

اثر نیکوتین بر سیستم خونساز انسان

لعیا تکبیری اسگویی^۱، کاظم پریور^۱، اسماعیل مرتاض^۲ و^۳، مرضیه ابراهیمی^۴

- (۱) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران
 (۲) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 (۳) مرکز تحقیقات سل بالینی و اپیدمیولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان مسیح دانشوری، تهران، ایران
 (۴) پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌پزشکی ترمیمی، تهران، ایران

چکیده:

یکی از شاخص‌های خونی در افراد سیگاری بالا بودن نرخ تولید گلبول‌های سفید (WBC) و قرمز (RBC) می‌باشد. از طرفی نیکوتین به عنوان اصلی‌ترین ماده موجود در دود سیگار باعث افزایش تکثیر رده‌های مختلف سلولی می‌گردد. از این رو ممکن است نیکوتین در تحریک خونسازی در افراد سیگاری نقش داشته باشد. در این پژوهش پس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف، این سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با سه دوز ۱۰ نانومول، ۱ میکرومول و ۱۰۰ میکرومول نیکوتین تیمار شدند. سپس سلول‌های مورد نظر به مدت ۱۴ روز در محیط کشت متیل سلولز واجد انواع فاکتورهای رشد کشت داده شدند. پس از اتمام انکوباسیون، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خونساز موجود در نمونه بواسطه شمارش تعداد کلنی‌های رشد نموده و مورفولوژی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نیکوتین در دوزهای ۱ میکرومول و ۱۰۰ میکرومول باعث افزایش تکثیر سلولی و تولید کلنی‌های اریتریویدی و میلویدی شد. دوز ۱۰ نانومول نیکوتین چنین اثری نشان نداد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در محیط برون‌تنی (in vitro) نیکوتین باعث تحریک خونسازی و افزایش تولید گلبول‌های سفید و قرمز می‌گردد.

واژگان کلیدی: نیکوتین، سلول‌های بنیادی خونساز، گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید

* نویسنده مسئول:

دکتر اسماعیل مرتاض، مرکز تحقیقات سل بالینی و اپیدمیولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دارآباد، نیاوران، تهران، ایران، کد پستی: ۱۹۵۶۹-۴۴۴۱۳، پست الکترونیک: e.mortaz@uu.nl

مقدمه:

مطالعات متعددی نشان داده‌اند استعمال سیگار منجر به افزایش تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و قرمز (RBC) در خون می‌گردد [۱-۳]. لکوسیتوز ایجاد شده باعث افزایش ترافیک سلولی در بافت‌های مختلف می‌شود که زمینه ساز التهاب بافتی و عوارضی همانند بیماری‌های ریوی [۴]، بیماری‌های قلبی-عروقی [۵-۷]، سندرم متابولیک [۸] و انواع مختلف سرطان [۹] می‌گردد.

از آنجایی که دود سیگار دربرگیرنده بیش از ۵۰۰۰ ماده شیمیایی است، بنابراین اثرات ایجاد شده متعاقب مصرف سیگار بر آیند اثر مواد مختلف می‌باشد [۱۰].

نیکوتین یکی از اصلی‌ترین مواد موجود در دود سیگار است [۱۰]. گزارشات متعددی مبنی بر این که نیکوتین بر روی تکثیر سلولی اثر تحریک کننده دارد، موجود می‌باشد [۱۱-۱۳]. اثری که بواسطه گیرنده‌های نیکوتینیک استیل کولین^۲ [۱۳] اعمال می‌گردد و با نقش نیکوتین بعنوان یک عامل پیش‌برنده سرطان (tumor promoter) در ارتباط مستقیم می‌باشد [۱۴-۱۶]. علی‌رغم اهمیت موضوع، اطلاعات زیادی در مورد نقش نیکوتین در لکوسیتوز و اریتروپوئز ناشی از مصرف سیگار در دسترس نیست. مطالعه حاضر اولین قدم در جهت پر کردن خلا مورد نظر بوده و برای روشن‌گری بیشتر، اثر دوزهای مختلف نیکوتین را بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی (CD34+ cells) موجود در نمونه خون بند ناف انسان (HUCB)^۳ مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها:**مواد:**

جهت انجام این پژوهش، نیکوتین از کمپانی سیگماآلدریج^۴ با کد N3876^۵ و نیز محیط‌های کشت RPMI^۶، IMDM^۷ و متیل سلولز^۸ از کمپانی Stemcells technologies^۹ تهیه شدند.

