مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۰ شماره ۱ بهار ۱۳۸۷ صفحات ۴۹-۴۳

بررسی اثرات آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی (جنتامایسین، نئومایسین واسترپتومایسین) وفلوروکینولونی (اُفلوکساسین)بربروزآپوپتوز بافت بیضه موش صحرایی با روش TUNEL

دکتر آرش خاکی: استادیار پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز: نویسنده رابط

دکتر معرفت غفاری نوین: استادیار غدد تولید مثل و جنین شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی تولید مثل، علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن سینا تهران
دکتر محمد نوری: دانشیار بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر امیر افشین خاکی: استادیار علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر پرویز بزی: استادیار آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بو شهر
دکتر علی اکبر ابراهیم نژا د: دکتری علوم آزمایشگاهی، بیمارستان امام دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۵/۱۰/۲۵، **پذیرش**: ۸۶/۵/۸

چکیده

زمینه واهداف:داروهای جنتامایسین، نئومایسین، استرپتومایسین وافلوکساسین ازدسته آنتی بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزیدی و فلوروکینولونی می‌باشند، که بر روی بیماری‌های حاصل از باکتری‌های گرم منفی وبیماریهای عفونی دستگاه تناسلی-ادراری موثر عمل می‌کنندو در حال حاضردر بسیاری از کشورهای دنیا کاربرددرمانی دارند. انجام تحقیق فوق در ادامه تکمیل تحقیقات گذشته و به منظور، پی‌بردن به اثرات این داروها در ارتباط با مرگ برنامه ریزی شدهء (آپوپتوز) سلولهای بافت بیضه در طول دوره اسپرماتوژنز باروش تا نل در موش صحرایی بوده است.

روش بررسی:بدین منظور،۵۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار، که حدود ۸ هفته سن داشتند و وزنشان در حدود ۱۰g ± ۲۵۰ بود به پنج گروه کنترل و تحت مطالعه تقسیم شدند. هر چهار گروه تحت مطالعه (n=۴۰) و کنترل(n=۱۰) در شرایط یکسان از لحاظ مکان و محل زندگی و نوع ماده غذایی و آب آشامیدنی نگهداری می‌شدند و فقط گروهای تحت مطالعه در مقایسه با گروه کنترل که فقط از حلال دارو (سرم سالین نرمال) به صورت تزریقی(داخل صفاقی) استفاده کرده بودند، روزانه به مدت ۱۴ روز از داروهای جنتامایسین به میزان ۵mg/kg تزریقی (داخل صفاقی) و نئومایسین به میزان ۵۰ mg/kg، تزریقی (داخل صفاقی) و استرپتومایسین به میزان ۴۰mg/kg ، تزریقی (داخل صفاقی) و افلوکساسین به میزان ۷۲mg/kg ، تزریقی (داخل صفاقی) استفاده کردند. در روز چهاردهم به منظور مطالعات هیستوپاتولوژیکی، بافت بیضه پس از نمونه‌برداری و تثبیت در محلول فرمالین ۱۰٪ جهت بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) با تکنیک تا نل به آزمایشگاه پاتولوژی ارجاع داده شد.

یافته‌ها: میزان سلولهای ژرمینال جنسی آپوپتوتیک شده(اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیتهای اولیه) که به رنگ قهوه‌ای درآمده بودند در گروه جنتامایسین برابربا(۱۰/۱۷ ± ۲۴/۱۵) و در گروه نئومایسین برابربا(۹/۱۱ ± ۲۵/۱۵) در گروه استرپتومایسین برابربا(۱۱/۱۴ ± ۱۵/۱۵) و در گروه افلوکساسین برابربا(۸/۱۷ ± ۳۴/۱۵)بود و درگروه کنترل برابربا (۲/۴۱ ± ۷/۳) بود که این تغییرات به میزان ($P < ۰/۰۵$) معنی‌داربود.

نتیجه گیری: از آنجا که،تعداد سلولهای ژرمینال جنسی آپوپتوتیک شده (اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیتهای اولیه)درلوله های سیمینیفر گروه تحت درمان با استرپتومایسین در مقایسه با سایر داروها، کمتر میباشد لذا احتمال می‌رود که این دارو کمتر سبب ناباروری درموشهای نر گردد.

کلیدواژه ها: آپوپتوزیس،استرپتومایسین، افلوکساسین،جنتامایسین، نئومایسین ،تانل.

مقدمه

بیماری‌های عفونی، مخصوصا بیماری‌های دستگاه ادراری یکی از مهمترین عوامل تهدید کننده زندگی افراد بالغ به شمار رفته ودر حدود ۲۰ درصد از افراد مونث و۱٪ از افراد مذکر جامعه در طول زندگی خود به یکی از بیماری‌های عفونی دستگاه تناسلی- ادراری مبتلا می‌شوند(۱و۲). مهمترین عوامل پاتوژن در این دستگاه اشرشیاکولای به میزان ۹۵-۷۰٪ و استافیلوکوکوس ساپروفیتوکوس به میزان ۵٪،و همچنین کلامیدیاها و نایسریاها از عوامل اصلی ایجاد کننده التهاب بافت اپیدیدیم بشمار می آیند(۱). از بیماری‌هایی که سبب ایجاد نارسایی در دستگاه ادراری می‌شوند می‌توان به پیلونفریت، لپتوزپیروزیس، سیستیت، سوزاک، بیماری

