریه، نوزاد موش

۱- استادیار گروه آموزشی علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
تلفن: ۰۳۹۱-۵۲۳۴۰۰۳، دورنگار: ۰۳۹۱-۵۲۲۵۲۰۹، پست الکترونیکی: shariatik@gmail.com
۲- استاد گروه آموزشی علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳- استادیار گروه آموزشی ایمونولوژی مرکز تحقیقات بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴- دانشیار گروه آموزشی علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

مقدمه

تقریباً ۴۰۰۰ نوع ماده شیمیایی مختلف در سیگار شناسایی شده است که بر اساس گزارش مرکز بین المللی تحقیق سرطان بیش از ۶۰ ماده از آن، سرطان زا تشخیص داده شده است [۱]. استعمال توتون، تنباکو و مشتقات حاصل از آن علت بیش از ۳۰٪ مرگ ناشی از سرطان گزارش شده است [۲]. نیکوتین مهم‌ترین ترکیب اعتیادآور سیگار می‌باشد که با عبور از جفت و انتقال به جنین، قادر است بر گیرنده‌های استیل کولین نیکوتین [Nicotine acetylcholine receptor (nAChR)] در سلول‌های در حال تکامل اثر بگذارد [۳]. علاوه بر این نیکوتین می‌تواند تکثیر سلولی و رگ زایی را در انواع سیستم‌ها افزایش دهد. این خاصیت نیکوتین رشد و متاستاز تومورها را تسهیل می‌کند [۵-۴].

شیوع استعمال دخانیات (سیگار) در بین خانم‌های باردار در کشورهای مختلف متفاوت می‌باشد، به طوری که در ژاپن ۹/۹٪ [۶]، استرالیا ۱۷٪ [۷]، اسپانیا ۳۰ تا ۳۵٪ [۸] و در هند ۱۷٪ [۹]، گزارش شده است. علاوه بر این، میلیون‌ها خانم باردار به ویژه در آفریقا، آسیا و حتی در اسکاندیناوی تنباکو را به روشی غیر از سوزاندن استفاده می‌کنند. اگرچه این خانم‌ها در معرض برخی ترکیبات مضر تنباکو مانند منوکسیدکربن یا سیانید نیستند، اما جنین آن‌ها در دوره بارداری در معرض سطح بالایی از نیکوتین قرار می‌گیرد [۱۰]. استعمال دخانیات در طول دوران حاملگی موجب کاهش حجم ریوی، ناتوانی در عملکرد ریه‌ها و افزایش بیماری‌های تنفسی در نوزادان می‌شود [۱۱]. علاوه بر این مصرف سیگار در طی بارداری می‌تواند موجب تولد زود هنگام، تأخیر در رشد داخل رحمی و علت ۵ تا ۱۰٪ مرگ تمام جنین‌ها باشد [۱۲].

تکامل ریه در پستانداران شامل مراحل مختلفی است که در دوره‌های رویانی، جنینی، تولد و حتی بعد از آن صورت می‌گیرد [۱۳]. ماتریکس خارج سلولی در بافت تنفسی از پروتئین‌های مختلفی از جمله الیاف کلاژن، الاستین، گلیکوپروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌ها تشکیل شده است [۱۴].