جمع‌آوری نمونه و جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای نمونه خون بند ناف (HUCB-MNC):^{۱۰}

در یک محدوده زمانی ۳ ماهه، ۳ نمونه خون بند ناف استریل از ۳ مادر بستری در بیمارستان‌های طرف قرارداد با پژوهشکده رویان تهیه گردید. قبل از نمونه‌گیری از مادران شرکت کننده در پژوهش رضایت‌نامه کتبی گرفته شد. نمونه‌ها در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل گردیده و سلول‌های تک هسته‌ای موجود در نمونه به روش ذیل جداسازی گردید. در مرحله اول نمونه خون به لوله‌های فالکون^{۱۱} ۱۵ میلی لیتری منتقل شد و جهت سهولت در جدا سازی به نسبت ۱ به ۵ به آن هیدروکسی اتیل نشاسته (HEAS)^{۱۲} اضافه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه^{۱۳} شدند. طی این مدت گلبول‌های قرمز در ته لوله رسوب نمودند. طی مرحله دوم مایع رویی^{۱۴} که حاوی سلول‌های تک هسته‌ای بود به لوله دیگری منتقل شده و در ۱۵۳۰۰g^{۱۵} مورد سانتریفوژ قرار گرفت. در مرحله سوم پس از افزودن ۵ میلی لیتر بافر PBS^{۱۶} به هر لوله رسوب سلولی دوباره به حالت معلق درآمده و نمونه مورد نظر با دقت تمام به لوله‌های حاوی ۲/۵ میلی لیتر فایکول^{۱۷} منتقل شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰۰ g^{۱۸} سانتریفوژ قرار گرفت. در این مرحله سه لایه در لوله ایجاد گردید و لایه وسط (بافی کوت^{۱۸}) که حاوی سلول‌های تک هسته‌ای خون بود به لوله دیگری منتقل شده و جهت اطمینان از خارج شدن کامل فایکول از محیط ۲ نوبت دیگر سلول‌ها با استفاده از بافر PBS^{۱۹} مورد شستشو قرار گرفتند (سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰g^{۱۹}). سرانجام در مرحله نهایی پس از رنگ آمیزی سلول‌ها با تریپان بلو^{۱۹} و اطمینان از زنده بودن بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها با استفاده از محیط کشت RPMI

⁸ MethoCult⁹ Stem cells technologies company¹⁰ Human umbilical cord blood-Mononuclear cells¹¹ Falcon¹² Hydroxyethyl starch¹³ Incubation¹⁴ Supernatant¹⁵ G or relative centrifugal force¹⁶ Phosphate-buffered saline¹⁷ Ficoll-Paque¹⁸ Buffy coat¹⁹ Trypan blue¹ Metabolic Syndrome² Nicotinic acetylcholine receptor³ Human umbilical cord blood⁴ Sigma Aldrich company⁵ SKU-Pack Size⁶ Roswell Park Memorial Institute Medium⁷ Iscove's Modified Dulbecco's Medium

مورد نظر علاوه بر $1\mu\text{M}$ یک دوز پایین و یک دوز حداکثری برای ادامه کار انتخاب شد.

آنالیز آماری:

داده‌های بدست آمده با استفاده از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA یک طرفه و مقایسه میانگین دانکن^۸ مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج:

تعداد کل کلنی‌های خونساز تولید شده در تست CFU-Assay^۹:

پس از ۱۴ روز انکوباسیون میانگین تعداد کلنی‌های رشد نموده در پلیت‌های واجد ۱ میکرومول نیکوتین با $P \leq 0.05$ و پلیت‌های واجد ۱۰۰ میکرومول نیکوتین با $P \leq 0.05$ نسبت به نمونه کنترل افزایش نشان داد (نمودار ۱).

شمارش افتراقی کلنی‌های تولید شده در تست CFU-Assay:

در تست CFU-Assay انجام گرفته ۳ نوع کلنی (تصاویر ۱ الی ۳) از نظر مورفولوژیک مورد بررسی قرار گرفت.

(الف) کلنی‌های گرانولوسیتی-ارترئوئیدی-مونوسیتی-مگاکاریوسیتی (CFU-GEMM)^{۱۰}:

منشا این کلنی‌ها از سلول‌های چند توان پیشساز میلوئیدی یا (CMP)^{۱۱} می‌باشد (تصویر ۱). نتایج نشان داد تعداد کلنی‌های CFU-GEMM رشد نموده در غلظت ۱۰۰ میکرومول نیکوتین نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) می‌باشد (نمودار ۲).

(ب) کلنی‌های گرانولوسیتی-ماکروفاژی (CFU-GM)^{۱۲}: نتایج بدست آمده نشان دهنده افزایش معنی‌داری در تعداد کلنی‌های گرانولوسیتی-ماکروفاژی در دوز ۱ میکرومول ($P \leq 0.05$) و ۱۰۰ میکرومول ($P \leq 0.01$) نیکوتین بود (نمودار ۳).

واجد ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنیسیلین^۱ و استرپتومایسین^۲) سوسپانسیونی با غلظت 1×10^6 سلول در میلی لیتر تهیه گردید.

مجاورسازی^۳ با نیکوتین:

سلول‌های تک‌هسته‌ای جداسازی شده با ۳ غلظت ۱۰ نانومول، ۱ میکرومول و ۱۰۰ میکرومول از نیکوتین مجاور گشتند. جهت کنترل منفی از نمونه سلولی استفاده شد که با هیچ ماده‌ای مجاور نشده بود. پلیت^۴ موردنظر به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور^۵ 37°C انکوبه گردید.

