

Evaluation of Proliferative activity of adult mouse male germ cells following administration of different doses of nicotine

Khajeh Jahromi S., M.D. Student, Mohammadghasemi F., Ph.D.*, Hajizadeh Fallah H., M.D.

** P.O.Box: 3363, Cellular and Molecular Research Center, Medicine Faculty, Rasht, Iran*

Received: Jul 2011 Accepted: Oct 2011

Abstract

Purpose: Nicotine can induce sub fertility or infertility both in males and females. The aim of this study is to evaluate the proliferative activity of adult mouse male germ cells following treatment with different doses of nicotine.

Materials and Methods: Adult male NMRI mice were divided into four groups. The control group received normal saline and the other animals in groups of 2, 3 and 4 were treated with nicotine in doses of 0.1, 0.2 and 0.4 mg/Kg, respectively. Nicotine was administered intraperitoneally once a day for 14 days. All animals were dissected on 15th day, and evaluations were made by Ki67 immunohistochemistry staining and Johnson's scoring for assessment of proliferative activity of mitotic & meiotic spermatogenic cells and evaluation of quality of spermatogenesis respectively, and Elisa test for serum testosterone level. Statistical analyses were performed using ANOVA and Tukey tests.

Results: Nicotine in doses of 0.2 mg/Kg and 0.4 mg/Kg significantly reduced Johnson's score in comparison with that of control group ($p < 0.05$). Nicotine in dose of 0.2 and 0.4 mg/Kg significantly reduced ki67 index in meiotic leptotene and pachytene cells in comparison with that of control group. However it was not effective on spermatogonia cells. Serum levels of testosterone in groups of 3 and 4 were significantly reduced compared to that of control group ($p < 0.05$).

Conclusion: This study indicates that nicotine has adverse effects on spermatogenesis process and it acts in a dose dependent manner. However, in lower doses, proliferative activity is not altered; therefore, it seems that probability of the other mechanisms are involved in reducing of maturity and quality of spermatogenesis.

Key words: Nicotine, Proliferation, Testis, Spermatogenesis Quality

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

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

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

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

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

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

چکیده

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

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

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

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

کلیدواژه‌ها: نیکوتین، تکثیر، بیضه، کیفیت اسپرماتوژنز

مقدمه

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

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

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

E-mail: parsahistolab@gmail.com

نیکوتینی استیل کولینی (nAChRs) اعمال می کند [۱۰]. این رسپتورها علاوه بر این که به طور گسترده در سلول های عصبی و محل اتصالات عصبی - ماهیچه ای وجود دارد [۱۰ و ۱۱]، در تعداد زیادی از سلول های غیر عصبی مانند سلول های اپی تلیالی برونش، آستروسیت ها و دستگاه تولید مثل نیز یافت می شود [۱۲].

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

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

این که نیکوتین با چه مکانیسمی یا مکانیسم هایی باعث ایجاد اختلالات نامبرده در اسپرماتوژنز می شود دقیقاً معلوم نیست. شاید یکی از مکانیسم ها، تغییر در سیکل سلولی یا تغییر در میزان بروز مرگ و تکثیر سلولی توسط نیکوتین باشد. نیکوتین آثار سلولی خود را از طریق گیرنده های

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

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

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

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

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

مواد و روش‌ها

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

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

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

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

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

ارزیابی کمیت اسپرماتوژنز

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

ارزیابی سلول های در حال تکثیر

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

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

ارزیابی کیفیت اسپرماتوژنز با روش

جانسون

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

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

۱۰: اسپرماتوژنز کامل، تعداد زیادی سراسپرم که در حاشیه لومن گرد و منظم قرار دارند.

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

۸: تعداد اسپرم خیلی کم است.

۷: اسپرم دیده نمی شود ولی تعداد زیادی اسپرماتید گرد دیده می شود.

۶: تعداد کمی اسپرماتید گرد دیده می شود.

۵: هیچ اسپرم و اسپرماتید گردی دیده نمی شود. تعداد زیادی اسپرماتوسیت اولیه دیده می شود.

۴: تعداد خیلی کمی اسپرماتوسیت اولیه دیده می شود.

۳: هیچ اسپرماتوسیت اولیه دیده نمی شود. فقط اسپرماتوگونی دیده می شود.

