

Farelere Uygulanan Paklitaksel'in Testis Dokusu Üzerine Etkileri

Effects of Paclitaxel Administered to Mice on Testicular Tissue

Sadık KÜÇÜKGÜNAY¹  Oya KORKMAZ²  Ali Erdem ÖZTÜRK³  Ayşe SARI⁴ 
Halime TOZAK YILDIZ⁵  Halil İbrahim KUZ⁶  Mustafa Numan BUCAK⁶ 

ÖZ

Amaç: Kemoterapötik ilaçlar, sperm kalitesini ve erkek fertilitasını etkileyerek üreme bozukluklarına neden olabilir. Birçok kanser türünün tedavisinde aktif olarak kullanılan paklitaksel (PTS), dokularda oksidatif stresin artmasına neden olarak toksik etki gösterir. Mevcut çalışmada, farelere PTS uygulaması yapılarak PTS'nin erkek üreme sistemi üzerindeki hasar verici etkilerinin ortaya konulması amaçlandı.

Araçlar ve Yöntem: Çalışmada 8-10 haftalık erkek Balb/c cinsi fareler kullanıldı. Her bir grupta n:5 olacak şekilde hayvanlar rastgele seçildi. 1, 3 ve 5. günlerde intraperitoneal olarak kontrol grubu farelerine serum fizyolojik, PTS grubu farelerine ise 2 mg/kg PTS uygulandı. Hayvanlar, deneyin sonunda (7. gün) sakrifiye edildi, testis dokuları toplandı ve histopatolojik incelemeler (Hematoksilen-eozin, Masson trikrom, Periyodik asit schiff) yapıldı. Ayrıca farelerden sperm örnekleri toplandı, yayma preparatlar hazırlandı ve DNA kromatin bütünlüğü Toluidin mavisi boyama ile değerlendirildi.

Bulgular: PTS grubunda testis histolojik yapısında bozulmalar gözlemlendi. Seminifer tübüllerde bozulma, germinal epiteldeki spermatojenik seri hücrelerinde azalma, seminifer tübüllerin bazal membranında bozulma, interstisyel bağ dokuda azalma, ödem ve hemoraji gözlemlendi. Ayrıca, PTS grubunda zayıf bir peritübüler interstisyel doku reaksiyonu ve leydig hücrelerinde azalma mevcuttu. Gruplar DNA kromatin bütünlüğü bakımından karşılaştırıldığında, PTS grubunda DNA bütünlüğünde bozulmanın yüksek düzeyde olduğu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlendi (p=0.009).

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular, PTS'nin fare testis dokusunda toksisiteye neden olabileceğini ve sperm DNA integritesini olumsuz olarak etkileyerek erkek infertilitesine neden olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA; fertilitate; infertilite; kromatin

ABSTRACT

Purpose: Chemotherapy drugs can cause reproductive disorders by affecting sperm quality and male fertility. Paclitaxel (PTS), which is actively used in the treatment of many types of cancer, exhibits toxic effects by causing an increase in oxidative stress in tissues. In the present study, PTS was administered to mice to investigate its damaging effects on the male reproductive system.

Materials and Methods: Male Balb/c mice aged 8-10 weeks were used in the study. Animals were randomly selected as n:5 in each group. On days 1, 3 and 5, saline was administered intraperitoneally to control group mice and 2 mg/kg Paclitaxel to PTS group mice. Animals were sacrificed at the end of the experiment (day 7), testicular tissues were collected and histopathological examinations (Haematoxylin-eosin, Masson trichrome, Periodic acid schiff) were performed. In addition, sperm samples were collected from mice, smear preparations were prepared and DNA chromatin integrity was evaluated by Toluidine blue staining.

Results: Testicular histology was abnormal in the PTS group. The seminiferous tubules had abnormalities, a decrease in germinal epithelial spermatogenic series cells, damage to the basal membrane, a decrease in interstitial connective tissue, oedema, and haemorrhage. PTS group also had a limited peritubular interstitial tissue reactivity and fewer leydig cells. High DNA chromatin integrity damage was reported in the PTS group, with a significant difference between the groups (p=0.009).

Conclusion: Our findings indicate that PTS may cause toxicity in mouse testicular tissue and may cause male infertility by adversely affecting sperm DNA integrity.

Keywords: chromatin; DNA; fertility; infertility

Gönderilme tarihi: 27.01.2025; Kabul edilme tarihi: 23.05.2025

1Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Tıp Fakültesi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye.

2Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Tıp Fakültesi, Malatya Turgut Özal Üniversitesi, Malatya, Türkiye.

3Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye.

4Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Konya, Türkiye.

5Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Tıp Fakültesi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye.

6Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye.

Sorumlu Yazar: Mustafa Numan Bucak, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye.
e-posta: mnumanbucak@gmail.com

Makaleye atf için: Küçükğünay S, Korkmaz O, Öztürk AE, Sarı A, Tozak Yıldız H, Kuz Hİ, Bucak MN. Farelere uygulanan paklitaksel'in testis dokusu üzerine etkileri. Ahi Evran Med J. 2025;9(3):301-309. DOI: 10.46332/aemj.1627411



GİRİŞ

Kanserlerin görülme sıklığı günümüzde artış göstermeye devam etmektedir ve yüksek ölüm oranlarıyla hastaların yaşam kalitesini ciddi şekilde olumsuz olarak etkilemektedir. Dünya Sağlık Örgütü dünya genelinde yılda 14 milyon kanser hastası olduğunu bildirmiştir ve bu sayının 2030 yılına kadar %50 artarak yılda 21.6 milyon hastaya ulaşacağını öngörmektedir.¹