تست تشکیل کلنی (Colony forming unit assay):

پس از اتمام انکوباسیون سلول‌های مورد آزمایش یک نوبت با استفاده از بافر PBS مورد شستشو قرار گرفتند. سپس با استفاده از محیط کشت IMDM حاوی ۲٪ FBS^۶ سوسپانسیونی با غلظت 1×10^5 سلول در میلی لیتر تهیه گردید. به هر لوله حاوی ۳ میلی لیتر محیط کشت متیل سلولز، ۰/۳ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی فوق اضافه گردید و سپس به هر حفره از پلیت کشت ۶ خانه‌ای ۱/۱ میلی لیتر از محیط کشت واجد سلول اضافه شد به طوری که تعداد سلول موجود در هر حفره بطور تقریبی 10^4 برآورد گردید. پلیت در انکوباتور 37°C حاوی CO_2 و رطوبت ۹۵٪ به مدت ۱۴-۱۶ روز انکوبه گردید. شرایط انکوباسیون هر روز کنترل شد. پس از اتمام انکوباسیون با استفاده از میکروسکوپ معکوس تعداد کلنی‌های رشد کرده در هر حفره مورد شمارش قرار گرفت و سپس تک تک کلنی‌ها از نظر مورفولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین دوز نیکوتین:

اگرچه در مطالعات برون تنی دوز نیکوتین استفاده شده محدوده بسیار گسترده‌ای را در بر می‌گیرد ولی $1\mu\text{M}$ بعنوان دوز ایده‌آل بیشترین کاربرد را داشته است. در این پژوهش پس از انجام تست با دوزهای مختلف و اطمینان از سمی بودن مقادیر بالاتر از $100\mu\text{M}$ برای سلول‌های

¹ Penicillin

² Streptomycin

³ Treatment

⁴ Plate

⁵ Incubator

⁶ Fetal bovine serum

⁷ Carbon dioxide

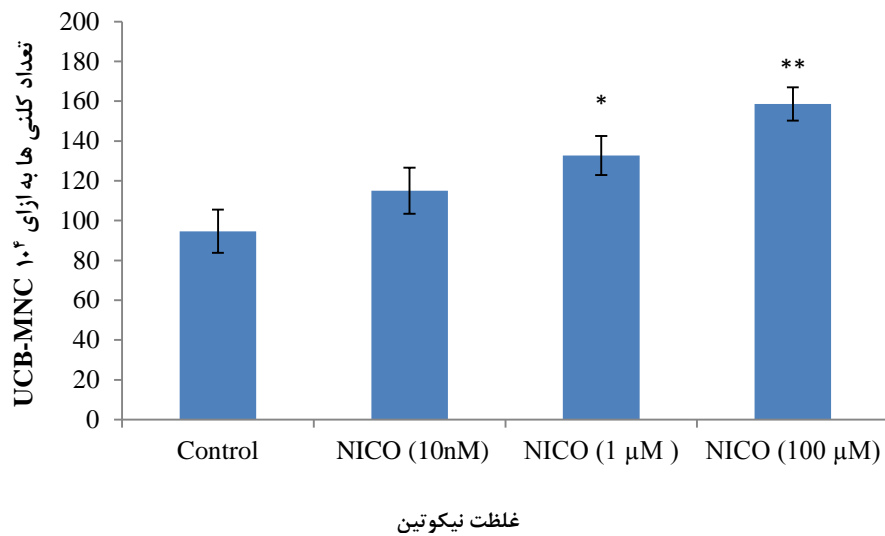
⁸ Duncn Test

⁹ Colony-forming unit (CFU) assay

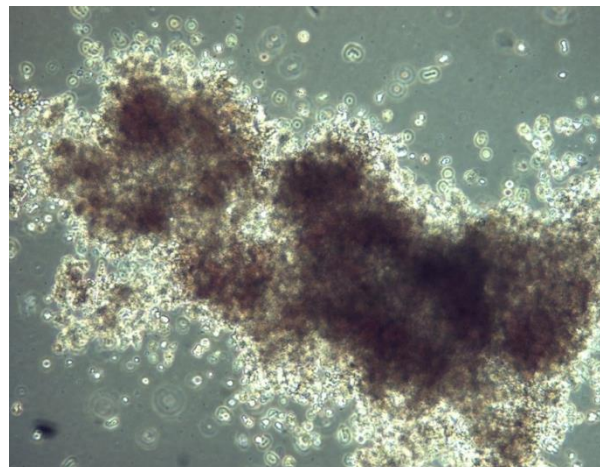
¹⁰ Colony-forming unit -granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte

¹¹ Common myeloid progenitor cells

¹² Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage



نمودار ۱- تعداد کلنی های مشاهده شده در تست CFU-assay پس از ۲۴ ساعت مجاور سازی با نیکوتین (Bar: Mean \pm SD) & (n=۳) (* $P \leq 0.05$ & ** $P \leq 0.01$)



تصویر ۱- کلنی گرانولوسیتی-اریتروئیدی-مونوسیتی-مگاکاریوسیتی (CFU-GEMM) با عدسی $20\times$

ج) کلنی های اریتروئیدی (BFU-E):^۱

تعداد کلنی های اریتروئیدی در دوز ۱ میکرومول و ۱۰۰ میکرومول نیکوتین افزایش معنی داری ($P \leq 0.05$) نسبت به نمونه کنترل نشان داد (نمودار ۴).

