

Research Paper

Effects of Levofloxacin on Expression of Apoptosis Genes of Ovarian Follicles in NMRI Mouse in Vitro and in Vivo

Sedigheh Sadat Borhani¹ , *Nasrin Heidarieh² , Nasim Hayati Roodbari¹ , Kambiz Roshanaei² 

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Qom Islamic Azad University, Islamic Azad University, Qom, Iran.



Citation Borhani S S, Heidarieh N, Hayati Roodbari N, Roshanaei K. [Effects of Levofloxacin on Expression of Apoptosis Genes of Ovarian Follicles in NMRI Mouse in Vitro and in Vivo (Persian)]. Qom University of Medical Sciences Journal. 2021; 15(9):606-617. <http://dx.doi.org/10.32598/qums.15.9.2406.1>

 <http://dx.doi.org/10.32598/qums.15.9.2406.1>



Received: 05 Aug 2021

Accepted: 21 Sep 2021

Available Online: 01 Dec 2021

Keywords:

Levofloxacin, Apoptosis, Ovary, Ovarian Neoplasms, Bax Genes, Genes, bcl-2

ABSTRACT

Background and Objectives Levofloxacin is a fluoroquinolone. Long-term use of antibiotics, including fluoroquinolone antibiotics, causes dystrophic changes in the ovaries. In this study, the effects of levofloxacin on the development of ovarian follicles and their apoptosis in the in vitro and in vivo conditions of NMRI Mouse were investigated.

Methods In the vitro study, isolated ovaries of animals were treated with levofloxacin at concentrations of 1, 2, 5, 10 µg/ml for 6 days and in the vivo study were treated with levofloxacin at concentrations of 100, 200, 400 and 800 mg/kg. After 24 days, animals were sacrificed in the in vivo groups and ovary samples were obtained. Hematoxylin and eosin (H&E) stains for histological studies also Real Time PCR techniques for study of expression rate of Bax and Bcl-2 genes were performed in both groups.

Results The results of the in vitro study showed that the dose of 2 µg/ml induced apoptosis in the monolayer primary follicles. Doses of 5 and 10 µg/ml increased the induction of apoptosis in the multilayer primary follicle. The number of secondary follicles at the 5 µg/ml dose had the most decrease. While at the dose of 10 µg/ml, the number of mature follicles had the most increase. As the antibiotic concentration increases, the expression of the Bax gene decreases and Bcl-2 gene increases significantly. The results of the in vitro study showed that the number of primary and secondary follicles decreased dose-dependently. The number of atretic follicles increased significantly with increasing dose. The expression of the Bax and Bcl-2 genes increased with increasing levofloxacin antibiotic concentration.

Conclusion This study demonstrates that levofloxacin induces apoptosis in ovarian follicles

*** Corresponding Author:**

Nasrin Heidarieh, PhD

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Qom Islamic Azad University, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Tel: +98 (912) 3593264

E-Mail: n_heidarieh@qom-iau.ac.ir, nheidarieh@yahoo.com

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات آنتی بیوتیک لووفلوکساسین بر میزان بیان ژن های آپوپتوز در فولیکول های تخمدان موش نژاد NMRI در شرایط برون تنی و درون تنی

صدیقه سادات برهانی^۱، *نسرین حیدریه^۲، نسیم حیاتی رودباری^۱، کامبیز روشنائی^۲

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴ مرداد ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۳۰ شهریور ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۰ آذر ۱۴۰۰

زمینه و هدف: لووفلوکساسین یک آنتی بیوتیک فلوروکینولون است. مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک ها، از جمله آنتی بیوتیک های فلوروکینولون، باعث تغییرات دیستروفيک در تخمدان ها می شود. در این مطالعه، اثرات آنتی بیوتیک لووفلوکساسین بر تکوین فولیکول های تخمدان و میزان آپوپتوز آن ها در شرایط برون تنی و درون تنی موش های سوری نژاد NMRI بررسی شد.

روش بررسی: در مطالعه برون تنی، تخمدان های جداسازی شده از حیوانات با غلظت های یک، دو، سه و ده میکروگرم بر میلی لیتر به مدت شش روز با آنتی بیوتیک لووفلوکساسین تحت تیمار قرار گرفتند و در مطالعه درون تنی موش های ماده در گروه های آزمایش با داروی لووفلوکساسین با غلظت های صد، دویست، چهارصد و هشتصد میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تحت تیمار قرار گرفتند. پس از ۲۴ روز حیوانات گروه درون تنی، کشته شده و نمونه بافت تخمدان تهیه شد. سپس رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوژین جهت بررسی های بافتی و همچنین تکنیک Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان ژن های Bax و Bcl-2 برای هر دو گروه انجام شد.

یافته ها: نتایج مطالعه برون تنی نشان داد که دز دو میکروگرم بر میلی لیتر، آپوپتوز را در فولیکول اولیه تک لایه القا کرد. دزهای پنج و ده میکروگرم بر میلی لیتر، روند القای آپوپتوز را در فولیکول اولیه چند لایه افزایش دادند. تعداد فولیکول های ثانویه در دز پنج میکروگرم بر میلی لیتر، بیشترین کاهش را داشت در صورتی که تعداد فولیکول بالغ در دز ده میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین افزایش را داشت. با افزایش غلظت لووفلوکساسین، بیان ژن Bax کاهش و بیان Bcl-2 افزایش معناداری داشت. در مطالعه درون تنی مشاهده شد که تعداد فولیکول های اولیه و ثانویه به طور معناداری به صورت وابسته به دز کاهش یافت. تعداد فولیکول های آترتیک با افزایش دز به طور معناداری افزایش یافت. با افزایش غلظت لووفلوکساسین در این گروه، بیان هر دو ژن Bax و Bcl-2 افزایش یافت.

نتیجه گیری: این بررسی نشان می دهد که آنتی بیوتیک لووفلوکساسین باعث القای آپوپتوز در فولیکول های تخمدان می شود.

کلیدواژه ها:

لووفلوکساسین، آپوپتوز، تخمدان، سرطان تخمدان، ژن Bax، ژن Bcl-2

از نظر بیولوژیک و هم کلینیکال اهمیت دارد [۱].

مقدمه

فلوروکینولون ها^۲ به عنوان آنتی بیوتیک های پراستفاده در دهه های اخیر، بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته اند. اگرچه استفاده از آنتی بیوتیک ها رو به افزایش است، اما آسیب های احتمالی آن ها نیز باید در نظر گرفته شود. فلوروکینولون ها به علت توانایی شان در مهار همانندسازی و رونویسی دی ان ای^۳ باکتری ها از طریق هدف گیری دی ان ای ژیراز یا توپوایزومراز^۴ نوع ۲ بسیار شناخته شده هستند.

از میان بسیاری از اندام ها که در دوران جنینی در معرض آپوپتوز قرار می گیرند، گندهای ماده به طور ممتد بیشترین آپوپتوز^۱ را داشته که همراه با تکمیل و بلوغ جرم لاین صورت می گیرد. جرم سل های ماده اووسیت به شدت آسیب پذیر هستند، به خصوص در شرایط پاتولوژیک، مانند درمان های ضد سرطان که در نهایت باعث نارسایی زودرس تخمدان و ناباروری ناشی از مرگ تسریع شده اووسیت ها می شود. تلاش ها برای درک وقوع و تنظیم آپوپتوز در تخمدان، هم

2. Fluoroquinolone
3. Deoxyribonucleic acid (DNA)
4. Topoisomerase

1. Apoptosis

* نویسنده مسئول:

دکتر نسرین حیدریه

نشانی: قم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.