Paklitaksel (PTS) çeşitli kanser türlerine karşı yaygın olarak kullanılan bir antineoplastik ajandır. PTS, endometriyal kanser, malign beyin tümörleri, meme kanseri, akciğer kanseri ve mesane kanseri gibi kemoterapiye dirençli kanserlere karşı etkili bir ilaçtır.^{2,3} Güçlü antitümör aktivitelerine rağmen PTS, üreme sistemi de dahil olmak üzere birçok sistem için toksiktir. PTS, testisteki tüm testis parankim hücrelerine etkili bir şekilde nüfuz edebilir ve Sertoli hücreleri içindeki kan-testis bariyerini geçebilir.³ PTS, parankim hücreleri üzerinde zararlı bir etki göstererek spermatozoanın tükenmesine, testis parankim hücre tabakasının dejenerasyonuna ve testis parankim hücre tabakasının çökmesine neden olur. Birçok araştırma PTS enjeksiyonunun oksidatif stres oluşturarak doku redoks homeostazını bozduğunu göstermiştir.³⁻⁵ Testislere nasıl zarar verdiğinin kesin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.

Semen kalitesi, bir erkeğin fertilite potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Semen kalitesinin değerlendirilmesi, rutin olarak numune hacmi, konsantrasyon, hareketlilik ve morfoloji gibi parametrelerin değerlendirilmesini içerir. Testisler kemoterapötik ilaçlara duyarlı organlar olduğundan, bu ajanlar spermatogenez süreci üzerinde olumsuz etkileri olan sperm kromatin kalitesini düşürebilir.⁶ Sperm DNA bütünlüğü, üremeye semen kalitesinin yararlı bir ölçütü olarak kabul görmeye devam etmektedir. Bununla birlikte, DNA bütünlüğünün tanımı, hangi ideal araçlarla ölçülmesi gerektiği ve fertilite için öngörücü değeri çok tartışılan bir konu olmaya devam etmektedir.

Sperm genom bütünlüğü, sağlıklı yavruların gelişiminde temel bir faktördür ve sperm üreme potansiyeli için etkili bir belirleyici olabilir. Diğer semen faktörlerinin fertilite potansiyeli üzerindeki etkisi çeşitli türlerde araştırılmış

olsa da, DNA bütünlüğünün etkisine ilişkin kesin ve tek tip bulgular elde edilememiştir. Sperm hücresindeki DNA hasarı çeşitli testler kullanılarak ölçülebilir. Türler arasında sperm DNA hasarını tahmin etmek için kullanılan yaygın testler arasında sperm kromatin yapısı testi (SCSA), sperm kromatin dağılım testi (SCD), transferaz dUTP nick end etiketleme (TUNEL) ve tek hücre jel elektroforezi (COMET) yer almaktadır ancak bunlarla sınırlı değildir. Bunların dışında toluidin mavisi (TM) da tercih edilmektedir. Toluidin mavisi; sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan temel boyadır. Zayıf paketlenmiş kromatine veya hasarlı DNA'ya sahip nükleustaki sperm DNA'sının fosfat rezidüleri toluidin mavisi gibi baz boyalara bağlanmaya daha eğilimlidir. Bazı çalışmalar boğalarda,⁷ aygırlarda,⁸ insanlarda,⁹ domuzlarda¹⁰ ve koçlarda¹¹ sperm DNA parçalanması ile fertilite arasında potansiyel bir bağlantı olduğunu vurgulamış olsa da, aynı türler üzerinde çelişkili sonuçlar da bildirilmiştir.¹²

Bu deneysel araştırmayla, erkek Balb/c farelerde PTS uygulaması yapılarak PTS'nin erkek üreme sistemi üzerindeki hasar verici etkilerinin histopatolojik olarak ortaya konulması ve bir semen kalitesi parametresi olarak DNA bütünlüğünün analiz edilmesi amaçlanmaktadır.

ARAÇLAR ve YÖNTEM

Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (27/06/2024 tarih ve 12/6 sayılı).

Kimyasallar, Laboratuvar Hayvanları, Çalışma Grupları ve Dokuların Toplanması

PTS (TAKSEN 30mg/5ml) Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi AŞ'den temin edildi. Çalışmada kullanılan fareler Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Hayvan deneyinde 8-10 haftalık, 30g ± 3g ağırlığında erkek Balb/c fareler kullanıldı. Her grup için fareler rastgele seçildi.

Deney Grupları

Grup 1- Kontrol (K): 1, 3 ve 5. günlerde intraperitoneal FTS (Fizyolojik tuzlu su/Serum fizyolojik/ %0.9 NaCl izotonik) uygulandı.

Grup 2- Paklitaksel (PTS): 2 mg/kg PTS 1, 3 ve 5. günlerde intraperitoneal olarak uygulandı.¹³⁻¹⁵

Deney hayvanları, deneyin sonunda (7. gün), ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık periton içi) ve ketamin (60 mg ketamin hidroklorür/kg canlı ağırlık, periton içi) genel anestezisi altına alındı. Derin anestezisi altındaki hayvanların abdominal bölgesinde asepsi ve antisepsi şartları sağlanarak, linea alba üzerinden 2 cm'lik cilt insizyonu yapıldı. Deri altı bağ dokusu ve abdominal kaslar açılarak sol ve sağ testis diseke edildi. Testisler Bouin solüsyonuna alınarak histopatolojik değerlendirmeler için kullanıldı.

Histopatolojik Analizler

Testis doku örnekleri Bouin solüsyonunda 48 saat süreyle fikse edildi. Fiksasyon sonrası dokular rutin histolojik takip işlemlerine tabi tutularak parafin bloklar hazırlandı ve 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen Eozin yöntemi ile boyanarak ışık mikroskobu (Leica DM2000) altında spermatogenez kaybı ve testiküler doku hasarı değerlendirildi.

Seminifer tübüller arasındaki bağ dokusu proliferasyonunu değerlendirmek için Masson Trikrom boyaması ve seminifer tübüllerin bazal membranındaki bozulmaları değerlendirmek amacıyla Periyodik Asit-Schiff boyaması kullanıldı.