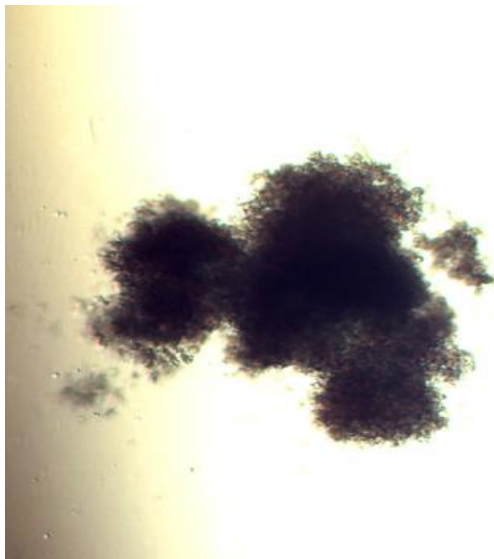
نقش نیکوتین در تمایز رده های گرانولوسیتی-ماکروفازی و اریتروئیدی

اگرچه در مقایسه مابین کلنی های گرانولوسیتی-ماکروفازی و اریتروئیدی ما با افزایش دوز نیکوتین شاهد سوق تمایز سلولی در جهت رده گرانولوسیتی-ماکروفازی بودیم ولی این اختلاف به حد معنی دار نرسید (نمودار ۵).

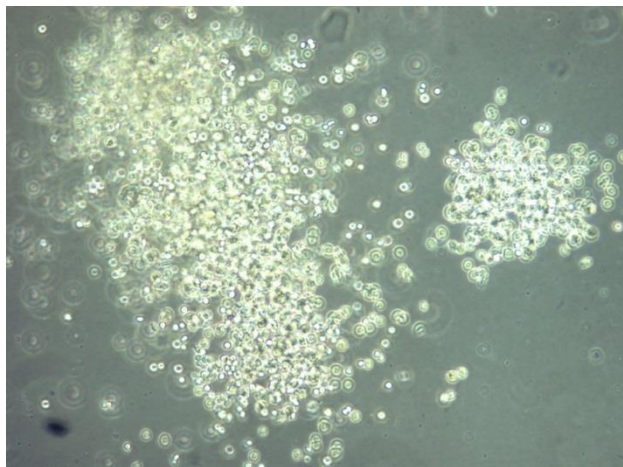
بحث:

در مطالعه حاضر نیکوتین در دوزهای ۱ μ M و ۱۰۰ μ M باعث افزایش معنی داری در تکثیر سلول های بنیادی-پیش ساز خونی گشت. در حالی که در دوز ۱۰ nM چنین اثری نشان نداد. اگر چه در مورد اثر نیکوتین روی سلول های بنیادی-پیش ساز خونی اطلاعات چندانی در دست نیست ولی بخش اعظم مطالعات انجام گرفته روی رده های سلولی سرطانی و غیر سرطانی سیستم تنفسی و همچنین رده های سلولی دیگر اثرات میتوزنیک نیکوتین را تایید نموده اند [۱۱-۱۳]. از مطالعات انجام شده می توان به پژوهش های زیر اشاره نمود. Dasgupta و

^۱ Erythroid burst-forming units



تصویر ۲- یک کلنی اریترووییدی (BFU-E) با عدسی ۲۰X



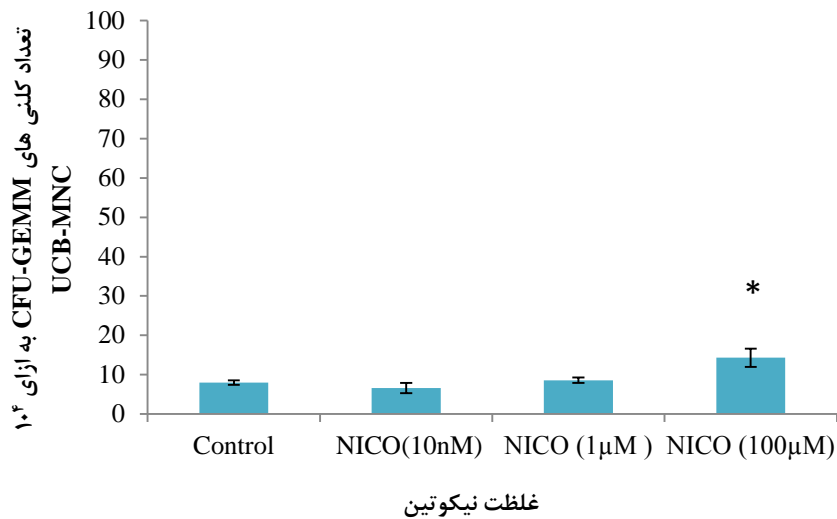
تصویر ۳- کلنی گرانولوسیتی- ماکروفاژی (CFU-GM) با عدسی ۲۰X