فیبرونکتین، نوعی خاص از گلیکوپروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی است که علاوه بر اینتگرین به اجزاء دیگر ماتریکس از قبیل کلاژن، فیبرین و پروتئوگلیکان هپاران سولفات نیز متصل می‌شود و در اتصالات سلولی، رشد، مهاجرت و تمایز سلول‌ها در طی تکامل جنینی نقش مهمی ایفا می‌کند [۱۵]. علاوه بر این مشخص شده است که فیبرونکتین در روند ترمیم زخم نیز شرکت می‌کند [۱۶] و فقدان یا تغییر بیان آن، زمینه بروز اختلالات تکاملی متفاوتی از قبیل ایجاد تومور، سنتز بافت فیبروز نابجا، نقایص مزودرمی و تکاملی عروق خونی را فراهم خواهد آورد [۱۸-۱۷]. دیگر مطالعات نشان داده است که نیکوتین بر روی کلاژن نوع ۴ که یکی از سه جزء اصلی ماتریکس خارج سلولی می‌باشد اثر گذاشته و روند آلوئول‌سازی و برونکوژنز را تحت تأثیر قرار داده است [۱۹]. لذا در این مطالعه با توجه به نقش مهم فیبرونکتین در روند تکامل و عبور نیکوتین از سد جفتی در دوره بارداری و تجمع آن در شیر مادر در هنگام شیردهی، اثر نیکوتین بر بیان این گلیکوپروتئین در دوره بارداری و شیردهی در ریه نوزادان موش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تجویز نیکوتین و تهیه بافت: در این مطالعه تجربی از ۲۴ سر موش ماده balb/c استفاده شد که پس از جفت‌گیری و تعیین روز صفر حاملگی به ۲ گروه آزمایشی و ۲ گروه کنترل تقسیم شدند. شرایط نگهداری حیوانات، دمای ۱±۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نور و تاریکی ۱۲ ساعت با آب و غذای کافی در نظر گرفته شد. گروه آزمایشی۱، از روز هفتم تا پایان دوره حاملگی روزانه ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکوتین محلول در نرمال سالین به صورت داخل صفاقی تزریق گردید [۱۹]. در گروه آزمایشی ۲، این عمل تا دو هفته پس از زایمان نیز ادامه یافت. گروه‌های کنترل نیز حجم مشابهی از نرمال سالین در زمان‌های مشابه دریافت کردند. در پایان دوره همه نوزادان متولد شده از گروه آزمایشی اول که یک روزه بودند، گروه آزمایشی دوم نوزادان چهارده روزه که تا دوهفته بعد از زایمان از شیر مادر تغذیه می‌نمودند و نوزادان گروه‌های کنترل ۱و ۲، پس از بیهوشی عمیق ابتدا با ترازوی دیجیتال وزن شده سپس ریه‌های آنان جدا و پس از وزن، به مدت ۲۴ ساعت در فرمالدئید ۱۰٪ ثابت و سپس به منظور مطالعات هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی مورد آماده‌سازی بافتی قرار گرفتند.

تکنیک ایمونوهیستوشیمی: روش به کار رفته در این مطالعه تکنیک آویدین بیوتین پراکسیداز بود. برش‌هایی که از ریه نوزادان به دست آمده بود به میزان دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در PBS (pH =۷/۴) شستشو داده شد. جهت بازیابی آنتی‌ژن از روش گرمایی و محلول Tris EDTA استفاده گردید. جهت بلوک کردن آنتی‌ژن‌های غیراختصاصی به مدت ۲ ساعت برش‌ها در مجاورت تریتون ۰/۳٪ X100 در PBS و goat serum قرار داده شدند. در ادامه نمونه‌ها با آنتی‌بادی اولیه فیبرونکتین (abcam .co) با رقت ۱ به ۱۵۰ به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس نمونه‌ها ۲ بار در محلول PBS حاوی تریتون ۰/۳٪ X100 و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. برای مهار فعالیت پراکسیداز، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در محلول ۳٪ آب اکسیژنه در متانول قرار گرفت. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه به رقت ۱ به ۸۰۰ انکوبه گردید. پس از این مرحله، برش‌ها برای مدت ۱۵ دقیقه در معرض دی‌آمینوبنزیدین حاوی ۰/۰۳٪ آب اکسیژنه قرار داده شد و در نهایت پس از شستشو برای ایجاد رنگ زمینه از هماتوکسیلین استفاده گردید. برش‌ها با چسب انتلان تثبیت شد و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. درجه رنگ‌پذیری بر اساس روش‌های رایج به عنوان معیار تراکم فیبرونکتین مد نظر قرار گرفت [۱۹]. در خاتمه، نتایج مبتنی بر مطالعات میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفته و با استفاده از میکروسکوپ دوربین‌دار OlympusB57 از مناطق مورد نظر اقدام به تهیه عکس گردید. ارزشیابی فیبرونکتین در نواحی مختلف ریه بر اساس شدت واکنش به صورت سه نفره و جدای از یکدیگر درجه بندی شد [۲۰].