سیفلیس، لنفوگرانولماو عفونتهای ناحیهء واژن با منشاء باکتریایی اشاره کرد (۳). جهت درمان این بیماری‌هاو عفونت های ناشی از باکتری‌های گرم منفی از آنتی بیوتیک‌های موجود در خانوادهای آمینوگلیکوزیدی و فلوروکینولونی استفاده میشود. مصرف آمینوگلیکوزیدها به همراه سایر آنتی بیوتیک ها مخصوصا آنتی بیوتیک های فلوروکینولونی می‌تواند در درمان این عفونت ها موثر واقع شود (۱). تحقیقات نشان داده است که جنتامایسین و استرپتومایسین می‌تواند در درمان بروسلوز انسانی موثر واقع شوند (۴). همچنین جنتامایسین در درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اپیدرمیس و استافیلوکوکوس آرئوس، انتروکوکوس فایسالیس موثر واقع شده (۵) و به همراه آنتی بیوتیک‌های خانواده فلورکینولونها جهت درمان بسیاری از عوامل پاتوژن وگاهی پس از جراحی ها به صورت توام مصرف شوند(۶و۷). باتوجه به این مسئله که آمینوگلیکوزیدها و فلورکینولونها در پیشگیری و درمان بسیاری از عفونتها به صورت انفرادی یا توام مورد مصرف واقع و مصرف برخی ازاین آنتی بیوتیک هامثل جنتامایسین، استرپتومایسین و داکسی سایکلین بر روی بعضی ازپارامترهای سیمن مانندتحرک اسپرم و میزان هورمون تستسترون تاثیرگذاربوده اند. همچنین داروها و مواد شیمیایی می توانند به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) محسوب گردند (۷و۸) بنابراین می خواهیم در تحقیق حاضر به اثرات احتمالی این داروها (جنتامایسین و نئومایسین واسترپتومایسین و اُفلوکساسین) به صورت جداگانه درگروههای تحت مطالعه و کنترل، و در مقایسه باهمدیگر برمرگ برنامه ریزی شدهء سلولهای بافت بیضه در موش صحرایی بپردازیم .

مواد و روش ها

جهت این تحقیق از ۵۰ سرموش صحرایی نژاد ویستار که از مرکز انیستیتو پاستور ایران خریداری شده بود، استفاده گردید. موشهای صحرایی در حدود ۸ هفته سن داشتند و وزنشان در حدود ۱۰g $\pm$ ۲۵۰ بود. در طول زمان تحقیق، این حیوانات به مدت ۱۲ ساعت در روشنایی و ۱۲ ساعت در تاریکی قرار گرفتند،(۹ صبح تا۹ شب) دمای اطاق نگهداری(۲۵/۳– ۲۳/۹) درجه سانتی‌گراد بود و درصد رطوبت اطاق ۶۰ ـ ۵۵٪ اندازه‌گیری شده بود. تمامی حیوانات حاضر در تحقیق فوق بر طبق قانون حمایت از حیوانات (۹) کشته شدند.۵۰ سر موش صحرایی به چهار گروه تحت مطالعه و یک گروه کنترل تقسیم شدند .گروههای تحت مطالعه در مقایسه با گروه کنترل، روزانه به مدت ۱۴ روز پی درپی از داروی جنتامایسین به میزان 5mg/kg تزریقی(داخل صفاقی)،نئومایسین به میزان ۵۰mg/kg تزریقی(داخل صفاقی)، استرپتومایسین به میزان ۴۰mg/kg تزریقی (داخل صفاقی) و افلوکساسین به میزان ۷۲mg/kg تزریقی (داخل صفاقی) استفاده کردند، شایان ذکر است که حلال داروهای تزریقی ۳ سی سی سرم سالین نرمال بود.

پودر خالص آنتی بیوتیکهای مورد مصرف دراین تحقیق از شرکت (Sigma)کشور آمریکاخریداری شده بودند. کیت آپوپتوزیس و مواد مربوطه ساخت شرکت روشه Rosche کشورآلمان بودند.در روز چهاردهم، از پنتوباربیتورال(۴۰ mg/kg) جهت بیهوشی از طریق تزریق داخل صفاقی استفاده شده و سپس ناحیه صفاقی با شکاف عرضی شکمی باز شد. سپس بیضه‌ها در گروهای تحت مطالعه و کنترل از بدن خارج شدند. در انتهای این تحقیق حیوانات و در طول مدت ۲ ساعت(۱۱ـ۹ صبح) توسط گاز CO2 کشته شدند.(۹)نمونه‌ها در محلول فرمالین ۱۰٪ تثبیت گردید وپس ازتهیهء مقاطع میکروسکوپی باضخامت(۵µ)،رنگ آمیزی هماتوکسیلن–ائوزین(H&E) انجام گردید(۱۰)وسپس جهت تهیهٔ تصاویراز فیلم ASA 400 Kodak Ultra ومیکروسکوپ نوری مدل (Olympus/ 3H - Z) ساخت کشور ژاپن استفاده شد.

پس از تهیه بلوک پارافینه از بافت بیضهٔ موشهای صحرایی موجود در گروه‌های تحت مطالعه و گروه کنترل، برشهایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. سپس این برشها بر روی لام قرار داده شدند. برشهایی مربوط به گروهای تحت مطالعه و کنترل جهت بررسی مرگ برنامه‌ریزی شدهء سلول با کیت آپوپتوزیس ساخت شرکت روشه((Roscheکشورآلمان و با روش Tunel مورد آزمایش قرار گرفتند.الف ـبرشهای بافتی توسط گزیلل پارافین‌گیری شدند.ب ـ برشهای بافتی پارافین‌گیری شده در دستگاه میکروویو W۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه دردمای ۹۰ درجه سانتی گرادقرار داده شدند.پ ـ برشهای بافتی در مادهٔ با فر فسفات (PBS) ، حاوی H_20_2 ۳٪ برای مدت۱۰ دقیقه انکوبه‌شدند. ج ـ برش‌های بافتی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌شدند. چ ـ برش‌های بافتی ،سه بار در مادهٔ با فر فسفات PBS)) شستشوداده شدند.ح ـ برش‌های بافتی در مادهٔ antifluorescein-pod به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه‌شدند. دـ برش‌های بافتی در مادهٔ PBS به میزان سه بار شسته‌شدند. ذ– برش‌های بافتی با مادهٔ H_20_2-Diaminobenzidine DAB-Rosche-Germany آغشته شدند .ر ـ برش‌های بافتی با رنگ هماتوکسیلن رنگ آمیزی افتراقی شدند .همچنین درصد میانگین تعداد سلولهای ژرمینال جنسی آپوپتوتیک شده (اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیتهای اولیه) که به رنگ قهوه‌ای درآمده بودند در۱۰۰ عدد لوله سیمینی فر(به ازای هرسرموش صحرایی ۴ عدد مقطع میکروسکوپی ودرهر مقطع میکروسکوپی۲۵ لوله سیمینی فر)درهرگروه محاسبه گردید.(۱۳–۱۱).

