

## SIÇAN TESTİSİNDE METOTREKSAT'IN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOP DÜZEYİNDE ETKİLERİ\*

Ayça Işık\*\* • Levent Işlay\*\*\* • Esra Atabenli Erdemli\*\*  
Canan Akbay\*\* • Kadri Anafarta\*\*\*

### ÖZET

Bir folik asit antimetaboliti olan metotreksat (MTX) hücre siklusunun S dönemindeki hücreler üzerinde sitotoksik etki yapar. Hücre bölünmesini inhibe ettiğinden, kanser tedavisinde uzun zamandan beri kullanılan bir kemoterapötiktir. Metotreksat etkisine özellikle duyarlı olan hücreler, kemik iliği, GIS mukozası, kıl kökleri ve spermatojenik hücreler gibi, hızlı bölünen hücrelerdir. MTX tedavisi alan erkeklerde, yeni spermatozoon oluşumunun bozulmasına bağlı gelişen infertilite önemli bir sorundur. Bu nedenle, biz bu çalışmada, kümülatif düşük dozlarda (0.7 mg/kg, haftada bir, 6 hafta süreyle) kullanılan MTX'in, rat testis germinal epiteli üzerindeki morfolojik etkilerini inceledik. İlk dozdan sonraki, 2., 4., ve 6. haftalarda ilaç verildikten bir hafta sonra sakrifiye edilen ratlardan elde edilen testiküler doku incelemelerinde, özellikle spermatosit ve spermatidlerde öldürücü hasar olduğunu gördük. Germinal epitelin kök hücrelerini oluşturan spermatogonyumlar ise en az etkilenen hücre grubunu oluşturmuyorlardı. Bu sonuçlar, MTX'in testis dokusu üzerindeki etkilerinin geri dönüşümlü olduğunu düşündürdü.

**Anahtar Kelimeler :** Kısırlık, Metotreksat, Testis

### SUMMARY

#### **Methotrexate Effects on Rat Testis Using Light and Electron Microscopes**

Methotrexate (MTX) that is a folic acid antimetabolite has cytotoxic effects on cells in S phase of the cell cycle. Since, it inhibits the cell division, it has been used in the treatment of cancer patients for a long time. Cell populations especially susceptible to methotrexate suppression include rapidly dividing cells such as bone marrow, GIS mucosa, hair roots and spermatogenic cells. Impairment of new sperm development in man who was receiving MTX causes infertility. Therefore, in this study, we examined the morphological changes in rat testes germinal epithelium after repeated low doses (0,7 mg/kg BW once a week for 6 weeks) of MTX i.v. When we examined the testicular tissue preparations obtained from sacrificed rats (on 2., 4., 6<sup>th</sup> week of administration), we have observed that especially the spermatocytes and spermatids were fatally damaged on 6th week. On the other hand, spermatogonia, the stem cells of the germinal epithelium, were less affected cell group. These data suggest that the effects of MTX on testes are reversible.

**Key Words:** Infertility, Methotrexate, Testes

Günümüzde özellikle malign hastalıklar, Jeneralize psöriazis ve artrit gibi deri hastalıklarının tedavisinde birçok kemoterapötik ilaçtan faydalanılmaktadır. Esasen kontrolsüz ve anormal hücre artışı ile karakterize olan malign hastalıklarda hücre bölünmesinin herhangi bir aşamasında etkili olan bu ilaçlar aynı zamanda normal hücreler üzerinde de benzer etki göstermektedirler. Kemik iliği, gastrointestinal mukoza ve saç kökleri gibi hızlı bölünen hücreler bu ilaçlara karşı daha duyarlıdır. Germ hücreleri de hızlı bölünme göstermekte ve bu ilaçların testis dokusu üzerine olan etkisi özellikle reproduktif çağıdaki genç erişkinler için sonuçları açısından önem taşımaktadır.

Jeneralize psöriazis ve artrit tanısıyla metotreksat tedavisi alan birçok erkek hastanın çocuk sahibi olmak istemesi ve bu sebeple tedaviye devam etmek istememeleri üzerine bir dizi araştırma yapılmış, araştırmalar sonucunda hastalarda ciddi oligospermi saptanmıştır(1).

Malign hastalıklar arasında ise metotreksatın en önemli kullanım yeri Akut Lenfositik Lösemidir(2). İlerleyen kanser tedavileri sonucunda erişkin yaşlara kadar ulaşan bu çocukların gonad fonksiyonuna tedavinin etkisi göz önünde bulundurulmalıdır. Kullanılan antineoplastik ilaç grubu ve çocukların kemoterapiyi aldıkları puberte dönemi gonad disfonksiyonunun ne

\* Bu çalışma, Eylül-1996 III. Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde sunulmuştur.