در تکثیر لنفوسیت‌های $TCD4^+$ بر نقش گیرنده $\alpha 4$ نیکوتینیک استیل کولین در این میان تاکید نموده‌اند [۱۳]. اما اخیراً Qinglan و همکاران در پژوهشی روی سلول‌های بنیادی جنینی موش نتایج کاملاً متفاوتی را گزارش نموده‌اند. در این مطالعه دوزهای 10 nM و 100 nM نیکوتین اثر القایی روی تکثیر سلولی داشت در حالی که در دوزهای $1\text{ }\mu\text{M}$ و $100\text{ }\mu\text{M}$ باعث مهار تکثیر سلولی گشت [۱۷].

مطالعه حاضر نیز همخوان با مطالعات Nordman و Hong, Dasgupta برای اولین بار نشان داد نیکوتین قادر است باعث افزایش تکثیر سلول‌های

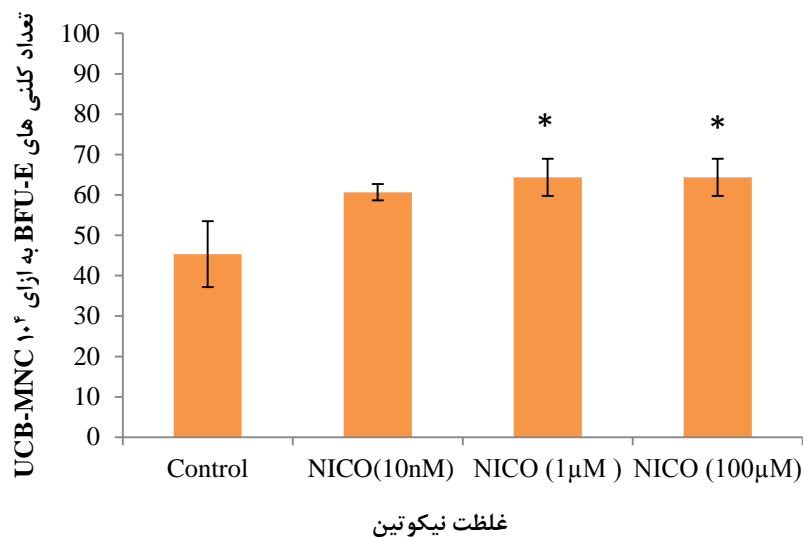
همکاران اثر نیکوتین را روی چهار رده سلولی سرطانی NCI-H226، NCI-H441، A549 و NCI-H23 و چهار رده سلولی غیرسرطانی HMEC-Ls، NHBEs، HAECs و SAECs مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد نیکوتین در دوز $1\text{ }\mu\text{M/L}$ باعث افزایش تکثیر سلول‌های هر هشت رده فوق می‌گردد [۱۱]. Honag و همکاران نیز گزارش دادند نیکوتین در دوز $10\text{ }\mu\text{M}$ - $1\text{ }\mu\text{M}$ باعث افزایش تکثیر سلول‌های عضلانی صاف برونشی (HBSMCs)^۱ می‌گردد [۱۲]. Nordman و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ در توجیه مکانیسم اثر القایی نیکوتین

^۱ Human Bronchial Smooth Muscle Cells



نمودار ۲- تعداد کلنی های گرانولوسیتی-اریتروئیدی-مونوسیتی - مگاکاریوسیتی پس از ۲۴ ساعت مجاور سازی با نیکوتین

(Bar: Mean ± SD) & (n=۳) (*P≤۰/۰۵)



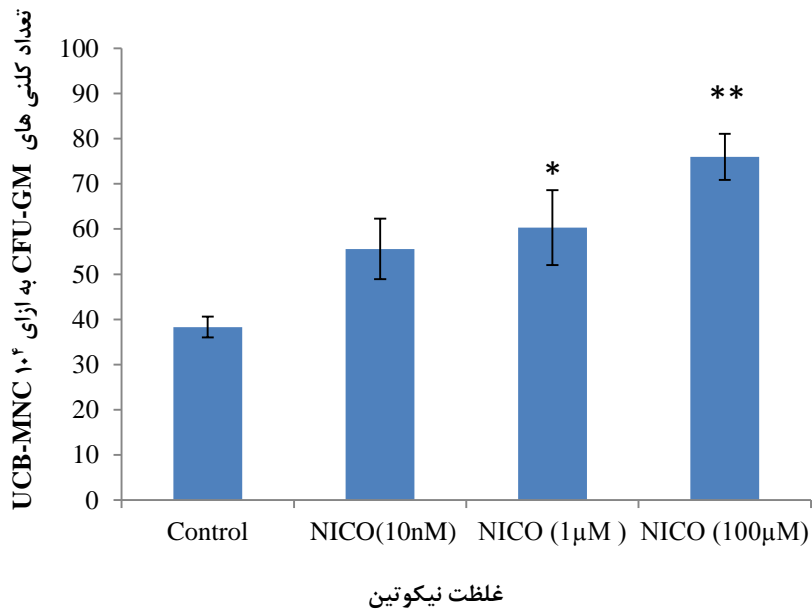
نمودار ۳- تعداد کلنی های اریتروئیدی پس از ۲۴ ساعت مجاور سازی با نیکوتین