جهت بررسی وارزیابی لوله های سیمنی‌فرازلحاظ score های(مراحل) مختلف از متد (De Kretser)استفاده گردید که بدین منظورمقاطع میکروسکوپی باضخامت(۵µ) تهیه گردیدوسپس با رنگ آمیزی هماتوکسیلن–ائوزین(H&E)این مقاطع رنگ آمیزی شدند،سپس به ازای مقاطع میکروسکوپی تهیه شده ازبافت بیضهء

هر سرموش صحرایی وبه ازاء هریک از گروههای کنترل وآزمایش، ۱۰۰ عدد لوله سیمنی‌فر به صورت تصادفی انتخاب گردیدو بابزرگنمایی ۶۴۰ برابر لوله های سیمنی‌فربرطبق متد (De Kretser)ارزیابی شدند، باتوجه به اینکه برطبق این متد ارزیابی لوله های سیمنی‌فردر ۱۰، مرحله(scores)انجام میگیرد و مرحله‌اول(Sc1)مربوط به آتروفی(ازبین رفتن سلولهای جنسی زایا) لوله های سیمنی‌فرو مرحله‌دهم(Sc ۱۰) مربوط به لوله های سیمنی‌فرسالم میباشدوار آنجایی که این دو مرحله حساسیت متناسب با نوع روش تحقیق مادارد لذا جهت ارزیابی لوله های سیمنی‌فرمطالعه برروی مراحل اول و دهم انتخاب گشتند (۱۴).

بررسی مورفومتریک اپیتلیوم ژرمینال وقطر توبولهای بیضه بااستفاده ازنرم افرار فتوشاب۷، برحسب واحد میکرومتر(μm)مورفومتری گردیده است. جهت بررسی و مقایسه نتایج حاصله از بررسی توبولهای بیضه و سلولهای آپوپتوتیک وهمچنین بررسی لوله های سیمنی‌فرازلحاظ score های(مراحل) مختلف در گروه کنترل وتست از روش ANOVA ، استفاده گردید.

یافته ها

میانگین درصدسلولهای آپوپتوتیک اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیتهای اولیه که به رنگ قهوه‌ای درآمده بودند در گروه جنتامایسین برابربا(۱۰/۱۷ ± ۲۴/۱۵) و در گروه نئومایسین برابربا(۹/۱۱ ± ۲۵/۱۵) درگروه استرپتومایسین برابربا (۱۱/۱۴ ± ۱۵/۱۵) و در گروه افلوکساسین برابربا (۸/۱۷ ± ۳۴/۱۵)بود و درگروه کنترل برابربا (۲/۴۱ ± ۷/۳) بود که این تغییرات به میزان ($P \leq$ ۰/۰۱) معنی‌داربود. در بررسی نتایج لوله های سیمنی‌فرازلحاظ score های(مراحل) مختلف این لوله‌ها در scoreهای(مراحل) مختلف قرار داشتند و نتایج حاصله نشان داد که لوله های سیمنی‌فر واقع در در مرحله اول (Sc_1)در گروههای تحت مطالعه جنتامایسین برابر با (۳/۱۷ ± ۴/۵) ،گروه تحت مطالعه نئومایسین برابر با (۲/۱۲ ± ۶/۴) ،گروه تحت مطالعه استرپتومایسین برابر با(۳/۱۷ ± ۱/۱) ودر گروه تحت مطالعه افلوکساسین برابر با(۱/۱۱ ± ۱۰/۴) ودرگروه کنترل برابر با(۴/۱۹ ± ۰/۲) بودند.همچنین لوله های سیمنی‌فر واقع در در مرحله دهم (Sc_{10})در گروههای تحت مطالعه جنتامایسین برابر با (۲/۵ ± ۱/۱۶) ،گروه تحت مطالعه نئومایسین برابر با (۲/۱ ± ۱/۳۶)، گروه تحت مطالعه استرپتومایسین برابر با (۲/۷ ± ۵/۱۵) ودر گروه تحت مطالعه افلوکساسین برابر با (۴/۱ ± ۶۶/ ۱) ودر درگروه کنترل برابر با۲/۰۱±۸/۴ بودند ($P <$ ۰/۰۵).

