



اثر انروفلوکسازین بر تغییرات ظاهری، میکروسکوپی و هیستوشیمیایی غضروف مفصلی بره

کاوه خزائیل^{۱*}، یزدان مظاهری^۱، محمود هاشمی تبار^۲، حسین نجف‌زاده^۱، حسن مروتی^۲، علیرضا قدردان^۴

۱- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

۳- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

*مسئول مکاتبات: k.khazaeil@scu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۰

چکیده

استفاده از فلوروکینولون‌ها به مدت بیش از دو هفته و خصوصاً با دوزهای بالا سبب ایجاد تغییراتی در غضروف مفصلی می‌گردد. با توجه به استفاده نسبتاً زیاد از انروفلوکسازین در گله‌های گوسفندی، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر انروفلوکسازین بر برخی تغییرات غضروف مفصلی بره‌های در حال رشد انجام گردید تا برخی مکانیسم‌های احتمالی مؤثر در ایجاد این تغییرات ارزیابی شود. در این تحقیق ۱۲ رأس بره نر به سن حدود ۲ ماه به سه گروه تقسیم شدند که شامل گروه کنترل که فقط تزریق سرم فیزیولوژی داشت، گروه درمانی که انروفلوکسازین را روزانه ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۵ روز به صورت تزریق زیر پوستی دریافت کرد و گروه توکسیک انروفلوکسازین را مشابه با گروه درمانی ولی با دوز ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمود. ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، دام‌ها ذبح شدند و مفصل استایفل تشریح گردید. بعد از ارزیابی ماکروسکوپی، جهت مطالعات میکروسکوپی نمونه برداری شد. مقاطع بافتی غضروف مفصلی تهیه شده از نظر مورفومتری و هیستوشیمی بررسی گردید. تغییرات ماکروسکوپی از جمله ایجاد فلاپ‌های غضروفی در گروه توکسیک مشاهده شد. تغییرات میکروسکوپی شامل حضور سلول‌های دوکی شکل و حفره در ماده زمینه‌ای، کاهش ضخامت کلی غضروف، کم شدن تعداد کندروسیت‌ها و افزایش تعداد لاکونا‌های خالی و کاهش پروتوگلیکان‌ها و قندهای ماده زمینه‌ای در گروه توکسیک قابل مشاهده بود. در گروه درمانی برخی از این تغییرات با شدت کمتری نسبت به گروه توکسیک مشاهده گردید. نتایج این مطالعه نشان داد مصرف انروفلوکسازین در بره‌های در حال رشد حتی با دوز درمانی توصیه شده، از نظر ایجاد تغییرات در غضروف مفصلی کاملاً هم‌بی‌خطر نیست.

کلمات کلیدی: انروفلوکسازین، غضروف مفصلی، بره، تغییرات میکروسکوپی

مقدمه

اتصال نظیر فیبرونکتین تشکیل می‌دهد و فنوتیپ سلول‌ها نیز توسط سنتز، رسوب‌گذاری و نگهداری مولکول‌های ماده زمینه‌ای مشخص می‌شود [۲۲]. انروفلوکسازین که با نام تجاری بای‌تریل (Baytril) شناخته می‌شود [۱]، آنتی‌بیوتیکی صنعتی از دسته فلوروکینولون‌ها و اولین دارو از این گروه بوده که به طور اختصاصی جهت مصرف دامپزشکی عرضه گردید [۲]. انروفلوکسازین یکی از بهترین داروها در درمان سالمونلوز و عفونت‌های تنفسی خصوصاً در نشخوار

غضروف مفصلی که از نظر بافت‌شناسی غضروف شفاف محسوب می‌شود، بافت بسیار تخصص یافته‌ای است که باعث تشکیل سطحی صاف در مفصل می‌شود و دارای ماده زمینه‌ای عاری از رگ خونی، رگ لنفاوی و عصب است. ماده زمینه‌ای توسط کندروسیت‌ها که تنها سلول‌های موجود در غضروف هستند، ساخته می‌شود [۸]. اکثر مولکول‌های ماده زمینه‌ای را موادی نظیر کلاژن‌ها به ویژه کلاژن نوع II، پروتوگلیکان‌های غیرکلاژنی، آگریکن (Agrican) و گلیکوپروتئین‌های



مواد و روش کار

۱۲ رأس بره نر به سن تقریباً ۲ ماه از یکی از گله‌های اطراف اهواز خریداری گردید. با پرسش‌های صورت گرفته دقت شد تا دام‌هایی تهیه گردند که سابقه بیماری و دارو درمانی خصوصاً دریافت آنتی بیوتیک نداشته باشند. دام‌های خریداری شده به مدت یک هفته در یکی از اصطبل‌های بیمارستان دانشکده دامپزشکی اهواز نگهداری شدند و در طول این مدت علائم بالینی روزانه کنترل می‌گردید. پس از حصول اطمینان نسبی از سالم بودن دام‌ها و عادت کردن آن‌ها به محیط، گروه بندی بره‌ها جهت مطالعه انجام شد. بدین ترتیب سه گروه که هر کدام شامل ۴ رأس بود به ترتیب زیر مشخص گردید.

گروه ۱: گروه کنترل که روزانه تزریق سرم فیزیولوژی استریل برای آن‌ها انجام می‌شد.

گروه ۲: روزانه ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (دوز درمانی) انروفلوکساسین به صورت زیرپوستی به آن‌ها تزریق می‌شد.

گروه ۳: روزانه ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم انروفلوکساسین به صورت تزریق زیر پوستی دریافت می‌کرد.

تزریقات ۱۵ روز متوالی انجام شد و در طول این مدت روزانه وضعیت راه رفتن دام‌ها، علائم بالینی و وزن دام‌ها کنترل می‌گردید. ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، دام‌ها ذبح شده و بلافاصله پس از آن، مفصل استایفل تشریح شده و غضروف مفصلی انتهایی پائینی ران و انتهای بالایی درشت نی مورد مطالعه ظاهری قرار گرفت. سپس تکه‌هایی از غضروف مفصلی همراه با استخوان زیر غضروف (Subchondral bone) هم برداشته شد و جهت مطالعه بافت‌شناسی به ظروف نگهداری نمونه حاوی فرمالین بافر ۱۰٪ منتقل گردید. ۲۴ ساعت پس از نمونه‌گیری، فرمالین بافر روی نمونه‌ها تعویض شد. بعد از ۲ هفته و پس از اطمینان از ثبوت نمونه‌ها، کار کلسیم‌گیری آغاز گردید. از محلول اسیدفرمیک ۵٪ به مدت ۲ هفته جهت کلسیم‌گیری نمونه‌ها استفاده شد. محلول کلسیم‌گیری در طول این مدت روزانه تعویض می‌گردید. پس از آزمایش

کنندگان بوده و جهت از بین بردن باکتری‌های گرم منفی، بعضی از باکتری‌های گرم مثبت و مایکوپلاسماها به کار می‌رود. استفاده از انروفلوکساسین خصوصاً در دام‌های جوان با تغییراتی در غضروف همراه است [۲].

مطالعات در موجودات زنده نشان داده که استفاده از فلوروکینولون‌ها به مدت بیش از دو هفته و خصوصاً با غلظت‌های بالا در موش صحرایی و سگ‌های نابالغ، با تغییراتی در غضروف مفصلی همراه بوده است [۹]. تجویز فلوروکینولون‌ها به صورت سیستمیک به میزان بیش از پنج برابر دوز توصیه شده کارخانه سازنده دارو تغییراتی در غضروف ایجاد کرده است [۵].

