بررسی آپوپتوزیس القاء شده توسط سیپروفلوکساسین در بافت بیضهٔ موش صحرایی با روش TUNEL

دکتر آرش خاکی*- دکترمعرفت غفاری نوین**- دکترعلی اکبرابراهیم نژاد*** - دکترامیرافشین خاکی****

* استادیار بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

**استادیار گروه غدد تولید مثل وجنین‌شناسی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم‌پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا تهران

*** مربی بخش ایمنوهیستوشیمی بیمارستان قائم، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

**** استادیار بخش آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۸۵/٤/۲۵

چکیده

مقدمه: سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) یکی از آنتی بیوتیک‌های خانواده فلورکینولون با طیف اثر وسیع بر باکتری‌هاست. این دارو کاربرد گسترده‌ای در کنترل عفونت‌های ناشی از میکروب‌های گرم منفی و درمان عفونت‌های دستگاه تناسلی- ادراری دارد و در ۱۰۰ کشور دنیا برای درمان استفاده می‌شود.

هدف : مطالعه مرگ برنامه‌ریزی شده(آپوپتوزیس) القاءشده توسط سیپروفلوکساسین در بافت بیضهٔموش صحرایی .

مواد و روش‌ها: ۲۰سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به دو گروه کنترل (n=۱۰) و آزمایش (n=۱۰) تقسیم شدند. در گروه کنترل موش‌ها به مدت ٦۰ روز از غذا و آب در شرایط استاندارد استفاده کردند و در گروه آزمایش موش‌ها دوز درمانی داروی سیپروفلوکساسین را به میزان ۱۲/٥mg/kg به مدت ٦۰ روز به صورت محلول در آب آشامیدنی دریافت کردند. در روز شصتم، بافت بیضه در محلول فرمالین ۱۰٪ برای بررسی هیستوپاتولوژی مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) به روش Tunel به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده شد.

نتایج: میزان سلول‌های آپوپتوتیک که به رنگ قهوه‌ای درآمده بودند در گروه آزمایش ۱۰/۱۷ ± ۱۵/۱۵ و درگروه کنترل ۲/٤۱ ± ۳ بود که این تغییرات به میزان ($P\leq$ ۰/۰۱) معنی‌داربود.

نتیجه گیری: چون تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در لوله‌های سمینی‌فر نسبت به گروه کنترل به میزان قابل توجهی افزایش یافته بود، می‌توان نتیجه گرفت که این دارو می‌تواند سبب ناباروری در موش‌های نر شود.

کلید واژه ها: آپوپتوزیس/ بیضه/ سیپروفلوکساسین/ موش‌های صحرایی

مقدمه

آنتی بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی کاربرد مهمی دارند. عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از مهم‌ترین عوامل تهدید کننده زندگی در افراد بالغ به شمار می‌روند. حدود ۲۰ درصد افراد مؤنث و ۱٪ افراد مذکر در طول زندگی خود به یکی ازبیماری‌های دستگاه ادراری- تناسلی، مبتلا می‌شوند(۳-۱). مهم‌ترین عوامل پاتوژن در این دستگاه اشریشیاکولی، به میزان ۹۵ـ۷۰٪ و استافیلوکوک ساپروفیتی‌کوس به میزان ۵٪ هستند(٤و۵). از بیماری‌های ایجاد کننده نارسایی در دستگاه ادراری می‌توان به پیلونفریت، لپتوسپیروز، سیستیت، سوزاک، سیفلیس، لنفوگرانولم و عفونت‌های واژینا بامنشاء باکتریایی اشاره کرد (۵و٦). برای درمان این بیماری‌ها از آنتی بیوتیک‌هایی مانند خانواده فلوروکینولون مثل سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) استفاده می‌شود که با مکانیسم جلوگیری از عمل DNA-gyrase (توپوایزومراز)و با ممانعت از بازشدن

نویسنده مسئول: دکتر آرش خاکی؛ تبریز- خیابان شریعتی جنوبی- کوچه اتکالی- پلاک ۱- کدپستی ۵۱۳۸۸