Hematoksilen-Eozin Boyama

5 µm kalınlığındaki kesitleri deparafinize etmek için 60°C'de 1 saat etüvde bekletildi. Deparafinizasyondan sonra, giderek azalan konsantrasyonda etil alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70) geçirildi. Dokular Hematoksilen (Bio-Optica) ve Eozin (Bio-Optica) ile boyandı ve ardından artan etil alkol serilerinden (%70, %80, %96, %100) geçirildi ve ksilen ile temizlendi. Preparatların üzeri entellan ile kapatıldı ve testis dokuları ışık mikroskop (Leica DM2000) altında incelenerek bulgular kaydedildi. Testiküler seminifer tübüllerdeki

spermatogenez Johnsen testiküler skorlama yöntemi ile gruplar arasında değerlendirildi.¹⁶

Masson Trikrom Boyama

Çalışmamızda, testiküler seminifer tübüller arasındaki bağ doku proliferasyonunu ortaya koymak için ticari olarak temin edilen Masson trikrom boyama kiti (Bio-Optica, 04-010802) kullanıldı. Kesitler deparafinize edildi ve kit protokolüne göre boyandı. Boyama sonrasında dokular ışık mikroskobu (Leica DM2000) altında incelendi ve bulgular kaydedildi.

Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama

Çalışmamızda, testiküler seminifer tübüllerin bazal membranındaki herhangi bir bozulmayı ve kalınlaşmayı tespit etmek için ticari olarak temin edilen Periyodik Asit-Schiff (PAS, Bio-Optica, 04-130802) boyama kiti kullanıldı. Kesitler deparafinize edildi ve kit protokolüne göre boyandı. Boyama sonrasında dokular ışık mikroskobu (Leica DM2000) altında incelendi ve bulgular kaydedildi.

DNA Kromatin Bütünlüğü

Sperm hücrelerindeki kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için Toluidin mavisi boyaması (TM) kullanıldı. TM boyaması, Talebi ve arkadaşlarının (2012) protokolünde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi.¹⁷ Sol kauda epididimis petri kabına alınarak 35 ± 3°C'de ısıtılmış fosfat tamponlu çözelti (PBS, Sigma, P4417) ile yıkandı. Yıkama sonrasında doku, 2 mL PBS içerisinde ince uçlu cerrahi makas kullanılarak parçalandı ve sperm hücrelerinin süspansiyona geçmesi için yaklaşık 10 dakika bekletildi. Süspansiyon sonrası yaklaşık 5 µL sperm/PBS karışımı lamalara yayıldı ve 30 dakika boyunca hava ile kurutularak yayma preparatlar hazırlandı. Yayma preparatlar asetonda 4°C'de 1 saat süreyle fikse edildi ve ardından tekrar hava ile kurutuldu. Akabinde preparatlar 4°C'de 15 dakika boyunca 1N HCl içinde hidrolize edildi ve distile suda 2 dakika boyunca 3 kez durulandı. Ardından yayma preparatlar oda sıcaklığında 10 dakika süreyle %0.05 toluidin mavisi (pH 4.5) ile boyandı, 3 kez 2'er dakika süreyle distile suyla yıkandı ve hava ile kurutuldu. Her bir

yayma preparatta en az 200 spermatozoa ışık mikroskobu (Leica DM2000) altında 10 farklı alanda rastgele sayıldı ve anormal [TM (+)] veya normal TM [(-)] olarak değerlendirildi. Her örnek için ortalamalar hesaplandı ve sonuçlar yüzde (%) olarak kaydedildi. Normal kromatin bütünlüğüne sahip sperm hücre başları açık mavi, anormal kromatin bütünlüğüne sahip olanlar ise koyu menekşe (mor) rengindeydi.

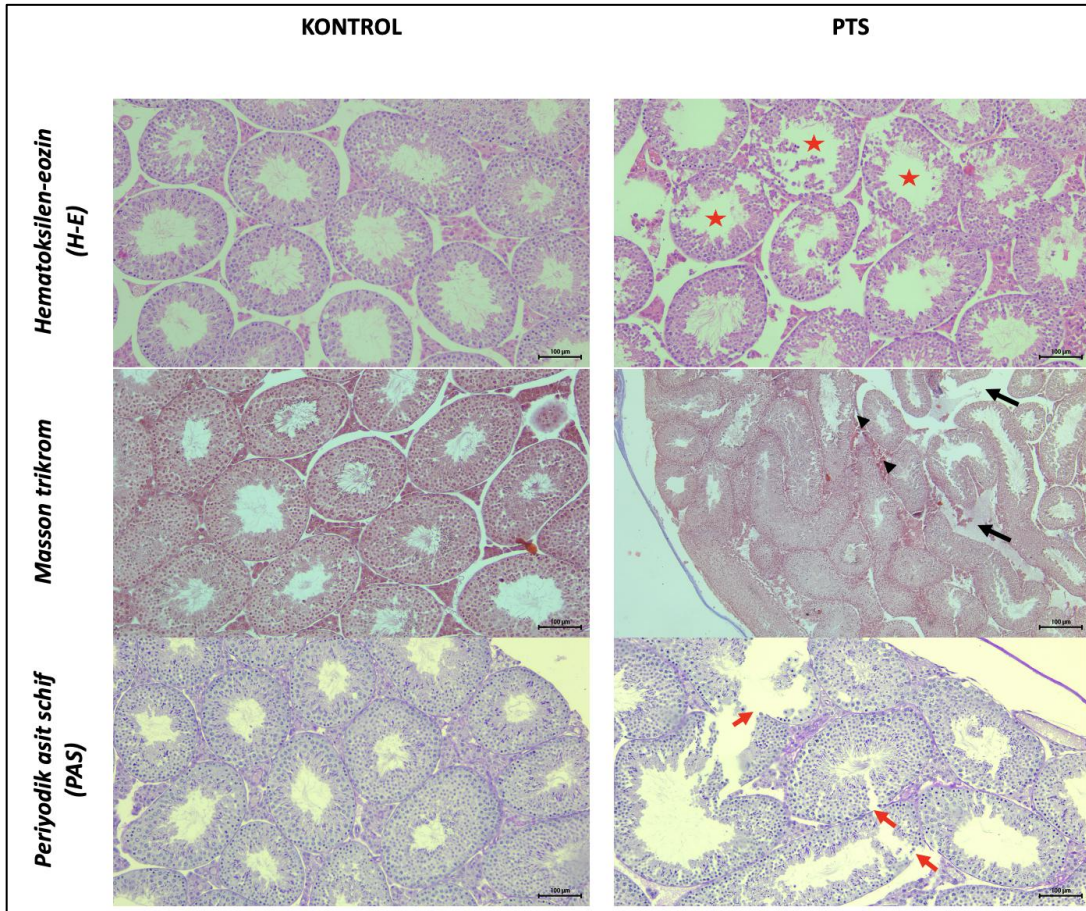
İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi için SPSS 25.0 (IBM, Armonk, NY, USA) programı kullanıldı. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. Sonuçları değerlendirmek için Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ düzeyindeki bir fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Histopatolojik Analiz