تحقیقات انجام گرفته تا به حال مکانیسم‌ها و مسیرهای مختلفی را در ایجاد تغییرات غضروفي متعاقب مصرف فلوروکینولون‌ها موثر دانسته‌اند اما هنوز هیچ کدام به عنوان یک عامل قطعی مورد تأیید قرار نگرفته‌اند. آنچه که اکثر مطالعات [۶، ۹، ۱۹] بر آن تأکید داشته‌اند این بوده که کمبود منیزیم در غضروف مفصلی به دلیل شلاته شدن یون‌های منیزیم با فلوروکینولون‌ها بوده است. اما به هر حال مکانیسم دقیق عوارض این داروها بر غضروف همچنان به خوبی شناخته نشده است [۱۹]. از این رو نظر به اهمیت گوسفند به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع دامی کشور و با توجه به استفاده نسبتاً زیاد از انروفلوکساسین جهت درمان و حتی کنترل و پیشگیری از عفونت‌های باکتریایی و مایکوپلاسمایی در گله‌های گوسفندی و همچنین به دلیل شباهت گوسفند با انسان از نظر تکامل اسکلتی، بیومکانیک و چرخه‌های فعالیت اسکلتی [۲۳]، گوسفند جهت این مطالعه انتخاب شد.

هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر انروفلوکساسین به عنوان پرمصرف‌ترین فلوروکینولون دامپزشکی [۱] با دوز و طول دوره مصرف طراحی شده در این پروژه در غضروف مفصلی بره‌های در حال رشد بررسی گردید. همچنین برخی از مکانیسم‌های احتمالی مؤثر در این فرآیند با بررسی میکرومتری و هیستوشیمی نمونه‌های بافتی غضروف مفصلی مورد مطالعه قرار گرفت.



نهایت نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش گردید. جهت مقایسه متغیرهای مورد نظر بین گروه‌های مختلف مورد آزمایش از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و سپس آزمون LSD استفاده شد. اختلاف میانگین بین گروه‌های مختلف در سطح $0/05 < p$ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

نتایج بررسی ظاهری: ارزیابی ظاهری دام‌ها در طول مدت اجرای پژوهش، تغییرات خاصی را نشان نداد. با مقایسه میانگین وزن بدن دام‌ها در دوره تزریقات، اختلاف معنی‌داری در گروه‌های آزمایشی دیده نشد (جدول ۱). مشاهده و کنترل روزانه دام‌ها در گروه‌های مختلف، تغییرات بالینی خاصی از قبیل تغییر در نحوه راه رفتن دام، حرکت غیرطبیعی و یا لنگش را نشان نداد.

جدول ۱- مقایسه میانگین \pm انحراف معیار وزن بدن دام‌ها در

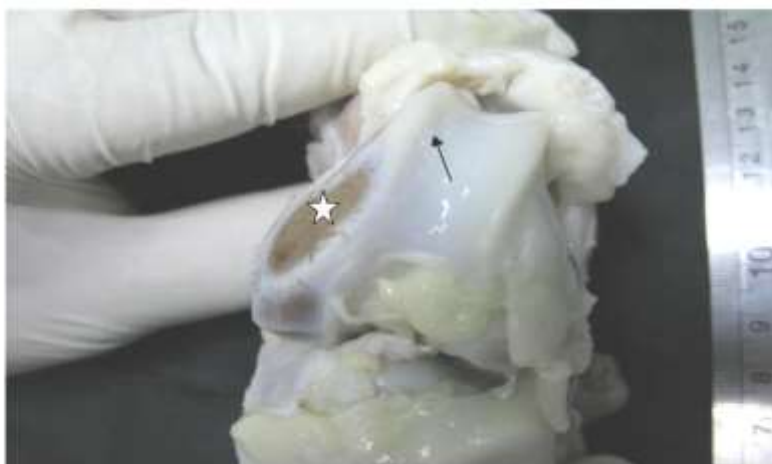
گروه‌های آزمایشی در دوره تزریقات	
گروه‌ها	وزن بدن (کیلوگرم)
کنترل	$6/67 \pm 0/20$
درمانی	$6/60 \pm 0/19$
توکسیک	$6/50 \pm 0/19$

در بررسی ظاهری مفصل استایفل در هیچ یک از گروه‌ها علائمی از قبیل تورم، افزایش مایع مفصلی و خونریزی دیده نشد. مطالعه ماکروسکوپی غضروف مفصلی در گروه کنترل، ساختار طبیعی و بدون هیچ‌گونه ضایعه‌ای را نشان داد. همچنین در گروه دریافت‌کننده دوز درمانی انروفلوکساسین در مقایسه با گروه کنترل، تغییرات ماکروسکوپی در غضروف مفصلی مشاهده نگردید (شکل ۱). اما در گروه توکسیک، تغییراتی از قبیل کنده شدن قطعاتی از سطح غضروف مفصلی، فلاپ‌های غضروفی، گودشدگی و ایجاد حفره در سطح غضروف مفصلی انتهای پایینی ران (شکل ۲) و انتهای بالایی درشت‌نی (شکل ۳) دیده شد.

کلسیم‌گیری [۴] و اطمینان از انجام آن، جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی از نمونه‌ها با روش استاندارد عمل گردید. بدین ترتیب برش‌هایی به ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر تهیه گردید و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین بر روی آن‌ها انجام شد [۴]. پس از رنگ‌آمیزی، مقاطع میکروسکوپی آماده شده جهت مطالعه ساختار هستیومورفولوژی و هستیومورفومتری غضروف مفصلی بره و مقایسه آن در گروه‌های مختلف آزمایشی، مورد بررسی قرار گرفتند و با استفاده از لنز عکس‌برداری میکروسکوپی دیجیتال Dinocapture تصاویر مورد نظر تهیه گردید. برای مطالعه مورفومتری از عدسی چشمی مدرج، اسلاید کالیبره و میکروسکوپ الیمپوس استفاده شد. برای تعیین فاصله خطوط عدسی چشمی در هر یک از بزرگنمایی‌ها نیز از اسلاید کالیبره استفاده گردید. در این مطالعه مواردی همچون تعیین ضخامت هر کدام از لایه‌های بافتی غضروف مفصلی و ضخامت کلی آن، تخمین نسبت ماده زمینه‌ای به سلول‌های غضروفی در لایه‌های مختلف، شمارش تعداد سلول‌های غضروفی در هر لایه و شمارش لاکونا‌های خالی در هر لایه مدنظر بود. برای شمارش و اندازه‌گیری هر یک از پارامترهای مورد مطالعه، حداقل پنج مقطع بافتی از هر نمونه بررسی می‌شد و در هر مقطع پنج فیلد میکروسکوپی لحاظ می‌گردید و بدین ترتیب میانگین آن‌ها برای هر پارامتر محاسبه می‌شد. کلیه مقاطع توسط دو نفر به روش کور بررسی می‌گردید. جهت انجام مطالعه هیستوشیمی، رنگ‌آمیزی اختصاصی پرئودیک اسید شیف (PAS) برای بررسی میزان قندها در ماده زمینه‌ای غضروف مفصلی [۲۱] و رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو جهت مقایسه میزان پروتئوگلیکان‌ها [۱۹] استفاده گردید. برای ارزیابی مقاطع هیستوشیمی از روش درجه-بندی و کمی‌سازی نسبی [۱۹، ۲۱] استفاده شد. بدین ترتیب با اختصاص یک درجه برای هر مقطع مشاهده شده، نهایتاً میانگین آن‌ها برای یک نمونه ثبت می‌گردید. داده‌های به دست آمده با کمک نسخه‌ی شماره ۱۷ نرم-افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در



شکل ۱- غضروف های مفصلی انتهای پایینی ران (راست) و انتهای بالایی درشت نی (چپ) در گروه درمانی مشابه با گروه کنترل تغییرات ظاهری خاصی مشاهده نمی شود.