\*\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji ABD

\*\*\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji ABD

kadar geniş olacağını belirleyen faktörlerdir. Günümüzde kullanılan tedavi şemaları çok ilaçlı olduğu için, tek başına metotreksatın testis dokusundaki morfolojik ve hormonal değişikliklerden veya bu değişikliklerin herhangi birinden sorumlu olup olmadığını belirlemek zordur (3).

Bu nedenle çalışmamızda, tedavi programlarında sık olarak kullanılan metotreksatın hızlı bölünme özelliği gösteren testis hücreleri üzerine olan etkilerinin, deneysel olarak doz-süre ilişkisi bazında histopatolojik olarak aydınlatılması amaçlanmıştır.

### MATERYAL - METOD

Bu çalışmada 16 adet Wistar tipi erkek erişkin sıçan kullanılmıştır. Hayvanların 4 tanesi kontrol grubu olarak ayrılmış, diğerleri 4'erli gruplara bölünmüştür. Bu hayvanlara 0.7mg/kg. metotreksat haftada bir kez 6 hafta süreyle anestezi altında (iV) olarak verilmiş, 2. hafta, 4. hafta, 6. haftada ilaç uygulandıktan bir hafta sonra hayvanlar anestezi altında öldürülerek testisler çıkarılmıştır. İlacın testis dokusunda kantitatif olarak spermatogenez üzerine olan etkileri morfolojik yönden incelenmiştir. İlacın dozu insanda kullanılan mutan ilaç dozunun sıçanlara göre hesaplanmasıyla bulunmuştur. Çıkarılan örnekler ışık mikroskobu takibi için Bouin solüsyonunda tespit edilip parafin bloklara gömülmüştür. Alınan kesitler Hematoksilen-eozin ve PAS boyalılarıyla incelenmiştir. EM için hazırlanan bloklar içinse %2.5 gluteraldehitte tesbit edilip yarı ince kesitleri Toluidin mavisi Azur II ile boyanmıştır. Işık mikroskop incelemeleri Axioskope fotomikroskobu altında yapılmıştır. İnce kesitler kurşun sitrat ve üranil asetatla boyanarak jeol 100 EM mikroskobu altında incelenmiştir.

### BULGULAR

Işık mikroskobu incelemelerinde tubuli seminiferi kontorti duvarında spermatogenezis incelendiğinde Johnsen kriterlerine göre ortalama puan 2. haftada = 8.86 , 4. haftada =7.90, 6. haftada = 7.20 olarak bulundu. Normal testiste bu oranın 9.39 olması bekleniyordu.(4) Kontrol grubuna ait olan testiküler doku incelemelerinde ise ortalama değer 9.10 olarak bulundu.

### JOHNSEN KRİTERLERİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

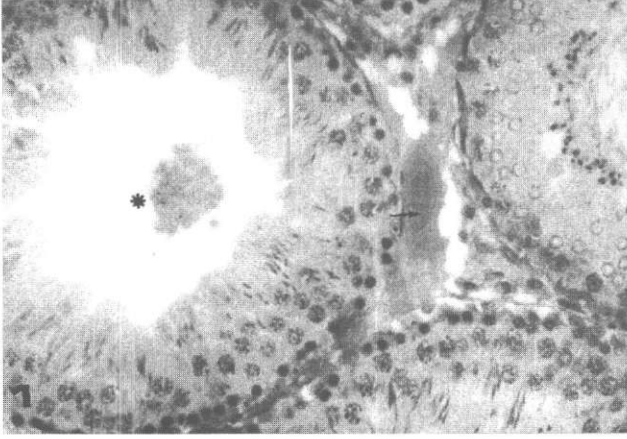
Johnsen'in 1970'de oluşturduğu puanlama sisteme göre tübülü seminiferi kesitleri incelenerek aşağıdaki kriterlere göre her tübülüse verilen puanların top-

lamı, sayılan tübül sayısına bölünerek ortalama puan hesaplandı.