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه۱۱ و آزمون تی مستقل برای مقایسه میانگین وزن و آزمون من-ویتنی برای مقایسه شدت واکنش بین گروه آزمایشی و کنترل در روز اول و چهاردهم به صورت مجزا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌دار در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج این تحقیق نشان داد میانگین وزن نوزادان در گروه‌های آزمایشی اول و دوم کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل خود داشت. مطالعه میانگین وزن ریه نوزادان در گروه آزمایشی اول کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد(p=۰/۰۳). این نتیجه نیز در گروه آزمایشی دوم که شامل نوزادان چهارده روزه که تغذیه آنان توسط شیر مادر صورت گرفته بود نیز مشاهده گردید (p=۰/۰۱). مقایسه شاخص نسبت وزن ریه به وزن بدن، در گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار وزن بدن، وزن ریه و نسبت وزن ریه به وزن بدن در نوزادان موش یک روزه و ۱۴ روزه گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل

گروه / متغیر	گروه کنترل ۱ (روز اول)	گروه آزمایشی ۱ (روز اول)	سطح معنی‌داری	گروه کنترل ۲ (روز چهاردهم)	گروه آزمایش ۲ (روز چهاردهم)	سطح معنی‌داری
وزن بدن (گرم)	۱/۵۵۲±۰/۰۵۲	*۱/۴۳۲±۰/۰۶۱	p=۰/۰۰۳	۵/۸۴۳±۰/۳۳۱	*۵/۲۸۱±۰/۳۹۳	p=۰/۰۲
وزن ریه (گرم)	۰/۰۲۹±۰/۰۰۱	*/۰۲۵±۰/۰۰۴	p=۰/۰۳	۰/۱۱±۰/۰۰۶	*۰/۰۹۸±۰/۰۰۷	p=۰/۰۱
نسبت وزن ریه به وزن بدن	۰/۰۱۸±۰/۰۰۱	۰/۰۱۷±۰/۰۰۲	p=۰/۱۲	۰/۰۱۸±۰/۰۰۱	۰/۰۱۸±۰/۰۰۲	p=۰/۸

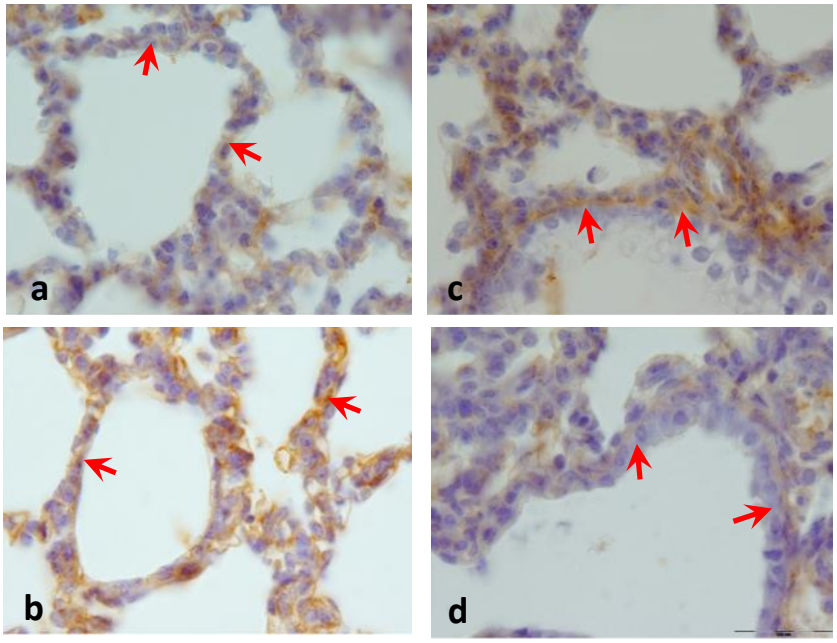
آزمون t *: .مقایسه بین گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل خود صورت گرفته است