تلفن: ۳۵۹۳۲۶۴ (۹۱۲) ۹۸+

رایانامه: n_heidarieh@qom-iau.ac.ir, nheidarieh@yahoo.com

روش بررسی

این پژوهش در حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم انجام شد. تعداد شصت سر موش سوری ماده ۸-۶ هفته نژاد NMRI با محدوده وزنی ۳۰-۲۵ گرم از انستیتو پاستور ایران^{۱۱} خریداری شد. موش‌ها در شرایط استاندارد دمایی ۲۹±۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۵-۴۸ درصد و سیکل دوازده ساعت تاریکی و دوازده ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به پلت و آب شیرین قرار گرفتند. حیوانات به‌طور تصادفی به دو گروه سی تایی درون‌تنی و برون‌تنی تقسیم شدند. گروه درون‌تنی به پنج گروه شش تایی تقسیم شدند، که شامل:

گروه کنترل

بدون دریافت آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین و گروه‌های آزمایش صد، دویست، چهارصد و هشتصد میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن که روزانه آنتی‌بیوتیک را به صورت گاوژ به مدت ۲۴ روز دریافت کردند. تخمدان‌ها جدا شد. سپس مطالعات بافت‌شناسی و آنالیز آزمایش پی سی آر کرونا Real Time PCR به منظور تعیین بیان ژنی BAX و Bcl-2 بر آن‌ها انجام گرفت. گروه برون‌تنی نیز به پنج گروه شش تایی تقسیم شده و سپس حیوانات تشریح شدند که بلافاصله تخمدان‌ها جدا شده و به صورت گروه‌های زیر کشت شدند. در گروه کنترل بدون اضافه کردن آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین به محیط کشت و در گروه‌های آزمایش یک، دو، پنج و ده میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب همین میزان از آنتی‌بیوتیک به محیط کشت پایه تخمدان‌ها افزوده شد. سپس مطالعات بافت‌شناسی و آنالیز Real Time PCR به منظور تعیین بیان ژنی BAX و Bcl-2 بر آن‌ها انجام گرفت. آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین از شرکت سیگما و آلدیج آمریکا تهیه شده است.

کشت تخمدان

همه محلول‌ها و وسایل مورد استفاده در کشت، استریل شدند. تخمدان‌ها از موش‌های ماده جدا و پس از جدا کردن چربی از آن‌ها و دو بار شست‌وشو در محلول نمکی بالانس شده هنکس^{۱۲} به ظروف مخصوص کشت اندام، منتقل شد. محیط کشت مصرفی شامل DMEM F12 و α -MEM به نسبت مساوی که به آن سه میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA، ۰/۲۳ میلی‌مولار اسید پیرویک و ۱ درصد پنی‌سیلین^{۱۳}-استرپتومایسین^{۱۴} اضافه و توسط فیلتر سر سرنگی استریل شد. pH محیط کشت نیز در حد ۷/۴ تنظیم شد. تخمدان‌ها درون انکوباتور دی‌اکسیدکربن^{۱۵} ۵ درصد و ۹۵ درصد هوا در دمای ۳۷±۰/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت شش روز انکوبه شدند. محیط کشت به صورت روزانه تعویض شد.

حضور هر دو آنزیم برای رشد باکتری ضروری است. از آنجا که هر دو آنزیم از همتای‌شان در پستانداران بسیار متفاوت هستند، فلوروکینولون‌ها نسبت به باکتری‌ها هزاران بار حساس‌تر هستند [۲]. آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین^۵ از انواع فلوروکینولون‌ها است. سیپروفلوکساسین^۶، لووفلوکساسین، موکسی‌فلوکساسین^۷ و جمی‌فلوکساسین^۸ قادرند عفونت‌های ادراری را در دوران بارداری کاملاً موفقیت‌آمیز درمان کنند، اما استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دوران بارداری، اثرات تراتوژنیک بر جنین دارد [۳].

اثرات تخریبی برخی از فلوروکینولون‌ها مانند سیپروفلوکساسین بر دستگاه تناسلی نر و ماده اثبات شده است [۴]. آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون، از جمله لووفلوکساسین، اثرات ضدتکثیر سلولی، به‌خصوص در انواع سل‌لاین‌های سرطانی از خود نشان داده‌اند [۵-۷]. یکی از سازوکارهای ضدتکثیر سلولی فلوروکینولون‌ها اثر بر عوامل مسیر آپوپتوز است. پروتئین Bcl-2 به عنوان یک پروتئین‌کنکوزن در سلول‌های ژرمینال در تنظیم فرایند آپوپتوز سلولی دخالت می‌کند. دو خانواده بزرگ ژنی Bcl-2 و Caspases در مسیر آپوپتوز درگیر هستند. خانواده Bcl-2 دو گروه پروتئینی پیش‌برنده آپوپتوز و مهارکننده آپوپتوز دارد. نسبت متوسط این پروتئین‌ها سرنوشت یک سلول را تعیین می‌کند [۸].

پروتئین Bcl-2 یک مولکول Prosurvival است. این پروتئین غشایی در پوشش هسته و میتوکندری قرار گرفته است و از طریق اتصال به BAX وظیفه خود را انجام می‌دهد [۹]. پروتئین BAG1 از اعضای آنتی‌آپوپتوز^۹ خانواده Bcl-2 بوده و آپوپتوز را مهار می‌کند. پروتئین BAX از نظر ساختاری هومولوگ Bcl-2 بوده و پیش‌برنده آپوپتوز است که در سیتوپلاسم یا غشای سلولی قرار می‌گیرد؛ بنابراین از نظر عملکردی این پروتئین آنتاگونیست نقش حفاظتی Bcl-2 است [۱۰].

سیگنال‌های مرگ، سبب راه‌اندازی پروتئین‌های آپوپتوزی خانواده Bcl-2، به‌ویژه BAX می‌شوند [۱۱]. این پروتئین‌ها موجب تراوش سیتوکروم C از میتوکندری به بیرون می‌شوند. سیتوکروم C آزاد شده و فاکتور فعال‌کننده پروتئاز آپوپتوزی Apaf-1 به کاسپاز ۹ متصل شده و آبشار کاسپازی^{۱۰} را فعال می‌کند که منجر به مرگ سلولی خواهد شد [۱۲].

از آنجا که تاکنون اثرات احتمالی آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین بر آپوپتوز فولیکول‌های تخمدان بررسی نشده است و با توجه به اهمیت و مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها، از جمله لووفلوکساسین، در مطالعه حاضر به تعیین اثرات احتمالی این دارو بر آپوپتوز فولیکول‌های تخمدان پرداخته شد.