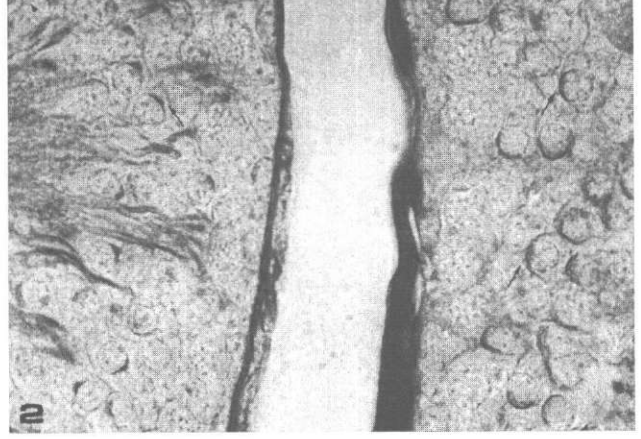
- 10 Germ epiteli çok tabakalı, açık santral lümen, çok miktarda spermatozoa,
- 9 Germ epiteli çok tabakalı ancak disorganize, lümendeki epitel hücreleri spermatozoonlarla karışmış,
- 8 Germ epiteli çok tabakalı, lümeninde 10'dan daha az spermatozoa,
- 7 Çok miktarda spermatid, ancak hiç spermatozoon yok,
- 6 Hiç spermatozoon yok, spermatid sayısı 10'dan daha az,
- 5 Bir kaç tane spermatosit, spermatid veya spermatozoon yok,
- 4 Spermatozoon ve spermatid hiç yok, spermatosit sayısı 5'den az,
- 3 Sadece birkaç spermatogonya,
- 2 Birkaç sertoli hücresi, germ hücresi hiç yok,
- 1 Semifer tübülde hiç hücre yok,

Ortalama değer azalması spermatogenezin bozulması lehine değerlendirildi (Şekil 1). 2. haftadan başlamak üzere 6. haftada daha fazla olmak üzere tubuli seminiferi duvarlarında bazal membranlarında kalınlaşma (Şekil 2), germ hücrelerinde maturasyon ve sıralanma bozukluğu, lümeninde spermatozoon azlığı veya yokluğu dikkat çekti (Şekil 1). Süreyle artan oranda en çok spermatositlerin ve spermatidlerin, daha az sayıda spermatogonyumların ilaçtan etkilendiği saptandı. Bu hücrelerde kromatin yoğunlaşması, parçalanması, hücrede vakuolizasyonla tanımlanan apoptozis hücre ölümü, dejenerer spermatidlerin lümenine dökülmesi söz konusuydu (Şekil 3). Kontrollerde bütün spermatid akrozomları Sertoli hücre bazal sitoplazmasına dönük duruşlu iken, metotreksat sonrası spermiyogenezde bozukluğa bağlı spermatidlerde akrozomlar ters duruşlu olarak izlendi (Şekil 2,3). Azalmış sayıdaki spermatozoonlarda lümeneye verilmiş bozukluğuna bağlı spermatozoonların derinlerde yerleşimi dikkat çekti (Şekil 4). Sertoli hücre sitoplazmalarında yağ birikimi artmıştı (Şekil 5), interstisyel dokuda ödem (Şekil 1) ve makrofajlarda (Şekil 5) artış izlendi.

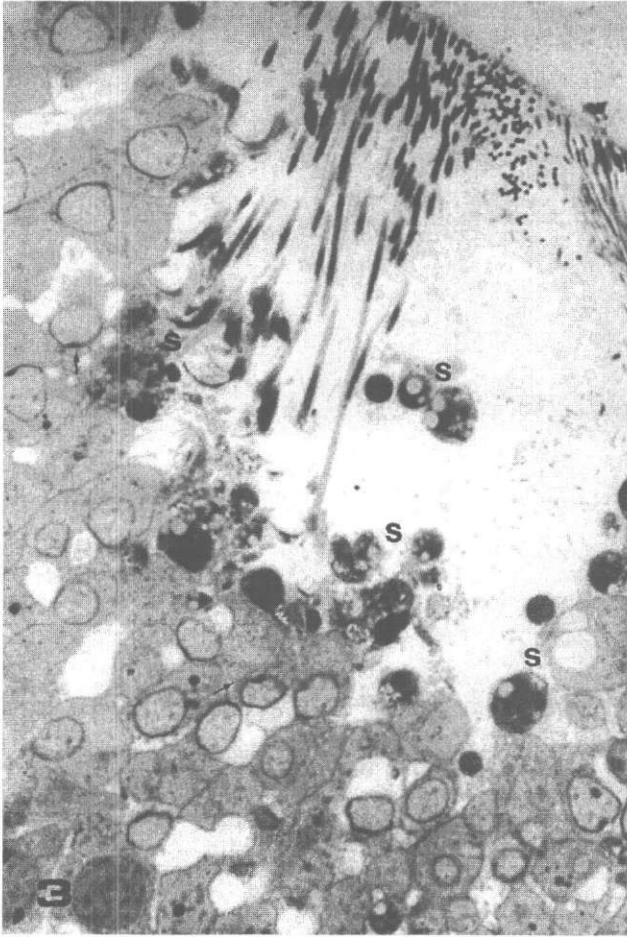
Elektron mikroskobu incelemelerinde, ışık mikroskobu bulgularını destekler nitelikte özellikle spermiyogenez bozukluğuna bağlı akrozomlarda malrotasyon, 4. haftada özellikle spermatid hücrelerinde apoptozis (Şekil 6) dikkat çekti. Bu evrede lümeninde görülen spermatozoonların ilaç etkisinden önceki



