

Atıf İçin: Yüksek, V., Dede, S., Usta, A. ve Koşal, V. (2025). Sıçan Testis Dokusunda Siklofosfamid ile Tetiklenen Apoptoz, Nekroz ve Otofaji Yollarının Modülasyonunda Koenzim Q10'un Koruyucu Rolü. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 15(3), 798-808.

To Cite: Yüksek, V., Dede, S., Usta, A. & Koşal, V. (2025). Protective Role of Coenzyme Q10 in Modulating Apoptosis, Necrosis, and Autophagy Pathways Induced by Cyclophosphamide in Rat Testicular Tissue. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 15(3), 798-808.

Sıçan Testis Dokusunda Siklofosfamid ile Tetiklenen Apoptoz, Nekroz ve Otofaji Yollarının Modülasyonunda Koenzim Q10'un Koruyucu Rolü

Veysel Yüksek^{1*}, Semiha Dede², Ayşe Usta³, Volkan Koşal⁴

Öne Çıkanlar:

- CPC apoptotik nekrotik ve otofajik markırları etkileyerek testis doku hasarına neden olmaktadır.
- Q10 CPC'nin neden olduğu hücrel hasarı düzeltmede önemli rol oynamakta
- Q10 BAX/BCL-2 oranı azalmasını sağlayarak hücre sağkalımını desteklemektedir

Anahtar Kelimeler:

- Siklofosfamid
- Koenzim Q10
- Kaspaze-3
- Kaspaz-9
- ATG3
- LC3

ÖZET:

Siklofosfamid (CPC) kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan en eski antikanser ilaçlarından biridir. CPC'nin testis, spermatogenez, üreme hormonları üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışma, infertilite tedavisinde kullanılan ve testis ile seminal sıvıda doğal olarak bulunan Koenzim Q10'un (CoQ10), CPC'nin testis dokusunda oluşturduğu hasarın onarılmasına etkisini belirlemeyi amaçlamıştır. 30 Albino Wistar erkek sıçan, her grupta 6 hayvan olacak şekilde 5 gruba [Kontrol, Siklofosfamid (CPC), Koenzim Q10 (CoQ10), CPC + CoQ10-I (CQ-I), CPC + CoQ10-II (CQ-II)] ayrıldı. Apoptotik (*kaspaz-8*, *kaspaz-9*, *kaspaz-3*, *BAX*, *BCL2*, ve *BAK1*), otofajik (*ATG3*, *ATG5* ve *LC3*) ve nekrotik (*RIPK1*) hücre ölüm mekanizmalarındaki kavşak genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri belirlendi. Toplam mRNA'dan cDNA sentezlendi. mRNA gen ekspresyon seviyeleri RT-qPCR ile tespit edildi. Tüm grup çalışmaları için $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. CPC'nin kontrol grubuna göre *kaspaz-9*, *kaspaz-3* ve *BAK1* mRNA düzeylerini artırdığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). CPC ile birlikte CoQ10 uygulandığında, *kaspaz-9*, *kaspaz-3* ve *BAK1* genlerinin ekspresyon seviyelerini düşürdüğü ($p < 0.05$) tespit edilmiştir. Ayrıca, *BCL-2* gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0.05$) gözlemlenmiştir. Hem kontrol grubuna hem de CPC grubuna kıyasla CoQ10 uygulamasının *BAX/BCL-2* oranını istatistiksel olarak azalttığı ($p < 0.05$) ortaya konulmuştur. CPC, *ATG3* ve *LC3* mRNA ekspresyonunu düşürmüştü, ancak CPC ile birlikte CoQ10 uygulaması *LC3* ekspresyonunu artırmıştır ($p < 0.05$); ayrıca *RIPK1* seviyesi CQ-I grubunda CPC'ye göre azalmıştır ($p < 0.05$). Sonuç olarak, CoQ10'un, siklofosfamidin (CPC) neden olduğu apoptozu düşürdüğü, otofajiyi düzenlediği ve nekroptozu önlemede rol oynadığı ve hücre sağkalımını desteklediği tespit edilmiştir. Ancak klinik uygulamalar için daha geniş ve uzun vadeli çalışmalar gerekmektedir.

Protective Role of Coenzyme Q10 in Modulating Apoptosis, Necrosis, and Autophagy Pathways Induced by Cyclophosphamide in Rat Testicular Tissue

Highlights:

- CPC causes testicular tissue damage by affecting apoptotic necrotic and autophagic markers.
- Q10 plays an important role in correcting cellular damage caused by CPC
- Q10 supports cell survival by reducing the BAX/BCL-2 ratio

Keywords:

- Cyclophosphamide
- Coenzyme Q10
- Caspase-3
- Caspase-9
- ATG3
- LC3

ABSTRACT:

Cyclophosphamide (CPC) is one of the oldest anticancer drugs frequently used in cancer treatment. However, CPC is known to have adverse effects on the testis, spermatogenesis, and reproductive hormones. This study aimed to investigate the effect of Coenzyme Q10 (CoQ10), a compound naturally found in the testis and seminal fluid and used in infertility treatment, on repairing the damage caused by CPC in testicular tissue. Thirty male Wistar Albino rats were divided into five groups, each consisting of six animals: Control, CPC, CoQ10, CPC + CoQ10-I (CQ-I), and CPC + CoQ10-II (CQ-II). The mRNA expression levels of junctional genes were detected in apoptotic (*caspase-8*, *caspase-9*, *caspase-3*, *BAX*, *BCL2*, and *BAK1*), autophagic (*ATG3*, *ATG5*, and *LC3*), and necrotic (*RIPK1*) cell death mechanisms. cDNA was synthesized from total mRNA, and the gene expression levels of apoptosis markers were determined by RT-qPCR. Statistical significance was set at $p < 0.05$. CPC was found to upregulate *caspase-9*, *caspase-3*, and *BAK1* mRNA levels compared to the control group ($p < 0.05$). However, co-administration of CoQ10 with CPC significantly reduced the expression levels of *caspase-9*, *caspase-3*, and *BAK1* ($p < 0.05$). Additionally, a significant increase in *BCL-2* gene expression was observed ($p < 0.05$). CoQ10 treatment reduced the *BAX/BCL-2* ratio compared to the control and CPC groups ($p < 0.05$). CPC reduced *ATG3* and *LC3* mRNA expression, but co-administration of CPC with CoQ10 increased *LC3* expression ($p < 0.05$); additionally, *RIPK1* levels were lower in the CQ-I group compared to CPC ($p < 0.05$). In conclusion, CoQ10 was found to reduce CPC-induced apoptosis, regulate autophagy, and prevent necroptosis, promoting cell survival. However, larger and longer-term studies are required for clinical implementation.