5. Levofloxacin
6. Ciprofloxacin
7. Moxifloxacin
8. Gemifloxacin
9. Anti-Apoptosis
10. Cascade Caspase

11. <https://fa.pasteur.ac.ir/>

12. Hanks' Balanced Salts Solution (HBSS)

13. Penicillin

14. Streptomycin

15. Carbon dioxide (CO₂)

مطالعه بافت‌شناسی

ارزیابی آماری داده‌ها

داده‌های این مطالعه به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شد. برای آنالیز آماری و مقایسه بین گروه‌های مختلف از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در تمام محاسبات $P < 0.05$ از لحاظ آماری، معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج تغییرات هیستولوژیکی القا شده توسط غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین بر بافت تخمدان سوری، گروه برون‌تنی

فوتومیکروگراف بافت تخمدان در گروه‌های برون‌تنی تحت تیمار با دزهای مختلف آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین نشان داد که تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه کاهش پیدا کرده، در حالی که با افزایش فولیکول‌های بالغ مواجه شدیم (تصویر شماره ۱ الف و ب). در دز دو میکروگرم بر میلی‌لیتر، تعداد فولیکول‌های اولیه بیشترین کاهش را داشت. میان گروه دارویی با غلظت دو میکروگرم بر میلی‌لیتر و گروه کنترل، اختلاف معناداری در سطح 0.01 و نیز میان همین گروه و گروه ده میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معناداری در سطح 0.05 وجود دارد و تعداد سلول‌ها کاهش یافته است (تصویر شماره ۱ الف).

همچنین در دز پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر، هم فولیکول اولیه و هم ثانویه بیشترین کاهش تعداد را نشان دادند، در حالی که دز ده میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین افزایش تعداد فولیکول‌های بالغ را داشت (تصویر شماره ۱ ج). اندازه لایه تکا تغییر معناداری نداشت (تصویر شماره ۱ د)، ولی اندازه لایه گرانولوزا در غلظت پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش معنادار را نشان داد که این نتایج نشان‌دهنده آسیب بافتی تخمدان به صورت کاهش تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه و همچنین کاهش اندازه لایه گرانولوزا است (تصویر شماره ۲).

نتایج تغییرات هیستولوژیکی القا شده توسط غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین بر بافت تخمدان سوری، گروه درون‌تنی

فوتومیکروگراف بافت تخمدان در گروه‌های درون‌تنی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین نشان داد که تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه و بالغ و همچنین تعداد جسم زرد در گروه هشتصد میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشترین کاهش را نشان داد (تصویر شماره ۳ الف، ب و ج - تصویر شماره ۴ الف).

این در حالی بود که در دز هشتصد میلی‌گرم بر کیلوگرم با بیشترین افزایش فولیکول‌های آترتیک روبه‌رو شدیم (تصویر شماره ۳ د). اندازه لایه تکا و گرانولوزا به‌طور معناداری کاهش پیدا

پس از خارج کردن تخمدان‌های گروه کنترل و تیمار تحت کشت در گروه برون‌تنی و همچنین تخمدان‌های گروه درونی پس از تشریح حیوان، در محلول بوئن فیکس شدند، سپس مراحل آبگیری و قالب‌گیری با پارافین و برش‌گیری انجام شد. برش‌ها به صورت سریالی روی لام فیکس شدند. با توجه به اینکه اندازه هر فولیکول بالغ ۲۵ میکرومتر است، از طرفی ضخامت برش هر نمونه پنج میکرومتر در نظر گرفته شد؛ بنابراین هر پنج مقطع به صورت متناوب روی لام قرار گرفت و بعد از آماده‌سازی آن، نمونه‌ها به روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین^{۱۶} انجام شدند. از مقاطع میکروسکوپی عکس‌برداری شد و ارزیابی میکروسکوپی اندازه سلول‌های تکا و گرانولوزا، طول و عرض تخمدان و شمارش فولیکول‌های سالم و آسیب‌دیده تخمدان، تحت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، توسط نرم‌افزار Image J انجام شد.

مطالعات مولکولی

جهت بررسی بیان ژن‌های BAX و Bcl-2 از روش Real Time PCR استفاده شد. در این روش ابتدا استخراج RNA از بافت تخمدان‌ها توسط کیت شرکت GeneAll انجام شد. تعیین کمیت و خلوص RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ^{۱۷} که به مقدار بسیار کمی از RNA در حد نانوگرم نیاز دارد، انجام شد. برای تعیین کیفیت RNA استخراج‌شده از روش الکتروفورز استفاده شد. به منظور بررسی RNA ژنومیک استخراج‌شده، نمونه حاصل روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز شد. بعد از انجام استخراج، سنتز دی‌ان‌ای مکمل^{۱۸} با استفاده از کیت HyperScript™ RT pre-mix (with Random hexamer) شرکت GeneAll انجام شد. با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت. پس از اتمام تست و به دست آوردن CT‌های ژن رفرنس و ژن مورد نظر از روش $\Delta\Delta CT$ برای محاسبه میزان بیان ژن استفاده شد. میزان بیان هر کدام از ژن‌ها با ژن کنترل داخلی GAPDH^{۱۹} مقایسه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در زیر آورده شده است:

BAX (F) TTCACAGGTTGGCATTAGG

(R) TCAGCCCATCTTCTTCCAG

Bcl-2 (F) CCCTTCGGAGTTTAATCAGA

(R) CCTTCTTCTCGGCAATTTAC

GAPDH (F) AAGGTCATCCCAGAGCTGAA

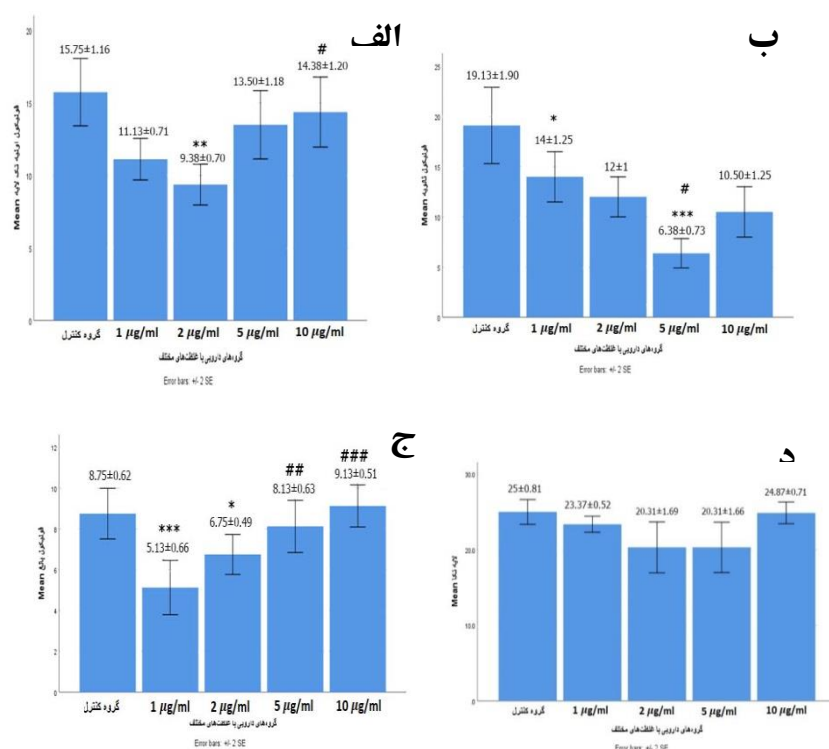
(R) CTGCTTACCACCTTCTTGA

16. Hematoxylin and eosin (H&E stain) or (HE stain)

17. NanoDrop

18. Complementary DNA (cDNA)

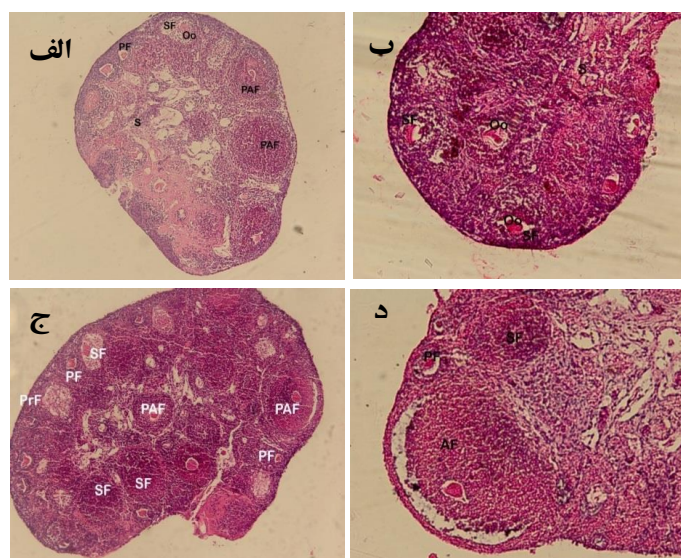
19. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)



تصویر ۱. اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین

الف) تعداد فولیکول‌های اولیه. ** کاهش معنادار در مقایسه با گروه کنترل. # افزایش معنادار در مقایسه با گروه دو میکروگرم بر میلی‌لیتر. ب) تعداد فولیکول‌های ثانویه. * و *** کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل. ## کاهش معنادار نسبت به گروه یک میکروگرم بر میلی‌لیتر. ج) تعداد فولیکول‌های بالغ. * و *** کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل. ## و ### افزایش معنادار نسبت به گروه یک میکروگرم بر میلی‌لیتر. د) اندازه لایه تکا در شرایط برون‌تنی. کاهش معنادار تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه نسبت به گروه کنترل. اندازه لایه تکا تغییر معناداری نشان نداد.

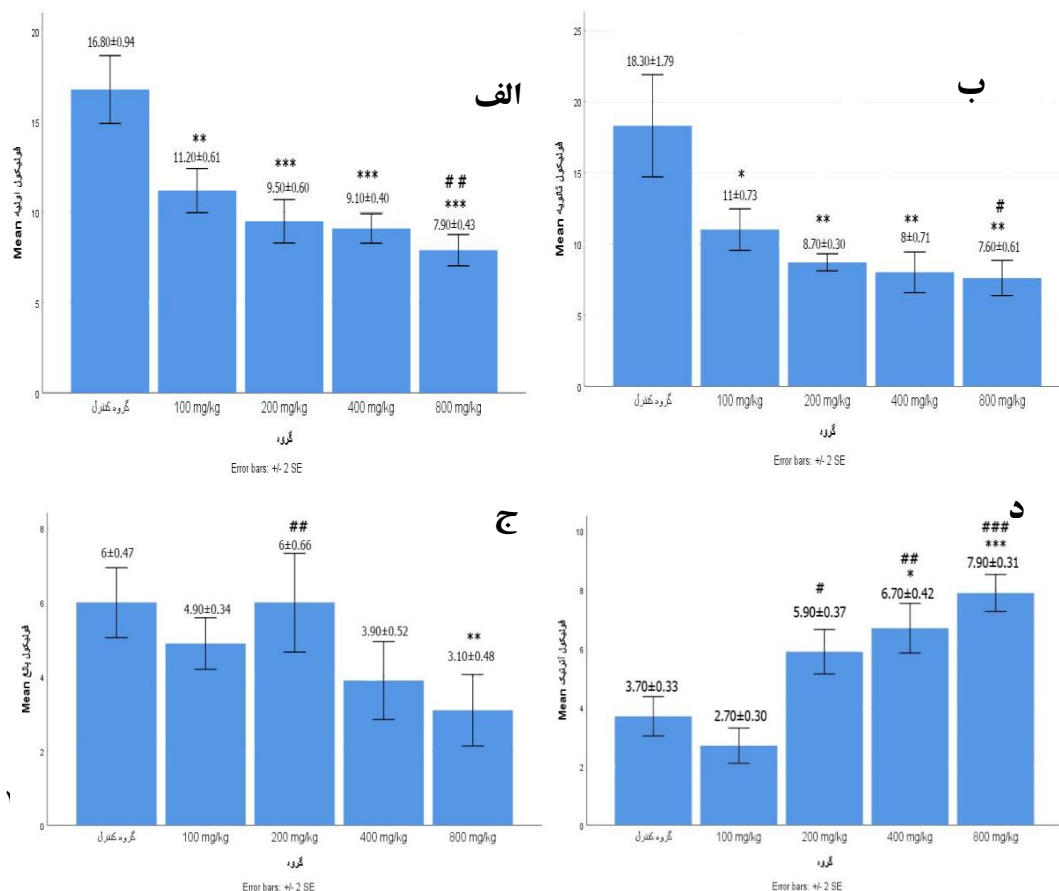
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001



PrF: Primordial Follicle, PF: Primary Follicle, SF: Secondary Follicle, PAF: Preantral Follicle, AF: Antral Follicle, S: stroma, Oo: oocyte

تصویر ۲. تغییرات هیستولوژیکی بافت تخمدان سوری در گروه برون‌تنی.

الف: گروه یک میکروگرم بر میلی‌لیتر، بزرگ‌نمایی: ۱۰X: ساختمان طبیعی تخمدان بدون تغییر در تعداد فولیکول‌ها را نشان می‌دهد. ب: گروه دو میکروگرم بر میلی‌لیتر، بزرگ‌نمایی: ۱۰X: کاهش تعداد فولیکول‌های اولیه را نشان می‌دهد. ج: گروه پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر، بزرگ‌نمایی: ۱۰X: کاهش تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه را نشان می‌دهد. د: گروه ده میکروگرم بر میلی‌لیتر، بزرگ‌نمایی: ۴۰X: افزایش تعداد فولیکول‌های بالغ را نشان می‌دهد.



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۳. اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین

الف) تعداد فولیکول‌های اولیه، * و *** کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل. ## کاهش معنادار نسبت به گروه صد میلی گرم در کیلوگرم. (ب) تعداد فولیکول‌های ثانویه. * و *** کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل. # کاهش معنادار نسبت به گروه صد میلی گرم در کیلوگرم. (ج) تعداد فولیکول‌های بالغ. ** کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل. ## کاهش معنادار نسبت به گروه دویست میلی گرم در کیلوگرم. (د) تعداد فولیکول‌های آترتیک در شرایط درون تنی. * و *** افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل. # و ## و ### به ترتیب افزایش معنادار گروه دویست و چهارصد و هشتصد میلی گرم در کیلوگرم نسبت به گروه صد میلی گرم در کیلوگرم. $P<0.05$ ، $P<0.01$ ، $P<0.001$

لووفلوکساسین، افزایش معنادار را نشان داد (تصویر شماره ۶ الف).