arashkhaki@canada.com & dr.khaki@iaut.ac.ir

رشته‌های DNA (DNA -Supercoiling)، از تکثیر باکتری جلوگیری می‌کند. این دارو در درمان عفونت‌های داخل سلولی مثل لیستریامونوسایتوژنز، مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، استافیلوکوک اورئوس (۱۰-۷)، عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی در دستگاه ادراری- تناسلی، عفونت‌های مایکوپلاسمایی، کلامیدیایی، استرپتوکوکی(٤، ۱۱، ۱۲، ۱۳و۱٤) بسیار موثر است. این دارو ناهنجاری‌هایی در دستگاه ماهیچه‌ای- حرکتی افراد نابالغ (کودکان)، تورم مفصل، و ناهنجاری در راه‌رفتن را سبب می‌شود. همچنین آثار سوء بر دستگاه اعصاب مرکزی(CNS) در ۹-۱٪ بیماران گزارش شده‌است(٤و۱۵). باتوجه به گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، حدود یک سوم مردم کره زمین از ابتلای به بیماری‌های عفونی مانند سل، بروسلوز و بیماری‌های آمیزشی مزمن ناحیه ادراری تناسلی رنج می‌برند و نیاز به مصرف دراز مدت آنتی‌بیوتیک گاهی تا حدود ٤۰ تا٦۰ روز دارند (۱۵و۱٦) طول این دوره درمانی با مدت اسپرماتوژنز در انسان (۸±٦٤روز) (۱٦و۱۷)ودر موش صحرایی (۵± ٤۸ روز) (۲۰-۱۸)مطابقت دارد. طبق بررسی‌های گذشته نشان داده شده که سیپروفلوکزازین با فعال کردن کاسپاز ۳ سبب مرگ برنامه ریزی شده سلول(آپوپتوز) می‌شود(۱۰و۲۱و۲۲و۲۳) در این تحقیق به تاثیر احتمالی این دارو بر لوله‌های سمینی‌فر دربافت بیضهٔموش صحرایی باروش TUNEL(Terminal Uridine Nick End Labeling) پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

از ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار(Wistar) خریداری شده از مرکز انستیتو پاستور ایران، استفاده شد. سن موش‌های صحرایی در حدود ۸ هفته و وزنشان در حدود ۱۰g±۲۵۰ بود. در مدت تحقیق، موش‌های صحرایی ۱۲ ساعت در روشنایی و ۱۲ ساعت در تاریکی قرار داده شدند(۹ صبح تا ۹ شب). دمای اطاق نگهداری (۲۵/۳ ـ ۲۳/۹) درجه سانتی‌گراد و درصد رطوبت اطاق ٦۰ـ ۵۵٪ بود. موش‌ها به دو گروه (n=۱۰) کنترل و (n=۱۰) مطالعه تقسیم شدند. گروه مطالعه از غذا به همراه دوز درمانی سیپروفلوکساسین (آریاـ ایران) به میزان ۱۲/۵mg/kg برخوردار شدند(۲۰و۲٤) دارو محلول در آب آشامیدنی به صورت روزانه و به مدت ۳۰ روز تجویز شد و برای اطمینان از مصرف دارو، هر روز آب آشامیدنی آب‌خوری موش‌های در گروه مطالعه تعویض می‌شد(٦).

روش جراحی جهت برداشت نمونه:

در روز شصتم موش‌ها، با پنتوباربیتورال (٤۰ mg/kg) داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس صفاق از ناحیه شکاف عرضی شکم باز شد. و بیضه‌ها در هر دو گروه کنترل و مطالعه از بدن خارج شدند. در خاتمه تحقیق، آنها طبق قانون حمایت از حیوانات (۲٤) در مدت ۲ ساعت(۱۱ـ۹ صبح) با CO2 کشته شدند.

مراحل آماده سازی بافت برای مطالعه با میکروسکوپ نوری:

نمونه‌ها در محلول فرمالین ۱۰٪ تثبیت شدند و پس از تهیه مقاطع میکروسکوپی باضخامت(۵µ)، رنگ آمیزی هماتوکسیلن- ائوزین(H&E) انجام شد. سپس تهیهٔ تصویر از فیلم ASA 400 Kodak Ultra ومیکروسکوپ نوری مدل(Olympus/3H- Z) ساخت ژاپن استفاده‌شد.

مورفومتری برای بررسی قطر سیاهرگ‌ها:

قطر سیاهرگ‌ها بانرم افزار فتوشاب ۷، مورفومتری شد.

بررسی توبول‌های بیضه و سلول‌های آن از نظر مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلول (Apoptosis) به روش Tunel:

پس از تهیه بلوک پارافینه از بافت بیضهٔ موش‌های RAT گروه‌های مطالعه (Experimental) و کنترل (Control)، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و بر لام قرار داده شد که برای بررسی مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ

سلـــول، کیت آپوپتوزساخت شرکت روشه (Rosche) آلمان با روش Tunel استفاده شد.

الف ـ پارافین‌گیری برش‌های بافتی با گزیلل.