¹Veysel YÜKSEK (Orcid ID: 0000-0001-7432-4989), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Özalp Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Van, Türkiye

²Semiha DEDE (Orcid ID: 0000-0001-5744-6327), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Van, Türkiye

³Ayşe USTA (Orcid ID: 0000-0002-5522-3469), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Van, Türkiye

⁴Volkan KOŞAL (Orcid ID: 0000-0001-5268-5046), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Suni Tohumlama Anabilim Dalı

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Veysel YÜKSEK, e-mail: veyselyuksekk@yyu.edu.tr

Etik Kurul Onayı / Ethics Committee Approval: Bu çalışmada kullanılan testis dokusu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel

Etik Kurulu (YUHAD-YEK, Date: 28/11/2019; Decision number: 2019/11) çalışmasından alınmıştır.

GİRİŞ

Siklofosfamid (CPC), 1958 yılında kanser tedavisinde kullanımı onaylanan en eski antikanser ilaçlardan biridir (Brock ve Wilmanns, 1958). Siklofosfamid, en başarılı ve yaygın olarak kullanılan antineoplastik ilaçlardan biri olmaya devam etmektedir (Emadi ve ark., 2009). Bağışıklık sistemini baskılayan ve kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir alkilleyiçi kemoterapi ajanıdır (Ahlmann ve Hempel, 2016). CPC, fosforamid ve akrolein moleküllerine metabolize olur. CPC metabolitleri, DNA zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturarak hücre bölünmesini önler. Bu metabolitler sitotoksiteye neden olmaktadır (Le ve ark., 2015; Fusco ve ark., 2021). Bununla birlikte, siklofosfamidin benzersiz metabolizması ve aldehit dehidrogenaz tarafından inaktivasyonu, belirgin sitotoksik özelliklerinden sorumludur. Aldehit dehidrogenazın farklı hücresel ekspresyonu, siklofosfamidin antikanser terapötik indeksi ve immünoşüpresif özellikleri üzerinde bir etkiye sahiptir (Emadi ve ark., 2009). Ancak, CPC ve metabolitlerinin testis ağırlığında azalma, germ hücre kaybı, tubulus seminiferus contortus'larda dejenerasyon, oligospermi, azospermi, oksidatif strese artış ve testosteron seviyesinde düşüş gibi birçok fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir (Gajjar ve ark., 2015; Smart ve ark., 2018; Li ve ark., 2022). Kemoterapi sırasında üreme sistemini zararlı etkilerden korumak için antioksidan ve sitoprotektif özelliklere sahip maddelerin kullanılması oldukça faydalı olabilir (Abdi ve ark., 2024).

Koenzim Q10 (CoQ10), hücrelerin enerji üretim süreçlerinde kritik bir rol oynayan, yağda çözünen önemli bir antioksidan bileşiktir. Mitokondride yer alan bu koenzim, elektron taşıma zincirinde görev alarak ATP üretimini destekler ve hücresel enerji üretiminde hayati bir öneme sahiptir (Pravst ve ark., 2010; Nelson ve Cox, 2017). Bunun yanı sıra, C ve E vitaminlerinin rejenerasyonunda rol alarak dolaylı bir antioksidan işlevi de görür. CoQ10, sadece oksidatif stresle mücadele etmekle kalmaz, aynı zamanda inflamasyonun düzenlenmesi, kolesterol metabolizması, lizozomal pH dengesi ve sülfür metabolizması gibi birçok biyokimyasal süreçte önemli görevler üstlenir. Ayrıca, sülfür kinon oksidoredüktazın kofaktörü olarak sülfür metabolizmasında ve amino asit metabolizmasında da kritik bir rol oynar. Tüm bu işlevleriyle CoQ10, hücresel homeostazın sağlanmasında ve genel metabolik dengenin korunmasında temel bir bileşendir. Vücudumuz doğal olarak CoQ10 üretse de, yaşlanma süreciyle birlikte bu üretim azalır. CoQ10'un enerji metabolizmasındaki bu önemli işlevi, kalp, beyin ve kaslar gibi yüksek enerji gereksinimi olan organlar için özellikle kritiktir (Hargreaves ve ark., 2020).

İdiyopatik erkek infertilite problemleri tedavisinde CoQ10 sıklıkla tercih edilmektedir. Spermatozoon enerji mobilizasyonunun sürdürülebilmesi ve lipid peroksidasyonundan korumada görev almaktadır (Barcelos ve Haas, 2019). CoQ10 spermatazoaların orta bölümünde bulunan mitokondriye dağılır; enerji promötörü ve antioksidan olarak görev alır (Wu ve ark., 2022). Gen ekspresyonu, membran stabilitesi ve hücre sinyalinde rol oynar. Hücreleri hasardan ve anormal büyümeden korur (Bentinger ve ark., 2007). Bizi bu çalışmaya yönlendiren, önceki çalışmamızdaki (Koşal ve ark., 2024) CoQ10'nun CPC'in neden olduğu testis hasarını önlediğini, sperm hareketliliğini ve sayısını artırdığı deneysel olarak ortaya konulmasıdır.

Bu çalışmanın amacı, siklofosfamid (CPC) kaynaklı testis dokusu kaybında hücre ölüm yollarına ait genlerin ekspresyon düzeylerini ölçmek ve bu süreçte oluşabilecek doku hasarını değerlendirmek; ayrıca, koenzim Q10 (CoQ10) tedavisinin farklı sürelerde uygulanarak bu hasarı önleyici etkisini araştırmaktır. Ayrıca, bu alandaki literatürel eksiklikleri gidermeye katkı sağlamak hedeflenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Etik Beyan

Bu çalışmada kullanılan testis dokusu için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izin belgesi (YUHAD-YEK, Tarih: 30/01/2025; Karar No: 2025/01-05) alınmıştır.