تغییرات بیان ژن‌های BAX و Bcl-2 در گروه درون تنی

نتایج تغییرات بیان ژن‌های BAX و Bcl-2 در گروه درون تنی در سلول‌های تخمدان به این صورت است که با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین میزان بیان ژن‌های BAX و Bcl-2 افزایش معنادار را نشان داد (تصویر شماره ۶ ب).

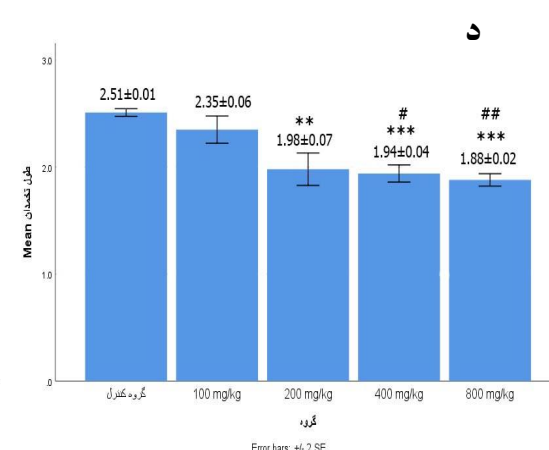
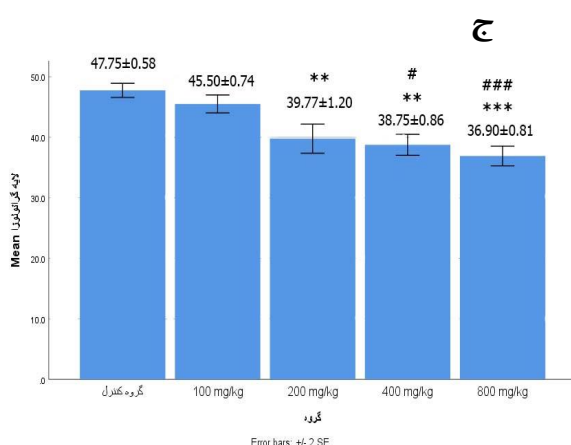
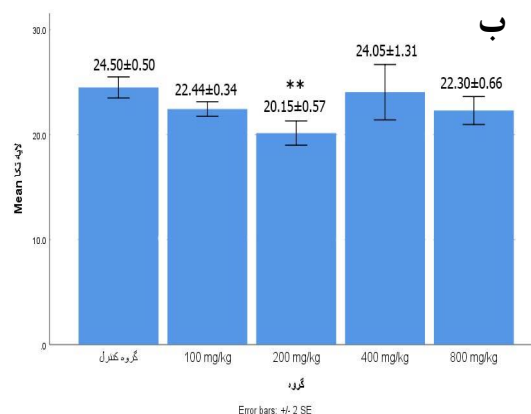
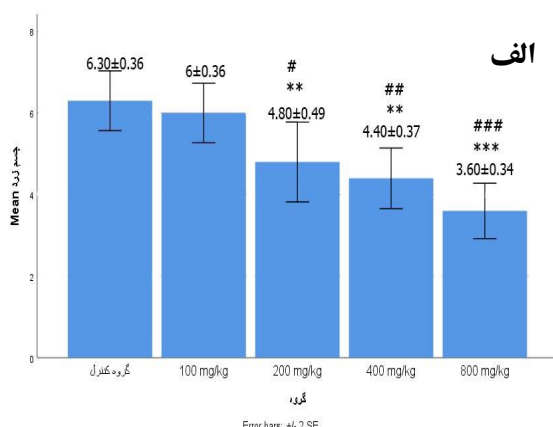
بحث

آپوپتوز نقش مهمی در برخی فرایندهای فیزیولوژیک و همچنین شرایط پاتولوژیک دارد [۱۳]. یکی از این فرایندها آترزی فولیکولی در تخمدان است که دخالت آپوپتوز در این فرایند به اثبات رسیده است. آترزی فولیکولی یک فرایند وابسته به مراحل تکوینی است که قسمت عمده آن در مرحله انتقالی

کرد (تصویر شماره ۴ ب و ج). طول تخمدان نیز به‌طور وابسته به دُز کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل داشت (تصویر شماره ۴ د). در پارانشیم تخمدان در گروه دویست میلی گرم بر کیلوگرم کاملاً افزایش رگ‌های خونی مشاهده شد (تصویر شماره ۵ ب) که این اثرگذاری لووفلوکساسین در گروه‌های چهارصد و هشتصد میلی گرم بر کیلوگرم به صورت افزایش فولیکول‌های آترتیک مشاهده شد (تصویر شماره ۵ ج و د) که این نتایج نشان‌دهنده آسیب‌پذیری قابل توجه بافت تخمدان در دُز هشتصد میلی گرم بر کیلوگرم از آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین است (تصویر شماره ۵).

تغییرات بیان ژن‌های BAX و Bcl-2 در گروه برون تنی

نتایج تجربیات حاضر نشان داد که سطح بیان ژن BAX در سلول‌های تخمدان تحت تیمار با دُزهای مختلف آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین، با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک، کاهش معناداری دارد، در حالی که سطح بیان ژن Bcl-2، با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک



تصویر ۴. اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین

الف) تعداد جسم زرد، ** و *** کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل. # و ## و ### کاهش معنادار نسبت به گروه صد میلی گرم در کیلوگرم. ب) اندازه لایه تکا. ** کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل. ج) اندازه لایه گرانولوزا. ** و *** کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل. # و ### کاهش معنادار نسبت به گروه صد میلی گرم در کیلوگرم. د) طول تخمدان در شرایط درون تنی. ** و *** کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل. # و ## کاهش معنادار نسبت به گروه صد میلی گرم در کیلوگرم. بیشترین کاهش تعداد جسم زرد و اندازه لایه گرانولوزا در گروه هشتصد میلی گرم در کیلوگرم لووفلوکساسین. کاهش معنادار و وابسته به دُز طول تخمدان با افزایش دُز آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