شکل ۲- نمای جلویی پایینی غضروف مفصلی فرقره انتهای پایینی ران در گروه توکسیک کنده شدن قطعه هایی از سطح غضروف و ایجاد فلاپ (پیکان) دیده می شود. (☆) محل نمونه برداری بافت شناسی است.



شکل ۳- نمایی نزدیک از غضروف مفصلی کندیل میانی انتهای بالایی درشت نی در گروه توکسیک. کنده شدن قطعه ای از غضروف (پیکان بزرگ) و ایجاد حفره های کوچک و متعدد (پیکان های کوچک) در سطح غضروف مشهود است.



عمقی کاهش تعداد سلول‌ها فقط در گروه توکسیک نسبت به دو گروه دیگر معنی‌دار بود ($p < 0/05$). از طرفی در لایه آهکی تریق انروفلوکسازین سبب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌ها در گروه‌های درمانی ($p < 0/05$) و توکسیک ($p = 0/01$) نسبت به گروه کنترل شده بود. گروه‌های درمانی و توکسیک هم نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند (جدول ۲).

همچنان که در شکل‌های ۷ و ۸ مشاهده می‌گردد، تجویز انروفلوکسازین باعث افزایش تعداد لاکونا‌های خالی شمارش شده در واحد سطح در گروه‌های درمانی و توکسیک شد. افزایش تعداد لاکونا‌های خالی در لایه‌های سطحی و عمقی غضروف مفصلی در گروه توکسیک فقط نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < 0/05$). در حالی که در لایه میانی این اختلاف بین تمام گروه‌ها به صورت معنی‌دار مشاهده گردید ($p = 0/003$).

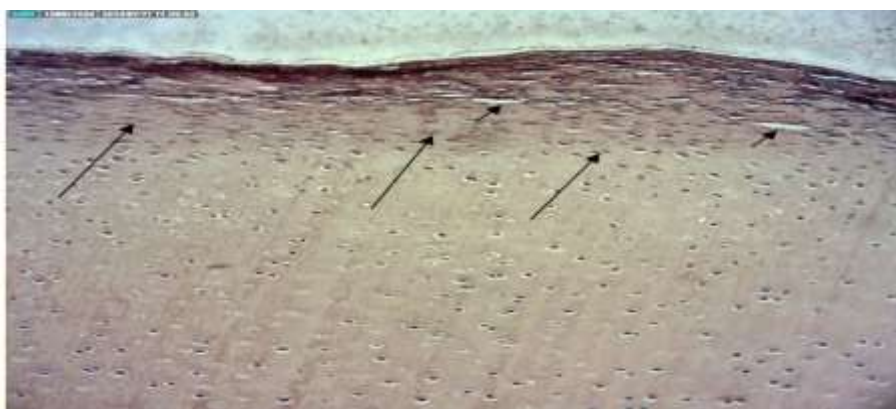
بررسی نسبت ماده زمینه‌ای غضروف مفصلی به سلول‌های غضروفی در لایه‌های مختلف غضروف مفصلی بره در گروه‌های آزمایشی نیز انجام گردید (جدول ۲). لایه آهکی بیشترین نسبت و لایه سطحی کمترین نسبت ماده زمینه‌ای به سلول را به خود اختصاص دادند. به عبارت دیگر این نسبت از سطح به عمق غضروف مفصلی افزایش یافت. با تجویز انروفلوکسازین در گروه‌های درمانی و توکسیک، اختلاف معنی‌داری در نسبت ماده زمینه‌ای به سلول‌های غضروفی در لایه‌های سطحی و میانی مشاهده نگردید ($p < 0/05$). اما در لایه‌های عمقی و آهکی، افزایش معنی‌دار این نسبت در گروه توکسیک نسبت به گروه‌های درمانی و کنترل مشاهده شد.

نتایج میکروسکوپی: غضروف مفصلی بره از نظر بافت‌شناسی در گروه کنترل شامل چهار ناحیه سطحی، میانی، عمقی و آهکی بود (شکل ۴). مطالعه هیستومورفولوژی نمونه‌ها در گروه درمانی، ایجاد حفرات متعدد در لایه سطحی غضروف مفصلی و تعداد زیادی سلول‌های دوکی شکل در بخش بالایی لایه میانی را نشان می‌داد (شکل ۵). در گروه توکسیک، تغییرات نسبت به گروه درمانی بیشتر و شدیدتر بود. کنده شدن بخش‌هایی از لایه سطحی غضروف مفصلی، تخریب وسیع در ماده زمینه‌ای غضروف به صورت ایجاد شکاف و حفره‌های بزرگ و دوکی شدن کندروسیت‌ها در لایه میانی مشاهده گردید (شکل ۶).

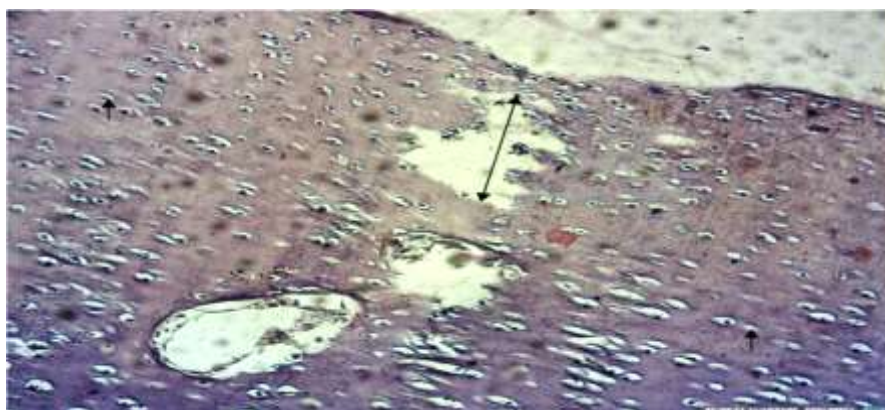
نتایج هیستومورفومتری مقاطع بافتی نمونه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. همان طور که در جدول مشاهده می‌گردد تریق انروفلوکسازین سبب کاهش ضخامت کلی غضروف مفصلی در گروه‌های درمانی و توکسیک نسبت به گروه کنترل شد که این کاهش در گروه توکسیک نسبت به دو گروه دیگر معنی‌دار بود اما در گروه درمانی در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود. در مورد ضخامت هر کدام از لایه‌های بافتی غضروف مفصلی نیز در گروه توکسیک، کاهش معنی‌دار ضخامت در لایه میانی نسبت به گروه‌های کنترل و درمانی ($p < 0/0001$) و در لایه آهکی نسبت به گروه کنترل ($p < 0/05$) مشاهده گردید. مقایسه ضخامت لایه‌های سطحی و عمقی هم اختلاف معنی‌داری را در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان نداد. همچنین تجویز انروفلوکسازین در گروه‌های درمانی و توکسیک به صورت معنی‌دار سبب کاهش تعداد سلول‌ها در لایه‌های سطحی و میانی شد ($p = 0/002$) اما در لایه



شکل ۴- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه کنترل (H & E, $\times 4$). الف: لایه سطحی، ب: لایه میانی، ج: لایه عمقی، د: لایه آهکی، ن: استخوان زیر غضروف



شکل ۵- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه درمانی (H & E, $\times 10$). ایجاد حفره‌های متعدد در لایه سطحی (پیکان‌های کوچک) و سلول‌های دوکی شکل (پیکان‌های بزرگ) در بخش بالایی لایه میانی مشهود است.



