

بررسی آپوتوزیس القاء شده توسط سیپروفلوکساسین در بافت بیضه موش صحرایی

با روش TUNEL

دکتر آرش خاکی* - دکتر معرفت غفاری نوین** - دکتر علی اکبر ابراهیم نژاد*** - دکتر امیرافشین خاکی****

* استادیار بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

** استادیار گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی 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: ۸۵/۴/۲۵

چکیده

مقدمه: سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) یکی از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده فلوروکینولون 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 (آپتوزیس) القاء شده توسط سیپروفلوکساسین در بافت بیضه موش صحرایی.

مواد و روش‌ها: ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به دو گروه کنترل (n=۱۰) و آزمایش (n=۱۰) تقسیم شدند. در گروه کنترل موش‌ها به مدت ۶۰ روز از غذا و آب در شرایط استاندارد استفاده کردند و در گروه آزمایش موش‌ها دوز درمانی داروی سیپروفلوکساسین را به میزان ۱۲/۵ mg/kg به مدت ۶۰ روز به صورت محلول در آب آشامیدنی دریافت کردند. در روز ششم، بافت بیضه در محلول فرمالین ۱۰٪، برای بررسی هیستوپاتولوژی مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) به روش Tunel به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده شد.

نتایج: میزان سلول‌های آپتوتیک که به رنگ قهوه‌ای درآمده بودند در گروه آزمایش ۱۷/۱۰ ± ۱۵/۱۵ و در گروه کنترل ۴۱/۲ ± ۳ بود که این تغییرات به میزان (P ≤ ۰/۰۱) معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: چون تعداد سلول‌های آپتوتیک در لوله‌های سمینی فر 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 واژه‌ها: آپتوزیس/بیضه/سیپروفلوکساسین/موش‌های صحرایی

مقدمه

هستند (۵ و ۴). از بیماری‌های ایجاد کننده نارسایی در دستگاه ادراری می‌توان به پیلونفریت، لپتوسپیروز، سیستیت، سوزاک، سیفلیس، لنفوگرانولم و عفونت‌های واژینا بامنشاء باکتریایی اشاره کرد (۵ و ۶). برای درمان این بیماری‌ها از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند خانواده فلوروکینولون مثل سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) استفاده می‌شود که با مکانیسم جلوگیری از عمل DNA-gyrase (توپوایزومراز) و با ممانعت از بازشدن

آنتی‌بیوتیک‌ها 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 از بیماری‌های دستگاه ادراری- تناسلی، مبتلا می‌شوند (۳-۱). مهم‌ترین عوامل پاتوژن در این دستگاه اشریشیاکولی، به میزان ۹۵-۷۰٪ و استافیلوکوک ساپروفیتی کوس به میزان ۵٪

ساعت در تاریکی قرار داده شدند (۹ صبح تا ۹ شب). دمای اطاق نگهداری (۲۵/۳ - ۲۳/۹) درجه سانتی‌گراد و درصد رطوبت اطاق ۶۰-۵۵٪ بود. موش‌ها به دو گروه (n=۱۰) کنترل و (n=۱۰) مطالعه تقسیم شدند. گروه مطالعه از غذا به همراه دوز درمانی سیروفلوکساسین (آریا- ایران) به میزان ۱۲/۵mg/kg برخوردار شدند (۲۴ و ۲۰) 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 (۶).

روش جراحی جهت برداشت نمونه:

در روز ششم موش‌ها، با پنتوباریتورال (۴۰ 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 (۲۴) در مدت ۲ ساعت (۱۱-۹ 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 با ضخامت (۵μ)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین (H&E) انجام شد. سپس تهیه تصویر از فیلم ASA 400 Kodak Ultra و میکروسکوپ نوری مدل (Olympus/3H-Z) ساخت ژاپن استفاده شد. مورفومتری برای بررسی قطر سیاهرگ‌ها:

قطر سیاهرگ‌ها بانرم افرار فتوشاب ۷، مورفومتری شد. بررسی توبول‌های بیضه و سلول‌های آن از نظر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis) به روش Tunel: پس از تهیه بلوک پارافینه از بافت بیضه 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 شده