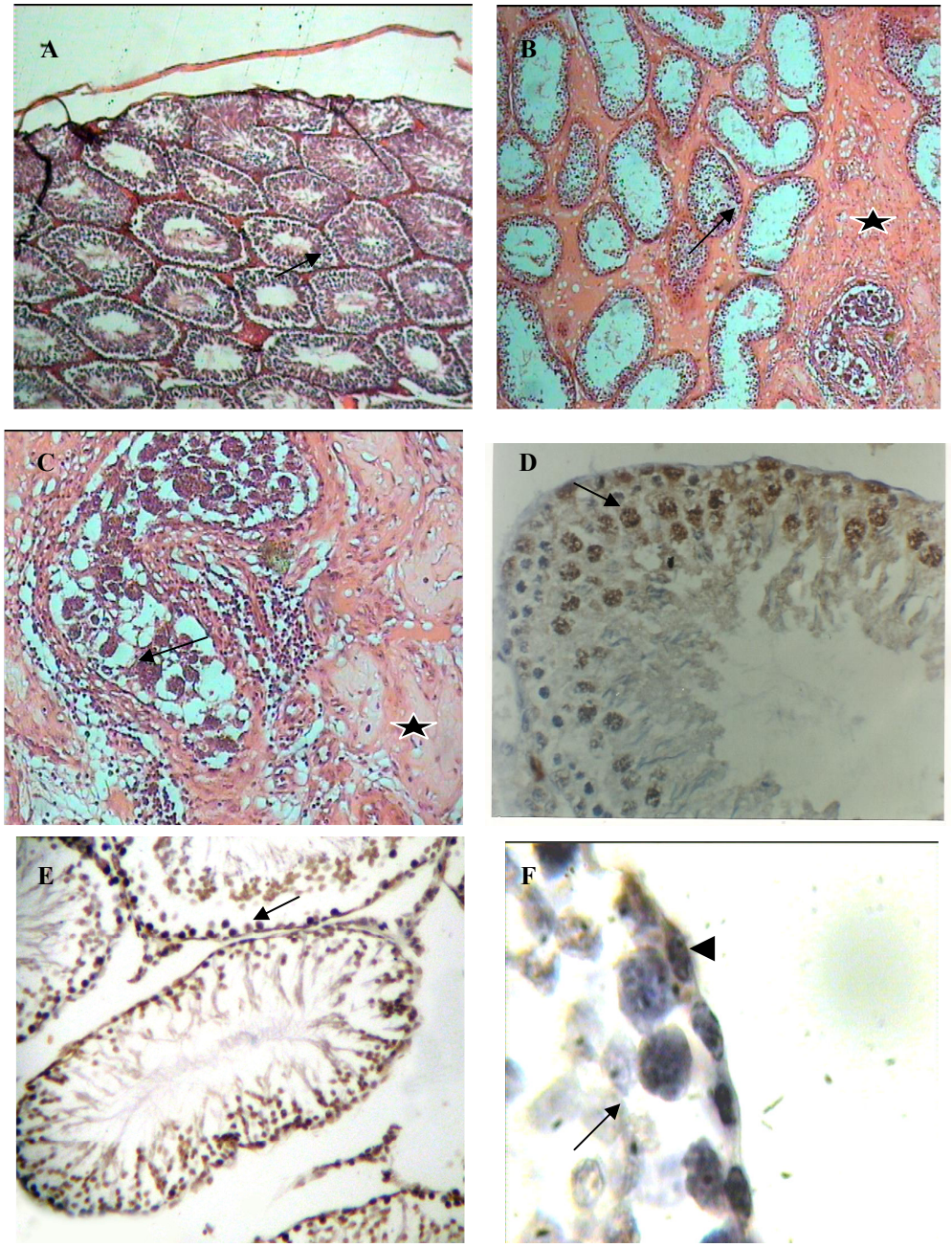
در بررسی نتایج بررسی مورفومتریک ضخامت اپیتلیوم ژرمینال و قطر توبولهای بیضه مشخص شد که ضخامت اپیتلیوم ژرمینال واقع در گروههای تحت مطالعه جنتامایسین برابر با (۰/۰۰۳ ± ۱/۰۲۱) ،گروه تحت مطالعه نئومایسین برابر با (۰/۰۰۲ ± ۱/۰۰۸)،گروه تحت مطالعه استرپتومایسین برابر با(۰،۱۱۷ ± ۱/۱۱۰) ودر گروه تحت مطالعه افلوکساسین برابر با (۰/۰۰۳ ± ۰/۹۸۷) ودر درگروه کنترل برابر با (۰/۰۰۱ ± ۱/۹۱۷)بودند،($P <$ ۰/۰۵).همچنین قطر توبولهای بیضه واقع در گروههای تحت مطالعه در گروههای تحت مطالعه جنتامایسین برابر با(۰/۰۰۱ ± ۲۸۲/۳)، گروه تحت مطالعه نئومایسین برابر با (۰/۰۰۵ ± ۲۷۹/۳)، گروه تحت مطالعه استرپتومایسین برابر با (۰.۰۰۸ ± ۲۹۲/۱) ودر گروه تحت مطالعه افلوکساسین برابر با (۰/۰۰۹ ± ۲۷۲) ودر درگروه کنترل برابر با (۰/۰۰۱ ± ۳۸۵/۲) بودند ،($P <$ ۰/۰۵).

فتومیکروگرافهای نوری مقطع عرضی از توبولهای بیضوی در گروه کنترل(فتومیکروگراف A:). نشان دهنده‌ءتوبولهای بیضوی دارای ضخا مت طبیعی و حفره مرکزی کاملا تنگ و پر از سلولهای تکامل یافته(اسپر ماتوزوآ) میباشدو سلولهای اسپرماتوسیت اولیه با مورفولوژی طبیعی دیده میشدندو توبولهای بیضه سالم ودارای دیواره ی پوششی سالم بودند. فتومیکروگرافهای نوری مقطع عرضی وطولی در گروههای تحت مطالعه نشان دهنده فضاها و اتساعات غیر عادی بودند، وجود واکوئل های فراوان در بافت بینابینی بیضه، پر خونی درعروق بافت بینابینی بیضه، عدم تمایزکافی سلولها،کاهش تعداد سلولهای بنیادی(اسپرماتوگونیا)، افزایش تعداد سلولهای سرتولی، کوچکتر شدن قطر توبولهای بیضوی و کاسته شدن از ضخامت اپیتلیوم ژرمینال به همراه حضور سلولهای لنفوسیت وپلاسماسل نشان دهنده دژنراسیون وآتروفی بافت بیضه بودند(فتومیکروگرافهای B,C)همچنین تعدادسلولهای آپوپتوتیک اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیتهای اولیه که به رنگ قهوه‌ای درآمده بودند در گروههای تحت مطالعه(دریافت کننده دارو)درمقایسه با گروه کنترل افزایش یافته بودند (فتومیکروگرافهای D,E,F)