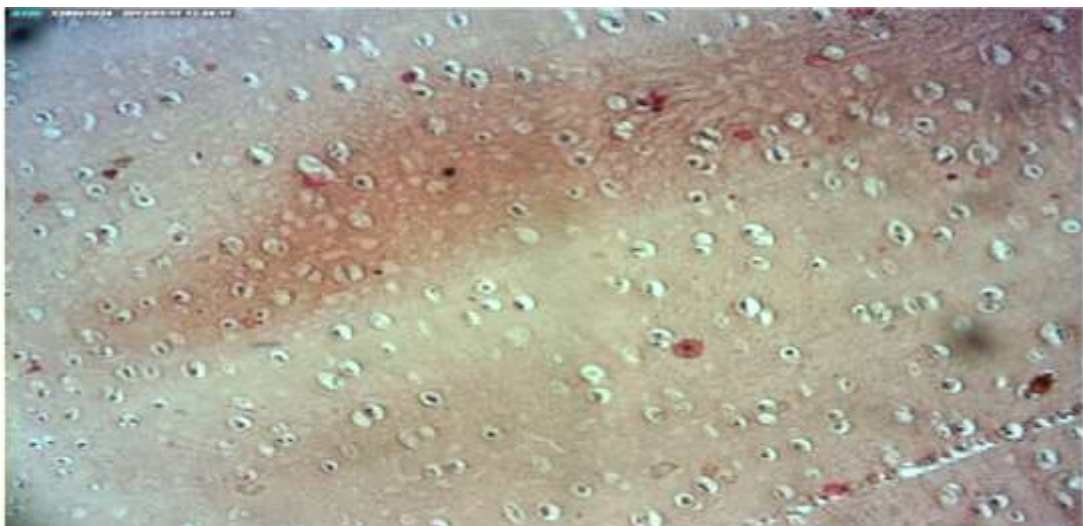
شکل ۶- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه توکسیک (H & E, $\times 10$). تخریب در ماده زمینه ای غضروف، ایجاد حفره در آن (\updownarrow) و دوکی شدن کندروسیت‌ها (پیکان) در لایه میانی مشاهده می‌شود.



جدول ۲- میانگین \pm انحراف معیار مشخصه های مورفومتریک بافت غضروف مفصلی بره در گروه های مورد مطالعه

گروه ها			لایه های غضروف	مشخصه های مورد مطالعه
توکسیک	درمانی	کنترل	مفصلی	
10.79 ± 0.41	10.65 ± 0.26	13.20 ± 3.18	سطحی	ضخامت هر کدام از لایه های غضروف مفصلی (میکرومتر)
a,b 58.57 ± 1.35	c 74.59 ± 2.72	c 77.48 ± 4.33	میانی	
34.72 ± 0.96	32.52 ± 0.57	32.74 ± 3.10	عمقی	
a 21.65 ± 0.35	20.64 ± 1.45	c 19.59 ± 1.39	آهکی	
a,b 2.73 ± 0.17	a,c 3.37 ± 0.17	b,c 4.46 ± 0.19	سطحی	تعداد سلول های غضروفي در هر لایه در بزرگنمایی $\times 40$
a,b 1.04 ± 0.18	a,c 1.41 ± 0.05	b,c 2.08 ± 0.11	میانی	
a,b 0.74 ± 0.17	c 1.11 ± 0.21	c 1.20 ± 0.13	عمقی	
a 0.50 ± 0.14	a 0.57 ± 0.02	b,c 0.74 ± 0.09	آهکی	
a 0.33 ± 0.13	0.22 ± 0.22	c 0	سطحی	تعداد لاکوناهاى خالی در هر لایه در بزرگنمایی $\times 40$
a,b 0.77 ± 0.18	a,c 0.37 ± 0.06	b,c 0.04 ± 0.06	میانی	
a 0.51 ± 0.24	0.32 ± 0.16	c 0.22 ± 0.12	عمقی	
0.50 ± 0.18	0.60 ± 0.12	0.50 ± 0.08	آهکی	
2.70 ± 0.57	2.44 ± 0.42	2.74 ± 0.33	سطحی	نسبت ماده زمینه ای غضروف مفصلی به سلول های غضروفي در هر لایه
3.95 ± 0.50	3.93 ± 0.61	3.96 ± 0.30	میانی	
a,b 6.16 ± 0.61	c 4.94 ± 0.69	c 5.06 ± 0.59	عمقی	
a,b 25.41 ± 3.98	c 13.07 ± 0.88	c 10.52 ± 1.12	آهکی	
a,b 125.95 ± 1.78	c 138.80 ± 1.64	c 142.52 ± 7.47		ضخامت کلی غضروف مفصلی (میکرومتر)

حروف a, b, c در هر مورد بیانگر وجود اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) می باشد.



شکل ۷- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه درمانی ($\times 10$, H & E). افزایش تعداد لاکوناهاى خالی در لایه میانی که می تواند به علت افزایش مرگ سلولی باشد.



شکل ۸- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه توکسیک (H & E, $\times 10$).

افزایش مشخص در تعداد لاکوناهاى خالى لایه میانی که می تواند به علت افزایش شدید مرگ سلولی باشد.

شدت رنگ‌پذیری ماده زمینه‌ای نشان می‌دهد. از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف هم جهت مقایسه میزان کربوهیدرات‌ها در ماده زمینه‌ای غضروف مفصلی در گروه‌های مختلف آزمایشی استفاده گردید. نتایج درجه‌بندی مقاطع رنگ‌آمیزی شده با این رنگ در جدول ۴ آورده شده است. طبق این نتایج، شدت رنگ‌آمیزی ماده زمینه‌ای که نشان دهنده میزان کربوهیدرات‌ها بود در گروه‌های مختلف آزمایشی با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0/0001$). بیشترین شدت رنگ‌پذیری در گروه کنترل و کمترین شدت رنگ‌پذیری در گروه توکسیک مشاهده گردید (شکل‌های ۱۲، ۱۳ و ۱۴).

نتایج هیستوشیمی: به منظور مقایسه میزان پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای در گروه‌های مختلف از رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو استفاده شد. بررسی مقاطع رنگ‌آمیزی شده با تولوئیدن بلو با استفاده از سیستم درجه‌بندی میزان کاهش رنگ ماده‌ای زمینه‌ای، نشان داد شدت رنگ‌پذیری ماده زمینه‌ای غضروف مفصلی در سه گروه کنترل، درمانی و توکسیک اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشت ($p < 0/0001$). در گروه درمانی شدت رنگ‌پذیری ماده زمینه‌ای کمتر از گروه کنترل بود اما بیشترین میزان کاهش رنگ‌پذیری در گروه توکسیک مشاهده گردید (شکل‌های ۹، ۱۰ و ۱۱). جدول ۳ میانگین درجه اکتسابی هر گروه را از نظر میزان کاهش

جدول ۳- میانگین \pm انحراف معیار درجه اکتسابی گروه‌های مختلف از نظر میزان کاهش رنگ‌پذیری ماده زمینه‌ای در رنگ‌آمیزی

تولوئیدن بلو*

گروه‌ها	درجه اکتسابی
کنترل	$0/3 \pm 0/06$
درمانی	$2/1 \pm 0/25$
توکسیک	$3/85 \pm 0/21$

* بین تمامی گروه‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/0001$ مشاهده می‌گردد.