ارزیابی بیان فیبرونکتین با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی در گروه‌های مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. با مطالعه این جدول می‌توان دریافت که واکنش این پروتئین در ماده خارج سلولی آلوئول‌های ریوی در گروه آزمایشی ۱، نوزادان یک روزه که مادران آن‌ها در طی بارداری نیکوتین دریافت نمودند، شدید (+++) بود که در مقایسه با گروه کنترل متوسط (++) افزایش معنی‌داری مشاهده گردید (p=۰/۰۰۱) (شکل ۱). مطالعه برونشیول‌ها و عروق خونی کوچک ریوی در این گروه نشان داد، شدت واکنش در گروه آزمایشی متوسط (++) بود که در مقایسه با گروه کنترل شدید (+++) کاهش معنی‌داری داشت (جدول۲). مطالعه شدت واکنش در گروه آزمایشی ۲، نوزادان چهارده روزه، نشان داد که بیان فیبرونکتین در ماتریکس خارج سلولی آلوئول‌ها اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نداشت، اما شدت واکنش در برونشیول‌ها و عروق خونی متوسط (++) ارزیابی شد که در مقایسه با گروه کنترل شدید (+++) کاهش معنی‌داری داشت (شکل ۲، جدول ۲). مطالعه کیفی هیستولوژیک ریه در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که قطر برخی از آلوئول‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش داشت همچنین تمایز سلول‌های آلوئولی نوع ۱ نسبت به گروه کنترل کاهش داشت.

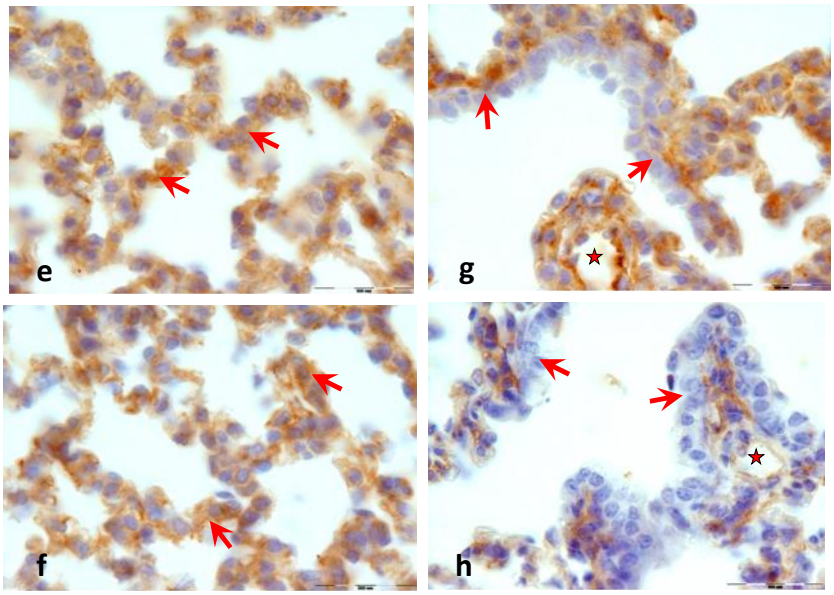
جدول۲- مقایسه اثر نیکوتین بر میانگین شدت بیان فیبرونکتین در بخش‌های مختلف ریه نوزادان یک روزه و چهارده روزه گروه آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل، با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی.

گروه / ساختمان	گروه کنترل ۱ (روز اول)	گروه آزمایشی ۱ (روز اول)	سطح معنی‌داری	گروه کنترل ۲ (روز چهاردهم)	گروه آزمایش ۲ (روز چهاردهم)	سطح معنی‌داری
آلوئول (شدت واکنش)	++	❋+++	p=۰/۰۰۱	+++	+++	p=۰/۱۲
برونشیول(شدت واکنش)	+++	❋++	p=۰/۰۰۲	+++	❋++	p=۰/۰۰۳
رگ (شدت واکنش)	+++	❋++	p=۰/۰۰۶	+++	❋ ++	p=۰/۰۰۴

آزمون آماری: من- ویتنی. ❋ مقایسه بین هر گروه آزمایشی با کنترل خود صورت گرفته است.
+++ : (شدید، قهوه ای) ، ++: (متوسط، قهوه‌ای)، +: (ضعیف، قهوه‌ای روشن)،
-: (بدون واکنش، بدون رنگ)



شکل۱- مقاطع مربوط به رنگ‌آمیزی اختصاصی برعلیه فیبرونکتین. واکنش به آنتی‌فیبرونکتین در اپیتلیوم برونشیول و آلوئول‌های ریوی نمونه‌های مختلف نوزادان یک روزه به رنگ قهوه‌ای نشان داده شده است. در این شکل به ترتیب در گروه کنترل ۱ (a) مقطع آلوئول ریوی، (c) مقطع یک برونشیول نشان داده شده است. برش‌های مشابه آن در گروه تجربی ۱ (b, c) افزایش و کاهش واکنش فیبرونکتین (پیکان‌ها)را به ترتیب در آلوئول‌ها و برونشیول‌ها نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی زمینه، هماتوکسیلین، (بزرگ‌نمایی= ۱۰۰۰×).