(Bar: Mean ± SD) & (n=۳) (*P≤۰/۰۵)

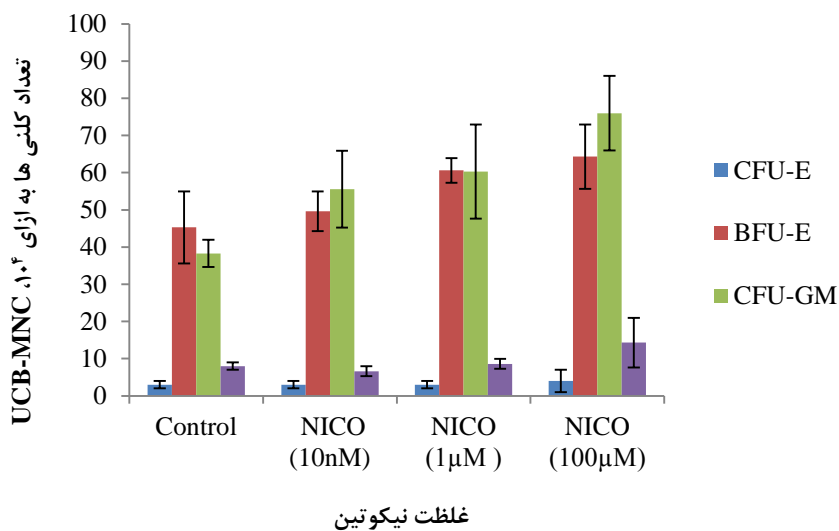
گیرنده دخیل در شناسایی نیکوتین باشد. سلول های بنیادی جنینی تمایز نیافته و پرتوان می باشند، در حالی که سلول های بنیادی-پیش ساز خونی یک مرحله تمایزی را پشت سر گذاشته و چندتوان محسوب می گردند. از طرف دیگر طیف وسیعی از گیرنده های کلاسیک نیکوتینیک استیل کولین و همچنین گیرنده های غیر کلاسیک قادر به شناسایی نیکوتین و ایجاد پاسخ می باشند و هرکدام از این گیرنده ها می توانند مسیرهای پیام رسانی

بنیادی-پیش ساز خونی گردد. ولی نکته قابل ذکر این است که این اثر در دوزی بالاتر از دوز فیزیولوژیک مشاهده گردید.

از طرف دیگر نتایج مطالعه ما کاملا مغایر نتایج Qinglan می باشد که بسته به دوز نیکوتین استفاده شده نتایج متفاوتی را گزارش نموده اند. دلایل احتمالی برای اثر متفاوت نیکوتین در دو پژوهش مورد نظر ممکن است مربوط به نوع سلول، مرحله تمایزی آن و همچنین



نمودار ۴- تعداد کلنی های گرانولوسیتی - ماکروفاژی پس از ۲۴ ساعت مجاورسازی با نیکوتین
(Bar: Mean ± SD) & (n=۳) (*P≤۰/۰۵ & **P≤۰/۰۱)



نمودار ۵- مورفولوژی کلنی های شمارش شده در تست CFU-assay

مورد سؤال برانگیز دیگر این است که آیا در شرایط درون تنی نیز می توان برای نیکوتین نقش میتوژنیک قائل شد. مطالعات درون تنی که روی مدل موشی انجام گرفته اند نه تنها این موضوع را تأیید نموده اند بلکه نشان داده اند حضور نیکوتین در غلظتی نزدیک به غلظت اندازه گیری شده در خون افراد سیگاری، با گسترش سرطان در حیوان در ارتباط مستقیم می باشد. بعنوان نمونه Davis و همکاران نشان دادند که تجویز نیکوتین

متفاوتی را فعال نمایند. جالب توجه اینکه در مطالعه Qinglan مسیر پیام رسانی دخیل Wnt بوده است. مسیر پیام رسانی ای که عمدتاً در مرحله جنینی فعال می باشد [۱۷].

در حالی که گیرنده های نیکوتینیک استیل کولین در افراد بالغ برای پیام رسانی، مسیرهای دیگری همانند PI3-kinase و NF-KB را مورد استفاده قرار می دهند [۱۸].

مابین نیکوتین و تغییر روند تمایزی سلول‌های بنیادی خونساز مطرح نماید.