ب ـ قراردادن آنهـا در دسـتگاه میکروویـو700W بـه مدت ۱۰ دقیقه.

پ ـ انکوبه کردن در مادهٔ بافرفـسفات (PBS)، حـاوی H_2O_2 ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه.

ت ـ انکوبه‌کردن به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

ث ـ شستشوی بـرش‌هـای بـافتی ،سـه بـار در مـادهٔ بافر(PBS).

ج ـ انکوبـه‌کـردن بـرش‌هـای بـافتی در مـادهٔ antifluorescein-pod به مدت ۳۰ دقیقه.

چ ـ شستن برش‌ها در مادهٔ PBS به میزان سه بار.

ذ- آغـشته کـردن بـرش‌هـای بـافتی بـا مـادهٔ H_2O_2- Diaminobenzidine (DAB-Rosche -Germany) .

ر ـ رنگ آمیزی افتراقی با هماتوکسیلن(۲۷-۲۵).

آنالیز آماری:

برای بررسی و مقایسه نتـایج در دو گـروه از روش F-test (Fisher test) استفاده شد.P values آن (P±/۰۱) در نظر گرفته شده بودکه از نظر آماری معنی‌دار است.

نتایج

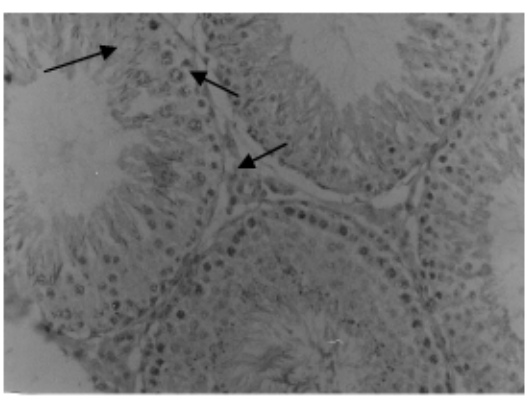
بررسی با میکروسکوپ نوری در موش‌های صحـــرایی گـــروه مطالعـــه کـــه از سیپروفلوکـــساسین بـــه مقـــدار ۱۲/۵mg/kg به مـدت ٦۰ روز اسـتفاده کـرده بودنـد، افزایش فاصله بین لولـه‌هـای سـیمنی‌فـر، پرخـونی و افزایش قطر سیاهرگ‌ها(جدول۱)، مرگ سلول‌های رده اسپرماتوسیت I را در گروه مطالعه در مقایسه بـا گـروه کنترل (شکل ۱) نشان داد. سلول‌های اسپرماتوگونی بـا روش Tunel به رنگ قهوه‌ای تیره در آمـده بودنـد کـه نشان دهنده سلول‌های آپوپتوتیک بود که تعدادشـان در گروه مطالعه به میزان قابل تـوجهی نـسبت بـه کنتـرل افزایش یافته بود.شـایان ذکـر اسـت کـه سـلول‌هـای آپوپتوتیک در گروه مطالعه دیـده مـی‌شـدند ولـی در توبول‌های دیگر از همـان گـروه وجـود نداشـتند کـه احتمالاً نشان‌دهنده نمره(score)های مختلف توبـول‌هـا بود.

جدول۱:آنالیز آماری، قطر عروق سیاهرگی،درهردو گروه کنترل و آزمایش،(P<0.05).

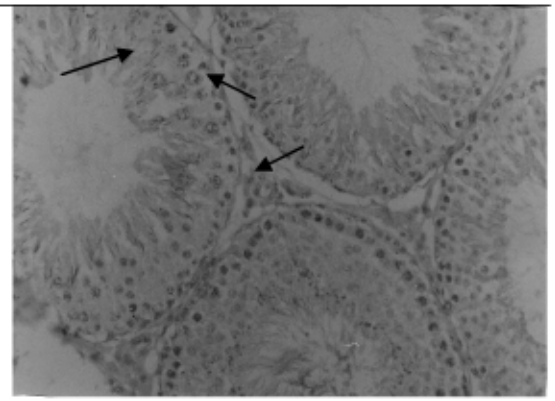
گروه‌ها	قطر عروق سیاهرگی*
کنترل	۰/۹۲۱±۱/٤۷۱
آزمایش	۱/۷۳±۱/۰۷

* توضیح: (قطر عروق سیاهرگی بااستفاده ازنرم افزار فتوشاپ۷، مورفومتری گردیده است).