رشته‌های DNA (DNA-Supercoiling)، از تکثیر باکتری جلوگیری می‌کند. این دارو در درمان عفونت‌های داخل سلولی مثل لیستریامونوسایتوز، مایکوباکتریوم توبریکولوزیس، استافیلوکوک اورئوس (۷-۱۰)، عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی در دستگاه ادراری-تناسلی، عفونت‌های مایکوپلاسمایی، کلامیدیایی، استرپتوکوکی (۴، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴) بسیار موثر است. این دارو ناهنجاری‌هایی در دستگاه ماهیچه‌ای-حرکتی افراد نابالغ (کودکان)، تورم مفصل، و ناهنجاری در راه رفتن را سبب می‌شود. همچنین آثار سوء بر دستگاه اعصاب مرکزی (CNS) در ۹-۱٪ بیماران گزارش شده است (۱۵ و ۱۴). با توجه 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 ۴۰ تا ۶۰ روز دارند (۱۵ و ۱۶) طول این دوره درمانی با مدت اسپرماتوزن در انسان (۸±۶۴ روز) (۱۶ و ۱۷) و در موش صحرائی (۵±۴۸ روز) (۲۰-۱۸) مطابقت دارد. طبق بررسی‌های گذشته نشان داده شده که سیروفلوکزازین با فعال کردن کاسپاز ۳ سبب مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) می‌شود (۱۰ و ۲۱ و ۲۲ و ۲۳) در این تحقیق به تاثیر احتمالی این دارو بر لوله‌های سمینی فر دریافت بیضه موش صحرائی باروش (Terminal TUNEL) (Uridine Nick End Labeling) پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

از ۲۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار (Wistar) خریداری شده از مرکز انستیتو پاستور ایران، استفاده شد. سن موش‌های صحرائی در حدود ۸ هفته و وزنشان در حدود ۱۰±۲۵۰g بود. در مدت تحقیق، موش‌های صحرائی ۱۲ ساعت در روشنایی و ۱۲

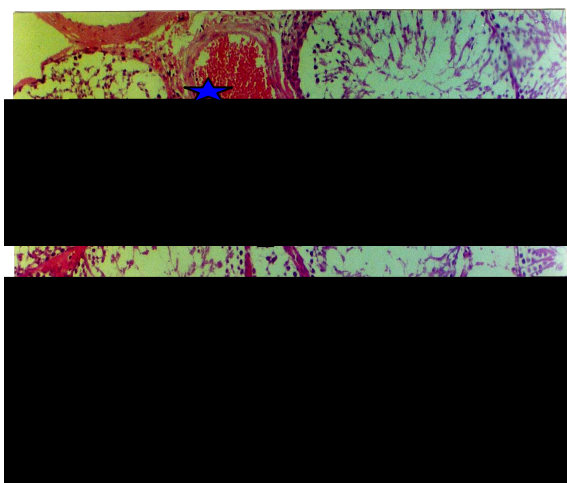
افزایش یافته بود. شایان ذکر است که سلول‌های آپوپتوتیک در گروه مطالعه دیده می‌شدند ولی در توبول‌های دیگر از همان گروه وجود نداشتند که احتمالاً نشان‌دهنده نمره (score) های مختلف توبول‌ها بود.

جدول ۱: آنالیز آماری، قطر عروق سیاهرگی، در هر دو گروه کنترل و آزمایش، ($P < 0.05$).

گروه‌ها	قطر عروق سیاهرگی *
کنترل	۰/۹۲۱±۱/۴۷۱
آزمایش	۱/۷۳±۱/۰۷

* توضیح: (قطر عروق سیاهرگی با استفاده از نرم افزار فتوشاپ ۷، مورفومتری گردیده است).

از ۱۰۰ لوله سیمنی فر در هر گروه، ۲۰ عدد به صورت تصادفی انتخاب شدند. تعداد سلول‌های Apoptotic به طور متوسط در گروه کنترل $۳±۲/۴۱$ و در گروه مطالعه $۱۵/۱۵±۱۰/۱۷$ ، به میزان $P \leq ۰/۰۱$ معنی‌دار بود. این سلول‌ها در گروه‌های کنترل (شکل ۲) و مطالعه (شکل‌های ۳ و ۴) نشان داده‌اند اکثر سلول‌های آپوپتوتیک در گروه مطالعه در Score های (Sc₅₋₇) و (Sc₈₋₁₀) (شکل‌های ۱ و ۳ و ۴) قرار داشتند.