Hayvanlar, yetişkin, patojensiz, erkek Albino Wistar sıçanlar olup, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilmiştir. Çalışmada ortalama 3-4 aylık, 200-250 gram ağırlığında hayvanlar kullanıldı. Hayvanlar *ad libitum* olarak beslendi ve günde 12 saat ışık, 12 saat karanlıkta tutuldu. Yaşam alanları ortalama 22-24°C sıcaklığa ve %55-60 bağıl neme sahipti. Hayvan yetiştiriciliği için İmte Üreme Kafesi T-4 kullanıldı. Her deney grubu için kafeste 6 hayvan olacak şekilde gerçekleştirildi. Deney gruplarının belirlenmesinde dozlar cinsiyet ve ortalama ağırlıklar baz alınarak belirlendi (Reagan-Shaw ve ark., 2008). Deney grupları rastgele seçilen hayvanlardan meydana getirildi. Gruplar aşağıda verildiği gibi düzenlendi:

Kontrol: 4 hafta boyunca oral gavaj yoluyla günlük 0,5 ml fizyolojik tuzlu su uygulandı.

Siklofosfamid (CPC): CPC (Endoxan 90 tablet, Eczacıbaşı, Türkiye) 6 mg/kg dozunda 0.5 ml fizyolojik tuzlu suda çözüldü ve 4 hafta boyunca oral gavaj yoluyla uygulandı.

Koenzim Q10 (CoQ10): 2.8 mg/kg dozunda CoQ10 (Ocean, Almanya) 0.5 ml zeytinyağında çözüldü ve 4 hafta boyunca oral gavaj yoluyla uygulandı.

CPC+CoQ10 I (CQ-I): 6 mg/kg CPC + 2.8 mg/kg CoQ10 4 hafta boyunca oral gavaj yoluyla uygulandı.

CPC+CoQ10 II (CQ-II): 4 hafta boyunca oral gavaj yoluyla 6 mg/kg CPC + 3. ve 4. haftalarda oral gavaj yoluyla 2,8 mg/kg CoQ10 uygulandı.

4 haftanın sonunda, hayvanlar 50 mg/kg dozunda ketalar (Zentiva Sağlık Ürünleri, Türkiye) ve 10 mg/kg dozunda xylazin (Bioveta, Çekya) kombinasyonunun i.p olarak uygulanması ile anesteziye alındı. Sakrifiye edilerek testis dokusundan RNA izolasyonu için örnek alındı. Steril şartlarda alınan testis dokusunun üzerine RNA stabilizatör (GeneAll, RiboSaver: Cat. No 351-001, Korea) konularak -80 °C'de saklandı. Çalışma günü saklanan dokular oda sıcaklığında çözölmeye bırakıldı ve yaklaşık 30 mg kadarı steril tüplere alındı. Dokuların üzerine 0.2 ml steril fosfat tamponu eklenerek homojenizatör (IKA Ultra Yellow line, US) yardımıyla homojenize edildi. Homojenize edilen dokular 3000 RPM 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün üstünde kalan sıvı kısım atıldı, alta kalan homojenatan RNA izole edildi.

RNA eldesi ve cDNA sentezi

Total RNA izolasyon Protokolü (GeneAll, Cat. No.301-001); Elde edilen homojenata 1 ml solüsyon eklendi. Homojenat bir pipet yardımıyla birkaç kez pipetlendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. 1 ml solüsyon başına 0,2 ml kloroform ilave edilir ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. 4°C'de 12.000 x g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi, ardından üst şeffaf faz dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0,5 ml izopropanol eklendi ve çözelti 3~5 kez ters çevirerek yavaşça karıştırıldı. Karışımı oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. 12.000 x g'de 10 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edildi. Üstü dikkatli bir şekilde döküldü ve RNA pelletini yıkamak için 1 ml %75'lik etanol eklendi. 4°C'de 7500 x g'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi, ardından üstü atıldı. Laminer kabinde 10 dakika kurutulmaya bırakılan total RNA pelleti DEPC'li su ile sullandırıldı. Total RNA'nın kantitatif değerlendirilmesi, 260 ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle (BioDrop, UK) hesaplandı. Kantitatif değerlendirme sonucunda, her gruptan en iyi total RNA değerlerine sahip üç hayvanın RNA'sı cDNA sentezi için kullanıldı. Total RNA, Rotor-Gene Q Software-Run cihazı kullanılarak Applied Biosystems™ cDNA sentez kiti (Cat: 4368814, Lithuania)

Sıçan Testis Dokusunda Siklofosamid ile Tetiklenen Apoptoz, Nekroz ve Otofaji Yollarının Modülasyonunda Koenzim Q10'un Koruyucu Rolü

protokolüne göre (25°C 10 dk, 37°C 120 dk, 85°C 5 dk) sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar, hedef gen bölgesine özgü olarak tasarlanmış primerler (ABT, Türkiye) RT-PCR cihazı yardımıyla çoğaltıldı. Primerler ticari olarak satın alındı.

Real Time-qPCR

Elde edilen cDNA'lar kullanılarak, Çizelge 1'de primer sekans dizilimleri verilen hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri belirlendi. Örnek reaksiyon şartları, Çizelge 2'de verildiği gibidir. RT-qPCR reaksiyonu, ROTOR-GENE Q (Qiagen, Germany) cihazında gerçekleştirildi. Gen ekspresyon paternlerinin saptanması amacıyla; Apoptozis için *Caspase-8*, *Caspase-9*, *BCL-2*, *BAX*, *BAK1* ve *Caspase-3*; Otofaji için *ATG3*, *ATG5* ve *LC3*; Nekrotik için *RIPK1* ekspresyon düzeyleri belirlendi. Ekspresyon analizlerinde kontrol geni olarak *gliseraldehit 3- fosfat dehidrogenaz (GAPDH)* kullanıldı. Her bir hedef gene ait primerlerin optizasyon şartları belirlendi. Çalışmada amplikasyon tespiti için SYBR Green master mix (ABT cat: Q030201) kullanıldı. Her çalışma grubundan üç bağımsız örnek olarak analiz edildi. Ct (cycle threshold) değerleri, amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibarıyla belirlendi. Ekspresyon analizlerinde genlerin ürünleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile belirlendi (Livak ve Schmittgen, 2001). Gruplar arasındaki farklılıklar, gen ekspresyonunun kat değişim (fold change) değerleri üzerinden karşılaştırılarak değerlendirildi.