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

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

یافته‌ها

بر اساس بررسی مشاهداتی که توسط میکروسکوپ نوری صورت پذیرفت در بیضه گروه کنترل در لوله‌ها اسپرماتوژنز فعال بود (تمام رده سلول‌ها شامل سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه، اسپرماتیدهای گرد، اسپرماتیدهای دراز (اسپرماتوزا) و همچنین سلول‌های سرتولی مشاهده شدند. محدوده اغلب لومن‌ها که در فاز ۷ و ۸ اسپرماتوژنز بودند، دارای حاشیه منظم و تعداد نسبتاً زیادی اسپرماتوزوئید بود. در بافت بینابینی، بافت همبند سست حاوی عروق خونی و سلول‌های همبند به انضمام سلول‌های لیدیگ مشاهده شد. سلول‌های لیدیگ به صورت گروهی و توده‌ای اسیدوفیل مشاهده شدند. میانگین نمره جانسون در گروه کنترل 9 ± 0.30 به دست آمد و در واقع بیانگر این نکته است که اسپرماتوژنز به صورت فعال در لوله‌ها در جریان است. در مشاهده با میکروسکوپ نوری به نظر می‌رسید نیکوتین باعث اختلال در اسپرماتوژنز شده است چرا که تعداد سلول‌های زایا و اسپرم بالغ کمتر به نظر می‌رسید این تغییرات در گروه سوم و به‌ویژه چهارم واضح‌تر دیده شد. با این حال تمام رده‌های سلولی زایا و سوماتیک در این لوله‌ها نیز مشاهده شد. در گروه چهارم به نظر می‌رسید که پارامترهای کمی لوله سمینفروس در مقایسه با کنترل کاهش واضح یافته باشند (شکل ۱). نیکوتین در دوزهای ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم یعنی گروه سوم و چهارم، سبب کاهش نمره جانسون به صورت معنی‌دار شد ($p < 0.05$ ، $8/6 \pm 1/60$ و $8/5 \pm 1/50$ در مقابل $9/0 \pm 0/30$) (جدول ۱).

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

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

محاسبه حجم سلول‌های لیدیگ

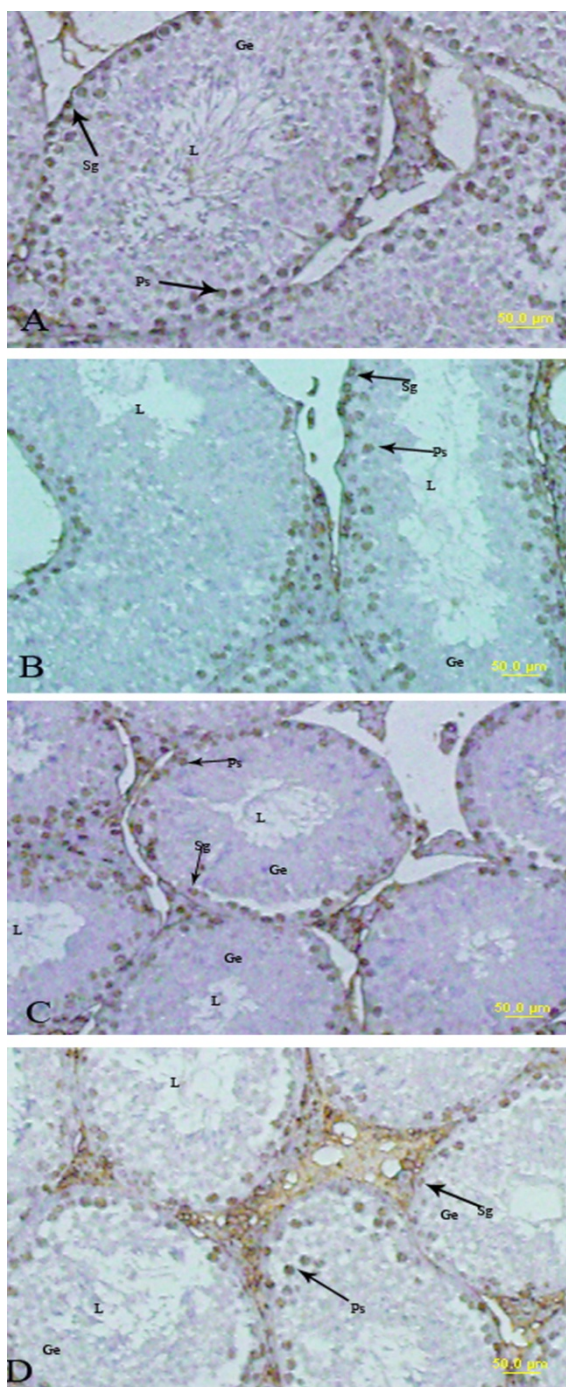
با کمک گرید خطی که روی لنز چشمی میکروسکوپ نصب شد و با بزرگنمایی $\times 1000$ ، حجم هسته سلول‌های لیدیگ محاسبه شد. بدین ترتیب که در هر حیوان ۲۰ سلول مطالعه شد. ابتدا از فرمول $R = \sqrt{(D_2 \times D_1)/2}$ شعاع به دست آمد که در این فرمول R معادل شعاع و D_1 و D_2 به ترتیب اقطار کوچک و بزرگ هسته است.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