Kontrol grubunun H&E boyaması, sağlam hücresel bileşenlere sahip normal bir seminifer tübül yapısı ortaya koydu. Kontrol grubunun H&E boyalı testis dokularında, seminifer tübüllerin bazal membranı organize bir görünüm sergilemiştir. Spermatogenezin farklı aşamalarındaki hücreler seminifer tübül duvarında normal lokalizasyon gösterdi ve hücreler arasındaki bağlantılar normaldi. Seminifer tübüllerin lümeninde spermatogenezin farklı aşamalarından hücre kolonileri ve hücre döküntüleri bulundu. Ayrıca, lümen normal interstisyel boşluklara sahip hareketsiz spermatozoa ile doluydu (Şekil 1).

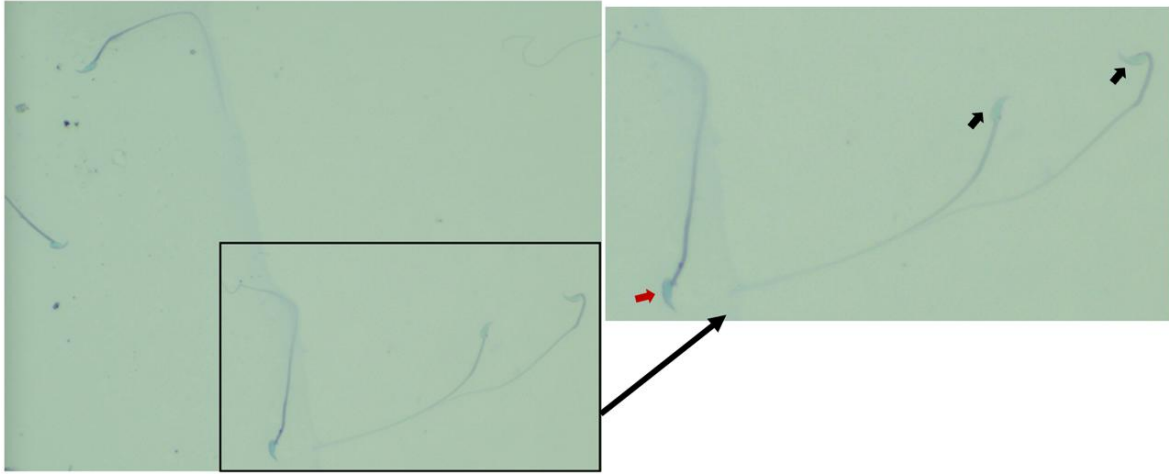


Şekil 1. Kontrol ve PTS gruplarına ait testis dokularında histopatolojik analizler.

A. PTS grubunun testis doku örneklerinde seminifer tübül yapısında bozulmalar ve germinal epitelde spermatojenik seri hücrelerinde azalma gözlemlendi (kırmızı yıldız).

B. PTS grubunun bağ dokusunda bozulma, ödem ve hemoraji alanları (siyah ok başı) gözlemlendi. Seminifer tübül atrofik, genişlemiş interstisyel boşluklar (siyah uzun ok) ve seyrek lümen belirgindi. Ayrıca Leydig hücrelerinde azalma (siyah uzun ok) görüldü.

C. Seminifer tübüllerin bazal membranlarında ayrılma (kırmızı ok) gözlemlendi. Bar: 100 µm



Şekil 2. Toluidin mavisi ile elde edilen TM (+) ve TM (-) hücrelerin ışık mikroskop görüntüsü.

Siyah ok: TM (-) hücreyi göstermektedir. Kırmızı ok: TM (+) hücreyi göstermektedir. Bar: 100 μ m. PTS grubunda kontrol grubuna göre daha fazla anormal DNA görüldü ($p=0.009$).

PTS grubunun H&E boyaması testis histolojik yapısında bozulmalar olduğunu gösterdi. PTS grubunun H&E boyalı testis dokularında seminifer tübüller düzensiz bir görünüm sergilemiş ve germinal epitelde spermatojenik seri hücrelerinde azalma gözlenmiştir. Seminifer tübüllerin bazal membranlarında ayrılma ve kalınlaşma gözlemlendi. Ayrıca seminifer tübüllerin etrafındaki bağ dokusunda bozulma (interstisyel doku kalınlaşması), ödem ve hemoraji alanları gözlemlendi. Seminifer tübül atrofisi, genişlemiş interstisyel boşluklar ve seyrek lümen belirgindi. Johnsen testiküler skorlama sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde kontrol (9.8 ± 0.02) ve PTS (5.67 ± 0.33) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p=0.008$).