Çizelge 1. Hedef genlere ait primer sekans dizilimi

Gen ismi	Primer sekansı (F: 5'-3')	Primer sekansı (R: 5'-3')
<i>GAPDH</i>	AACCCATCACCATCTTCCAG	GCCATCCACAGTCTTCTGAG
<i>ATG3</i>	GGGAAGAATTGAAAGTGAAGG	TGAACTGAACACATAGGAGG
<i>ATG5</i>	CTATTTGACGCTGGTAACTGA	CTGATGTGAAGGAAGTTGTCTGG
<i>RIPK1</i>	CTTCAGCACCTAGCTCCGTC	TGTCCAGGTCTTTCTCTCTCCA
<i>Kaspaz-8</i>	GATGTCCTGGTGCTATTTTCAGAG	CCTCCTGTCCATGCTTCTG
<i>BAK1</i>	TTGTCCCTAGAACCCAACAG	GTTTAGTTTAGTCCAGGCAGTC
<i>Kaspaz-3</i>	CGAAACTCTTCATCATTTCAGG	GAGCATTGACACAATACACGG
<i>BCL2</i>	ACCAGAATCAAGTGTTTCGTC	TCTTCATCTCCAGTATCCCACTC
<i>Kaspaz-9</i>	TCTCACACCAGAAACACCCA	GTCGTTCTTCACCTCCACCA
<i>BAX</i>	TGCTACAGGGTTTCATCCAG	ATCCACATCAGCAATCATCC
<i>LC3</i>	CCTGGATAAGACCAAGTTTCTG	GCCTGAGCAATCTTTATTCTG

F: Forward, R: Reverse.

Çizelge 2. RT-qPCR reaksiyon şartları

Reaksiyon içeriği	Bir örnek için	Reaksiyon Döngüsü
Master miks (SYBR green)	:10 µl	95°C 5' denatürasyon
Forward (20 µM)	:0.5 µl	95°C 20" } 40 döngü
Reverse (20 µM)	:0.5 µl	
dH ₂ O	:9 µl	
cDNA	:1 µl	
Toplam	:20 µl	

*Bağlanma sıcaklığı primerlere göre değişkenlik göstermiştir.

Melting Curve

Ramp: 50-99 (1'er derece artış)

90°C 5 saniye

İstatistiksel Analiz

Her gruba ait verilerin normallik dağılımı için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Bu özellikler bakımından gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemek amacıyla Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıklar için One-way ANOVA ve post-hoc Bonferroni testi kullanıldı. Tüm

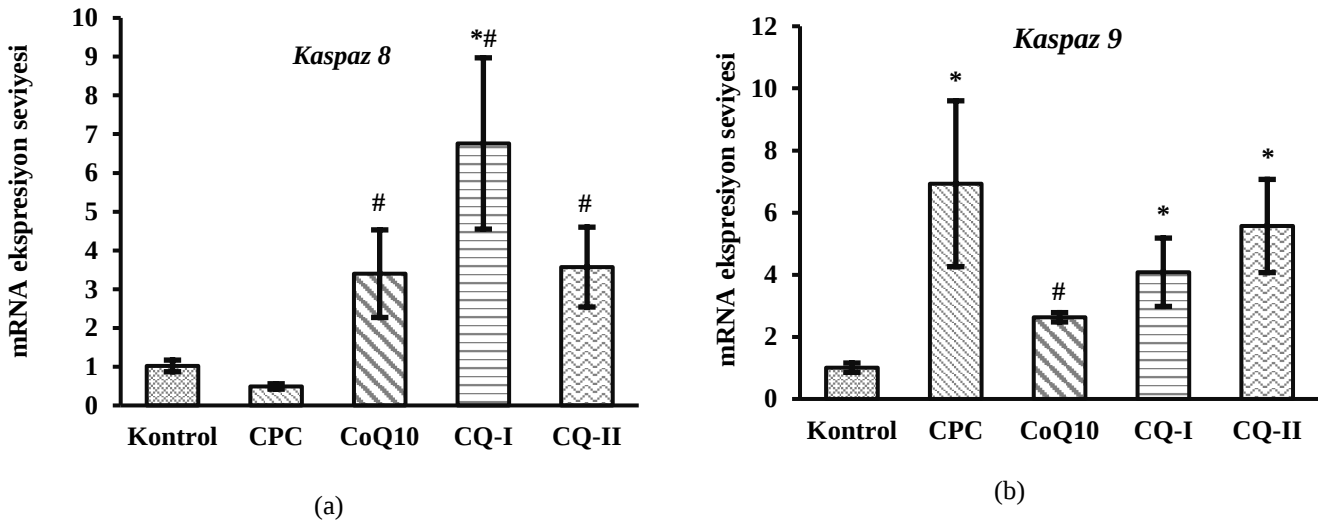
parametreler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. Tüm grup çalışmaları için $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hesaplamalar için SPSS (ver: 22) istatistik paket programı kullanıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