بحث

آنتی بیوتیک‌ها به خاطر نقش مهمی که در درمان بیماری‌های عفونی از خود به جای می‌گذارند کمک ارزنده‌ای را به زندگی بشری نموده اند. باتوجه به گزارش سازمان بهداشت جهانی(WHO)، حدود یک سوم از مردم کره زمین از بیماریهای عفونی رنج می‌برند وقسمتی از این گروه، شامل مبتلایان به بیماری‌های مقاربتی و عفونی ناحیه دستگاه ادراری –تناسلی ، سل و بروسلوز می‌باشند و جهت درمان، نیاز به مصرف دراز مدت خانواده‌ء آنتی‌بیوتیکها دارند (۷-۴و۱۵و۱۶). مصرف این داروها اثرات مطلوبی را در درمان بیماری‌های مختلف از خود به جای می‌گذارند ولی احتمالا" اثرات جانبی دیگری را برروی سایر ارگان‌ها و بافت‌های بدن خواهند داشت که در تحقیق حاضر ما به اثرات آنتی‌بیوتیکهای خانواده‌ء آمینوگلیکوزیدی (جنتامایسین و نئومایسین واسترپتومایسین) وفلوروکینولونی (اُفلوکساسین)بر روی میزان آپوپتوزیس دربافت بیضه اشاره می‌کنیم. در مطالعات

انجام شده در مورد اثرات آنتی بیوتیک‌های اکسی تتراسایکلین، تیمیکوسین، استرپتومایسین، ایزونیازید مشخص شده بود که این داروها اثری بر روی تحرک اسپرم ندارند (۱۷)ولی آنتی بیوتیکهای اریترومایسین، کوتریموکسازول، آموکسی سیلین همگی سبب کاهش درصد قابلیت زیست اسپرم‌ها می شوند (۱۸)در برخی از تحقیقات که در مورد درمان التهاب اپیدیدیم با آنتی‌بیوتیک گروه داکسیسیلین انجام شده بود، وقوع حالت اولیگواسپرمیا پس از تجویز ۸ روزه در ۷۵٪ بیماران رخ داده بود(۸). همچنین تجویز۱۵ روزهء داروهای پفلوکساسین و افلوکساسین در موشهای صحرایی که به مدت متوالی ازدزهای درمانی استفاده کرده بودند نشان دهنده کاهش میزان لاکتات دهیدروژناز (LDH-X)، بیضه و کاهش اسید فسفاتاز و کاهش تعداد و تحرک اسپرمها بوده است (۱۹).



A) فتومیکروگراف مربوط به توبولهای سیمینی فر در گروه کنترل به منظم بودن و حضور انواع سلولهای ژرمینال توجه شود (فلش). رنگ آمیزی (H&E) (X۱۶۰). **B)** فتومیکروگراف مربوط به توبولهای سیمینی فر در گروه دریافت کننده جنتامایسین ،به افزایش وتوسعه بافت همبندی دربین توبولهای بیضه (ستاره) توجه شود. رنگ آمیزی (H&E)، (X۳۲۰) . **C**) فتومیکروگراف مربوط به گروه دریافت کننده داروی نئومایسین به از بین رفتن انواع سلولهای جنسی(فلش) و جایگزین شدن بافت همبندی دربین توبولهای بیضه (ستاره) و در نهایت آتروفی شدن توبولها توجه شود. رنگ آمیزی (H&E)، (X۶۴۰). **D)** فتومیکروگراف مربوط به توبولهای سیمینی فر در گروه دریافت کننده جنتامایسین،به سلولهای اسپرماتوسیت اولیه (فلش) آپوپتوتیک شده که باروش Tunel به رنگ قهوه ای درآمده اند توجه شود، (X۶۴۰). **E** فتومکیروگراف مربوط به توبولهای سیمینی فر در گروه دریافت کننده افلوکساسین، به انواع سلولهای ژرمینال جنسی (فلش) آپوپتوتیک شده که باروش Tunel به رنگ قهوه ای درآمده اند توجه شود ، (X۱۶۰).**F)** فتومکیروگراف مربوط به توبولهای سیمینی فر در گروه دریافت کننده نئومایسین،به به سلولهای اسپرماتوگونی (مثلث) آپوپتوتیک شده که باروش Tunel به رنگ قهوه ای درآمده اندو همچنین افزایش سلولهای سرتولی (فلش) توجه شود، (X۶۴۰).