Kontrol grubu farelerin MT boyamasında testis kapsülünü çevreleyen normal kolajen liflerinde herhangi bir bozulma görülmedi. Ancak, PTS grubu farelerin MT boyamasında kapsülü oluşturan bağ dokusu yapısında ayrılmalar ve kolajen liflerinde bozulmalar görüldü (Şekil 1).

Kontrol grubu farelerin PAS boyalı kesitlerinde normal seminifer tübül bazal membranı, normal pozitif PAS boyalı peritübüler interstisyel doku ve Leydig hücreleri görüldü. Fakat, PTS grubunda, PAS ile zayıf bir peritübüler interstisyel doku reaksiyonunun yanı sıra Leydig hücrelerinin azalması ve bazal membranda kalınlaşma ve bozulmalar mevcuttu (Şekil 1).

DNA Parçalanması

Kontrol (90.2 ± 4.32) ve PTS (58.0 ± 6.28) grupları kromatin bütünlüğü açısından karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p=0.009$) (Şekil 2).

TARTIŞMA

Mevcut deneysel çalışmada, erkek farelere PTS uygulaması yapılarak PTS'nin erkek üreme sistemi üzerindeki hasar verici etkileri ortaya konuldu ve bir semen kalitesi parametresi olarak sperm DNA bütünlüğü analiz edildi.

PTS'nin testis dokusu üzerindeki olumsuz etkileri seminifer tübül yapısında hasara neden olmaktadır. Kankılıç ve ark. (2024)¹⁸ PTS kaynaklı testis toksisitesi konusunda yaptıkları bir çalışmada, histolojik incelemeler sonucunda PTS'nin testis dokusunda birçok yapısal hasara (bazal membran hasarı, tübüller düzensizlikler ve seminifer tübül çaplarında azalma) neden olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızın PTS grubuna ait testis dokularında da benzer sonuçlar gözlemlendi. Bu bağlamda sonuçlarımız Kankılıç ve ark. (2024) çalışmasının sonuçlarını doğrular niteliktedir ve benzerlik göstermektedir.

Terapötik bir tedavi yöntemi olarak kullanılan kemoterapik ilaçlar oksidatif stres oluşumunu indükleyebilir, spermatogenez bozabilir, sperm üretimini azaltabilir, anormal spermatozoa sayısını artırabilir ve

fertilite potansiyelini azaltabilir.¹⁹ Böylece, kemoterapötik ilaçların kullanılmasının hücreler ve dokular üzerinde zararlı etkileri olabilir. PTS'nin uygun dozlarda kullanıldığında hücrede tubulin-mikrotübül bağlantısını sağlayan multipolar içciklerde kromozomun yanlış bölgeden ayrılmasına neden olarak mikrotübül disfonksiyonuna yol açtığı bildirilmiştir ve tümör hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek tedavi edici etkisinin olduğu ileri sürülmüştür.²⁰ Fakat PTS ile tedavi için kullanılan uygun dozlar genellikle yüksektir ve uygulanan bu dozların toksik etkilere neden olduğu rapor edilmiştir.²¹ Okay ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada PTS'nin testis dokusunda patolojik değişikliklere ve spermatozoa aktivitesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir.⁵ PTS'nin toksik etkisinin altında yatan mekanizmalardan biri, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırarak oksidatif stresin indüklenmesidir. Aşırı ROS üretimi DNA hasarına, endotel hücre hasarına, oksidatif strese, apoptoza ve testis parankim hücrelerinin nekrozuna yol açar.^{22,23}

Memelilerde spermatogenez, seminifer epitelyumda spermatojenik hücre gelişiminin döngüsel bir sürecidir ve PTS ile tedavi fare spermatogenezini önemli ölçüde etkilemektedir.²⁴ PTS'nin intravenöz olarak uygulamasından sonra sıçan testis dokusunda spermatogenez nasıl etkilendiğinin araştırıldığı bir çalışmada, PTS'nin aktif olarak bölünen hücelere (spermatogonialar ve spermatositler) ve postmeiotik epitelyositlere (spermatidler ve spermatozoa) zarar verdiği gözlenmiştir. Spermatojenik hücreler üzerindeki bu toksik etkiler, ilacın apoptozu indüklemeye kapasitesinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.²⁴ PTS enjeksiyonundan sonra sıçan testisinin onarıcı rejenerasyon mekanizmalarının incelendiği bir çalışmada, maksimum tolere edilen dozda tek bir intravenöz antitümör ilaç PTS enjeksiyonundan 2, 3 ve 6 ay sonra spermatogonia hücre popülasyonunun azaldığı bildirilmiştir.²⁵ Sertoli hücresi sayısının deney başlangıcından 3 ay sonra artış gösterdiği, seminifer tübül epitelinin olgunluğunun kontrol grubu sıçanlara göre daha düşük olduğu belirtilmiştir. Ayrıca spermatogenez sürecinde üretilen hücre popülasyonunun, deney başlangıcından 6 ay sonra kontrol grubu hayvanlardakine göre farklı olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler