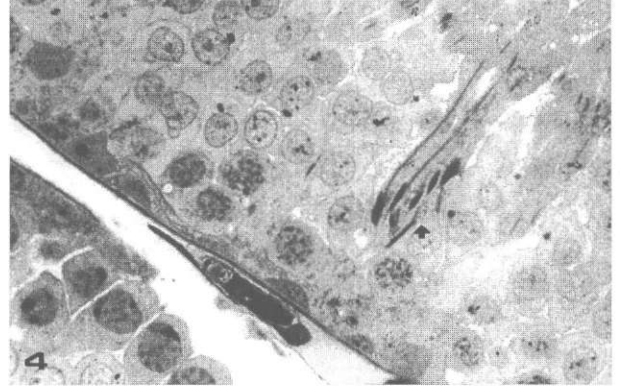
**Şekil 1:** Dördüncü haftaya ait mikrografta germ epitelinde bozulmuş hücre sıra dizilimi ve lümenlerde spermatozoon yokluğu, dökülmüş spermatidler (\*) izlenmektedir.. İnterstisiyel bölgede ödem vardır (^). (x 40 HE)



**Şekil 2:** Altıncı haftaya ait mikrografta bazal membranda kalınlaşma, spermatidlerde spermiyogenez bozukluğuna bağlı olarak akrozom malrotasyonu (^) izleniyor. (x 100 PAS).



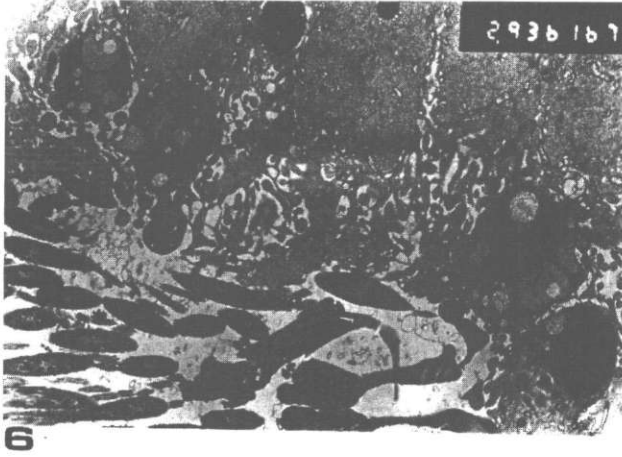
**Şekil 3:** 6. deney haftasına ait mikrografta apoptotik spermatidler lümeninde izlenmekte (^). Spermatidlerde akrozom reaksiyonundaki bozukluk dikkat çekmektedir (^). (x 100 Toluidin mavisi Azur II)



**Şekil 4:** İkinci haftaya ait mikrografta mekik şeklindeki spermatozoon başlarının lümeneye verilmiş bozukluğuna bağlı derinlerde yerleşimi (^) izleniyor. (x 100 Toluidin mavisi Azur II)



**Şekil 5:** Altıncı deney haftasına ait grupta apoptotik hücreler (^), yağ birikimine ait vakuoller (\*) interstisiyel dokuda makrofajlar izlenmekte (Kıvrık ok). (x 100 Toluidin mavisi Azur II)



**Şekil 6:** Dördüncü haftaya ait mikrografta apoptotik spermatidler (↑), lümende spermatozoonlar görülüyor. (X 2900)

devreye ait olduğu kabul edildi. 6. haftada spermatid ve spermatozoonlarda artan apoptozis yanında hala spermatogonyumların sağlam kaldığı tesbit edildi (Şekil 7).