شکل۲- مقاطع مربوط به رنگ‌آمیزی اختصاصی برعلیه فیبرونکتین. واکنش به آنتی‌فیبرونکتین در اپیتلیوم برونشیول و آلوئول‌های ریوی نمونه‌های مختلف نوزادان ۱۴ روزه به رنگ قهوه‌ای نشان داده شده است. در این شکل به ترتیب در گروه کنترل ۲ (e) مقطع آلوئول ریوی، (g) مقطع یک برونشیول نشان داده شده است، برش‌های مشابه آن در گروه تجربی ۱ (h, f) واکنش فیبرونکتین (پیکان‌ها) در آلوئول‌ها بدون تغییر و در برونشیول و عروق (ستاره) در گروه آزمایشی کاهش را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی زمینه، هماتوکسیلین (بزرگ نمایی = ۱۰۰۰×)

بحث

مطالعه حاضر نشان می‌دهد تجویز نیکوتین در دوران بارداری و شیردهی موجب کاهش وزن بدن نوزاد و بافت ریه در زمان تولد و دو هفته پس از شیرخوارگی می‌گردد. نتایج پژوهش حاضر با نتیجه دیگر تحقیقات محققین هم خوانی دارد [۲۲- ۲۱]. اگرچه درمان جایگزین با نیکوتین می‌تواند به ترک سیگار کمک کند، اما اطلاعات کمی در رابطه با بی‌خطر بودن آن در دوران بارداری و شیردهی وجود دارد [۲۳]. Maritz و همکاران نشان دادند که نیکوتین در ریه تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را افزایش و به موازات آن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد، علاوه بر این مسیر گلیکولیز را مهار و غلظت cAMP را افزایش می‌دهد. این عوامل در نهایت می‌تواند موجب تغییرات رشد در ساختمان ریه شود [۲۴]. کاهش وزن مشاهده شده در این مطالعه ممکن استً به دلیل این تغییرات درون سلولی در طی دوران جنینی و شیر خوارگی باشد.

فیبرونکتین یکی از گلیکوپروتئین‌های مهم ماتریکس خارج سلولی است که ضمن پشتیبانی از سلول‌ها، نقش مهمی در تکامل بافت‌های جنینی، تکثیر، مهاجرت و تمایز دارد [۲۵]. در مطالعه قبلی با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی نشان داده شد تجویز نیکوتین در دوره بارداری و شیردهی موجب افزایش بیان کلاژن نوع ۴ و نقص در روند برونکوآلوئولزنز ریه نوزادان می‌گردد [۱۹]. مطالعه ما نشان داد نیکوتین بر بیان فیبرونکتین در طی مراحل بارداری و شیردهی اثر دارد. مطالعه بیان این پروتئین در ساختمان‌های مختلف بافت ریه توسط روش ایمونوهیستوشیمی نشان داد بیان فیبرونکتین در همه

قسمت‌ها یکسان نیست. به طوری که در نوزادان به دنیا آمده از مادرانی که در معرض نیکوتین بوده‌اند افزایش واکنش را در سپتوم آلوئولی و کاهش بیان را در برونشیول‌ها و عروق کوچک بافت ریه مشاهده کردیم.