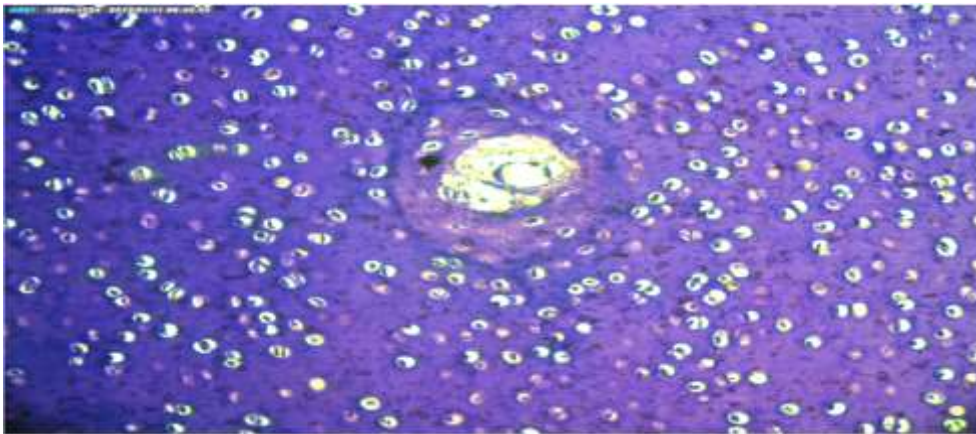


جدول ۴- میانگین \pm انحراف معیار درجه اکتسابی گروه‌های مختلف از نظر شدت رنگ‌پذیری ماده زمینه‌ای در رنگ آمیزی پرئودیک اسید

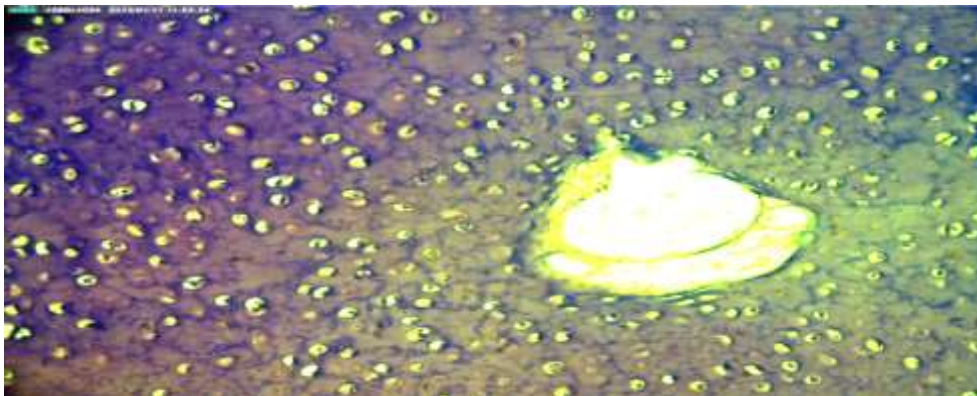
شیف *

گروه‌ها	درجه اکتسابی
کنترل	$3/65 \pm 0/10$
درمانی	$2/65 \pm 0/12$
توکسیک	$1/20 \pm 0/14$

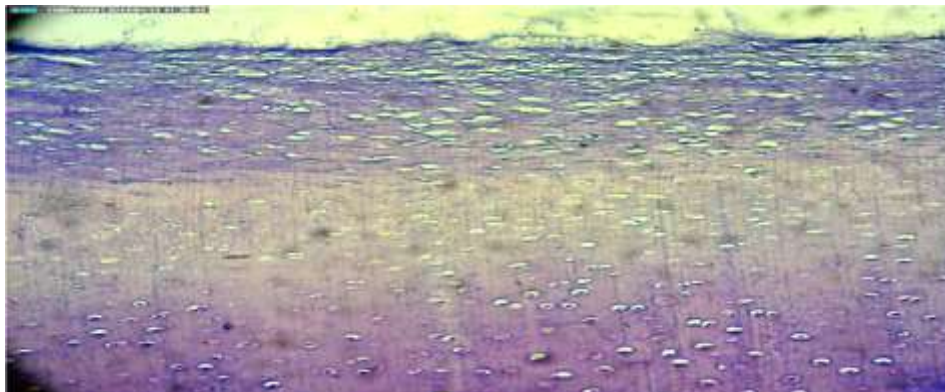
* بین تمامی گروه‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/0001$ مشاهده می‌گردد.



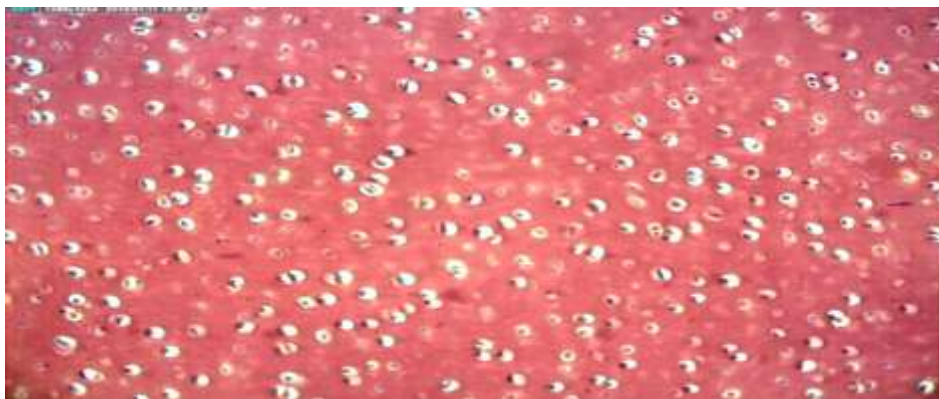
شکل ۹- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه کنترل (تولوئیدین بلو، $\times 10$). شدت رنگی مناسب ماده زمینه‌ای، نشان دهنده میزان طبیعی پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای است.



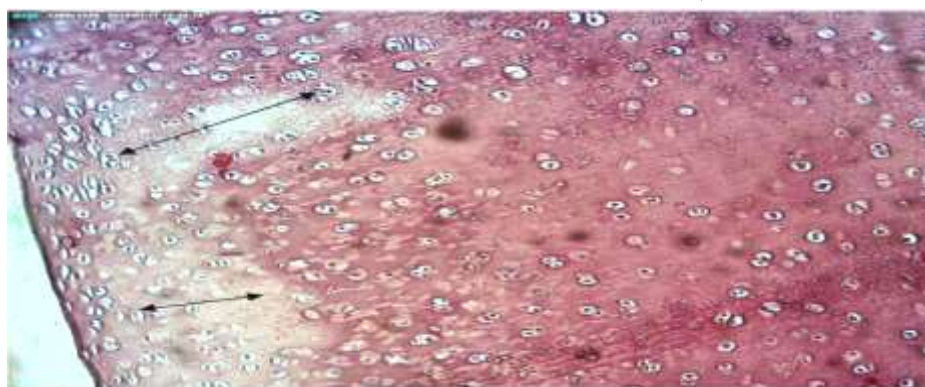
شکل ۱۰- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه درمانی (تولوئیدین بلو، $\times 10$). کاهش شدت رنگ ماده زمینه‌ای به ویژه در ناحیه اطراف کانال غضروفی، نشان‌دهنده کاهش پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای است.



شکل ۱۱- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه توکسیک (Toluidine blue, $\times 10$). کاهش شدید رنگ ماده زمینه‌ای به ویژه در لایه میانی، بیانگر کاهش شدید پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای است.



شکل ۱۲- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه کنترل ($\times 10$, PAS). تمام ماده زمینه ای واکنش PAS مثبت نشان می دهد که به علت تراکم کربوهیدراتها در ماده زمینه ای غضروف مفصلی طبیعی است.



شکل ۱۳- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه درمانی ($\times 10$, PAS). کاهش شدت رنگ پذیری ماده زمینه ای به ویژه در بخش بالایی لایه میانی (\downarrow) که نشان دهنده کاهش میزان کربوهیدراتها می باشد.



شکل ۱۴- ساختار بافتی غضروف مفصلی بره در گروه توکسیک ($\times 10$, PAS). کاهش شدید رنگ پذیری ماده زمینه ای بیانگر کاهش مشخص میزان کربوهیدراتهای غضروف نسبت به گروه های کنترل و درمانی می باشد.