Kontrol grubuna ait kesitlerde (Şekil- 8) tubuli seminiferi kontorti lümenleri açıktı ve bol spermatozoon içeriyordu. Germinal epitel çok tabakalıydı, sıralanma bozukluğu tesbit edilmedi. Spermiyogenezdeki akrozom durumu ve spermatozoonların lümene verilmesi normal olarak izlendi. Apoptotik hücre yoktu.

## TARTIŞMA

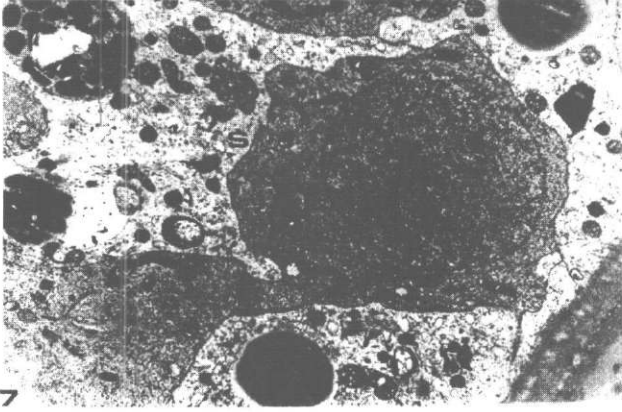
Kanserli erkek hastalarda fertilitenin korunması problemi giderek önem kazanan bir konudur. Kanser tedavisinde yeni gelişmeler sonucunda uzun süreli yaşam yüzdeleri giderek artmaktadır. Bu yüzden tedavinin akut etkileri yanında geç başlayan toksik etkileri şu anda daha önem kazanmıştır. Kemoterapiden sonra uzamış infertilite ve spermatojenik hücrelerdeki kromozomal hasar uzun süreli ve geç başlayan toksik etkilerdir. Hastalarda son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçları hem radyoterapi hem kemoterapiden sonra gonadlarda önemli morfolojik değişikliklerin olduğunu göstermiştir. Fakat MTX'in gonadlar üzerindeki etkisine dair çok az çalışma vardır.

Biz MTX'in testislerdeki spermatojenik aktivite ve fertilitate etkisini belirlemek için, basit ve objektif bir metod olan Johnsen'in 1970'de oluşturduğu puanlama sistemini kullandık (4). Buna göre tübülüs seminiferi kontorti kesitleri incelenerek Johnsen'in belirlediği kriterlere göre her tübülüse verilen puanların toplamı sayılan tübülüs sayısına bölünerek ortalama puan hesap-

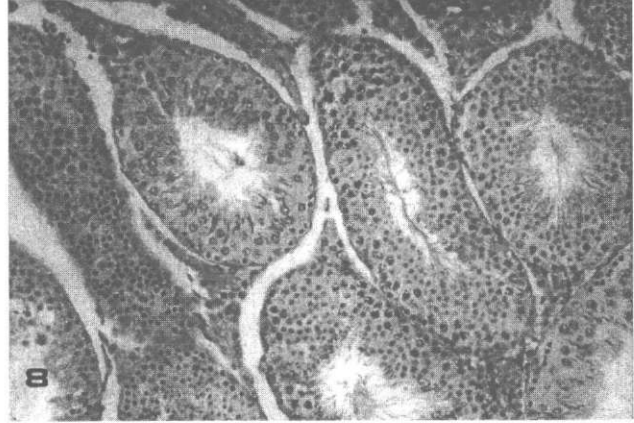
landı. Altı hafta boyunca, haftada tek doz MTX alan grupta ortalama puan en düşük olarak bulundu. Ortalama değerdeki bu azalma spermatogenez ve spermiyogenezin bozulması lehine değerlendirildi. İkinci ve 4. haftalarda ilacın akut ve subakut etkisi izlenirken 6. haftada ilaç verildikten bir hafta sonra kesilen hayvanlarda ise sıçan için gerekli spermatojenik siklus süresi (48 gün) tamamlandığı için kronik etki belirlendi. İkinci haftadan başlamak üzere 6. haftada en fazla olmak üzere tubuli seminiferi duvarlarında yer yer bazal membran kalınlaşmaları, germ hücrelerinde maturasyon ve sıralanma bozukluğu, lümende spermatozoon azlığı veya yokluğu dikkat çekti. Bu bulgular diğer yazarların çalışmaları ile uyumlu bulundu (3, 6). Süre ile artan oranda özellikle spermatozoonların ve spermatidlerin etkilendiği fakat spermatogonyumların daha az miktarda etkilendiği saptandı.