شکل ۱: میکروگراف نوری مقطعی از بافت بیضه در گروه تحت مطالعه. رنگ آمیزی H&E ($\times 320$) از بین رفتن اپیتلیوم ژرمینال (پیکان) و پرخونی عروق سیاهرگی (ستاره) دقت نمایند.

سلول، کیت آپوپتوز ساخت شرکت روشه (Rosche) آلمان با روش Tunel استفاده شد.

الف - پارافین‌گیری برش‌های بافتی با گزلیل.

ب - قراردادن آنها در دستگاه میکروویو 700W به مدت ۱۰ دقیقه.

پ - انکوبه کردن در ماده بافر فسفات (PBS)، حاوی H_2O_2 ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه.

ت - انکوبه کردن به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

ث - شستشوی برش‌های بافتی، سه بار در ماده بافر (PBS).

ج - انکوبه کردن برش‌های بافتی در ماده antifluorescein-pod به مدت ۳۰ دقیقه.

چ - شستن برش‌ها در ماده PBS به میزان سه بار.

ذ - آغشته کردن برش‌های بافتی با ماده H_2O_2 -Diaminobenzidine (DAB-Rosche-Germany).

ر - رنگ آمیزی افتراقی با همتاکسین (۲۷-۲۵).

آنالیز آماری:

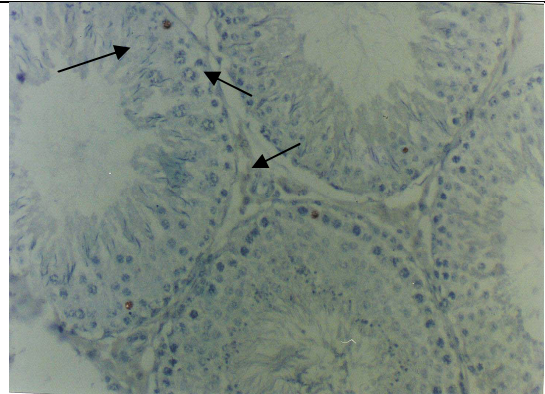
برای بررسی و مقایسه نتایج در دو گروه از روش F-test (Fisher test) استفاده شد. P values آن ($P \pm ۰/۰۱$) در نظر گرفته شده بود که از نظر آماری معنی‌دار است.

نتایج

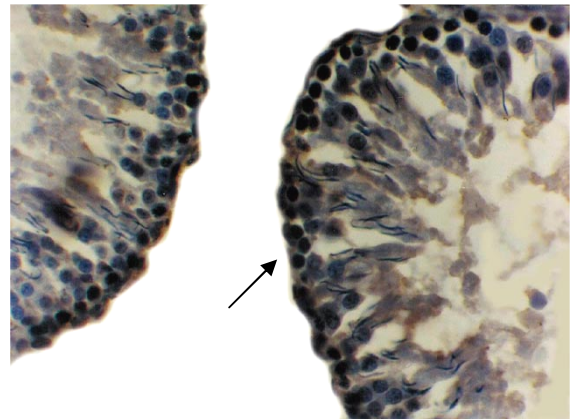
بررسی با میکروسکوپ نوری در موش‌های صحرایی گروه مطالعه که از سیپروفلوکساسین به مقدار ۱۲/۵mg/kg به مدت ۶۰ روز استفاده کرده بودند، افزایش فاصله بین لوله‌های سیمنی فر، پرخونی و افزایش قطر سیاهرگ‌ها (جدول ۱)، مرگ سلول‌های رده اسپرماتوسیت I را در گروه مطالعه در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۱) نشان داد. سلول‌های اسپرماتوگونی با روش Tunel به رنگ قهوه‌ای تیره در آمده بودند که نشان دهنده سلول‌های آپوپتوتیک بود که تعدادشان در گروه مطالعه به میزان قابل توجهی نسبت به کنترل