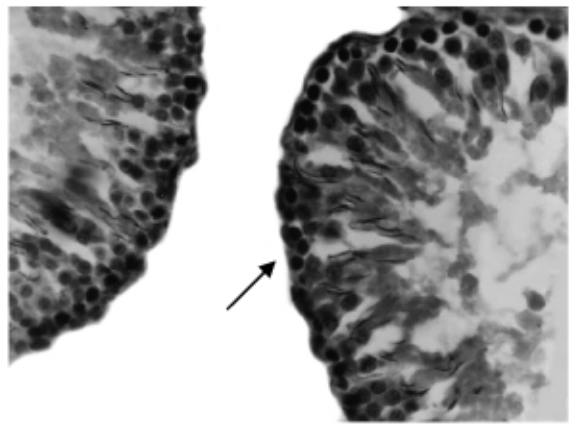
از ۱۰۰ لوله سیمنی‌فر در هر گروه ، ۲۰ عدد به صورت تصادفی انتخاب شدند. تعداد سلول‌های Apoptotic بـه طور متوسط در گروه کنترل ۲/٤۱±۳ و در گروه مطالعه ۱۰/۱۷ ± ۱۵/۱۵، به میزان P≤۰/۰۱ معنی‌دار بـود. ایـن سـلول‌هـا در گـروه‌هـای کنتـرل(شـکل۲) و مطالعـه (شـکل‌هـای ۳و٤) نـشان داده‌انـد اکثـر سـلول‌هـای آپوپتوتیک در گـروه مطالعـه درScoreهـای(Sc_{5-7}) و (Sc_{8-10}) (شکل‌های ۱و۳و٤) قرارداشتند.



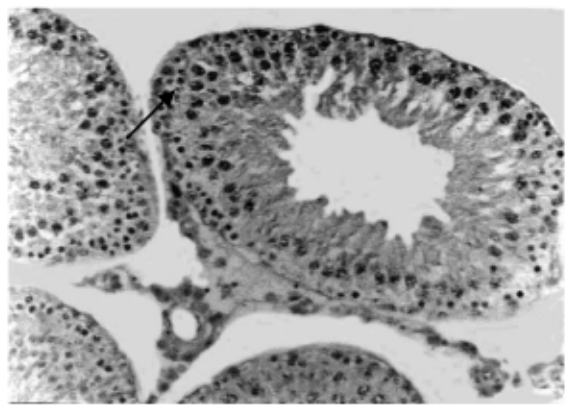
شکل۱: میکـروگـراف نوری مقطعـی ازبافت بیضه درگروه تحـت مطالعه. رنگ آمیزی H&E.(×320) از بین رفتن اپیتلیوم ژرمینال (پیکـان)و پرخونی عروق سیاهرگی (ستاره) دقـت نمائید.



شکل ۲: میکروگراف نوری مقطعی از بافت بیضه در گروه کنترل. رنگ‌آمیزی ضمیمه هماتوکسیلین، با تکنیک Tunel. (×۳۲۰) سلول‌های Apoptotic در رده اسپرماتوگونی که به رنگ قهوه‌ای تیره درآمده‌اند(پیکان)دقت نمائید.



شکل۳: میکروگراف نوری مقطعی از بافت بیضه در گروه تحت مطالعه. رنگ‌آمیزی ضمیمه هماتوکسیلین با تکنیک Tunel.(×۶۴۰) سلول‌های Apoptotic در رده اسپرماتوسیت I که به رنگ قهوه‌ای تیره درآمده‌اند(پیکان) دقت نمائید.



شکل۴: میکروگراف نوری مقطعی از بافت بیضه در گروه تحت مطالعه. رنگ‌آمیزی ضمیمه هماتوکسیلین با تکنیک Tunel. (×۳۲۰) سلول‌های Apoptotic که به رنگ قهوه‌ای تیره درآمده‌اند در score8-10 قراردار ند.