doğrultusunda, PTS tedavisinden sonra spermatojen dokunun rejenerasyonunun spermatojenik epitelin yenilenmesi yoluyla gerçekleştiğini, ancak spermatogonial hücre popülasyonunun miktarı göz önüne alındığında, iyileşme oranının düşük olacağı sonucuna varılmıştır.²⁵ Ghafari-fard ve ark. (2021) tarafından yürütülen bir çalışmada çeşitli kemoterapik ajanların (sisplatin, doksorubisin, PTS, 5-florourasil ve siklofosfamid) erkek germ hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Kullanılan kemoterapik ajanlardan birisi de PTS'dir. Araştırmanın bulguları PTS dahil tüm kullanılan kemoterapik ajanların testis dokusunda toksisiteye sahip olduğunu ortaya koymuştur.²⁶ Wang ve ark. (2022), PTS'nin testis yapısında hasara neden olduğunu ve germ hücrelerinin çoğalmasını, mayoz bölünmesini ve sonraki süreçte sperm fonksiyonunu önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir.²⁷ Borovskaya ve ark. (2009), PTS'nin aktif olarak bölünen sperm hücrelerine zarar verdiğini ve sperm hücrelerinin kalitesinde düşüşe neden olduğunu bildirmiştir.²⁴ Toraman ve ark. (2024) sıçan testis dokusunda PTS uygulamasıyla oluşan oksidatif stresin testis dokusuna zarar verip vermediğini araştırmışlardır. Histopatolojik analizleri sonucunda, PTS toksisitesinin sıçan seminifer tübüllerindeki germinal seri hücrelerinde nekrotik ve dejeneratif bir duruma neden olduğunu bildirmişlerdir.²⁸ PTS'nin sıçan testis dokusu üzerindeki toksik etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada, PTS ile intokse edilen sıçanların testis dokularında tunika albuginea kalınlaşma ve spermatojenik, Sertoli ve Leydig hücrelerinde dejeneratif değişikliklerin meydana geldiği histolojik ve ultrastrüktürel düzeyde incelenerek rapor edilmiştir.⁴

PTS'nin erkek üremesi üzerindeki etkilerinin moleküler mekanizmasının incelenmesinin amaçlandığı bir çalışmada, PTS'ye maruz kalan farelerde sperm sayısında azalma, sperm hareketliliğinde azalma ve anormal spermelerde artış gibi spermatogenez bozuklukları görülmüştür.²⁷ Bu sonuçlardan yola çıkarak, PTS'nin germ hücre proliferasyonunu ve mayoz bölünmeyi olumsuz etkileyebileceğini ve sonuçta sperm kalitesini ve erkek infertilitesine neden olabileceği ileri sürülmüştür.²⁷ PTS uygulamasının spermatogenez dokuda neden olduğu sitostatik hasar konusunda Wistar sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, toplam sperm hücresi sayısında

azalma ve spermatogonyum popülasyonunda azalma gözlenmiştir. Testis dokusunda PTS kaynaklı hasarın altında bölgesel prekürsör havuzunun tükenmesiyle oluşan rejeneratif potansiyelin azalmasının yattığı bildirilmiştir. Progenitor hücrelerin fonksiyonel aktivitesindeki değişiklikler sadece PTS'nin doğrudan etkisinden değil, aynı zamanda doku mikroçevresinin salgı fonksiyonunun baskılanmasından da kaynaklandığı ileri sürülmüştür.²⁹ Bizim histopatolojik analizlerimiz sonucunda PTS grubunun testis dokusunda yapısal bozukluklara neden olduğu gözlemlendi. Bazal membranda hasar, tübüler düzensizlikler, interstisyel doku kalınlaşması ve hemaraji gibi birçok yapısal hasar gözlemlendi. Bu bağlamda çalışmamızın bulguları literatürde yapılan diğer çalışmalar ile benzer sonuçlar göstermektedir.

Kemoterapi ilaçları sperm sayısı, hareketlilik, morfoloji ve DNA bütünlüğü gibi çeşitli üreme parametrelerini olumsuz olarak etkilemektedir.^{30,31} Sarıözkan ve ark. (2017) PTS'nin neden olduğu testis ve sperm hasarlarını araştırdıkları çalışmada, PTS grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında üreme organlarının mutlak ve bağıl ağırlıklarında, testosteron seviyesinde, sperm hareketliliğinde, konsantrasyonunda azalmalara neden olduğunu bildirmişlerdir.³² Bu bulgularından yola çıkarak PTS'nin testislerde belirgin histolojik ve sitolojik hasarlara neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. In vitro fertilizasyon (IVF) deneylerinde, PTS'nin sperm fertilesini ve blastosist gelişimini bozduğu bilinmektedir. Erkek fertilesinin iyileştirilmesinde kök hücrelerin üreme toksisitesini ve koruyucu rollerini değerlendirmek için in vivo PTS ile indüklenmiş bir fare modeli oluşturulmuştur. 14 günlük PTS tedavi rejimi, spermatogenez etkileme, sperm sayısını azaltma ve sperm hareketliliğini azaltma dahil olmak üzere farelerin spermatogenezini ve sperm kalitesini önemli ölçüde zayıflattığı rapor edilmiştir.³³ Çalışmamızda erkek üremesi üzerindeki PTS'nin sperm DNA kromatin kondensasyonuna etkisini Toluidin mavisi (TM) boyama yöntemi ile değerlendirdik. İli ve ark. (2019) kemoterapötik ajan olarak epididimal spermelerde PTS'nin DNA hasarına neden olan etkisini inceledikleri bir çalışmada, PTS'nin sperm hücrelerinde DNA hasarının seviyelerini indüklediğini rapor etmişlerdir. Bu bulgularından yola çıkarak PTS içeren kemoterapi ilaçları sperm DNA'sının hasar görmesine neden olabilir ve üreme

çalışmadaki erkek kanser hastalarının fertilité potansiyelini olumsuz etkileyebilir sonucuna varmışlardır.³⁴ Balcıoğlu ve ark. (2023) yetişkin erkek sıçanların testislerinde PTS kaynaklı oksidatif stresi araştırdıkları çalışmada PTS grubunda testis dokusunun ciddi şekilde hasar gördüğünü ve DNA hasarı seviyesinin artış gösterdiğini bildirmişlerdir.³⁵ Moradi Maryamneghari ve ark. (2021) Wistar sıçanlarında erkek üreme sisteminde PTS'nin etkisini inceledikleri çalışmada, histopatolojik değerlendirmeleri sonucunda PTS grubunda kontrol grubuna göre sperm DNA parçalanma indeksinin önemli ölçüde artış gösterdiklerini rapor etmişlerdir.³¹ Abd-Elrazek ve ark. (2020), erkek sıçanların testislerinde PTS kaynaklı hasarı inceledikleri çalışmada, PTS'nin sperm sayısında, hareketliliğinde, canlılığında önemli bir azalmaya neden olduğunu ve sperm anormalliklerinde belirgin bir artış olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, kontrol grubuna göre PTS grubunda DNA hasarında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.³⁶