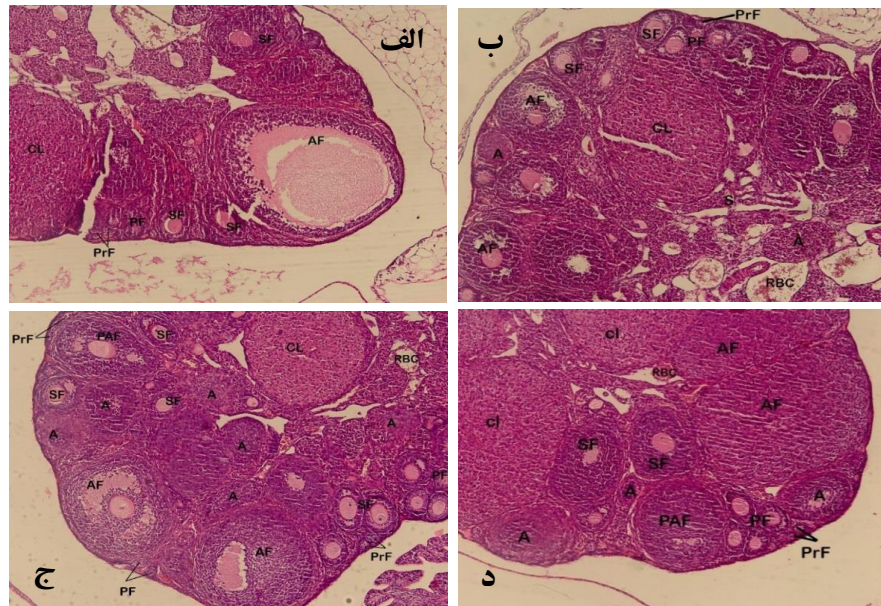
تخمدان آن‌ها بیش بیان شده بود، مهار آپوپتوز سلول فولیکولار و افزایش فولیکولوژنیز دیده شد که نشان‌دهنده این است که سیستم Bcl-2 در تخمدان عمل می‌کند [۱۸]. در این راستا نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در تخمدان‌های گروه برون تنی سطح بیان ژن BAX در سلول‌های تخمدان تحت تیمار با دُزهای مختلف آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین (غلظت‌های یک، دو، پنج و ده میکروگرم بر میلی لیتر)، با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک، کاهش معناداری دارد، در حالی که سطح بیان ژن Bcl-2 افزایش معنادار را نشان داد که می‌تواند بیان‌کننده نقش Bcl-2 در سرکوب آپوپتوز در سلول‌ها و افزایش بقای سلول‌ها در حضور آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین باشد.

از سویی در مطالعه حاضر، تغییرات بیان ژن‌های BAX و Bcl2 در تخمدان‌های گروه درون تنی با افزایش دُز آنتی‌بیوتیک

بین فولیکول‌های پره آنترال و شروع تشکیل آنتروم و در طول تکوین فولیکول‌های تخمدانی اتفاق می‌افتد. آترزی فولیکولی با آپوپتوز سلول‌های گرانولوزای فولیکولی آغاز شده و سپس دیگر ترکیبات فولیکولی دچار مرگ می‌شوند [۱۴، ۱۵].

نشانه‌هایی از القای آپوپتوز توسط آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون در مطالعات مختلف یافت شده است. همچنین مطالعاتی در سال‌های ۲۰۰۱ و ۱۹۹۷ ابراز کرده بودند که داروهای سیتوتوکسیک احتمالاً سیگنال‌های القاکننده آپوپتوز را فعال می‌کنند، زیرا هم بیان BAX و هم آپوپتوز را از طریق گیرنده هیدروکربنی آروماتیکی در اووسیت‌های موش افزایش می‌دهند [۱۶، ۱۷].

ثابت شده است که در موش‌های ترانسژنیک که Bcl-2 در



PrF: Primordial Follicle, PF: Primary Follicle, PAF: Preantral Follicle, SF: Secondary Follicle, AF: Antral Follicle, A: Atretic Follicle, CL: Corpus Luteum, S: stroma, RBC: Red Blood Cell, GC: Granulosa Cell, Cc: Cumulus cell, TC: Theca Cell, Oo: oocyte

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۵. تغییرات هیستولوژیکی بافت تخمدان سوری در گروه درون تنی

الف: گروه صد میلی گرم بر کیلوگرم، بزرگ‌نمایی: ۴۰X: فولیکول‌های اولیه و ثانویه و آنترال و جسم زرد در حد نرمال دیده شد. پارانشیم تخمدان حالت طبیعی دارد. گروه دویست میلی گرم بر کیلوگرم، بزرگ‌نمایی: ۴۰X: میزان فولیکول‌ها نرمال مشاهده شد. در پارانشیم تخمدان افزایش میزان رگ‌های خونی دیده شد. ج: گروه چهارصد میلی گرم بر کیلوگرم، بزرگ‌نمایی: ۱۰X: میزان فولیکول‌های آنتریک افزایش یافته است. د: گروه هشتصد میلی گرم بر کیلوگرم، بزرگ‌نمایی: ۴۰X: بیشترین کاهش تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه و بالغ و همچنین جسم زرد در این گروه دیده شد. اندازه لایه تکا و گرانولوزا کاهش پیدا کرده است. تعداد فولیکول‌های آنتریک به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا کرده است.

خاصیت ضدسرطانی فلوروکینولون‌ها بوده که در آن‌ها نیز افزایش بیان BAX دیده شده است، به طوری که ثابت کردند که فلوروکینولون‌ها از خاصیت آنتی‌بیوتیکی به خاصیت ضدسرطانی تغییر مسیر داده‌اند [۱۳].

همچنین مطالعه سایکوفسکی^{۲۲} و همکاران نشان داد که سیپروفلوکساسین تکثیر سلول‌های Jurkat را در فاز G2/M چرخه سلولی با تأثیر منفی بر تشکیل دوک‌های میتوزی و القای آنیوپلوئیدی مهار می‌کند و می‌تواند باعث بروز آپوپتوز شود [۲۱].

بنابراین با وجود افزایش پروتئین BAX در گروه درون تنی می‌توان این گونه اثبات کرد که از آنجا که افزایش سطوح Bcl2 چه در شرایط برون و درون تنی دیده می‌شود، می‌توان احتمال داد اثرات سیتوتوکسیک این آنتی‌بیوتیک در دژهای یادشده بر تخمدان مؤثر واقع نشده است.

از سوی دیگر، بررسی‌های بافتی در شرایط درون تنی در مطالعه حاضر نشان داد که اندازه لایه گرانولوزا، تعداد جسم زرد و طول تخمدان به‌طور وابسته به دژ نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت که تخریب این لایه را ثابت می‌کند. همچنین در همه گروه‌های تحت تیمار با دژهای مختلف لووفلوکساسین