بحث

فعالیت اسکلتی شباهت زیادی به انسان دارد [۲۳]. لذا جهت اجرای این پروژه، انروفلوکساسین به عنوان دارو و گوسفند به عنوان حیوان مورد آزمایش انتخاب گردید تا ضمن پیگیری اهداف پروژه در حیطه دامپزشکی، امکان

استفاده از انروفلوکساسین در گله های گوسفند جهت درمان، کنترل و حتی پیشگیری از عفونت های باکتریایی و مایکوپلاسمایی، امری معمول است [۱۴]. از طرفی گوسفند از نظر تکامل اسکلتی، بیومکانیک و چرخه های



هندی و موش صحرایی گزارش شده است [۷، ۱۳، ۱۸، ۳۲].

مطالعه هیستومورفولوژی نمونه‌ها، ایجاد حفرات متعدد و کوچک در لایه‌های سطحی و میانی و دوکی شدن سلول‌ها در لایه میانی را در گروه‌های درمانی و توکسیک نشان داد. در حالی که در گروه توکسیک تغییرات بسیار شدیدتر بود و کنده شدن بخش‌هایی از لایه سطحی، تخریب وسیع در ماده زمینه‌ای به شکل ایجاد حفره‌های بزرگ مشاهده می‌گردید. این تغییرات مشابه تغییرات گزارش شده در مطالعات سایر محققین بود. فورسترو همکاران و همچنین ورم‌ن و همکاران، تشکیل شکاف و ایجاد حفره در لایه‌های سطحی و میانی غضروف مفصلی موش‌های صحرایی نابالغ را متعاقب تجویز فلوروکینولون‌ها و رژیم‌های غذایی با کمبود منیزیم گزارش کرده‌اند [۱۰، ۳۳]. در تحقیقی دیگر، با مطالعه تأثیر دوزهای صعودی انروفلوکسازین بر غضروف مفصلی جوجه مرغ، ایجاد شکاف در ناحیه میانی و تغییر شکل و دوکی شدن کندروسیت‌ها در لایه میانی غضروف مفصلی گزارش شده است [۱۹]. به هر حال به نظر می‌رسد ایجاد شکاف و حفره در ناحیه میانی غضروف مفصلی، بیشترین و مهم‌ترین تغییری باشد که متعاقب تجویز کینولون‌ها ایجاد می‌گردد و در مطالعات زیادی هم به آن اشاره شده است [۱۰، ۱۳، ۱۹، ۳۱، ۳۳].

مطالعه مورفومتری ضخامت غضروف مفصلی در گروه‌های آزمایشی در این پروژه نشان داد تجویز انروفلوکسازین سبب کاهش ضخامت کلی غضروف مفصلی شده است. همچنین مقایسه ضخامت لایه‌های بافتی غضروف مفصلی در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد انروفلوکسازین ضخامت لایه‌ها را در گروه‌های درمانی و توکسیک کاهش داده است. چانا و همکاران، با بررسی تأثیر سیپروفلوکسازین بر غضروف صفحه رشد موش‌های صحرایی تازه متولد شده، کاهش عرض غضروف صفحه رشد را گزارش کردند. آن‌ها این کاهش عرض را به علت کاهش تعداد سلول‌های غضروفی در

بسط و استفاده از نتایج آن برای انسان هم امکان‌پذیر باشد.

در این مطالعه ارزیابی ظاهری دام‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی، تفاوت معنی‌داری از نظر مقایسه میانگین وزن بدن، تغییر در نحوه راه رفتن و یا ایجاد لنگش را نشان نداد. اینگهام و همکاران، تغییر در نحوه حرکت و ضایعات مفصلی را در سگ‌های جوانی که در معرض کینولون‌ها قرار گرفته بودند گزارش نمودند [۱۵]. از بررسی مطالعات انجام شده در گونه‌های مختلف مشخص می‌گردد که علائمی همچون تغییر در نحوه راه رفتن، قدم برداشتن غیر طبیعی و لنگش همیشه مشاهده نمی‌شود [۵، ۱۸، ۱۹] و موارد گزارش شده هم اکثراً مربوط به سگ بوده‌اند. لذا نتایج این پروژه از این نظر با مطالعات محققین در سایر گونه‌ها مطابقت دارد. با این وجود باید خاطر نشان کرد که عدم وجود علائم بالینی، الزاماً نشان دهنده عدم ایجاد تغییر و آسیب در غضروف مفصلی نیست چرا که غضروف مفصلی بافتی مقاوم و انعطاف‌پذیر است و بسته به میزان فشارهای وارده می‌تواند علی‌رغم آسیب دیدگی، علائم بالینی ایجاد نکند [۱۱].

مطالعه ماکروسکوپی غضروف مفصلی بره‌های مورد آزمایش در گروه توکسیک تغییراتی از قبیل کنده شدن قطعاتی از سطح غضروف مفصلی، فلاپ‌های غضروفی، گودشدگی و ایجاد حفره در سطح غضروف مفصلی انتهای پایینی ران و انتهای بالایی درشت نی را نشان داد. در حالی که در گروه‌های کنترل و درمانی تغییر قابل ملاحظه‌ای مشاهده نگردید. طبق نتایج مطالعات ماسلانکا و همکاران، مشاهده تغییرات ظاهری در غضروف مفصلی مانند وزیکول‌های پر از مایع، فلاپ‌های غضروفی و یا کنده شدن قطعاتی از غضروف، ایجاد اختلالات مفصلی و غضروفی به دنبال تجویز فلوروکینولون‌ها را کاملاً تأیید می‌کند [۱۹]. اگرچه ایجاد این تغییرات کاملاً به مقدار دارو و طول مصرف آن بستگی دارد [۲۵] اما وقوع آن علاوه بر سگ در گونه‌های دیگر مانند خرگوش، خوکچه



(binding) را ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از تجویز یک دوز 3000 mg/kg افلوکساسین در موش‌های صحرایی گزارش کرده‌اند که نشان دهنده کاهش میزان قندها به علت مصرف یک فلوروکینولون می‌باشد [۱۶]. کاهش شدید ترکیبات ماده زمینه‌ای به ویژه پروتئوگلیکان‌ها، زمینه‌ساز بروز سایر تغییرات در ماده زمینه‌ای همچون تشکیل حفره و شیار می‌شود [۱۹]. توجه به این نکته که میزان پروتئوگلیکان‌ها در لایه میانی بیشتر از سایر نواحی غضروف مفصلی است [۲۴]، می‌تواند دلیل خوبی برای این مطلب باشد که بیشترین میزان تغییرات هم در لایه میانی غضروف مفصلی مشاهده شده است. پس می‌توان گفت فلوروکینولون‌ها، لایه میانی غضروف مفصلی را که دارای بیشترین محتوای پروتئوگلیکانی است بیشتر هدف قرار داده و سبب کاهش پروتئوگلیکان‌های آن می‌شوند. همین کاهش شدید می‌تواند زمینه‌ساز بروز تغییرات دیگر در این لایه گردد. باید دقت کرد که فلوروکینولون‌ها این اثر کاهشی را با کاهش تولید پروتئوگلیکان‌ها انجام می‌دهند یا این‌که سبب افزایش تخریب آن‌ها می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهد کندروسیت‌های لایه میانی بالاترین ظرفیت تولید و سنتز پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای را دارند [۳]. به همین علت هم بیشترین میزان پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای در این لایه وجود دارد. پس چنانچه میزان سلول‌های لایه میانی کاهش یابد، به تبع آن تولید پروتئوگلیکان‌ها نیز کاهش می‌یابد. در این مطالعه با شمارش سلول‌های غضروفی در لایه‌های مختلف مشخص شد میزان کندروسیت‌ها در لایه‌های سطحی و میانی در اثر تجویز انروفلوکساسین به صورت معنی‌داری کاهش یافته است و افزایش میزان دارو در گروه توکسیک هم شدت این کاهش را افزایش داده است. پس کاهش میزان پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای به ویژه در لایه میانی می‌تواند متأثر از کاهش تعداد سلول‌های تولید کننده این مواد باشد. یابه و همکاران، گزارش کرده‌اند که کاهش پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای به علت عملکرد مهار کننده کینولون‌ها بر روی سنتز

ناحیه تکثیری و کاهش اندازه سلول‌ها در ناحیه هیپرتروفیک تفسیر کرده‌اند [۷]. هالاوا، کاهش ضخامت در غضروف صفحه رشد و غضروف مفصلی موش‌های صحرایی را متعاقب تجویز هفت روز سیپروفلوکساسین گزارش کرد. او این کاهش ضخامت را به دلیل اثر مهار کننده سیپروفلوکساسین بر میتوز سلول‌های ناحیه تکثیری و از بین رفتن ناحیه هیپرتروفیک در غضروف صفحه رشد تفسیر کرده است [۱۳].