استفاده از داروی آدریامایسین نشان داده است که سبب ایجاد سمیت دربافت بیضه شده ودرنهایت سبب کاهش تحرک اسپرمها میگردد(۲۰). از سوی دیگر داروی جنتامایسین میتواند با فعال کردن فسفاتازها،سبب کاهش تعداد اسپرم هاو کاهش درصد قابلیت زیست و کاهش درصد تحرک اسپرم ها و کاهش میزان هورمون تستسترون شود(۷و۱۱و۱۵و۲۱). همچنین مصرف جنتامایسین با دزبالا، دارای اثرات سوئی برروی سلولهای موجوددر لوله های سیمینی فر، میباشد بطوری که پس از گذشت۱۵ روز از درمان اولیه توقف تقسیم میتوز و میوز رخ میدهد و سلول های ژرمینال جنسی دچار پیکنوز و کاریولیز می گردند. همچنین این دارو میزان ساخت پروتئین و گلوکز را در سلولهای ردهء اسپرماتوگونی و اسپرماتویست ها کاهش می دهد. البته تحقیقات نشان داده است که در صورت قطع درمان جنتامایسین پس از یک دوره ۱۵ تا ۳۰ روزه مجدداً ساخت پروتئین و گلوکز در این سلولها شروع و میزان هورمون تستسترون و تعداد اسپرمهابه حالت نرمال برمیگردند (۸) همچنین مطالعاتی که بر روی جنتامایسین در موش های صحرایی انجام گرفته است نشان داده که مصرف روزانه ۱۰۰ mg/kg از این دارو سبب کاهش آنتی اکسیدانتها در بافت کلیه می گردد (۲۱) و با تجمع در لیزوزومهای سلولهای پروکزیمال بافت کلیه سبب تحریک کاسپازها شده و در نتیجه آپوپتوزیس را در این سلولها القاء می کند (۲۲). مطالعات قبلی که بر روی اثرات هیستوپاتولوژیکی داروی سیپروفلوکسازین بر روی بافت بیضه انجام شده بود،نشان داده است که تمام پارامترهای حیاتی اسپرم از قبیل میزان تحرک، تعدادوقابلیت زیست اسپرمها کاهش می یابند و هستهء سلولهای رده اسپرماتوگونی، و سلولهای مایوئید هتروکروماتین ترشده و هستهء سلولهای سرتولی یوکروماتین ترشده که حکایت از فعال شدن این سلولها در جهت بلع خرده ریزه های نکروزهء بافتی می کند، همچنین ضخیمترو تیره‌تر شدن نسبی غلاف رشته ای واقع در قسمت اصلی دم اسپرم ها به همراه واکوئولیزه شدن میتوکندریهای سلولهای اسپرماتوسیت اولیه دیده می‌شود (۲۳و۲۴). این مطالعه نشان دادکه آنتی بیوتیکهای خانوادهء آمینوگلیکوزیدی وفلوروکینولونی برمیزان آپوپتوزیس سلولهای ژرمینال جنسی واقع دربافت بیضه در چهار گروه تحت مطالعه با داروهای فوق نسبت به گروه کنترل اثرات افزایشی داشته وبیشترین این تغییرات مربوط به داروهای افلوکساسین و نئومایسین بود ($P< ۰/۰۵$). همچنین نتایج مورفومتریک، نشان داد که **ضخامت** اپیتلیوم ژرمینال وقطر توبولهای بیضه در گروههای تحت مطالعه با جنتامایسین وافلوکساسین نسبت به گروه کنترل بطورمعنی داری کاهش نشان میداد ($P< ۰/۰۵$). ولی در گروه تحت مطالعه با استرپتومایسین و نئومایسین ضخامت اپیتلیوم ژرمینال وقطر توبولهای بیضه نسبت به گروه کنترل تغیرات معنی داری را نشان نمیداد. همچنین بررسی نتایج بررسی لوله های سیمنی‌فرازلحاظ مراحل مختلف نشان داد که افلوکساسین و نئومایسین نسبت به سایر داروها بطورمعنی داری بیشتر سبب آتروفی لوله های سیمنی‌فر میشوند($P< ۰/۰۵$). مطالعات قبلی نشان داده است که آنتی بیوتیکهای خانوادهء آمینوگلیکوزیدی وفلوروکینولونی برمیزان اسپرماتوژنزازلحاظ، تعداد کل اسپرمها ومیزان درصد قابلیت زیست اسپرمها نسبت به گروه کنترل اثرات کاهشی داشته اند،که این نتایج در تاییدمطالعات قبلی بوده است (۱۱و۱۹و۲۰و۲۱و۲۵) ولی میزان درصد تحرک آنها فقط در گروههای تحت مطالعه با جنتامایسین و نئومایسین و استرپتومایسین نسبت به گروه کنترل کاهش نشان میداد ولی در گروه تحت مطالعه باافلوکساسین میزان درصدتحرک اسپرمها تغییری نکرده بود. در مقایسهء نتایج اثرات داروی افلوکساسین با داروی سیسپروفلوکسازین از خانوادهءفلوروکینولونها (۲۱و۲۴) برمیزان درصدتحرک اسپرمها که در مطالعات قبلی دراین زمینه انجام گرفته بود نتایج نشان داد که داروی افلوکساسین برخلاف داروی سیسپروفلوکسازین دارای اثرات سوئی برمیزان درصدتحرک اسپرمها نمیباشد.ازآنجاکه طبق مطالعات گذشته جنتامایسین وافلوکساسین سبب فعال کردن کاسپازها، که واسطه های اصلی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) هستند می‌گردند (۲۲و۲۴)، لذا سبب افزایش مرگ سلولهای ژرمینال جنسی بافت بیضه شده ودرنتیجه سبب کاهش وزن بافت بیضه و کاهش ضخامت اپیتلیوم ژرمینال جنسی و آتروفی بافت بیضه می گردد. افزایش حضور سلولهای سرتولی درمابین سایر سلولها خود در تاییدنقش این سلولها درپاکسازی توبولها از خورده ریزه های سلولی سلولهای مرده میباشد،از سوی دیگرحضور سلولهای آماسی در لابلای توبولهای سیمینیفرخود نشاندهنده دژنره شدن این توبولها میباشد.برطبق تحقیقات گذشته مصرف استر پتومایسین دردوزهای درمانی درمقایسه بادزهای بالاومزمن که جهت درمان عفونت گوش داخلی(اؤتیت)استفاده شده بود نمی تواند سبب آپوپتوزیس شود (۲۶و۲۷). همچنین مطالعات گذشته نشان داده است که مصرف استر پتومایسین به صورت ترکیبی باسایرآنتی بیوتیکها،درمحیط کشت سبب بازشدن کانالهای کلیسیم شده وفعال شدن کاسپازها را سبب میگرددواین امر سبب افزایش میزان آپوپتوزیس در ماکروفاژهای حاوی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس میگردد(۲۶).لذا باتوجه به نتایج حاصله که در آن وزن بافت بیضه درگروههای تحت مطالعه با داروهای جنتامایسین وافلوکساسین کاهش معنی داری داشته اند(۲۵) وبه نظرمی رسد که دلیل کاهش وزن بیضه به دلیل مکانیسم آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولونها مخصوصاً"داروهای جنتامایسین وافلوکساسین در فعال کردن کاسپازها (کاسپاز ۳) باشد (۲۲و۲۷و۲۸) که سبب افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول وآتروفیه شدن لوله های سیمینیفر میشود. از آنجا که پدیده آپوپتوزیس درتمام سلولهای سالم بدن پستانداران ازجمله بافت بیضه به طور طبیعی رخ میدهدوآنرا، بعنوان یکی از دلایل اصلی دژنره شدن سلولهای اسپرماتوگونی در طی سیکل اسپرماتوژنز در شرایط طبیعی معرفی می‌کنند (۳۲-۲۹)و آپوپتوزسیس میتواند درپاسخ به قطع برخی هورمونها دربافتهایی