بحث و نتیجه گیری

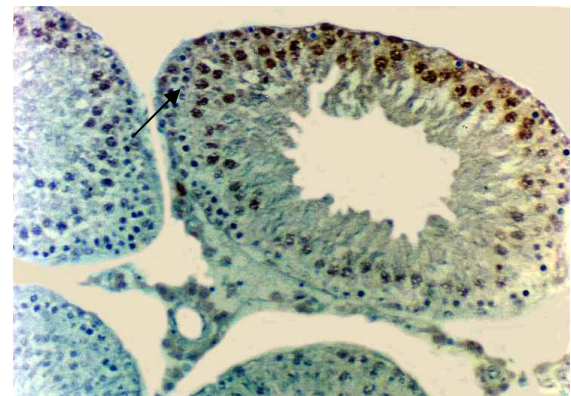
آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول، رویدادی است که با همکاری مولکول‌های خارج سلولی و پیام‌های درون سلولی در ارتباط با هم رخ می‌دهد که باعث نجات سلول و خودکشی خود بخودی آنها می‌شود (۱۴). ممکنست آپوپتوز در پاسخ به قطع برخی از هورمون‌ها در بافت‌هایی چون پروستات یا در بدن جنین و یا در زندگی پستانداران در اعضای 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 (۲۵ و ۲۶). آپوپتوز در بافت بیضه موش صحرائی، به طور معمول در اسپرماتوگونی‌های تیپ (مرحله) A۲ و A۳ و A۴ رخ می‌دهد ولی وقوع آن در مرحله‌های اسپرماتوسیت I، II و اسپرماتید نادر و اتفاقی است (۲۵ و ۲۷). آپوپتوز یکی از دلایل اصلی دژنره شدن سلول‌های اسپرماتوگونی در شرایط طبیعی در دوره اسپرماتوژنز شناخته شده است (۲۸) که در این میان باید به عوامل محرک محیطی و شیمیایی اشاره کرد (۳۱-۲۹). نتایج بررسی با میکروسکوپ نوری در موش‌های صحرائی گروه مطالعه که از داروی سیپروفلوکساسین به میزان ۱۲/۵mg/kg به مدت ۶۰ روز استفاده کرده بودند، نشان‌دهنده ایجاد فاصله بین لوله‌های سیمنی‌فر، پرخونی و افزایش قطر سیاهرگ‌ها بود که احتمالاً در اثر فعال شدن کاسپازها، بخصوص کاسپازهای ۳ تا ۸ باشد. زیرا کاسپازها به عنوان یکی از واسطه‌های مهم، می‌توانند توسط سیپروفلوکزازین فعال شده و سبب مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوز)، پرخونی سیاهرگ‌ها، کاهش تعداد و تحرک اسپرم‌ها، افزایش DNA قطعه قطعه شده در اسپرم و ایجاد واریکوسل شوند (۳۰ و ۳۱). در مطالعه‌های قبلی، مشاهده هتروکروماتین شدن هسته سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در زیر میکروسکوپ



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



شکل ۳: میکروگراف نوری مقطعی از بافت بیضه در گروه تحت مطالعه. رنگ آمیزی ضمیمه هماتوکسیلین با تکنیک Tunel (۶۴۰×). سلول‌های Apoptotic در رده اسپرماتوسیت I که به رنگ قهوه‌ای تیره درآمده‌اند (پیکان) دقت نمایند.



شکل ۴: میکروگراف نوری مقطعی از بافت بیضه در گروه تحت مطالعه. رنگ آمیزی ضمیمه هماتوکسیلین با تکنیک Tunel (۳۲۰×). سلول‌های Apoptotic که به رنگ قهوه‌ای تیره درآمده‌اند در 8-10 score قرار دارند.

نوری والکترونی به همراه تغییر شکل سیتوپلاسم آنها از گرد به بیضی و انوزینوفیل تر شدن آنها در گروه مطالعه نسبت به گروه کنترل نشان دهنده آن بود که اکثر سلول‌های رده اسپرما توگونی و اسپرما توسیت اولیه در لوله‌های سیمنی فر دچار مرگ سلولی از نوع نکروز انعقادی شده بودند (۳۴-۳۲). همچنین در میکروسکوپ الکترونی تغییراتی مثل هتروکروماتین شدن 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 (آپوتوز) شود، بنابراین تغییرات هیستوپاتولوژیک در سلول‌ها قادر است باعث آسیب استحکام سدخونی-بیضه‌ای، جدایی و ایجاد فاصله بین لوله‌های سیمنی فر شود. در تحقیق ما برای تمایز مرگ سلول از نوع نکروز انعقادی که در میکروسکوپ نوری دیده شده بود و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوتوز) از روش TUNEL استفاده شد، که توانایی تفکیک و تشخیص DNAی، قطعه قطعه شده در سلول‌های آپوتوتیک را دارد. در این روش در هر دو گروه مطالعه و کنترل، سلول‌های آپوتوتیک در لوله‌های سیمنیفر به رنگ قهوه‌ای تیره در آمده بودند. قابل توجه آن که وجود سلول‌های آپوتوتیک 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 اسپرما توژنز در تنظیم و حفظ جمعیت و تمایز سلولی و تقسیم سلول‌های جنسی از مرحله اسپرما توگونی تا اسپرما توژنید نیاز به پتانسیل ذاتی درون سلولی وجود دارد (۲۳ و ۲۶) که فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در این مورد نقش مهمی دارد. در مقایسه تعداد سلول‌های آپوتوتیک در گروه کنترل و درمان با سیپروفلوکساسین، این تغییرات به میزان $P \leq 0/01$ در گروه درمان معنی دار بود. اکثر