تولئیدن بلو به صورت اختصاصی پروتئوگلیکان‌ها را رنگ می‌کند و میزان شدت جذب رنگ تولئیدن بلو توسط ماده زمینه‌ای غضروف مفصلی، می‌تواند نشان دهنده میزان پروتئوگلیکان‌های آن باشد [۱۹]. در این مطالعه کاهش شدت جذب رنگ تولئیدن بلو توسط ماده زمینه‌ای غضروف مفصلی در گروه‌های درمانی و توکسیک در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. این کاهش در گروه درمانی، ملایم و در گروه توکسیک و به ویژه در لایه میانی بسیار شدید بود. این علائم نشان دهنده کاهش محتوای پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای در گروه‌های درمانی و توکسیک بوده است. مطالعات سایر محققین هم کاهش میزان پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای غضروف مفصلی متعاقب مصرف فلوروکینولون‌ها را تأیید می‌کند [۶، ۱۳، ۱۹].

مقدار قابل توجهی از پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای را گلیکوز آمینوگلیکان‌ها تشکیل می‌دهند که ترکیبات قندی دارند [۳۰]. مقایسه میزان قندها در مقاطع رنگ‌آمیزی شده با رنگ پرئودیک اسیدشیف (PAS) در این مطالعه نشان داد که در گروه‌های توکسیک و درمانی، شدت رنگ PAS کمتر از گروه کنترل بود. این کاهش در گروه توکسیک شدیدتر از گروه درمانی مشاهده می‌شد. پس می‌توان گفت هم میزان پروتئوگلیکان‌ها و هم مواد قندی ماده زمینه‌ای مثل گلیکوز آمینوگلیکان‌ها در اثر مصرف انروفلوکساسین کاهش یافته بود و این کاهش با افزایش میزان داروی مصرف شده، شدیدتر شد. کاتو و همکاران، کاهش یکی از نشانگرهای تولید پلی ساکاریدها (-35s



متابولیکی بالا در لایه میانی، این ناحیه را نسبت به تغییرات آسیب‌پذیرتر می‌سازد [۱۲، ۲۰]. تا به حال فرضیه‌های بسیاری در خصوص مکانیسم تأثیر فلوروکینولون‌ها در ایجاد تغییرات مفصلی و غضروفی مطرح شده است. آنچه که اکثریت منابع در آن اتفاق نظر دارند کمبود کاتیون‌های دو ظرفیتی و به ویژه یون منیزیم در مفصل و غضروف مفصلی به دلیل شلاته شدن با متابولیت‌های کینولون‌ها می‌باشد [۱۹، ۲۴، ۲۹، ۳۳]. کمبود منیزیم خارج سلولی، عملکرد اینتگرین‌ها را که سنتز پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای را تنظیم می‌کند، مختل می‌نماید. پس کاهش میزان پروتئوگلیکان‌های ماده زمینه‌ای می‌تواند به دلیل کاهش سنتز آن‌ها باشد [۲۹]. یک مکانیسم احتمالی در بروز تغییرات مفصلی و تاندونی متعاقب مصرف کینولون‌ها، عملکرد معیوب شده اینتگرین‌های β_1 می‌باشد. این رخداد، یک فرایند ابتدایی در پاسخ به سیگنال مختل شده بین کندروسیت‌ها و ماده زمینه‌ای خارج سلولی است. از آنجا که یون‌های منیزیم عملکرد طبیعی گیرنده‌های سیگنال خانواده اینتگرین β_1 را تنظیم می‌کنند، کمبود منیزیم سبب اختلال در عملکرد این گیرنده‌ها شده و در نتیجه کنش‌های متقابل سلول‌های غضروفی و ماده زمینه‌ای دستخوش تغییراتی می‌گردد که حاصل آن می‌تواند تشکیل رادیکال‌های آزاد و تخریب بافت باشد. علاوه بر این، اینتگرین β_1 باعث فعال شدن مسیر انتقال سیگنال MAPK می‌شوند [۲۵]. یافته‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد مسیر MAPK برای تمایز و بقای کندروسیت‌ها مهم است. مهار مسیر MAPK در کندروسیت‌ها باعث القای آپوپتوز می‌گردد [۲۶].

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد اگرچه دوز درمانی انروفلوکساسین در مقایسه با دوز توکسیک، تغییرات شدیدی در غضروف مفصلی بره ایجاد نکرد اما کاملاً هم بی‌خطر نبود چرا که از نظر میکروسکوپی باعث ایجاد تغییراتی نسبت به گروه کنترل شده بود. در مورد مکانیسم‌های ایجاد تغییرات غضروفی در اثر مصرف

پروتئوگلیکان‌ها در کندروسیت‌ها می‌باشد [۳۴]. با این وجود مطالعات قدیمی‌تر، کاهش پروتئوگلیکان‌ها را به علت کاهش سنتز آن‌ها و در اثر مهار سنتز DNA مطرح کرده‌اند [۱۷].

در این بررسی شمارش تعداد لاکونا‌های خالی در ماده زمینه‌ای غضروف مفصلی بره‌های مورد آزمایش نشان داد تعداد لاکونا‌های خالی در لایه‌های سطحی و عمقی گروه توکسیک به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود. در حالی که در لایه میانی، افزایش تعداد لاکونا‌های خالی در گروه‌های درمانی و توکسیک نسبت به گروه کنترل و همچنین نسبت به یکدیگر معنی‌دار بود. افزایش لاکونا‌های خالی می‌تواند نشانه‌ای از افزایش مرگ سلولی باشد [۲۷]. بدین ترتیب می‌توان در نظر گرفت که تجویز انروفلوکساسین می‌تواند میزان مرگ سلولی را در لایه‌های سطحی و عمقی گروه توکسیک نسبت به گروه کنترل افزایش دهد. همچنین افزایش میزان مرگ سلولی در لایه میانی گروه‌های درمانی و توکسیک هم قابل درک می‌باشد. باید توجه داشت که کندروسیت‌های لایه میانی بالاترین ظرفیت میتوزی را نسبت به لایه‌های دیگر دارند [۲۸] و شاید به همین علت هم باشد که این لایه بیشتر تحت تأثیر مرگ سلولی ناشی از دارو قرار می‌گیرد.