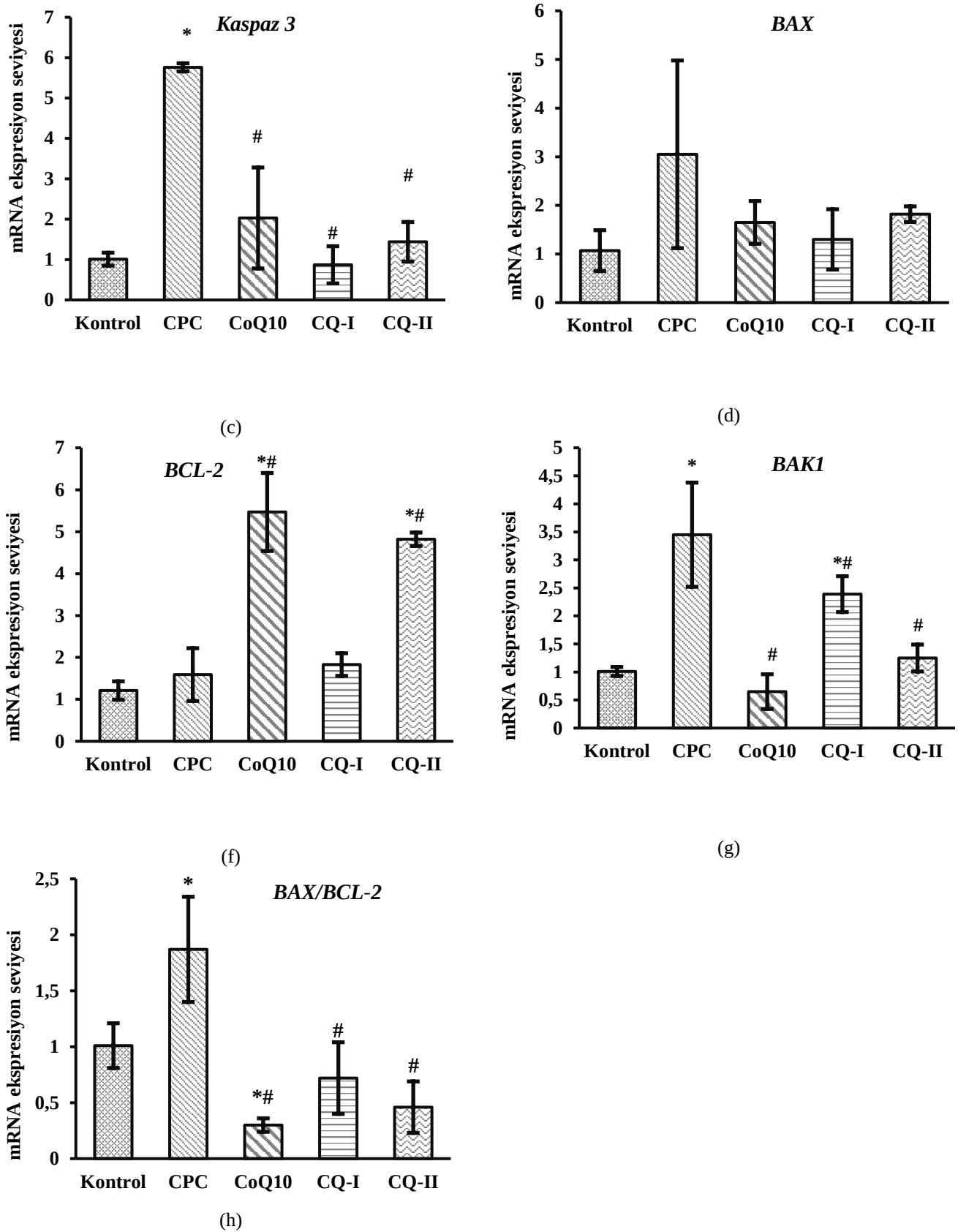
CPC ile birlikte CoQ10 uygulanan sıçanlardaki hedef genlerin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak aşağıda, Şekil 1 ve Şekil 2'de verildiği gibidir.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında: CPC uygulaması, *kaspaz-9*, *kaspaz-3* ve *BAK1* genlerinin sırasıyla yaklaşık olarak 7.0, 6.0 ve 3.5 kat artışı ($p < 0.05$) tespit edilmiştir. CPC ile birlikte CoQ10 uygulaması (CQ-I, CQ-II) karşılaştırıldığında: CQ-I grubunda, *kaspaz-8*'in 7.0 kat ve *BAK1*'in 2.4 kat artışı ($p < 0.05$) ortaya konulmuştur. CQ-II grubunda ise *kaspaz-9*'un 5.5 kat ve *BCL-2*'nin 4.8 kat artış ($p < 0.05$) gösterdiği tespit edilmiştir. CoQ10 ve CQ-II gruplarında ise *BCL-2* ekspresyonunun sırasıyla yaklaşık 5.5 kat ve 4.8 kat bir artış gösterdiği ($p < 0.05$) ortaya konulmuştur. *BAK1* geninin ise CPC ve CQ-I gruplarında artışı ($p < 0.05$) tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da *BAX*'ta bir artış meydana gelmiştir. CoQ10 grubunda ise *BCL-2* seviyesinde bir artış ($p < 0.05$) belirlenmiştir. Dolayısıyla *BAX/BCL-2* oranında bir azalma ($p < 0.05$) ortaya konulmuştur. Bu grupta, diğer gen seviyelerinde istatistiksel olarak bir değişim ortaya konulmamıştır.

CPC grubuna kıyasla, CoQ10 grubunda *kaspaz-8* ve *BCL-2* de artış ($p < 0.05$) ve *kaspaz-3*'de azalış ($p < 0.05$) meydana gelmiştir. *Kaspaz-9*'da bir azalma olsa da anlamlı değildir. CPC ile birlikte CoQ10 uygulamasının ise *kaspaz-8* gen ekspresyon seviyesini artırdığı ($p < 0.05$), buna karşılık *kaspaz-9*, *kaspaz-3* ve *BAK1* genlerinin seviyelerini ise düşürdüğü ($p < 0.05$) tespit edilmiştir. Ayrıca, CQ-II gruplarında *BCL-2* gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0.05$) gözlemlenmiştir. Hem kontrol grubuna hem de CPC grubuna kıyasla CoQ10 uygulamasının *BAX/BCL-2* oranını istatistiksel olarak azalttığı ($p < 0.05$) ortaya konulmuştur.



Sıçan Testis Dokusunda Siklofosfamid ile Tetiklenen Apoptoz, Nekroz ve Otofaji Yollarının Modülasyonunda Koenzim Q10'un Koruyucu Rolü