Sarıözkan ve ark. (2016) PTS ile ilgili yaptıkları bir başka araştırmada, PTS'nin testis ve epididimal dokularda üreme organlarının mutlak ve bağıl ağırlıklarında, testosteron seviyesinde, sperm hareketliliğinde, konsantrasyonunda, glutatyon seviyesinde ve katalaz aktivitesinde önemli azalmalara neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca anormal sperm oranını, testis ve epididimal malondialdehit seviyesini, apoptotik germ hücre sayısını ve sperm DNA parçalanmasını önemli ölçüde artırdığını ve testislerin histolojik yapısını önemli ölçüde bozduğunu ileri sürmüşlerdir.³⁷

Mevcut çalışmamızda, sperm hücrelerinin toplam TM (+) hücre yüzdesi PTS grubunda kontrol grubuna göre artış gösterdi. Elde edilen bu sonuç, PTS'nin sperm kalitesini düşürdüğünü ortaya koymaktadır. Bu bağlamda sonuçlarımız literatürde bu konuda yapılan mevcut çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Elde ettiğimiz bulgular, kemoterapide kullanılan bir ilaç olan PTS'nin yetişkin farelerin testis dokusunda toksisiteye neden olabileceğini ve semen parametresi analizlerinden biri olan sperm DNA integritesinin olumsuz olarak etkileyerek erkek infertilitesine neden olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak; bu çalışmadan elde edilen veriler, bir kemoterapötik olan PTS'nin testis dokusunu ve spermatogenezi olumsuz etkileyebildiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, PTS gibi yaygın olarak kullanılan kemoterapötiklerin gonadal toksisite üzerindeki etkilerini belirlemek ve bunlara karşı doğal tedavi stratejileri geliştirmek için bilimsel araştırmalarda hayvan modelleri kullanılmalıdır. Anormal spermatogenez, sperm parametrelerinden biri olan sperm DNA yapısını doğrudan etkileyebilir. Sperm DNA yapısı çeşitli infertilite durumları için önemli bir tanı belirtecidir ve erkek fertilité potansiyelini değerlendirmek için kullanılır. Bu veriler, kanser hastalarının kemoterapiden sonra yaşayabilecekleri fertilité sorunlarını anlamalarına ve fertilitelerini korumak için tedavi yöntemleri sunacaktır.

Çıkar Beyannamesi

Herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını yazarlar beyan etmektedirler.

Etik Kurul İzni

Bu çalışma Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (27/06/2024 tarih ve 12/6 sayılı).

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Ana fikir/Planlama: MNB, SK, OK. Veri toplama/İşleme: OK, MNB, SK, AEÖ, AS, HTY. Veri analizi ve yorumlama: OK, SK, MNB. Literatür taraması: OK, SK. Yazım: OK, SK. Gözden geçirme ve düzeltme: MNB. Danışmanlık: MNB.

KAYNAKÇA

- World Health Organization. Cancer prevention and control in the context of an integrated approach. World Health Assembly Resolution WHA70. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2017.
- Vurgun H, Sezer G, Yay A. The role of autophagy in paclitaxel and cremophor induced damage to rat testis. *Biotech Histochem.* 2022;97(6):433-440.
- Gur C, Kandemir FM, Caglayan C, Satıcı E. Chemopreventive effects of hesperidin against paclitaxel-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via amendment of Nrf2/HO-1 and caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Chem Biol Interact.* 2022;365:110073.
- Aboelwafa HR, Ramadan RA, El-Kott AF, Abdelhamid FM. The protective effect of melatonin supplementation against taxol-induced testicular cytotoxicity in adult rats. *Braz J Med Biol Res.* 2022;55:11614.
- Okkay U, Ferah Okkay I, Cicek B, ve ark. Achillea millefolium alleviates testicular damage in paclitaxel-intoxicated rats via attenuation of testicular oxidative-inflammatory stress and apoptotic responses. *Andrologia.* 2021;53(5):14028.
- Semet M, Paci M, Sañas-Magnan J, ve ark. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology.* 2017;5(4):640-663.
- Kumaresan A, Johannisson A, Al-Essawe EM, Morrell JM. Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above- and below-average fertility bulls. *J Dairy Sci.* 2017;100(7):5824-5836.
- Neuhauser S, Bollwein H, Siuda M, Handler J. Effects of Different Freezing Protocols on Motility, Viability, Mitochondrial Membrane Potential, Intracellular Calcium Level, and DNA Integrity of Cryopreserved Equine Epididymal Sperm. *J Equine Vet Sci.* 2019;82:102801.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(1):3-13.
- Didion BA, Kaspersen KM, Wixon RL, Evenson DP. Boar fertility and sperm chromatin structure status: a retrospective report. *J Androl.* 2009;30(6):655-660.
- Peris-Frau P, Álvarez-Rodríguez M, Martín-Maestro A, ve ark. Comparative evaluation of DNA integrity using sperm chromatin structure assay and Sperm-Ovis-Halomax during in vitro capacitation of cryopreserved ram spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 2019;54 (4):46-49.
- Chi HJ, Kim SG, Kim YY, ve ark. ICSI significantly improved the pregnancy rate of patients with a high sperm DNA fragmentation index. *Clin Exp Reprod Med.* 2017;44(3):132-140.
- Aktaş İ, Gur FM, Bilgiç S. Protective effect of misoprostol against paclitaxel-induced cardiac damage in rats. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2024;171:106813.
- Gür FM, Bilgiç S. Silymarin, an antioxidant flavonoid, protects the liver from the toxicity of the anticancer drug paclitaxel. *Tissue Cell.* 2023;83:102158.
- Gür FM, Aktaş İ. Silymarin Protects Kidneys from Paclitaxel-Induced Nephrotoxicity. *Turkish JAF Sci. Tech.* 2022;10:452-458.
- Ito Y, Unagami M, Yamabe F, ve ark. A method for utilizing automated machine learning for histopathological classification of testis based on Johnsen scores. *Sci Rep.* 2021;11(1):9962.
- Talebi AR, Vahidi S, Aflatoonian A, ve ark. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia.* 2012;44(1):462-470.
- Kankılıç NA, Küçükler S, Gür C, ve ark. Naringin protects against paclitaxel-induced toxicity in rat testicular tissues by regulating genes in pro-inflammatory cytokines, oxidative stress, apoptosis, and JNK/MAPK signaling pathways. *J Biochem Mol Toxicol.* 2024;38(7):23751.
- Drechsel KCE, Broer SL, van Breda HMK, ve ark. Semen analysis and reproductive hormones in boys with classical Hodgkin lymphoma treated according to the EuroNet-PHL-C2 protocol. *Hum Reprod.* 2024;39(11):2411-2422.
- Aktaş İ, Yahyazadeh A. Protective potential of misoprostol against kidney alteration via alleviating oxidative stress in rat following exposure to paclitaxel. *Tissue Cell.* 2022;79:101966.
- Çomaklı S, Özdemir S, Güloğlu M. Chrysin attenuates paclitaxel-induced hepatorenal toxicity in rats by suppressing oxidative damage, inflammation, and apoptosis. *Life Sci.* 2023;332:122096.