Metotreksat'ın toksik dozda kullanıldığı bir çalışmada yüksek (100-300 mg/kg.) tek doz I.V. olarak verilen MTX'a bağlı oluşan testiküler hasarın kısa dönemde (5 gün) önemli olduğu ortaya konmuş spermatozoon sayısı azalmış olarak bulunmuştur ancak rat testis germ epitelinin spermatojenik siklus süresi bekledikten sonra yapılan tubuli seminiferi kontorti incelemelerinde iyileşme tesbit edilmiştir. Bu durum MTX'ın toksik etkisinin dihidrofolat redüktaz inhibitörü olmasından kaynaklandığı ve genotoksik mekanizmalarla toksisitesini göstermediği şeklinde yorumlanmıştır (5). Erkek fertilitesi, kök hücresi olan spermatogonyum rejenerasyonuna ve bu hücrelerden köken alan spermatozoonların oluşumuna bağlıdır. Sitotoksik ilaç verilmesini takiben meydana gelen infertilitenin differansiye spermatozoonlardaki öldürücü hasardan dolayı hızla geliştiği kabul edilmiştir. Fertilitenin geri dönüşü ise yeterli sayıda hayatta kalmış kök hücrelerine bağlıdır ki bu hücrelerin tübüllerde tekrar çoğalıp sonuçta differansiye spermatojenik hücreler oluşturması ve bunlardan da fertilizasyon için gerekli spermatozoonların meydana gelmesi gereklidir. Bizim çalışmamızda ratlara düşük doz MTX verilmesine karşın bu çalışmayı destekler nitelikte germinal hasarın özellikle differansiye spermatozoonları etkilediği ve spermatogonyumların en az etkilenen hücre grubu olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla yukardaki çalışmayla paralel olarak bizim sonuçlarımızda göstermiştir ki MTX'ın testis dokusu üzerine olan etkisi geri dönebilir.

Tavşanlarda yapılan bir başka çalışmada ise uzun süreli (14 hafta) düşük doz (6mg/kg) MTX uygulamasından sonra spermatogonyum sayısında bir azalma



**Şekil 7:** Altıncı haftada, sağlam yapısını koruyan spermatogonyumlar(S) üstte apoptotik hücreler (↑) ve altta kalınlaşmış bazal lamina (\*) dikkat çekmiştir. (X 4800)



**Şekil 8:** Normal tübüli seminiferi kontorti kesitleri (X 20 HE)

tübüler bazal membranlarda bir kaç tübülde görülen kalınlaşmalar, pek çok spermatogonyumda hücre büyüklüğünde artma ve sitoplazmada şişme gözlenmiştir (3). Bizim çalışmamızda kullandığımız doz daha düşüktür ve süremiz daha kısadır. Bazal membran kalınlaşması ortak bulgumuzdur, ancak spermatogonyum değişiklikleri bizde bulunmamıştır.

Bu bulgular sonucunda, bir antimetabolit olarak S dönemindeki hücreler üzerinde sitotoksik etkisi olan metotreksatın (1,2) mutad insan tedavi dozunda testisleri spermatogenezi ve spermiyogenezi bozarak orta derecede etkilediği düşünüldü. Çoğu spermatogonyumun sağlam görünmesi nedeniyle bunların daha sonra mitozla çoğalacakları düşünülerek, ilacın etkisinin geri dönüşümlü olduğu kararına varıldı.

## KAYNAKLAR

1. Morris LF, Harrod MJ, Menter AM, Silverman AK. Methotrexate and Reproduction in men: Case report and recommendations. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1993; 29, 5 p:2 :913-6.
2. Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji*, Cilt I, 1994 ; 1035-36.
3. Koehler M, Waldherr R, Ludwig RI. Effects of MTX on Rabbit Testes. Part 1: Morphological Changes. *Pediatric Hematology Oncology*. 1986; 3(4):335-41.
4. Damjanov Ivan: Clinical evaluation of the infertile couple , *Pathology of Infertility* . Mosby - Year Book , Inc, 1993: 7-42.
5. Johnson FE, Farr SA, Mawad M, Sun Woo YC. Testicular Cytotoxicity of Intravenous Methotrexate in Rats : *Journal of Surgical Oncology* 1994; 55 :175-8.
6. Russel RA and Russel JA. Short - Term Morphological Response of the Rat Testis to Administration of Five Chemotherapeutic Agents :*The American Journal of Anatomy* 1991; 192: 142-63.