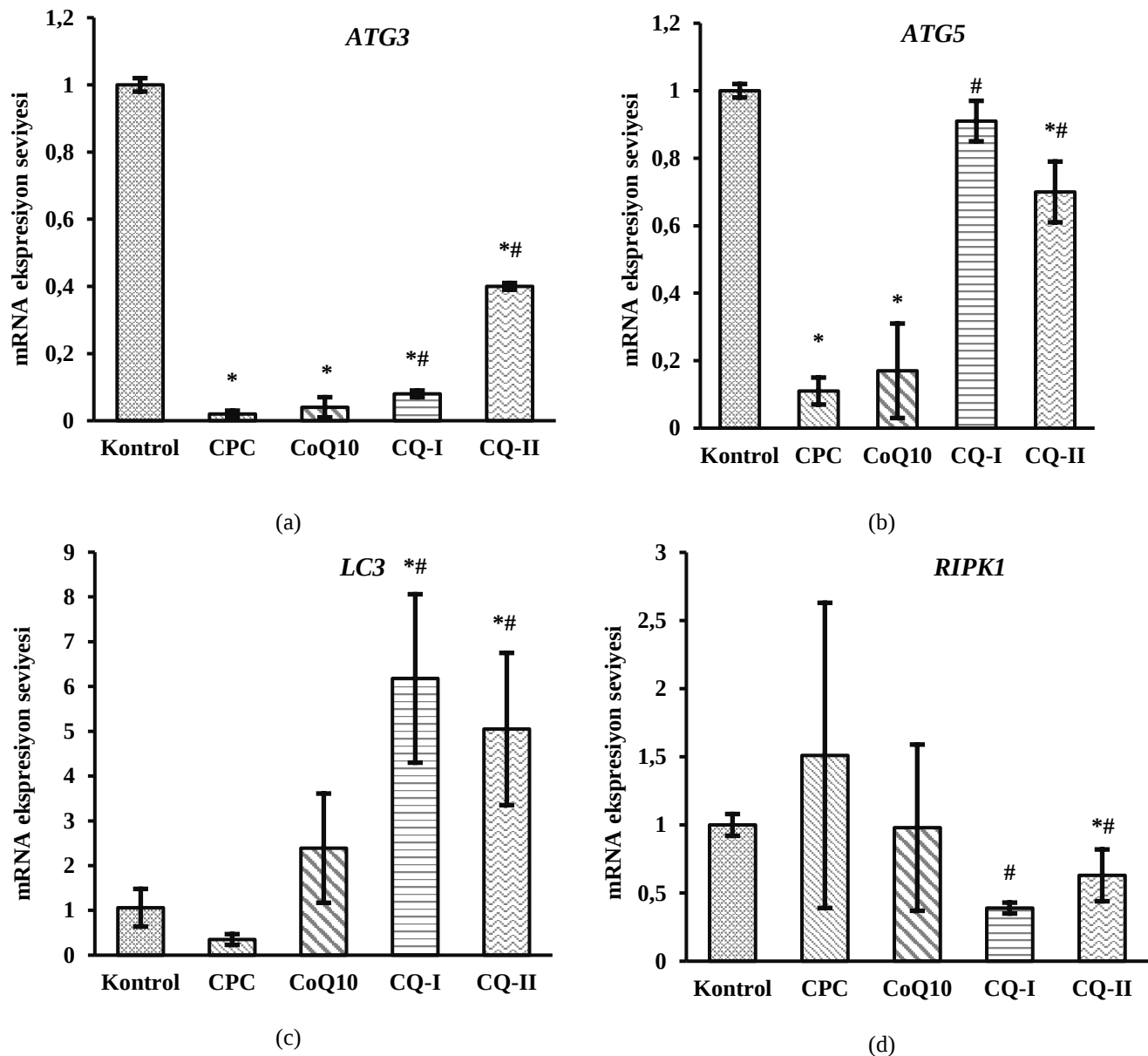


Şekil 1. CoQ10'nun CPC uygulanmış ratlarda testis dokusundaki apoptotik enzim sistemlerine ait bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi

*CPC, CoQ10 ve CPC + CoQ10 (CQ-I ve CQ-II) uygulamalarının farklı apoptoz ve hücre ölümüne bağlı genlerin ekspresyon seviyelerini göstermektedir. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiş olup, istatistiksel anlamlılık şu şekilde belirtilmiştir: * işareti, kontrol grubuna göre anlamlı bir farkı ($p < 0.05$) göstermektedir. # işareti, CPC grubuna göre anlamlı bir farkı ($p < 0.05$) ifade etmektedir

Sıçan Testis Dokusunda Siklofosamid ile Tetiklenen Apoptoz, Nekroz ve Otofaji Yollarının Modülasyonunda Koenzim Q10'un Koruyucu Rolü

ATG3 geni, CPC grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde düşmüştür ($p<0.05$). CoQ10 ve CPC ile birlikte CoQ10 (CQ-I, CQ-II) uygulanan gruplarda da *ATG3* seviyeleri kontrol grubuna göre düşüktür, ancak CQ-I ve CQ-II gruplarında bu düşüş CPC grubuna göre daha azdır ($p<0.05$). *ATG5* geni, kontrol grubuna göre CPC ve CoQ10 gruplarında önemli oranda azaldığı ($p<0.05$), CQ-I ve CQ-II gruplarında değişmediği ($p<0.05$) tespit edilmiştir. CPC grubuna göre ise, CQ-I ve CQ-II gruplarında *ATG5* ekspresyonu yüksek ($p<0.05$) bulunmuştur. *LC3* genin, CPC ile birlikte CoQ10 uygulamasının her iki (CQ-I ve CQ-II) grupta da hem kontrol hem de CPC grubuna göre olarak yaklaşık sırasıyla 6.0 ve 5.0 kat artırdığı ($p<0.05$) tespit edilmiştir. *RIPK1* seviyesi, kontrol grubuna kıyasla CPC ve CoQ10 gruplarında anlamlı bir değişiklik göstermezken, CQ-I grubunda CPC'ye göre anlamlı bir azalma ($p<0.05$) kaydedilmiştir.



Şekil 2. CoQ10'nun CPC uygulanmış ratlarda testis dokusundaki *ATG3*, *ATG5*, *LC3* ve *RIPK1* genlerine ait mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi

*CPC, CoQ10 ve CPC + CoQ10 (CQ-I ve CQ-II) uygulamalarının otofaji ve nekroze bağlı genlerin ekspresyon seviyelerini göstermektedir. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiş olup, istatistiksel anlamlılık şu şekilde belirtilmiştir: * işareti, kontrol grubuna göre anlamlı bir farkı ($p<0.05$) göstermektedir. # işareti, CPC grubuna göre anlamlı bir farkı ($p<0.05$) ifade etmektedir

Kemoterapötik ilaçlar, ağır metaller ve kolostojen maddeler testis doku hasarına neden olabilmektedir (Najafi ve ark., 2019). Kemoteropatik bir ajan olarak kullanılan CPC testislerde hasara yol açtığı bilinmektedir (Cao ve ark., 2017). CPC uygulanarak yapılan birçok çalışmada ve araştırmalarda sperm motilitesinin düştüğü, anormal sperm oranı ve genetik hasarının arttığı, testosteron seviyesinin azaldığı ve oksidatif stresin ortaya çıktığı belirlenmiştir (Liu ve ark., 2021; Özatik ve ark., 2021; Li ve ark., 2022; Koşal ve ark., 2024). Yapılan çeşitli çalışmalarda CoQ10 takviyesinin birçok ağır metal, radyasyon ve çeşitli nedenlere bağlı olarak meydana gelen oksidatif stres, histopatolojik değişimleri ve inflamasyon gibi durumları inhibe ederek testis fonksiyonlarını iyileştirdiği ve bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Najafi ve ark., 2019; El-khadragy ve ark., 2020; Irani ve ark., 2022). Yapılan bir çok çalışmalarda doğal antioksidanların bağışıklık sistemini düzenleme dahil olmak üzere ROS temizleme gibi bir çok özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Üstündağ, 2023). CoQ10 doğal bir antioksidan ve ROS temizleyici olup seminal sıvıda doğal olarak bulunma özelliği bulunmaktadır (Balercia ve ark., 2004; Smorag ve ark., 2012).