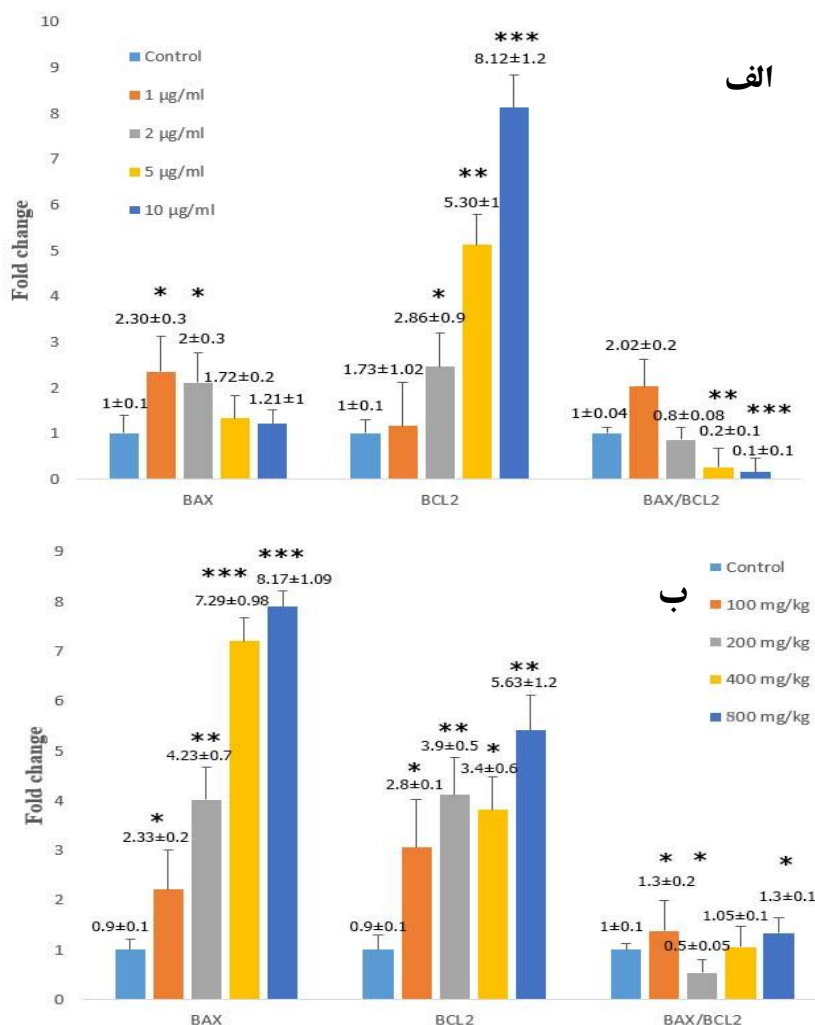
لووفلوکساسین (غلظت‌های صد، دویست، چهارصد و هشتصد میلی‌گرم بر کیلوگرم) افزایش معنادار هر دو ژن را نشان داد. در این پژوهش مشاهده شد که با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین، بیان BAX در گروه برون تنی کاهش پیدا می‌کند، در حالی که در گروه درون تنی افزایش معنادار داشت که نشان‌دهنده احتمال اثر آپوپتوزی این آنتی‌بیوتیک در شرایط درون تنی است.

در تأیید نتایج سیتوتوکسیک آنتی‌بیوتیک‌ها، بروک^{۲۰} و همکارانش بر سلول‌های ملانوما COLO829 نشان دادند که تیمار با لومفلوکساسین^{۲۱} بقای سلولی را از طریق شکست غشای میتوکندریایی در روشی وابسته به دژ و زمان در فاز S و G2/M با مهار توپوایزومراز نوع ۲ کاهش می‌دهد [۱۹].

هم‌راستا با مطالعه حاضر در فعال شدن مسیر میتوکندریایی آپوپتوز، یانگ و همکاران نشان دادند که لووفلوکساسین با کاهش کلژن نوع ۲ در سلول‌های هسته پالپوسوس موش صحرایی در شرایط آزمایشگاهی از طریق فعال‌سازی مسیر BAX/Bcl-2/cas-3، اثرات محرومیت از سرم را بر Anoikis افزایش می‌دهد [۲۰]. همچنین گزارش‌های زیادی در سال‌های اخیر نشان‌دهنده

22. Tsvikovskii

20. Beberok
21. Lomefloxacin



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۶. افزایش غلظت آنتی بیوتیک لووفلوکساسین

الف) تغییرات بیان ژنهای BAX و Bcl2 و نسبت بیان BAX/Bcl2 در تخمدانهای گروه برون تنی، تحت تیمار با غلظت های یک، دو، پنج و ده میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک لووفلوکساسین. کاهش معنادار BAX و افزایش Bcl2 و تغییرات بیان ژنهای BAX و Bcl2 و نسبت بیان BAX/Bcl2 در تخمدانهای گروه درون تنی، تحت تیمار با غلظت های صد، دویست، چهارصد و هشتصد میلی گرم بر کیلوگرم آنتی بیوتیک لووفلوکساسین. افزایش معنادار هر دو ژن با افزایش دوز آنتی بیوتیک لووفلوکساسین. * تغییرات معنادار نسبت به گروه کنترل

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

فولیکول آترتیک قابل مشاهده است. بیشترین اثر مخرب در پارانشیم تخمدان در گروه دویست میلی گرم بر کیلوگرم مشهود بود که افزایش رگ های خونی دیده شد.

اما در این مطالعه در شرایط برون تنی مشاهده شد که در روند تکوین فولیکول اولیه میان گروه دارویی با غلظت دو میکروگرم بر میلی لیتر و گروه کنترل، کاهش معناداری در سطح ۰/۰۱ و نیز میان همین گروه و گروه ده میکروگرم بر میلی لیتر افزایش معناداری در سطح ۰/۰۵ وجود دارد.

این نتایج حاکی از آن است که دوز دو میکروگرم بر میلی لیتر، احتمالاً آپوپتوز را در این مرحله فولیکولی القا کرده و جمعیت این

نسبت به گروه کنترل به طور معناداری اندازه لایه تکا کاهش پیدا کرده بود و بیشترین میزان کاهش در دوز دویست میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد.

همچنین در این دوز بالاترین میزان فولیکول بالغ مشاهده شده است، به طوری که می توان گفت دوز دویست میلی گرم بر کیلوگرم تعداد این فولیکول های بالغ را در حد گروه کنترل حفظ کرده بود و به بیان دیگر، تغییر معناداری نسبت به گروه کنترل نداشت. همچنین کاهش فولیکول اولیه و ثانویه به ترتیب با افزایش غلظت دارو مشاهده شد، به طوری که در گروه تحت تیمار با دوز هشتصد میلی گرم بر کیلوگرم کمترین تعداد این فولیکول ها وجود داشت، ولی بالعکس آن با افزایش غلظت لووفلوکساسین افزایش غلظت

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، این مقاله را تأیید کرده است (کد اخلاق: IR.IAU.SRB.REC.1398.012).

حامی مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان به یک اندازه در طراحی، تدوین و اجرای پژوهش مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

سلول‌ها را کاهش داده است. همچنین اگرچه تعداد فولیکول‌های ثانویه به‌طور وابسته به دُز کاهش یافته است، اما بیشترین کاهش در دُز پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. نتایج این بررسی همچنین نشان داد که تعداد فولیکول بالغ به‌طور وابسته به دُز افزایش یافته است، به طوری که در دُز ده میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین تعداد این فولیکول‌ها وجود دارد، اما در ساختار لایه تکا تفاوت معناداری مشاهده نشد؛ بنابراین می‌توان اثرات تخریب بافتی را چه در شرایط برون‌تنی و چه درون‌تنی تأیید کرد.

در تأیید مطالعات بافت‌شناسی تحقیق حاضر ارتباط مستقیم آنها با بیان پروتئین‌های آپوپتوزی، واسکیو و همکارانش نیز نشان دادند خانواده BAX و Bcl-2 در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های در حال رشد بیان می‌شوند، اما هیچ‌یک از این پروتئین‌ها در فولیکول‌های نخستین وجود ندارند، اما بیان BAX از مرحله فولیکول اولیه به بعد مشهود است و بیان Bcl-2 در برخی از فولیکول‌های ثانویه و در تمام فولیکول‌های آنترال بیان می‌شود [۲۲]. رابلس و همکاران نیز ابراز کردند که فاکتور فعال‌کننده پروتئاز آپوپتوزی-۳۱ نیز در سلول‌های گرانولوزا بیان می‌شود و توسط خانواده Bcl-2 میانجی‌گری‌کننده رهاسازی سیتوکروم سی^{۲۴} فعال می‌شود [۲۳].