فیبرونکتین در ریه می‌تواند توسط سلول‌های اندوتلیال، عضله صاف دیواره‌های عروق، کندروسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها [۲۶] و ماکروفاژهای آلوئولی بیان شود [۲۷]. با توجه به این که فیبرونکتین در تمایز و ریخت‌زائی در دوران تکاملی نقش مهم و مؤثری دارد، لذا کاهش بیان آن می‌تواند موجب بیماری و نقایص تکاملی شود و حذف آن می‌تواند منجر به مرگ در زمان جنینی گردد [۲۸]. کاهش بیان فیبرونکتین در تعدادی از بیماری‌ها مطالعه شده است، Kicic و همکاران در مطالعه خود نشان دادند فیبرونکتین که یک پروتئین ضروری برای ترمیم زخم می‌باشد بیان آن درسلول‌های اپیتلیال کودکان آسمی‌کاهش می‌یابد و این کاهش تولید فیبرونکتین یک عامل مهم در نقص ترمیم سلول‌های اپیتلیال راه‌های هوایی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد [۲۹]. Lieberman و همکاران در مطالعه خود نشان دادند بیان فیبرونکتین در کودکان دارای آسم کاهش می‌یابد و این کاهش می‌تواند یک ناهنجاری مادرزادی در سلول‌های اپیتلیال برانشیول باشد [۳۰]. علاوه بر این کاهش بیان فیبرونکتین در کودکان مبتلا به سیاه سرفه [۳۱]، سرطان‌های هپاتوسیت‌های کبد [۳۲]، در رده‌های سلولی توموری انسان و موش [۳۳] و در سرطان اندومتر رحم [۳۴] گزارش شده است. لذا کاهش بیان مشاهده شده در دوران جنینی می‌تواند احتمالاً زمینه‌ساز نقایص عملکردی در دوران کودکی و یا بلوغ به خصوص در بیماری آسم باشد.

Roman و همکاران در مطالعه خود اثر نیکوتین بر بیان فیبرونکتین در فیبروبلاست‌ها در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط *in vivo* (خوراکی به مدت ۹۰ روز) مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که نیکوتین موجب افزایش بیان فیبرونکتین توسط فیبروبلاست‌ها می‌شود [۱۸]. Wongtrakool و همکاران در مطالعه خود توزیع گیرنده نیکوتین α_7 nAChR را در مرحله شبه غددی از تکامل ریه جنین موش بررسی و نشان دادند که این گیرنده‌ها در روزهای ۱۳ تا ۱۵ جنینی افزایش و در روز ۱۷ جنینی کاهش می‌یابند و نیکوتین از طریق این گیرنده، موجب تحریک بیان فیبرونکتین در مرحله شبه غددی از تکامل ریه در مدل‌های رشد یافته در محیط کشت و جنین‌های به دست آمده از مادرانی که در معرض نیکوتین بوده‌اند، می‌شوند [۳۵]. در این تحقیق تغییر بیان فیبرونکتین در بخش‌های مختلف ریه در طی دور تحقیق متفاوت مشاهده گردید که نشان‌دهنده تغییر روند تکاملی گیرنده‌های اختصاصی نیکوتین در بافت‌های مختلف در طی تکامل ریه می‌باشد. اگرچه عوامل دیگری از قبیل نوع نیکوتین استفاده شده، مقدار مصرف، نوع حیوان و حتی دوره زمانی تحقیق (دوره بلوغ یا جنینی) می‌تواند پاسخ‌های متفاوتی را نسبت به نیکوتین از خود بروز داده و نتایج متفاوتی را موجب شود اما با توجه به مطالب ذکر شده نیکوتین باعث کاهش بیان و ساخت فیبرونکتین شده که نتیجه آن احتمالاً می‌تواند منجر به تغییرات عملی ریه در کودکی و نوجوانی شود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که نیکوتین بر تکامل ریه اثر داشته و درمان جایگزین با نیکوتین در

مادران سیگاری باید با احتیاط بیشتری صورت بگیرد تحقیقات بیشتری لازم است تا عوارض احتمالی آن آشکار شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مصوب دانشگاه علوم پزشکی مشهد می‌باشد که به عنوان پایان نامه PhD تصویب شده است، بدین وسیله از زحمات سرکار خانم متجدد کارشناس آزمایشگاه بافت شناسی و سرکار خانم مقدم کارشناس بخش ایمونوبیوشیمی پژوهشکده بوعلی تقدیر و تشکر می‌شود.

References

[1] International Agency for Research on Cancer, Tobacco smoking. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. *IARC* 2004; 83.

[2]WHO atlas maps global tobacco epidemic. *Public Health Rep* 2002; 117(5): 479.

[3]Rehan VK, Asotra K, Torday JS. The effects of smoking on the developing lung: insights from a biologic model for lung development, homeostasis, and repair. *Lung* 2009; 187(5): 281-9.