Siklofosfamid uygulamasının, hem sıçan testis dokusunda hem de karaciğer hücrelerinde *kaspaz-3* aktivasyonunu artırarak apoptoza yol açtığı rapor edilmiştir (Potnuri ve ark., 2018, Yalçın ve ark. 2020).

Bu çalışmada, Koenzim Q10 uygulamasının kaspaz enzim mekanizmaları üzerindeki etkisi, CPC grubuna kıyasla gen ekspresyon seviyeleri açısından değerlendirilmiştir. Ortaya konulan sonuçlar, CoQ10'un kaspaz enzim sistemine ait bazı genler üzerinde farklı etkiler oluşturduğunu göstermektedir. CPC'nin *kaspaz-9* ekspresyonunu artırarak *kaspaz-3* aktivasyonuna neden olduğu ortaya konulmuştur. Bu da daha önce yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar ortaya koyarak CPC'nin testis dokusunda mitokondriyal yollağı tetiklediğini desteklemektedir. CoQ10 hücreyi apoptoza karşı korur, enerjiyi artırır ve anti-inflamatuvar özelliğe sahiptir. Nanopartikül yapısı sayesinde kan-testis bariyerini geçebilir (Littarru ve ark., 2011; Masoumi ve ark., 2021). CPC ile birlikte CoQ10'un sıçanlara uygulamasının *kaspaz-9* ve *kaspaz-3* ekspresyon seviyelerinin azalması mitokondriyal hasarı önlemede koruma sağladığını tespit edilmiştir. CoQ10'un *kaspaz-8* ekspresyon seviyesini artırması, dışsal apoptoz yolunu hafif şekilde aktive edebileceğini düşündürmektedir. Bu durum, CoQ10'un oksidatif strese bağlı mitokondriyal disfonksiyonu azaltarak hücrel sağkalımı artırdığına işaret eder. Aynı şekilde, pro-apoptotik bir faktör olan *BAK1* gen ekspresyonunun düşmesi de CoQ10'un hücrel koruma mekanizmaları üzerinde pozitif bir etki yarattığını gösterir. Daha da önemlisi, CoQ10'un *BCL-2* gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olması, hücreyi apoptozdan koruyan anti-apoptotik mekanizmaların aktive olduğunu işaret etmektedir. *BCL-2*, mitokondriyal membran stabilitesini koruyarak sitokrom C salınımını önler ve böylece apoptoz sürecini durdurur. CoQ10'un hem kontrol hem de CPC grubuna kıyasla *BAX/BCL-2* oranını azaltması, hücrelerin apoptotik uyarılara karşı daha dirençli hale geldiğini ve hücrel sağkalımın desteklendiğini göstermektedir. *BAX/BCL-2* oranındaki düşüş, apoptozun baskılandığı ve hücrelerin hayatta kalma olasılığının arttığını net bir şekilde ortaya koymaktadır.

Çalışma sonuçları, CPC'nin ototofaji mekanizması üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğunu ve hücrel hasara neden olabileceğini göstermektedir. CPC'nin *ATG3*, *ATG5* ve *LC3* proteinlerinin seviyelerini düşürmesi, ototofajiyi baskıladığını ve hücre savunma mekanizmalarının zayıfladığını işaret etmektedir. CoQ10'un hem tek başına hem de CPC ile birlikte kullanıldığında ototofajiyi desteklediği ve CPC'nin olumsuz etkilerini hafiflettiği gözlemlenmiştir. CoQ10'un CPC'nin ototofaji üzerindeki baskılayıcı etkisini hafifleterek hücrel yenilenme süreçlerini desteklediği ve hücre ölümüne karşı koruma sağladığı bu çalışmada da doğrulanmıştır. *ATG3* ve *LC3* protein düzeylerinde

gözlenen artışlar, CoQ10'un ototofajiyi aktive ettiğini ve CPC'nin ototofaji üzerindeki baskılayıcı etkisini hafiflettiğini göstermektedir. Bu bulgu, CoQ10'un ototofaji ve apoptoz süreçlerine müdahale ederek hücre hasarı azalttığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, *RIPK1* seviyelerinin CPC grubunda yükselmesi, CPC'nin nekroptoz yolunu aktive ettiğini gösterirken, CoQ10'un bu artışı baskılaması, hücre ölümünü engelleyici bir etki göstermektedir (Diemer ve ark., 2003; El-khadragy ve ark., 2020). Nekroptoz, inflamatuvar hücre ölüm yolu olarak bilinir ve bu sürecin kontrol altına alınması, CPC'nin neden olduğu inflamatuvar hasarın azaltılmasında önemli bir rol oynayabilir (Kehe ve ark., 2009). Elde edilen önemli sonuçlara rağmen bazı kısıtlamalar mevcuttur. Çalışmanın örneklem büyüklüğünün sınırlı olması ve uzun vadeli etkilerin incelenmemesi, sonuçların genellenebilirliğini sınırlandırmaktadır. Ayrıca, çalışmanın hayvan modeliyle sınırlı olması, insanlara uyarlanabilirliğini zorlaştırmaktadır. Gelecekteki araştırmalarda daha geniş kapsamlı ve uzun süreli çalışmalarla bu eksikliklerin giderilmesi faydalı olacaktır. Elde edilen bu sonuçların öne çıkan önemli yönü, siklofosfamid kullanımına bağlı olarak oluşabilecek infertiliteyi azaltmada koenzim Q10 seviyesinin önemli bir rol oynayabileceği ve bu etki mekanizmasının daha ayrıntılı araştırılması gerektiği sonucudur.

SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışma koenzim Q10'un siklofosfamidin neden olduğu hücre ölüm yolları üzerinde koruyucu bir etki sağlayabileceğini ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgular ışığında koenzim Q10'un siklofosfamid gibi kemoterapötik ajanların yan etkilerini hafifletmek amacıyla terapötik bir ajan olarak kullanılma potansiyelini desteklemektedir. Ancak, bu sonuçların klinik uygulamalarda kullanılması için daha geniş kapsamlı ve uzun vadeli çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Koenzim Q10'un kemoterapi kaynaklı hücre hasarını azaltma potansiyeli, özellikle klinik tedavilerde destekleyici bir ajan olarak umut verici görünmektedir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abdi, M., Fadaee, M., Jourabchi, A., Karimzadeh, H., & Kazemi, T. (2024). Cyclophosphamide-Induced Infertility and the Impact of Antioxidants. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989), 92(6), e70014. <https://doi.org/10.1111/aji.70014>
- Ahlmann, M., & Hempel, G. (2016). The effect of cyclophosphamide on the immune system: Implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78(4), 661-671. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3152-1>
- Barcelos, I. P. de., & Haas, R. H. (2019). CoQ10 and aging. *Biology*, 8(2), 28. <https://doi.org/10.3390/biology8020028>
- Bentinger, M., et al. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7(S41-S50).
- Brock, N., & Wilmanns, H. (1958). Effect of a cyclic nitrogen mustard-phosphamidester on experimentally induced tumors in rats; chemotherapeutic effect and pharmacological properties of B518 ASTA [German]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 83, 453-458.