ارزیابی تستوسترون سرم

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

آنالیز آماری

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



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

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

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

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

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

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

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

* مقادیر معنی دار در مقایسه با کنترل (p<0.05).

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

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

* مقادیر معنی دار در مقایسه با کنترل (p<0.05).

بحث

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

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

دوزهای ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش داشته است. در همین راستا نشان داده شده است که حجم هسته سلول های لیدیگ به دنبال هیپوفیزکتومی و قطع هورمون های LH و FSH [۲۷] و کریپتورکیدیسم [۲۸] و کاهش هورمون hCG کاهش می یابد [۳۵].

کاملاً مشخص است که تعداد زیادی از سلول های بدن در زمان های مختلف فعالیت های سنتزی متفاوتی دارند که این فعالیت می تواند متناسب با پراکندگی کروماتین در هسته باشد. زمانی که تراکم کروماتین زیادتر باشد هسته کوچکتر و حجم آن نیز کمتر است، بر عکس در زمانی که تراکم کروماتین کمتر است هسته بزرگتر بوده و حجم هسته نیز افزایش می یابد [۳۳]. ضمن این که مطالعات نشان داده اند که تغییر در سایز سلول و سیتوپلاسم سلول های لیدیگ با تغییرات حجم هسته آن ها ارتباط مثبت دارد [۳۶ و ۳۷].

این نتایج احتمالاً بیانگر این است که فعالیت سنتزی سلول های لیدیگ در گروه های تحت درمان با ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش یافته است.

از طرف دیگر بر اساس چندین مطالعه انجام شده، محققین نشان داده اند که نیکوتین باعث مهار آزادسازی FSH و LH از هیپوفیز می شود و این عملکرد از طریق تاثیر مهاری بر هیپوتالاموس صورت می گیرد [۸ و ۲۹].

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

پاکی تن در گروه های سوم و چهارم کاهش یافت؛ در حالی که در سلول های اسپرماتوگونی در هیچ گروهی این شاخص تغییری نمود. به عبارت دیگر تیمار با نیکوتین در دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم برای مدت دو هفته بر سلول های میتوتیک بیضه اثری ندارد. احتمالاً این تفاوت اثر روی سلول های میتوتیک و میتوتیک ناشی از تفاوت در پراکندگی رسپتورهای نیکوتینی بر سلول های زایای بیضه است. در همین راستا نشان داده شده است که نیکوتین از طریق رسپتورهای استیل کولینی نیکوتینی اثر می گذارد و این نوع رسپتورها اغلب روی اسپرماتوسیت ها و اسپرماتیدها یافت می شوند. ضمن این که نشان داده شده است که اسپرماتوزوا نیز دارای یک نوع رسپتور کلینریژیک نیکوتینی است [۳۸ و ۳۹]. در تأیید این یافته نشان داده شده که تعدادی از آگونیست ها و آنتاگونیست های کلینریژیک بر تحرک اسپرم اثر دارد [۳۸ و ۳۹].

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

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

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

تقدیر و تشکر

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

References

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

در روند اسپرمیوژن یا تمایز مورفولوژیک اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتوزوا است. نشان داده شده است که در موش های hpG که فاقد آندروژن است، بیضه های آن ها فاقد اسپرماتید گرد و اسپرماتوزوا است [۴۱].

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

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

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