بحث و نتیجه گیری

آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شدهٔ سلول، رویدادی‌ست که با همکاری مولکول‌های خارج سلولی و پیام‌های درون سلولی در ارتباط با هم رخ می‌دهد که باعث نجات سلول و خودکشی خود بخودی آنها می‌شود(۱٤). ممکنست آپوپتوز در پاسخ به قطع برخی از هورمون‌ها دربافت‌هایی چون پروستات یا در بدن جنین و یا در زندگی پستانداران در اعضایی مثل روده یا پوست رخ دهد. این فرآیند در اسپرماتوژنز و در پاسخ به عوامل سیتوتوکسیک رخ می‌دهد که از این راه بین تعداد سلول‌های زنده جنسی سالم و سلول‌های مرده تعادل ایجاد می‌کند(۲۵و۲٦). آپوپتوز در بافت بیضه موش صحرایی، به طور معمول در اسپرماتوگونی های تیپ(مرحله) A۲ و A۳ و A٤ رخ می‌دهد ولی وقوع آن درمرحله‌های اسپرماتوسیت I، II و اسپرماتید نادر و اتفاقی‌ست(۲۵و۲۷). آپوپتوز یکی از دلایل اصلی دژنره شدن سلول‌های اسپرماتوگونی در شرایط طبیعی در دوره اسپرماتوژنز شناخته شده است(۲۸) که دراین میان بایدبه عوامل محرک محیطی‌و شیمیایی اشاره‌کرد(۳۱-۲۹). نتایج بررسی با میکروسکوپ نوری در موش‌های صحرایی‌گروه‌مطالعه که ازداروی سیپروفلوکساسین به میزان ۱۲/۵mg/kg به مدت ٦۰روز استفاده کرده بودند، نشان‌دهنده ایجاد فاصله بین لوله‌های سیمنی‌فر، پرخونی و افزایش قطر سیاهرگ‌ها بودکه احتمالاً در اثر فعال‌شدن کاسپازها، بخصوص کاسپازهای۳ تا ۸ باشد. زیرا کاسپازها به عنوان یکی ازواسطه‌های مهم، می‌توانند توسط سیپروفلوکزازین فعال شده وسبب مرگ برنامه ریزی شده سلول(آپوپتوز)، پرخونی سیاهرگ‌ها، کاهش تعداد و تحرک اسپرم‌ها، افزایش DNA قطعه قطعه شده در اسپرم و ایجاد واریکوسل شوند(۳۰و۳۱).

در مطالعه‌های قبلی، مشاهده هتروکروماتین شدن هسته سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در زیر میکروسکوپ

نوری والکترونی به همراه تغییر شکل سیتوپلاسم آنها از گرد به بیضی وائوزینوفیل‌ترشدن آنها در گروه مطالعه نسبت به گروه کنترل نشان دهنده آن بود که اکثر سلول‌های رده اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه در لوله‌های سیمنی‌فر دچار مرگ سلولی از نوع نکروز انعقادی شده بودند(۳۴-۳۲). همچنین در میکروسکوپ الکترونی تغییراتی مثل هتروکروماتین‌شدن سلول‌های مایوئید در غشای پایه دیده می‌شد که ممکنست ناشی از پرخونی سیاهرگی، افزایش دما و تأثیر آن بر سلول‌های مایوئید باشد. چون افزایش دما با فعال کردن کاسپازها می‌تواند سبب مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) شود، بنابراین تغییرات هیستوپاتولوژیک در سلول‌ها قادر است باعث آسیب استحکام سدخونی-بیضه‌ای، جدایی و ایجاد فاصله بین لوله‌های سیمنی‌فر شود. در تحقیق ما برای تمایز مرگ سلول از نوع نکروز انعقادی که در میکروسکوپ نوری دیده شده بود و مرگ برنامه ریزی شده سلول(آپوپتوز) از روش TUNEL استفاده شد، که توانایی تفکیک وتشخیص DNAی، قطعه قطعه شده در سلول‌های آپوپتوتیک را دارد. در این روش در هر دو گروه مطالعه و کنترل، سلول‌های آپوپتوتیک در لوله‌های سیمینیفر به رنگ قهوه‌ای تیره در آمده بودند. قابل توجه آن که وجود سلول‌های آپوپتوتیک در گروه کنترل نشان از وقوع مرگ خودبخودی و برنامه‌ریزی شده در سلول‌های طبیعی دارد و در تأیید یافته بررسی‌های گذشته نشان داد که برای بهبود و ترمیم اسپرماتوژنز در تنظیم و حفظ جمعیت و تمایز سلولی و تقسیم سلول‌های جنسی از مرحله اسپرماتوگونی تا اسپرماتوزوئید نیاز به پتانسیل ذاتی درون سلولی وجود دارد(۲۳و۲۶) که فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در این مورد نقش مهمی دارد. در مقایسه تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه کنترل و درمان با سیپروفلوکساسین، این تغییرات به میزان $P \leq ۰/۰۱$ در گروه درمان معنی‌دار بود. اکثر سلول‌های آپوپتوتیک در مراحل نمره (Score)،(S6-7)و(S8) در گروه مطالعه قرار داشتند که نشان دهنده توقف تکامل سلول‌های رده اسپرماتوسیت اولیه، هیپواسپرماتوژنز و آتروفی لوله‌های سمینی‌فر است که دلیلی دیگر بر از بین رفتن سلول‌های جنسی در این توبول‌ها و جداشدن آنها از یکدیگر بود. این نتایج تأییدکننده یافته‌ها در بررسی‌های پیشین بر توبول‌های سمینی‌فر بود که نشان می‌داد اولین سلول‌هایی که در پاسخ به عوامل سمی دچار آپوپتوز می‌شوند همان سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه هستند(۴۰-۳۵). سلول‌های آپوپتوتیک در برخی از توبول‌های سمینی‌فر در گروه مطالعه دیده می‌شدند ولی در توبول‌ها دیگر از همان گروه وجود نداشتند که احتمالاً نشان دهنده آن است که سلول‌های موجود دراین توبول‌ها درمراحل مختلف تکامل قرار داشتند.