- Cao, Y., Wang, X., Li, S., Wang, H., Yu, L., & Wang, P. (2017). The effects of L-carnitine against cyclophosphamide-induced injuries in mouse testis. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 120(2), 152-158. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12679>
- Chomczynski, P., & Mackey, K. (1995). Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, 19(6), 942-945.
- Diemer, T., Allen, J. A., Hales, K. H., & Hales, D. B. (2003). Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology*, 144(7), 2882-2891. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0090>
- El-Khadragy, M., Al-Megrin, W. A., AlSadhan, N. A., Metwally, D. M., El-Hennamy, R. E., Salem, F. E. H., Kassab, R. B., & Abdel Moneim, A. E. (2020). Impact of Coenzyme Q10 Administration on Lead Acetate-Induced Testicular Damage in Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 4981386. <https://doi.org/10.1155/2020/4981386>
- Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews. Clinical oncology*, 6(11), 638–647. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146>
- Fusco, R., Salinaro, A. T., Siracusa, R., D'Amico, R., Impellizzeri, D., Scuto, M., Ontario, M. L., Crea, R., Cordaro, M., Cuzzocrea, S., Di Paola, R., & Calabrese, V. (2021). Hidrox® counteracts cyclophosphamide-induced male infertility through NRF2 pathways in a mouse model. *Antioxidants*, 10(5), 778. <https://doi.org/10.3390/antiox10050778>
- Gajjar, R., Miller, S. D., Meyers, K. E., & Ginsberg, J. P. (2015). Fertility preservation in patients receiving cyclophosphamide therapy for renal disease. *Pediatric nephrology* (Berlin, Germany), 30(7), 1099–1106. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2897-1>
- Hargreaves, I., Heaton, R. A., & Mantle, D. (2020). Disorders of human coenzyme Q10 metabolism: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6695. <https://doi.org/10.3390/ijms21186695>
- Irani, S., Zhandi, M., Sadeghi, M., Yousefi, A. R., Marzban, H., & Rafieian-Naeini, H. R. (2022). The effect of dietary supplementation of coenzyme Q10 on reproductive variables of cadmium-challenged male Japanese quails (*Coturnix Japonica*). *Veterinary Medicine and Science*. <https://doi.org/10.1002/vms3.990>
- Kehe, K., Balszuweit, F., Steinritz, D., & Thiermann, H. (2009). Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology*, 263(1), 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.019>
- Koşal, V., Rua, İ., Yüksek, V., & Keleş, Ö. F. (2023). Investigation of the effect of Coenzyme-Q10 on cyclophosphamide-induced testicular damage in male rats. *Revista Científica de la Facultad de Veterinaria*, 33(2), 1-7.
- Li, J., You, Y., Zhang, P., Huang, X., Dong, L., Yang, F., Yu, X., & Chang, D. (2022). Qiangjing tablets repair of blood-testis barrier dysfunction in rats via regulating oxidative stress and p38 MAPK pathway. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03615-z>
- Littarru, G. P., Tiano, L., Belardinelli, R., & Watts, G. F. (2011). Coenzyme Q(10) , endothelial function, and cardiovascular disease. *BioFactors* (Oxford, England), 37(5), 366–373. <https://doi.org/10.1002/biof.154>
- Liu, X., Li, Q., Wang, Z., & Liu, F. (2021). Identification of abnormal protein expressions associated with mouse spermatogenesis induced by cyclophosphamide. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(3), 1624-1632. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16263>

- Livak, KJ., & Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25 (4), 402–408
- Masoumi, M., Salehi, M., Angaji, S. A., & Hashemi, M. (2021). Effects of coenzyme Q10 and diamond nanoparticles on ischemia-reperfusion-induced testicular damages in rats. *Galen Medical Journal*, 10, e2029. <https://doi.org/10.31661/gmj.v10i0.2029>
- Najafi, M., Cheki, M., Amini, P., Javad, A., Shabeeb, D., & Eleojo Musa, A. (2019). Evaluating the protective effect of resveratrol, Q10, and alpha-lipoic acid on radiation-induced mice spermatogenesis injury: A histopathological study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 17(12), 1-8. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v17i12.5791>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). *Macmillan Learning*.
- Özatic, F. Y., Özatic, O., Tekşen, Y., Yiğitaslan, S., & Ari, N. S. (2021). Protective and therapeutic effect of hydrogen sulfide on hemorrhagic cystitis and testis dysfunction induced with cyclophosphamide. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 51(3), 1530-1542. <https://doi.org/10.3906/sag-2003-10>
- Potnuri, A. G., Allakonda, L., & Lahkar, M. (2018). Crocin attenuates cyclophosphamide induced testicular toxicity by preserving glutathione redox system. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 101, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.068>
- Pravst, I., Žmitek, K., & Žmitek, J. (2010). Coenzyme Q10 contents in foods and fortification strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(4), 269-280.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB journal*, 22(3), 659-661.
- Smorag, L., Zheng, Y., Nolte, J., Zechner, U., Engel, W., & Pantakani, D. V. K. (2012). MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis: Evidence for stage-specifically expressed miRNA-221, -203, and -34b-5p mediated spermatogenesis regulation. *Biology of the Cell*, 104(11), 677-692. <https://doi.org/10.1111/boc.201200014>
- Üstündağ H. (2023). The Role of Antioxidants in Sepsis Management: A Review of Therapeutic Applications. *Eurasian Mol Biochem Sci.*, 2(2):38-48.
- Wu, Y., Li, H., Zhao, X., Baki, G., Ma, C., Yao, Y., Li, J., Yao, Y., & Wang, L. (2022). Differential expression of circRNAs of testes with high and low sperm motility in Yili geese. *Frontiers in Genetics*, 13, 970097. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.970097>
- Yalçın, A., Keleş, H., Kahraman, T., Bozkurt, M. F., & Aydın, H. (2020). Protective effects of ellagic acid against chemotherapy-induced hepatotoxicity. *Duzce Medical Journal*, 22(2), 124-130..