مثل پروستات ویا در دوره‌ءجنینی در بدن جنین ویادرطول زندگی روزمره‌ءپستانداران دربافتهایی مثل روده و پوست رخ دهدهمچنین در طی فرآیند اسپرماتوژنز در پاسخ به عوامل سیتوتکسیک دربافت بیضه رخ میدهد و از این راه تعادل درتعدادرا مابین تعداد سلولهای زنده سالم جنسی و سلولهای مرده ایجادمی کند(۲۹). برخی مواد شیمیایی، داروها،تغییرات دمایی ودرمعرض قرار گرفتن امواج الکترومغناطس می توانند این روند را تسریع بخشند(۳۵-۳۳) و از آنجا که دراین تحقیق داروی استر پتومایسین نسبت به سایر آنتی بیوتیکهای مصرف شده کمتر سبب مرگ برنامه ریزی شده سلولها میشودو دارای اثرات مخرب کمتری بربافت بیضه میباشد و به نظر میرسد که مکانیسم آن به دلیل مصرف تنهایی و بادوز درمانی در مدت کوتاه باشد،چون در این حالت داروی استر پتومایسین نمیتواند سبب افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولها گردد (۲۶). از آنجا که این داروها به طور روتین در کلینیکها جهت درمان برخی بیماری‌های عفونی(۱و۸) مخصوصا" عفونتهای ناحیه‌ء ادراری-تناسلی (۳) تجویز می‌گردند و گاهی جهت افزایش تاثیر درمانی تواما" تجویز میگردند (۸) لذا ممکن است سبب بوجودآمدن تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت بیضه و اثرات نامطلوب در کیفیت اسپرم گردند. نتیجه گیری میشود که تجویز داروی استرپتومایسین درصورت مصرف جداگانه دارای عوارض جانبی کمتری برروی پارامترهای سلامتی اسپرم بوده وتجویز آن نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها،مناسب ترمی باشد ولی در مورد سایر آنتی‌بیوتیک‌ها باید احتیاط لازم را مورد دقت قرار داده چون ممکن است سبب ناباروری وافزایش درصد ناباروری به صورت مقطعی و یا در صورت ادامه مصرف در زمان طولانی سبب ناباروری بصورت دایمی در مردها گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز جهت تخصیص بودجه‌ء پژوهشی و از مرکز بیولوژی و بیوتکنولوژی تولید مثل علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سیناء تهران وابسته به دانشگاه شهید بهشتی تهران به عنوان همکار طرح تحقیقاتی تقدیر و تشکر به عمل می آید.

References

1. Delavierre D. Orchi-epididymitis. *J Ann Urol* 2003; **37**(6): 322-38.
2. Neu, HC. Urinary tract infections. *Am J Med* 1992; **92**(4A): 63S-70S.
3. Harding, G,Nicolle L, Wenman W.Randomised comparison of oral ciprofloxacin vs. standard parenteral therapy in the treatment of complicated urinary tract infections. *JDrugs* 1993; **45**: 333–334.
4. Stephanie K,Henderson B, David M. Livermore L , Hall M C. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in Streptococcus pneumoniae.*Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; **57**(5): 849-854
5. Anagnostakos K, Kelm J, Regitz T, Schmitt E, Jung W. In vitro evaluation of antibiotic release from and bacteria growth inhibition by antibiotic-loaded acrylic bone cement spacers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomate* 2005; **72**(2): 373-8.
6. Galimand M, Lambert T, Courvalin P.Emergence and dissemination of a new mechanism of resistance to aminoglycosides in Gram-negative bacteria: 16S rRNA methylation. *J Euro Surveill* 2005; **10**(1): E050127.2.
7. Darie H. Mycobacterium ulcerans infection: epidemiological, clinical and therapeutical aspects. *J Bull Soc Pathol Exot* 2003; **96**(5): 368-71.
8. Hasanjani Roushan MR, Mohraz M, Hajiahmadi M, Ramzani A, Valayati AA. Efficacy of gentamicin plus doxycycline versus streptomycin plus doxycycline in the treatment of brucellosis in humans.*J Clin Infect Dis* 2006; **42**(8): 1075-80.
9. National Institutes of Health,.,The principles of laboratory animal care. National Institutes of Health publication 1985; No: 86-23.

۱۰. خاکی آ، بزی پ. اصول و فنون هیستوپاتولوژی وتکنیکهای اختصاصی رنگ آمیزی بافتها. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی بوشهر. ۱۳۸۵: چاپ اول، صص۳۷-۴۵ .

11. Allan, D.J., Harmon, B.V and Roberts, S.A.,Spermatogonial apoptosis Has three morphologically recognizable phases and shows no Circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *J Cell Proliferation* 1992, **25**: 241-250.

۱۲. خاکی آ، غفاری نوین م، ابراهیم نژاد ع، خاکی ا. بررسی آپوپتوزیس القاءشده توسط سیپروفلوکزازین دربافت بیضه‌ءموش صحرایی باروش TUNEL . مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، سال چهاردهم،شماره ۶۱، بهار۱۳۸۶، صص:۷۱-۸۰.