یافته‌های این تحقیق با تأیید وجود سلول‌های آپوپتوتیک دربافت بیضه باروش TUNEL، به نتایج بررسی میکروسکوپ نوری والکترونی که هتروکروماتین شدن هسته سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه را نشان می‌داد قطعیت بخشیده و مرگ برنامه‌ریزی شده را در این سلول‌ها تأیید نمود(۳۴).

در نتیجه می‌توان استدلال کرد که تجویز ۱۲/۵ Mg/Kg از دوز درمانی سیپروفلوکساسین به مدت ۶۰ روز، در طول دوره اسپرماتوژنز می تواند سبب بروز آسیب در بافت بیضه و مرگ سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت I شده، چرخه طبیعی اسپرماتوژنز را مختل کند و سبب هیپواسپرماتوژنز و ناباروری در موش‌های نر گردد، چون تأثیر دارو در انسان ممکنست مشابه موش‌های نر باشد، لذا پیشنهاد می‌کنیم که تجویز این دارو با احتیاط انجام شود.

تشکر و قدردانی: پژوهشکده ابن‌سینا دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران- بخش آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

منابع

1. Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE. Principles and Practice of Infectious Diseases.3rd Ed. New York; Churchill Livingston, 1990: 203-205.

2. Neu HC.Optimal Characteristics of Agents to Treat Uncomplicated Urinary Tract Infections. J Infection 1992: 20(Suppl 4): 266–71

3. Orenstein R, Wong ES.Urinary Tract Infections in Adults. JAm Fam Physician 1999;59: 1225- 34, 1237.

4. Jun YT, Kim HJ, Song MJ, Lim JH, Lee DG, Han KJ, Choi SM, Yoo JH, Shin WS, Choi JH.In Vitro Effects of Ciprofloxacin and Roxithromycin on Apoptosis of Jurkat T Lymphocytes. J Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003; 47: 1161-1164.

5. Reece RJ, Maxwell, A. Probing the Limits of the DNA Breakage-Reunion Domain of the Escherichia Coli DNA Gyrase A Protein. J Biol Chem 1991; 25: 3540-6.

6. Giamarellos-Bourboulis EJ, Grecka P,Giamarellou H. Comparative in Vitro Activity of Ciprofloxacin vs 8 Antimicrobial Agents Against Nosocomial Multiresistant P. J Aeruginosa Strains Drugs 1995; 49 (Suppl 2) : 203-4.

7. Ronald AR, Nicolle LE,Harding GK. Standards of Therapy for Urinary Tract Infections in Adults. J Infection 1992; 20(Suppl 3): 75-80.

8. Hooper DC, Wolfson JS, Ng EY, Swartz Mn.Mechanisms of Action and Resistance to Ciprofloxacin. Am J Med 1987; 82(Suppl 4):12–20.

9.Warren JW, Abrutyn E,Hebel JR, Johnson JR, Schaeffer AJ, Stamm WE. Guidelines for Antimicrobial Treatment of Uncomplicated Acute Bacterial Cystitis and Acute Pyelonephritis in Women. J Clin Infect Dis 1999; 29:745–58

10. Naber KG, Landen H. Rapid Resolution of Symptoms with Ciprofloxacin Therapy in 3859 Hospitalised Patients with Urinary Tract Infection. International Journal of Antimicrobial Agents 2004; 23: 35-40.

11. Firsov AA,Vostrov SN,Shevchenko AA, Portnoy YA, Zinner SH.A New Approach to in Vitro Comparisons of Antibiotics in Dynamic Models: Equivalent Area Under the Curve/MIC Breakpoints and Equiefficient Doses of Trovafloxacin and Ciprofloxacin Against Bacteria of Similar Susceptibilities. J Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2841-7.

12. Sissi C,Andreolli M,Cecchetti V, Fravolini A,Gatto B,Palumbo M. Mg(2+)-Mediated Binding of 6-Substituted Quinolones to DNA: Relevance to Biological Activity. J Bioorg Med Chem 1998;6 (suppl 9): 1555-61.