سلول‌های آپوتوتیک در مراحل نمره (Score)، (S6-7) و (S8) در گروه مطالعه قرار داشتند که نشان دهنده توقف تکامل سلول‌های رده اسپرما توسیت اولیه، هیپواسپرما توژنز و آتروفی لوله‌های سیمنی فر است که دلیلی دیگر بر از بین رفتن سلول‌های جنسی در این توبول‌ها و جدا شدن آنها از یکدیگر بود. این نتایج تأییدکننده یافته‌ها در بررسی‌های پیشین بر توبول‌های سیمنی فر بود که نشان می‌داد اولین سلول‌هایی که در پاسخ به عوامل سمی دچار آپوتوز می‌شوند همان سلول‌های اسپرما توگونی و اسپرما توسیت اولیه هستند (۴۰-۳۵). سلول‌های آپوتوتیک در برخی از توبول‌های سیمنی فر در گروه مطالعه دیده می‌شدند ولی در توبول‌ها دیگر از همان گروه وجود نداشتند که احتمالاً نشان دهنده آن است که سلول‌های موجود در این توبول‌ها در مراحل مختلف تکامل قرار داشتند.

یافته‌های این تحقیق با تأیید وجود سلول‌های آپوتوتیک در بافت بیضه باروش TUNEL، به نتایج بررسی میکروسکوپ نوری والکترونی که هتروکروماتین شدن هسته سلول‌های اسپرما توسیت 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 اسپرما توژنز می‌تواند سبب بروز آسیب در بافت بیضه و مرگ سلول‌های اسپرما توگونی و اسپرما توسیت I شده، چرخه طبیعی اسپرما توژنز را مختل کند و سبب هیپواسپرما توژنز 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 ابن سینا دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران- بخش آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

1. Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE. Principles and Practice of Infectious Diseases. 3rd Ed. New York; Churchill Livingstone, 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. *J Am 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 a Patient 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. 2nd ed. Philadelphia; W.B Saunders Company, 2001; 487-509.
17. Junquera 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(suppl 4-5): 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 System in Primary and Secondary Male Germ Cell Apoptosis Induced by 2-

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 Epithelium Cycles 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 During Post-prophase of Meiosis and Its Relationship to Daily Sperm Production. *J Biol Reprod*, 1983; 29: 207.

۳۲- خاکی، آرش؛ سهرابی حقدوست، ایرج؛ غفاری نوین معرفت؛ بزی، پرویز؛ زاهدی، افشین؛ آذرمی، یدا...: بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی سیپروفلوکساسین بر یافت بیضه موش صحرائی از لحاظ میکروسکوپ الکترونی. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، ۱۳۸۵، سال چهاردهم شماره ۵۷، صص: ۷-۱.

۳۳- خاکی، آرش؛ سهرابی حقدوست، ایرج؛ غفاری نوین، معرفت؛ بزی، پرویز؛ حیدری، مهناز؛ آذرمی، یدا...: بررسی اثرات داروی Ciprofloxacin بر میزان اسپرماتوزنز در رت. مجله پزشکی طب جنوب، دانشگاه

علوم پزشکی بوشهر، ۱۳۸۴، سال هشتم شماره ۲، صص: ۳۰-۲۱ .

۳۴- خاکی، آرش؛ غفاری نوین، معرفت، بزی، پرویز: بررسی اثرات سیپروفلوکساسین بر سلولهای رده سرتولی در موش صحرائی. مجله پزشکی طب جنوب، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، ۱۳۸۵، سال هشتم شماره ۲، 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* 1995; 105: 25-31.

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 histopathological disorders and might be decreased the fertility rat.

Key words: Apoptosis/ Ciprofloxacin/ Rat/ Testis