در مطالعه حاضر از سه دوز پایین (۱۰nM)، متوسط (۱μM) و بالای نیکوتین (۱۰۰μM) استفاده شد. با توجه به اینکه میزان نیکوتین در خون افراد سیگاری ۲۵-۴۴۴ nM می‌باشد [۲۵]، بنابراین اگرچه ما در مطالعه خویش مقادیر پایین‌تر و بالاتر از سطح خونی نیکوتین را مورد بررسی قرار دادیم ولی هیچکدام از دوزهای مورد آزمایش در محدوده فیزیولوژیک نبودند.

نتیجه‌گیری:

مطالعه حاضر نشان داد نیکوتین می‌تواند در محیط بیرون‌تنی باعث افزایش تولید کلنی‌های خونساز -CFU GM و BFU-E از سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی گردد. هر چند در مورد چنین نقشی در دوزهای مربوط به خون افراد سیگاری تردیدهایی وجود دارد. در صورت تأیید چنین اثری در شرایط درون‌تنی این احتمال وجود دارد که یکی از علل افزایش گلبول‌های سفید و قرمز در افراد سیگاری نیکوتین موجود در دود سیگار باشد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله نویسندگان مقاله از پژوهشگاه رویان تهران (گروه سلول‌های بنیادی و زیست پزشکی ترمیمی) که علاوه بر کمک‌های آموزشی کل هزینه پژوهش حاضر را تأمین نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی بعمل می‌آورند.

منابع:

- 1) Terashima T, Klut ME, English D, Hards J, Hogg JC, van Eeden SF. Cigarette smoking causes sequestration of polymorphonuclear leukocytes released from the bone marrow in lung microvessels. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1999; 20(1):171-177.
- 2) Van Eeden SF, Hogg JC. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *European Respiratory Journal*. 2000; 15(5):915-921.
- 3) Shipa SA, Rana M, Miah F, Alam J, Rob Mahmud MG. Effect of intensity of cigarette smoking on leukocytes among adult men and women smokers in bangladesh. *Asia Pacific Journal of Medical Toxicology*. 2017; 6(1):12-17.
- 4) Koo HK, Kang HK, Song, Park HK, Lee SS, Jung H. Systemic white blood cell count as a biomarker associated with severity of chronic

با دوز ۱ mg/ml به موش‌های سرطانی باعث گسترش تومور و متاستاز می‌گردد [۱۸]. در مطالعه‌ای مشابه Heeschen و همکاران نیز متعاقب تزریق نیکوتین به موش‌های مبتلا به سرطان ریه گسترش تومور و افزایش رگ‌سازی را در حیوان گزارش نموده‌اند [۱۹]. متاسفانه به نظر می‌رسد در حال حاضر در مورد اثر نیکوتین بر عملکرد سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی در شرایط درون‌تنی گزارشی وجود ندارد.

محور دوم پژوهش حاضر اثر نیکوتین روی تمایز سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی می‌باشد. همان طور که در مقدمه ذکر شد گزارشات متعددی مصرف سیگار را با افزایش تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در ارتباط دانسته‌اند [۱-۳، ۲۰]. اگرچه بیشترین افزایش در این میان مربوط به نوتروفیل‌ها می‌باشد ولی افزایش دیگر سلول‌های سفید همانند منوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها نیز گزارش گردیده است. نوتروفیل‌های تولید شده عمدتاً نابالغ بوده و مورفولوژی نوتروفیل باند را دارا می‌باشند که نشان دهنده تسریع آزادسازی سلول‌ها از مغز استخوان می‌باشد [۲]. از آنجایی که نوتروفیل‌های فوق درحد بالایی مولکول چسبان ال-سلکتین را بیان می‌کنند به راحتی در مویرگ‌های ریوی تجمع یافته و باعث تخریب سلول‌های آندوتلیوم دیواره عروق می‌گردند [۱]. استعمال سیگار همچنین منجر به افزایش تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و پارامترهای مربوطه همانند هموگلوبین و هماتوکریت می‌گردد [۲۱-۲۲]. اگرچه محققین افزایش گلبول‌های سفید و قرمز را به ترتیب به واکنش التهابی ایجاد شده و هیپوکسی ناشی از مصرف سیگار ارتباط داده‌اند [۲۳-۲۴] ولی این امکان نیز وجود دارد که خود مواد شیمیایی موجود در دود سیگار در این میان بی‌تأثیر نباشند. مطالعه ما نشان داد نیکوتین قادر است در دوزهای ۱ و ۱۰۰ میکرومول باعث افزایش معنی‌داری در تولید کلنی‌های CFU-GM و BFU-E گردد که به ترتیب تولید کننده سلول‌های گرانولوسیت-منوسیت و گلبول‌های قرمز می‌باشند. ما همچنین شاهد سوق نسبی تمایز سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی در جهت رده گرانولوسیتی-ماکروفازی بودیم، ولی از آنجایی که این اختلاف معنی‌دار نبود این مطالعه نمی‌تواند ارتباطی را