13. Andriole VT.Urinary Tract Infections in the 90s, Pathogenesis and Management. J Infection 1992; 20(Suppl 4):251–256.

14. Christine Norra, Erik Skobel, Christian Breuer,Gerhard Haase, Peter Hanrath, Paul Hoff. Ciprofloxacin-Induced Acute Psychosis in aP atient with Multidrug-Resistant Tuberculosis.J European Psychiatry 2003; 18: 262–263.

15. Neu HC.Optimal Characteristics of Agents to Treat Uncomplicated Urinary Tract Infections. J Infection 1992; 20(Suppl 4): 266–71.

16. Leslie P, Gartner Games L. The Color Text Book of Histology.2nded. Phliadelphia ;W.B Suanders Compmany, 2001; 487-509.

17.Junqueria L C, Carneiro J, Long jA. Basic Histology. 5th Edition. New york; Appleton, 1986; 468-484.

18. Bustos-Obregon E, Rodriguez H.Testicular x-Ray Irradiation in Adult Mice as a Model to Study Spermatogonial Proliferation.J Andrologia 1991; 23: 447–50

19. Kerr JB, Maddocks S, Sharpe RM.Testosterone and FSH have Independent, Synergistic and Stage-Dependent Effects Upon Spermatogenesis in the Rat Testis. J Cell and Tissue Research 1992;268: 179–189.

20. Raz R,Naber KG,Raizenberg C.Ciprofloxacin 250 mg Twice Daily Versus Ofloxacin 200 mg Twice Daily in the Treatment of Complicated Urinary Tract Infections in Women. Eur J Microbiol Infect Dis 2000; 158: 327–331.

21. Shinoda K,Mitsumori K,Yasuhara K,Uneyama C,Onodera H, Hirose M,Uehara M.Doxorubicin Induces Male Germ Cell Apoptosis in Rats.J Arch Toxicol, 1999;73(suppl4-5):274-81.

22. Suschek CV,Krischel V,Bruch-Gerharz D, Berendji D, Krutmann J, Kroncke K D, Kolb-Bachofen, V.Nitric Oxide Fully Protects Against UVA-Induced Apoptosis in Tight Correlation with Bcl-2 Up-Regulation. J Biol Chem 1999; 5:6130-7.

23. Zhang J H,Zhang Y,Herman B.Caspases Apoptosis and Aging.J Ageing Res Rev 2003; 2 (suppl 4): 357-66.

24. National Institutes of Health. The Principles of Laboratory Animal Care. Polish jour of Veterinary Science; National Institutes of Health Publication, 1985; 86-23.

25. Xiaozhong Yu,Hisayo Kubota,Ruisheng Wang,Junzo Saegusa, Yasutake Ogawa,Gaku Ichihara,Yasuhiro Takeuchi, Naomi Hisanaga.Involvement of Bcl-2 Family Genes and Fas Signaling Systemin Primary and Secondary Male Germ Cell Apoptosis Induced by 2-

۲۷
نویسنده مسئول: دکتر آرش خاکی؛ تبریز- خیابان شریعتی جنوبی- کوچه اتکالی- پلاک ۱- کدپستی ۵۱۳۸۸
arashkhaki@canada.com & dr.khaki@iaut.ac.ir

علـوم پزشـکی بوشـهر،۱۳۸٤،سـال هـشتم شـماره۲، صص:۳۰-۲۱ .

۳۴-خاکی ،آرش؛ غفاری نوین ،معرفت، بـزی ،پرویـز: بـــررسی اثـــرات سیپروفلوکساسین بر سـلولهای رده سرتولی در مـوش صحـــرایی . مجلـه پزشـکی طـب جنوب،دانشگاه علوم پزشکی بوشهر،۱۳۸۵،سال هـشتم شماره۲، صص:۱۱۸-۱۱۰.

35. Josefa Blanco- Rodri ´Guez. Deoxyribonucleic Acid Replication and Germ Cell Apoptosis During Spermatogenesis in the Rabbit. Journal of Andrology 2002; 23(2): 90 99.

36. Omura M, Romero Y, Zhao M, Inoue N. Histopathological Evidence that Spermatogonia are the Target Cells of 2-Bromopropane.J Toxicol Lett 1999; 104: 19–26.