با توجه به نتایج مطالعات سایر محققین و مقایسه با نتایج مطالعه حاضر، این طور به نظر می‌رسد که کاهش تعداد سلول‌های غضروفی از یک طرف و افزایش میزان مرگ سلولی از طرف دیگر، سبب کاهش معنی‌دار ضخامت غضروف مفصلی خصوصاً در لایه میانی گروه توکسیک شده است. همچنین کاهش اجزای ماده زمینه‌ای همچون پروتئوگلیکان‌ها و قندها می‌تواند دلیل دیگری برای کاهش ضخامت کلی غضروف مفصلی در اثر تجویز انروفلوکساسین باشد. با دانستن این‌که در لایه میانی، بیشترین قابلیت میتوز کندروسیت‌ها و بالاترین ظرفیت تولید پروتئوگلیکان‌ها وجود دارد، جای تعجب نیست که چرا در اثر مصرف انروفلوکساسین، بیشترین تغییرات هم در لایه میانی دیده می‌شود. بدیهی است که فعالیت



cartilage. *American Journal Veterinary Research*, 62 (2): 160-166.

10. Forster L., Kociok K., Shakibaei M., Merker H.J., Vormann J., Gunther, T. and Stahlmann R. (1996), Integrins on joint cartilage chondrocytes and alterations by ofloxacin or magnesium deficiency in immature rats. *Archive in Toxicology*, 70: 261-270.

11. Gao Z.Q, Guo X., Ma W. and Chen J.C. (2012), Altered aggrecan synthesis and collagen expression profiles in chondrocytes from patients with kashin- Beck disease and osteoarthritis. *Journal of International Medical Research*, 40: 1325-1334.

12. Goldman J.A. and Kearns G.L. (2001), Fluoroquinolone use in paediatrics. 18th Expert committee on the selection and use of essential medicines, California.

13. Halawa A.M. (2010), Effect of ciprofloxacin on the articular cartilage and epiphyseal growth plate cartilage in the growing albino rats and the possible protective role of vitamin E. *Egypt Journal of Histology*, 33 (3): 569-582.

14. Howard J.L. and Smith R.A. (1999), Current Veterinary Therapy, Food Animal Practice 4. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PP: 17-32.

15. Ingham B., Brentnall D.W., Dale E.A. and McFadzean J.A. (1977), Arthropathy induced by antibacterial fused N- alkyl- 4- pyridine- 3- carboxylic acids. *Toxicology*, 1: 6- 21.

16. Kato M. and onodera T. (1988), Morphological investigation of cavity formation in articular cartilage induced by ofloxacin in rats. *Fundamental Applied Toxicology*, 11: 110-119.

17. Kato M., Takada S., ogawara S. and Taka Yama S. (1995), Effect of levofloxacin on glycosaminoglycan and DNA synthesis of cultured rabbit chondrocytes at concentrations inducing cartilage lesions in vivo. *Antimicrobial Agents*, 39 (9): 1979-1983.

18. Machida M., Kusajima H., Aijima H. and Meada A. (1990), Toxicokinetic study of norfloxacin induced arthropath in juvenile

انروفلوکساسین، این تحقیق بر کاهش اجزای ماده زمینه‌ای و کاهش تعداد کندروسیت‌ها خصوصاً در لایه میانی غضروف مفصلی تاکید کرده و القاء و یا افزایش مرگ سلولی را هم عامل مهمی در ایجاد این تغییرات می‌داند. به هر حال انجام این مطالعه می‌تواند زمینه ساز مطالعات مشابه با دوزها و طول دوره مصرف متفاوت انروفلوکساسین در گوسفند و سایر گونه‌ها باشد.

منابع

۱. فاطمی، ا. ۱۳۸۶. فارماکولوژی بالینی دامپزشکی، تألیف: تی بی باراگری. انتشارات سازمان نظام دامپزشکی، تهران، جلد دوم، صفحات ۳۶۷-۳۶۳.

2. Adams H.R. (2001), Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 8th ed. Iowa State University press, PP: 900-905.

3. Aydelotte M.B. and Kuettner K.E. (1988), Differences between sub- populations of cultured bovine articular chondrocytes. *Connect Tissue Research*, 18: 205-222.

4. Bancroft J.D. and Gamble M. (2002), Theory and practice of histological techniques. 5th ed. Churchill Livingstone, London.

5. Beluche L.A, Berton A.L, Anderson D.E. and weisbrode S.E. (1999), In vitro dose dependent effects of enrofloxacin on equine articular cartilage. *American Journal Veterinary Research*, 60 (5): 577-582.

6. Bothe D.M. (2001), Small animal clinical pharmacology and therapeutics. W. B. Saunders company, London, PP: 166-167.

7. Channa H.M., Ashfaq M., Mastoi S.M. and Qureshi M.A.(2006), Effect of ciprofloxacin on growing cartilage in albino rat pups. *Journal of Ayub Medical College Abbotabad*, 18(3):50-54.

8. Chung C. and Burdick J.A. (2008), Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60: 243-262.

9. Devenport C.L., Boston R.C. and Rhichardson D.W. (2001), Effects of enrofloxacin and magnesium deficiency on matrix metabolism in equine articular



27. Shintaini N. and Hunziker E.B. (2011), Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells. *European Cells and Materials*, 22: 302-320.
28. Stahlmann R., Forster C. and Van sickle D. (1993), Quinolones in children. *Drug Safety*, 9: 397-403.
29. Stahlmann R., Kuhner S., Shakibaei M. and Flores D. (2000), Effects of magnesium deficiency of joint cartilage in immature Beagle dogs: immunohistochemistry, electron microscopy and mineral concentrations. *Archive in Toxicology*, 73: 573-580.
30. Stockwell R.A. (1970), Changes in the acid glycosaminoglycan content of the matrix of ageing human articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 29: 509-515.
31. Takizawa T., Hasimoto K., Itoh N. and Yamashita S. (1999), A comparative study of the repeat dose toxicity of greapafloxacin and number of other fluoroquinolones in rats. *Human and Experimental Toxicology*, 18: 38-45.
32. Takizawa T., Hashimoto K., Minkuni, T. and Owen K. (1999), The comparative arthropathy of fluoroquinolones in dogs. *Human and Experimental Toxicology*, 18: 392-399.
33. Vormann J., Forster C., Gunther T. and Stahlmann R. (1997), Effects of magnesium deficiency on magnesium and calcium content in bone and cartilage in developing rats in correlation to chondrotoxicity. *Calcified Tissue International*, 61: 230-238.
34. Yabe K., Satoh H., Ishii Y., Jindo T. and Okada K. (2004), Early Pathophysiological feature of arthropathy in juvenile dogs induced by ofloxacin. *Veterinary Pathology*, 41(6): 673-681.
19. Maslanka T., Jaroszewski J.J. Mikolajczyk A. and Rotkiewicz T. (2009), Effect of increasing doses of enrofloxacin on chicken articular cartilage. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 12(1): 21-33.
20. Mobarak Y.M. (2010), Embryotoxicity and teratogenicity of enrofloxacin on maternally treated chick. *Asian Journal of Developmental Biology*, 2 (1): 1-15.
21. Necas A., Crha M., Klima J., Amler E. and Gal P. (2010), Quality of newly formed cartilaginous tissues in defects of articular surface. *Physiological Research*, 59: 605-614.
22. Samuelson D.A. (2007), Text book of veterinary histology. Saunders Company, Missouri, PP: 100- 107.
23. Sanson J.M., Wilsman N.J., Leiferman E.M. and Noonan K.J. (2009), The effect of fluoroquinolone antibiotics on growing cartilage in the lamb Model. *Journal of Pediatric Orthopedics*, 29(2): 189-192.
24. Schumacher B.L., Block J.A., Schmid T.M. and Kuettner K.E. (1994), A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Archive in Biochemistry and Biophysics*, 311: 144-152.
25. Sendzik, J., Lode H., Stahlmann R. (2009), Quinolone induced arthropathy, an update focusing on new mechanistic and clinical data. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 194-200.
26. Shakibaei M., Schulze T.G., John T. and Rahmanzadeh R. (2001), Inhibition of mitogen activated protein kinase induces apoptosis of human chondrocytes. *Journal of Biology and Chemistry*, 276: 13289-13294.