[4]Heeschen C, Chang E, Aicher A, Cooke JP. Endothelial progenitor cells participate in nicotine-mediated angiogenesis. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(12): 2553-60.

[5]Davis R, Rizwani W, Banerjee S, Kovacs M, Haura E, Coppola D, et al. Nicotine promotes tumor growth and metastasis in mouse models of lung cancer. *PLoS One* 2009; 4(10): e7524.

[6]Ng SP, Zelikoff JT. Smoking during pregnancy: subsequent effects on offspring immune competence and disease vulnerability in later life. *Reprod Toxicol* 2007; 23(3): 428-37.

[7]Mohsin M, Young L, Leraci S, Bauman AE. Socio-demographic factors associated with smoking and smoking cessation among 426, 344 pregnant women in New South Wales, Australia. *BMC Public Health* 2005; 5: 138.

[8]Jimenez Ruiz CA. Nicotine replacement therapy during pregnancy. *Arch Bronconeumol* 2006;42(8):404-9.

[9]Al-Sahab B, Saqib M, Hauser G, Tamim H. Prevalence of smoking during pregnancy and associated risk factors among Canadian women: a national survey. *BMC Pregnancy Childbirth* 2010; 10: 24.

[10] Gupta PC, Subramoney S. Smokeless tobacco use, birth weight, and gestational age: population based, prospective cohort study of 1217 women in Mumbai, India. *BMJ* 2004; 325(7455)1538.

[11] Proskocil BJ, Sekhon HS, Clark JA, Lupo SL, Jia Y, Hull WM, et al. Vitamin C prevents the effects of prenatal nicotine on pulmonary function in newborn monkeys. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(9): 1032-9.

[12] Salihu HM, Aliyu MH, Pierre-Louis BJ, Alexander GR. Levels of excess infant deaths attributable to maternal smoking during pregnancy in the United States. *Matern Child Health J* 2003; 7(4): 219-27.

[13] Mund SI, Stampanoni M, Schittny JC. Developmental alveolarization of the mouse lung. *Dev Dyn* 2008; 237(8): 2108-16.

[14] Hagedorn HG, Bachmeier BE, Nerlich AG. Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). *Int J Oncol* 2001; 18(4): 669-81.

[15] Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 20):3861-3.

[16] Williams CM, Engler AJ, Slone RD, Galante LL, Schwarzbauer JE. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Res* 2008; 68(9): 3185-92.

[17] Darribere T, Schwarzbauer JE. Fibronectin matrix composition and organization can regulate cell migration during amphibian development. *Mech Dev* 2000; 92(2): 239-50.

[18] Roman J, Ritzenthaler JD, Gil-Acosta A, Rivera HN, Roser-Page S. Nicotine and fibronectin expression in lung fibroblasts: implications for tobacco-related lung tissue remodeling. *FASEB J* 2004; 18(12): 1436-8.

[19] 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.

[20] Ebrahimzadeh AR, Hassanzadeh Taheri MM, M.R. N, Faze lAR. Lectin Histochemical Study of Vasculogenesis During Rat Pituitary

[27] Samuel JL, Farhadian F, Sabri A, Marotte F, Robert V, Rappaport L. Expression of fibronectin during rat fetal and postnatal development: an in situ hybridisation and immunohistochemical study. *Cardiovasc Res* 1994; 28(11): 1653-61.

[28] Astrof S, Crowley D, Hynes RO. Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Dev Biol* 2007; 311(1): 11-24.

[29] Kicic A, Hallstrand TS, Sutanto EN, Stevens PT, Kobor MS, Taplin C, et al. Decreased fibronectin production significantly contributes to dysregulated repair of asthmatic epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181(9): 889-98.

[30] Lieberman P. Pulmonary remodeling in asthma. *F1000 Med Rep* 2010; 2. doi: pii: 440

[31] Lee KS, Rho YJ, Jang SI, Suh MH, Song JY. Decreased expression of collagen and fibronectin genes in striae distensae tissue. *Clin Exp Dermatol* 1994; 19(4): 285-8.

[32] Sell S, Ruoslahti E. Expression of fibronectin and laminin in the rat liver after partial hepatectomy, during carcinogenesis, and in transplantable hepatocellular carcinomas. *J Natl Cancer Ins* 1982; 69(5): 1105-14.