13. Urban J A, D'Souza. Tamoxifen induced multinucleated cells (symplasts) and distortion of seminiferous tubules in rat testis. *Asian Journal of Andrology* 2003; **5**: 217-220

۱۴. خاکی آ، حیدری م، غفاری نوین م، خاکی ا، رجایی ف. بررسی اثرات سیتوتوکسیک داروی سیپروفلوکزازین دربافت بیضه‌ءموش

26. Diana G, Luis, Mauricio R. Modulation of macrophage apoptosis by antimycobacterial therapy: physiological role of apoptosis in the control of Mycobacterium tuberculosis. *J Toxicology and Applied Pharmacology* 2003; **190**:111-119.
27. Nagel R,Chan A. Mistranslation and genetic variability the effect of streptomycin. *J Mutat Res.* 2006; 10; 601**(1-2)**:162-70.
28. Hélène S, Patrick V, Gaëtan T, Gauthier V, Françoise V, Paul M,Tulkens M. Gentamicin-induced apoptosis in LLC- PK1 cells: Involvement of lysosomes and Mitochondria. *J Toxicology and Applied Pharmacology*.2005; **206**: 321-333.
29. Carryn S,Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M P, Tulkens PM. Comparative intracellular (THP-1 macrophage) and extracellular activities of beta-lactams, azithromycin, gentamicin, and fluoroquinolones against Listeria monocytogenes at clinically relevant concentrations. *J Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; **46**: 2095–103.
30. Clermont Y.Kinetics of spermatogenesis in mammals; seminiferous epithelium cycles and spermatogonial renewal.*J Physiol Rev* 1972; **52**: 198-236.
31. Meistrich ML.Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis.*J Eur Urol* 1993; **23**: 136–42.
32. Xiaozhong Yu,Hisayo K,Ruisheng W,Junzo S, Yasutake O,Gaku I,Yasuhiro T, Naomi H. Involvement of Bcl-2 Family Genes and Fas Signaling Systemin Primary and Secondary Male Germ Cell Apoptosis Induced by 2-Bromopropane in Rat. *J Toxicology and Applied Pharmacology* 2001; **174**: 35–48.

۳۳. خاکی ا، سلیمانی راد ج، ارکانی ح، خاکی آ، محجل شجا م، زرین تن س، تنومند ا. بررسی اثرات احتمالی میدانهای الکترومغناطیسی(EMF)، برنابارووری مردان. مجله پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، بهار ۱۳۸۵، دورهء ۲۸، شماره۱، صص۴۱-۴۷.

34. Khaki AA. Tubbs RS, Shoja MM , Rad Js, khaki A,Farahani RM,Zarrintan S,Nag TC. The effect of an electromagnetic field on the boundary Tissue of The seminiferous tubules of the Rat: light and tvansmisson electron microscopye study. *J folia Morphol* 2006: **65**, No.3: 105-110.

۳۵. رجایی ف، سلیمانی راد ج، نیک نفس ب، غفاری نوین م. اثرات انجماد شیشه ای بر میزان آپوپتوز در بلاستوسیست موش. فصلنامه پزشکی باروری و ناباروری، زمستان ۱۳۸۲ .سال پنجم، شماره۲، صص۶۲-۵۵ .

صحرایی. مجله پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی همدان، شماره ۱۴، بهار۱۳۸۶، صص:۶۴-۷۰.

15. Mandell GL, Douglas RG,Bennet JE.Principles and practice of Infectious diseases. 3rd Ed. New York: Churchill Livingston 1990, PP: 203-205.
16. Abbitt B, Berndtson WE, Seidel GJ. Effect of dihydrostreptomycin or oxytetracycline on reproductive capacity of bulls. *Am J Vet Res* 1984; **45(11)**: 2243-6.
17. Kul'chavenia EV, Brizhitiuk EV, Medvedev SA.Toxic effect of antituberculous drugs on spermatogenesis.*JProbl Tuberk* 2002 ; **5**: 29-32.
18. Hargreaves, CA, Rogers S, Hills F, Rahman F, Howell R J, Homa S T. Effects of co-trimoxazole, erythromycin, amoxycillin, tetracycline and chloroquine on sperm function in vitro. *J Hum Reprod* 1998; **13**(7): 1878-86.
19. Abd-Allah AR, Aly HA, Moustafa AM, Abdel-Aziz AA, Hamada FM. adverse testicular effects of some quinolone members in rats. *J Pharmacol Res* 2000; **41**(2): 211-9.
20. Masashi K, Sachiko M, hitoshi K,Takao O,Tadakazu F,Yoichi N.Sperm motion analysis in rats treated with adriamycin and its applicability to male reproductive toxicity studies.*J toxicological sciences* 2001; **26**(1):51-59.
21. Ghosh S, Dasgupta S. Gentamicin induced inhibition of steroidogenic enzymes in rat testis. *Indian J Physiol Pharmacol* 1999; **43**(2): 247-50.
22. Tamer M ,Said P, Hans-Juergen G, Ashok A. Role of caspases in male infertility.*J Human Reproduction Update* 2004; **10**(1): 39-51.

۲۳. خاکی آ، سهرابی حقدوست ا، غفاری نوین م، بزی پ، زاهدی ا، آذرمی ی. بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی سیپروفلوکزازین بربافت بیضهٔ موش صحرایی ازلحاظ میکروسکوپ الکترونی. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، بهار۱۳۸۵، سال چهاردهم، شماره۵۷، صص۶۲-۷۰ .

۲۴. خاکی آ، غفاری نوین م، بزی پ. بررسی اثرات سیپروفلوکزازین بر سلولهای رده سرتولی در موش صحرایی . مجله پزشکی طب جنوب،دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، ۱۳۸۵،سال هشتم، شماره۱، صص۴۴-۵۵ .

۲۵. خاکی آ، غفاری نوین م، حیدری م، خاکی ام، قراچورلو ش. بررسی اثرات آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی (جنتامایسین و نئومایسین واسترپتومایسین) و فلوروکینولونی (اُفلوکساسین)بر میزان اسپرماتوژنز در موش صحرایی. مجله پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ۱۳۸۵، شماره زمستان