- of human cancer cell lines. *International Journal of Cancer*. 2009;124(1):36–45.
- 17) Qu Q, Zhang F, Zhang X, Yin W. Bidirectional regulation of mouse embryonic stem cell proliferation by nicotine is mediated through Wnt signaling pathway. *Dose-Response*. 2017;53(2):1-8
 - 18) Davis R, Rizwani W, Banerjee S, et al. Nicotine promotes tumor growth and metastasis in mouse models of lung cancer. *PLOS One*. 2009; 4(10):e7524.
 - 19) Heeschen C, Jang J, Weis M, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nature Medicine*. 2001;7(7):833-839.
 - 20) Higuchi T, Omata F, Tsuchihashi K, Higashioka K, Koyamada R, Okada S. Current cigarette smoking is a reversible cause of elevated white blood cell count: Cross-sectional and longitudinal studies. *Preventive Medicine Reports*. 2016;9(4):417–422.
 - 21) Asif M, Sajjad K, Umar Z, et al. Effect of cigarette smoking based on hematological parameters: comparison between male smokers and nonsmokers. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2013;38(1):75–80.
 - 22) Malenica M, Prnjavorac B, Bego T, et al. Effect of cigarette smoking on hematological parameters in healthy population. *Medical Archives*. 2017;71(2):132–136.
 - 23) Lee YJ, Lee JW, Kim JK, et al. Elevated white blood cell count is associated with arterial stiffness. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2009;19(1):3-7.
 - 24) Yanbaeva DG1, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest*. 2007; 131(5):1557–1566.
 - 25) Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *British Medical Journal*. 1980; 280(62):972-976.
 - obstructive lung disease.tuberculosis and respiratory diseases. 2017;80(3):304-310.
 - 5) Madjid M, Awan I, Willerson JT, Casscells SW. Leukocyte count and coronary heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(10):1945–1956.
 - 6) Hoffman M, Blum A, Baruch R, Kaplan E, Benjamin M. Leukocytes and coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2004;172(1):1–6.
 - 7) Tamakoshi K, Toyoshima H, Yatsuya H, et al. White blood cell count and risk of all-cause and cardiovascular mortality in nationwide sample of Japanese. *Circulation Journal*. 2007;71(4):479-485.
 - 8) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda EI, et al. Relationship between smoking, white blood cell count and metabolic syndrome in Japanese women. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2007; 78(1):72–76.
 - 9) Jee SH, Park J, Y Kim HS, Lee TY, Samet MJ. White blood cell count and risk for all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in a cohort of koreans. *American Journal of Epidemiology*. 2005;162(11):1062–1069.
 - 10) Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous compounds in tobacco smoke. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2011;8(2):613-628.
 - 11) Dasgupta P, Rastogi S, Pillai S, et al. Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(8):2208-2217.
 - 12) Hong W, Peng G, Hao B, et al. Nicotine-Induced Airway smooth muscle cell proliferation involves TRPC6-dependent calcium influx via $\alpha 7$ nAChR. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;43(3):986-1002.
 - 13) Nordman JC, Muldoon P, Clark S, et al. The $\alpha 4$ nicotinic receptor promotes CD4+ t-cell proliferation and a helper t-cell immune response. *Molecular Pharmacology*. 2014; 85(1):50-61.
 - 14) Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P. Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008;29(3):151-158.
 - 15) Cardinale A, Nastrucci C, Cesario A, Russo P. Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. *Critical Reviews in Toxicology*. 2012;42(1):68–89.
 - 16) Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial mesenchymal transition in a variety

Effects of Nicotine on Human Hematopoietic System

Laya takbiri Osgoei¹, Kazem Parivar¹, Esmail Mortaz^{2,3*}, Marzieh Ebrahimi⁴

- 1) Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
- 2) Clinical Tuberculosis and Epidemiology Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 3) Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 4) Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

Abstract:

One of the blood indexes of cigarette smokers is high rate production of white and red blood cells. As the main gradient of cigarette smoke, nicotine can increase different blood cell lines. So, it is possible that nicotine induces hematopoiesis in smokers. In this research the isolated mononuclear cells of umbilical cord were cultured for 24 hours and treated with three doses of 10nM, 1 μ M and 100 μ M of nicotine. Then, cells were cultured in methyl cellulose medium containing various growth factors for 14 days. After incubation propagation and differentiation of hematopoietic stem cells were investigated via number and morphologic properties of colonies. Nicotine in 1 μ M and 100 μ M concentration increased erythroid and myeloid colonies. But 10 nM of nicotine did not show any effect. It can be concluded that under in vitro condition nicotine stimulates hematopoiesis and increases white and red blood cells differentiation.

Key words: Nicotine, Hematopoietic stem cells, Red blood cells, White blood cells

* Corresponding Author:

Esmail Mortaz, Clinical Tuberculosis and Epidemiology Research Center, Daar-Abad, Niavaran, Tehran, Iran. Email: e.mortaz@uu.nl