همچنین هم‌راستا با این مطالعه، تزریق سیپروفلوکساسین به صورت هفتگی در دُز یک میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن خرگوش‌های آلبینو به مدت چهار هفته، باعث کاهش معنادار وزن تخمدان خرگوش‌ها و همچنین تغییرات هیستولوژیک واضح، از جمله همورازی و متلاشی شدن دیواره تخمدان و کاهش تعداد فولیکول‌ها شد [۴].

بنابراین می‌توان گفت در مطالعه حاضر کاهش فولیکول‌های اولیه و ثانویه و افزایش فولیکول‌های بالغ ناشی از لووفلوکساسین شرایط پیش آپوپتوزی را فراهم می‌کند که البته از سوی دیگر، بیان بالای پروتئین Bcl-2 با آن مخالفت می‌کند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که در معرض قرار گرفتن با آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین می‌تواند در دُزهای بالا منجر به آسیب به سیستم تولید مثل ماده شود، به طوری که در دُز هشتصد میلی‌گرم بر کیلوگرم لووفلوکساسین، بیشترین کاهش در تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه و تعداد جسم زرد را نشان داد و در مقابل به‌طور چشم‌گیری فولیکول‌های آترتیک را افزایش داد. افزایش پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 در تخمدان، نشان‌دهنده عدم القای آپوپتوز در سلول‌های سالم تخمدان در دُزهای بالا است که امید استفاده ایمن‌تر از آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون، از جمله لووفلوکساسین را تقویت می‌کند.

23. Apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1)
24. Cytochrome c

References

- [1] Kim MR, Tilly JL. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1644(2-3):205-10. [DOI:10.1016/j.bbamcr.2003.10.012]
- [2] Zhao X, Xu C, Domagala J, Drlica K. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: A strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(25):13991-6. [DOI:10.1073/pnas.94.25.13991]
- [3] Dogan Z, Cetin A, Elibol E, Vardi N, Turkoz Y. Effects of ciprofloxacin and quercetin on fetal brain development: A biochemical and histopathological study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019; 32(11):1783-91. [DOI:10.1080/14767058.2017.1418222]
- [4] Mohammad JE, Hasnawi NM. The effect of ciprofloxacin (CPX) on the histological structure of albino rabbit ovary. *J Glob Pharma Technol*. 2018; 10(03):498-508. https://www.researchgate.net/publication/331024699_The_Effect_of_Ciprofloxacin_CPX_on_the_Histological_Structure_of_Albedo_Rabbit_Ovary
- [5] Yu M, Li R, Zhang J. Repositioning of antibiotic levofloxacin as a mitochondrial biogenesis inhibitor to target breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 471(4):639-45. [DOI:10.1016/j.bbrc.2016.02.072]
- [6] Song M, Wu H, Wu S, Ge T, Wang G, Zhou Y, et al. Antibiotic drug levofloxacin inhibits proliferation and induces apoptosis of lung cancer cells through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biomed Pharmacother*. 2016; 84:1137-43. [DOI:10.1016/j.biopha.2016.10.034]
- [7] Phiboonchaiyanan PP, Kiratipaiboon C, Chanvorachote P. Ciprofloxacin mediates cancer stem cell phenotypes in lung cancer cells through caveolin-1-dependent mechanism. *Chem Biol Interact*. 2016; 250:1-11. [DOI:10.1016/j.cbi.2016.03.005]
- [8] Avery B, Hay-Schmidt A, Hyttel P, Greve T. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to in vitro maturation. *Mol Reprod Dev*. 1998; 50(3):334-44. [DOI:10.1002/(SICI)1098-2795(199807)50:3<334::AID-MRD10>3.0.CO;2-4]
- [9] Amsterdam A, Sasson R, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Rimon E, et al. Alternative pathways of ovarian apoptosis: Death for life. *Biochem Pharmacol*. 2003; 66(8):1355-62. [DOI:10.1016/S0006-2952(03)00485-4]
- [10] Bayir H, Kagan VE. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis—there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care*. 2008; 12(1):206. [DOI:10.1186/cc6779]
- [11] Broadhead ML, Dass CR, Choong PFM. Cancer cell apoptotic pathways mediated by PEDF: Prospects for therapy. *Trends Mol Med*. 2009; 15(10):461-7. [DOI:10.1016/j.mol-med.2009.08.003]
- [12] Asgharzadeh S, Mirshokraei P, Hassanpour H, Ahmadi E, Nazari H. The effect of mesenchymal stem cells as co-culture in in vitro nuclear maturation of ovine oocytes. *Animal Science Papers and Reports*. 2015; 33(3):223-32. <http://eprints.skums.ac.ir/6527/1/109.pdf>
- [13] Yadav V, Talwar P. Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth. *Biomed Pharmacother*. 2019; 111:934-46. [DOI:10.1016/j.biopha.2018.12.119]
- [14] Mazoochi T, Ehteram M. [Apoptosis in the ovary and follicular atresia (Persian)]. *J Kashan Univ Med Sci*. 2018; 22(1):112-9. <http://eprints.kaums.ac.ir/3275/>
- [15] Johnson AL. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*. 2003; 78(3-4):185-201. [DOI:10.1016/S0378-4320(03)00090-3]
- [16] Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nat Med*. 1997; 3(11):1228-32. [DOI:10.1038/nm1197-1228]
- [17] Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlegelinger JJ, Ryu HY, et al. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet*. 2001; 28(4):355-60. [DOI:10.1038/ng575]
- [18] Leo CP, Hsu SY, Chun SY, Bae HW, Hsueh AJ. Characterization of the antiapoptotic Bcl-2 family member myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) and the stimulation of its message by gonadotropins in the rat ovary. *Endocrinology*. 1999; 140(12):5469-77. [DOI:10.1210/endo.140.12.7171]
- [19] Beberok A, Wrzeński D, Szlachta M, Rok J, Rzepka Z, Respondek M, et al. Lomefloxacin induces oxidative stress and apoptosis in COLO829 melanoma cells. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(10):2194. [DOI:10.3390/ijms18102194]
- [20] Yang SD, Bai ZL, Zhang F, Ma L, Yang DL, Ding WY. Levofloxacin increases the effect of serum deprivation on anoikis of rat nucleus pulposus cells via Bax/Bcl-2/caspase-3 pathway. *Toxicol Mech Methods*. 2014; 24(9):688-96. [DOI:10.3109/15376516.2014.963772]
- [21] Tsvikovskii R, Sabet M, Tarazi Z, Griffith DC, Lomovskaya O, Dudley MN. Levofloxacin reduces inflammatory cytokine levels in human bronchial epithelia cells: Implications for aerosol MP-376 (levofloxacin solution for inhalation) treatment of chronic pulmonary infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011; 61(2):141-6. [DOI:10.1111/j.1574-695x.2010.00755.x]
- [22] Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, te Velde ER, et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: Apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(7):3421-9. [DOI:10.1210/jcem.86.7.7679]
- [23] Robles R, Tao XJ, Trbovich AM, Maravei DV, Nahum R, Perez GI, et al. Localization, regulation and possible consequences of apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) expression in granulosa cells of the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999; 140(6):2641-4. [DOI:10.1210/endo.140.6.6931]

This Page Intentionally Left Blank