22. Shokoohi M, Khaki A, Shoorei H, ve ark. Hesperidin attenuated apoptotic-related genes in testicle of a male rat model of varicocele. *Andrology*. 2020;8(1):249-258.
23. Cicek B, Hacimuftuoglu A, Kuzucu M, ve ark. Sorafenib Alleviates Inflammatory Signaling of Tumor Microenvironment in Precancerous Lung Injuries. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(2):221.
24. Borovskaya TG, Goldberg VE, Rumpel OA, ve ark. The rat spermatogenesis after injection of paclitaxel (antitumor agent). *Bull Exp Biol Med*. 2009;147(6):715-718.
25. Borovskaya TG, Shchemerova YA, Poluektova ME, ve ark. Mechanisms of reparative regeneration of rat testis after injection of paclitaxel. *Bull Exp Biol Med*. 2014;156(4):483-485.
26. Ghafouri-Fard S, Shoorei H, Abak A, ve ark. Effects of chemotherapeutic agents on male germ cells and possible ameliorating impact of antioxidants. *Biomed Pharmacother*. 2021;142:112040.
27. Wang Z, Teng Z, Wang Z, ve ark. Melatonin ameliorates paclitaxel-induced mice spermatogenesis and fertility defects. *J Cell Mol Med*. 2022;26(4):1219-1228.
28. Toraman E, Budak B, Bayram C, ve ark. Role of parthenolide in paclitaxel-induced oxidative stress injury and impaired reproductive function in rat testicular tissue. *Chem Biol Interact*. 2024;387:110793.
29. Dygai AM, Chaikovskii AV, Zhdanov VV, ve ark. Responses of Spermatogenous Tissue and Mechanisms of Their Development Upon Cytostatic Exposure. *Bull Exp Biol Med*. 2015;159(6):743-746.
30. Aksu EH, Kandemir FM, Küçükler S, Mahamadu A. Improvement in colistin-induced reproductive damage, apoptosis, and autophagy in testes via reducing oxidative stress by chrysin. *J Biochem Mol Toxicol*. 2018;32(11):22201.
31. Moradi Maryamneghari S, Shokri-Asl V, Abdolmaleki A, Jalili C. Genetic, biochemical and histopathological evaluations of thymoquinone on male reproduction system damaged by paclitaxel in Wistar rats. *Andrologia*. 2021;53(10):14192.
32. Sariözkan S, Türk G, Eken A, ve ark. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) fruit extract alleviates testis and sperm damages induced by taxane-based chemotherapeutics. *Biomed Pharmacother*. 2017;95:1284-1294.
33. Zhang Y, Liu Y, Teng Z, ve ark. Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) alleviate paclitaxel-induced spermatogenesis defects and maintain male fertility. *Biol Res*. 2023;56(1):47.
34. Ili P, Sari F, Bucak MN, ve ark. DNA damaging effect of paclitaxel in the epididymal sperms as a chemotherapeutic agent and possible remedies to prevent this effect: A study on reproductive potential of male cancer patients of reproductive age. *Theriogenology*. 2019;132:201-211.
35. Balcıoğlu E, Göktepe Ö, Tan FC, Bilgici P, Yakan B, Özdamar S. The role of curcumin against paclitaxel-induced oxidative stress and DNA damage in testes of adult male rats. *Turk J Med Sci*. 2023;53(1):40-50.
36. Abd-Elrazek AM, El-Dash HA, Said NI. The role of propolis against paclitaxel-induced oligospermia, sperm abnormality, oxidative stress and DNA damage in testes of male rats. *Andrologia*. 2020;52(1):13394.
37. Sariözkan S, Türk G, Güvenç M, ve ark. Effects of Cinnamon (*C. zeylanicum*) Bark Oil Against Taxanes-Induced Damages in Sperm Quality, Testicular and Epididymal Oxidant/Antioxidant Balance, Testicular Apoptosis, and Sperm DNA Integrity. *Nutr Cancer*. 2016;68(3):481-494.