37. Xiaozhong Yu, Hisayo Kubota, Ruisheng Wang, Involvement of Bcl-2 Family Genes and Fas Signaling System in Primary and Secondary Male Germ Cell Apoptosis Induced by 2-Bromopropane in Rat. Toxicology and Applied Pharmacology 2001; 174:35–48

38. Allan D J, Harmon B V, Roberts S A. Spermatogonial Apoptosis has Three Morphologically Recognizable Phases and Shows no Circadian Rhythm During Normal Spermatogenesis in the Rat. Cell Proliferation 1992; 25: 241–250.

39.Takehiko Koji, Yoshitaka Hishikawa, Hiroshi Ando. Expression of Fas and Fas Ligand in Normal and Ischemia-Reperfusion Testes:Involvement of the Fas System in the Induction of Germ Cell Apoptosis in the Damaged Mouse Testis. J BIOLOGY OF REPRODUCTION 2001; 64: 946-54.

40. Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, Nieschlag E. Identification of Male Germ Cells Undergoing Apoptosis in Adult Rats. J Reprod Ferti l995; 105:25–31.

Bromopropane in Rat. J Toxicology and Applied Pharmacology 2001; 174: 35–48 .

26. Meistrich ML.Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis.J Eur Urol 1993; 23: 136–42

27. Judas L,Bentzen SM,Hansen PV,Overgaard J.Proliferative response Of Mouse Spermatogonial Stem Cells after Irradiation.A Quantitative Model Analysis of Experimental Data.J Cell Prolif

1996; 29:73–87.

28. Clermont Y.Kinetics of Spermatogenesis in Mammals; Seminiferous EpitheliumC ycles and Spermatogonial Renewal.J Physiol Rev 1972; 52: 198-236.

29. Raff MC.Social Controls on Cell Survival and Cell Death Nature 1992;356:397–400.

30. Nakagawa S, Nakamura N, Fujioka M, Mori C.Spermatogenic Cell Apoptosis Induced by Mitomycin C in the Mouse Testis.J Toxicol Appl Pharmacol 1997;147(suppl2):204-13.

31. Johnson L, Petty CS,Neaves WB.Further Quantification of Human Spermatogenesis: Germ Cell Loss DuringP ost-prophase of Meiosis and Its Relationship to Daily Sperm Production. J Biol Reprod, 1983; 29: 207.

۳۲- خاکی، آرش؛ سهرابی حقدوست، ایـرج؛ غفـاری نوین معرفت؛ بزی، پرویـز؛ زاهـدی، افـشین؛ آذرمـی، یدا...: بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی‌سیپروفلوکساسین بربافت بیضۀ موش صحرایی از لحـاظ میکروسـکوپ الکترونی.مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشـکی گیلان،۱۳۸۵،سال چهاردهم شماره۵۷، صص: ۷-۱.

۳۳- خاکی، آرش؛ سهرابی حقدوست ،ایـرج؛ غفـاری نوین، معرفت؛ بـزی، پرویز؛حیـدری، مهنـاز؛ آذرمـی، یدا...: بررسی اثرات داروی Ciprofloxacinبـر میـزان اسپرماتوژنز در رت. مجله پزشکی طب جنوب،دانشگاه

Survey of Induced Apoptosis Effect of Ciprofloxacin in Rat's Testis by TUNEL Technique

Khaki A.(D.V.M,Ph.D), Ghafari novin M.(MD.Ph. D), Ebrahim nezhad A.A.(Ph. D), Khaki A.A.(Ph. D)

Abstract

Introduction: Ciprofloxacin is a synthetic antibacterial agent belonging to the family of fluoroquinolones that has a very broad spectrum against of microbial pathogens, especially Gram-negative infectious diseases, which has been approved in more than 100 countries in world.

Objective: The aim of this study was planed to see apoptosis effects of ciprofloxacin after inducement, in rat testis.

Materials and Methods: The twenty male wistar rat were selected and divided randomly into two groups; control (n=10) and experimental (n=10). The test group was received 12.5mg/kg (PO) ciprofloxacin daily for sixty days, in their drinking water however the control group just received its routine drinking water. On sixtieth day the testis tissue of rats in both groups were removed in 10% formalin solution and prepared for light microscopy, and the Terminal Uridine Nick End Labeling(TUNEL) technique was used to identify apoptosis.

Results: Light microscopic studies showed apoptotic bodies in tissue of testis in experimental group were (15.15±10.17) and were(3±2.41) in control group, This difference in apoptotic bodies in experimental and control groups was significant ($P<0.01$).

Conclusion: Since in our study ciprofloxacin had side effect such as increasing apoptotic body in testis cells in rat in experimental group, then it was suggested that ciprofloxacin using in human could induced many histopathogical disorders and might be decreased the fertility rat.

Key words: Apoptosis/ Ciprofloxacin/ Rat/ Testis