[33] Taylor GA, Jeffers M, Webb CP, Koo HM, Anver M, Sekiguchi K, et al. Decreased fibronectin

Morphogenesis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2011; 14(1): 35-41.

[21] Ozokutan BH, Ozkan KU, Sari I, Inanc F, Guldur ME, Kilinc M. Effects of maternal nicotine exposure during lactation on breast-fed rat pups. *Biol Neonate* 2005; 88(2): 113-7.

[22] 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.

[23] Gaither KH, Brunner Huber LR, Thompson ME, Huet-Hudson YM. Does the use of nicotine replacement therapy during pregnancy affect pregnancy outcomes? *Matern Child Health J* 2009; 13(4): 497-504.

[24] 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.

[25] Barnes JL, Torres ES, Mitchell RJ, Peters JH. Expression of alternatively spliced fibronectin variants during remodeling in proliferative glomerulonephritis. *Am J Pathol* 1995; 147(5): 1361-71.

[26] Astrof S, Hynes RO. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 2009; 12(2): 165-75.

[35] Wongtrakool Ch SR-P, Hilda N. River and Jesse Roma. Nicotine alters lung branching morphogenesis through the α 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(3): 611-8.

expression in Met/HGF-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 1998; 17(9): 117.

[34] Futyma K, Kubiatowski T, Rozynska K, Zdunek M, Kotarski J, Rechberger T, et al. Decreased osteonectin and fibronectin gene expression in endometrial cancer cancer as a prognostic marker. *Ginekol Po* 2009; 80(12): 907-13.

The Effect of Maternal Nicotine Exposure on Fibronectin Expression in Lung Parenchyma of the Mice Newborns

M. Shariati Kohbanani[1], M.R. Nikravesh[2], M. Jalali[2], M. Sankian[3], A.R. Fazel[2], A.R. Ebrahimzadeh[4]

Received: 11/01/2012 Sent for Revision: 06/05/2012 Received Revised Manuscript: 07/07/2012 Accepted: 24/07/2012

Background and Objectives: Nicotine is one of the chemical substances with high level of toxicity. It crosses the placenta and accumulates in the developing organs of fetus. In this study, the effects of maternal nicotine exposure on fibronectin expression in the lungs of newborn mice were evaluated.

Materials and Methods: Pregnant Balb/C mice were divided into 2 experimental and 2 control groups. The experimental group1, received 3 mg/kg intra peritoneal nicotine from day 7 of gestation to the last day of pregnancy. The experimental group 2 received the same amount of nicotine during the same gestational days as well as 2 first weeks after birth (lactation). The control groups received the same volume of normal saline during the same periods(n=6). At the end of exposure times, all of newborns were anesthetized and their lungs removed for histochemical and Immunohistochemical methods. Data were analyzed by student t-test and Mann-Whitney test.

Results: Our results indicated that ratios of lung weight and body weight in the offsprings born to the mothers with nicotine exposure compared to that of the control groups were significant. Histochemical study showed that pneumocytes type 1 differentiation and alveoli diameter were decreased in the experimental groups. Fibronectin immunoreactivity intensity was not similar in the different parts of the lungs including alveoli, bronchiole and small vessels. A significant increase in immunoreactivity showed that in alveoli experimental group 2, but in bronchioles and vessels of the experimental groups were decreased in contrast to the control groups ($p<0.05$).

Conclusion: These data also indicated that maternal nicotine exposure may induce abnormal fibronectin expression which might cause defects in lung function during life time..

Key words: Nicotine, Fibronectin, Lungs, Offspring mouse

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

Conflict of interest: None declared.

Ethical Approval: The Ethics Committee of Mashhad University of Medical Scinces approved the study.

How to cite this article: M. Shariati Kohbanani, M.R. Nikravesh, M. Jalali, M. Sankian, A.R Fazel, A.R. Ebrahimzadeh. The effect of maternal nicotine exposure on fibronectin expression in lung parenchyma of the mouse newborns. *J Rafsanjan Univ Med Scie* 2013; 12(4): 259-70. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Anatomy, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran (Corresponding Author) (0391) 5234003, Fax:(0391) 5225209, E-mail: shariatik@gmail.com

2- Prof., Dept. of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3- Assistant Prof., Bu-ali Research Institute, Immunology Research Center, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4- Associated Prof., Dept. of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran