

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
UFUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ TEDAVİ DOZUNDAKİ NİLOTİNİB'İN  
FOLİKÜLOGENEZ VE SPERMATOGENEZ ÜZERİNDEKİ  
ETKİSİNİN SAĞLIKLI FARE MODELİNDE GÖSTERİLMESİ**

**Uzm. Dr. Güldane CENGİZ SEVAL**

**HEMATOLOJİ BİLİM DALI  
YAN DAL UZMANLIK TEZİ  
DANIŞMAN  
Prof. Dr. Meltem AYLI**

**ANKARA  
2014**





**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
UFUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ TEDAVİ DOZUNDAKİ  
NİLOTİNİB'İN FOLİKÜLOGENEZ VE SPERMATOGENEZ  
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN SAĞLIKLI FARE MODELİNDE  
GÖSTERİLMESİ**

**Uzm. Dr. Güldane CENGİZ SEVAL**

**HEMATOLOJİ BİLİM DALI  
YAN DAL UZMANLIK TEZİ  
DANIŞMAN  
Prof. Dr. Meltem AYLI**

**ANKARA  
2014**



UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
Dr.Rıdvan Ege Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi (Hastanesi)  
.....Hematoloji.....ANABİLİM / BİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ JÜRİ TUTANAĞI

ADAYIN

ADI

: Güldane

SOYADI

: Cengiz Sevil

ANABİLİM / BİLİM DALI

: İç Hastalıkları / Hematoloji yarı dal

Tıp Fakültesi .....Hematoloji..... Anabilim Dalı/Bilim Dalı uzmanlık öğrencilerinden  
Dr. Güldane Cengiz Sevil tez değerlendirme jürisi toplandı, tez jüri üyeleri tarafından  
değerlendirildi ve sözlü savunması yaptırıldı.

Dr. G.C. Sevil'in "Kronik Miyeloid Lösemi tedavisi dozundağı Nilotinib'in spermatogenez ve Folikülogenez üzerindeki etkisinin sağlıklı fare modelinde gösterilmesi"  
uzmanlık tezi jürimiz tarafından başarılı bulunmuştur.

Saygılarımızla.

TARİH  
9.1.4.1.2014

**JÜRİ ÜYESİ**  
Adı-Soyadı : Prof. Dr. Gürbüz Erdoğan  
Anabilim Dalı : İç Hast / Endokrin.  
Tarih : 9.04.2014  
İmzası :  
**UFUK ÜNİVERSİTESİ**  
Dr. Rıdvan Ege Hastanesi  
Prof. Dr. Gürbüz ERDOĞAN  
İç Hast. Endokrinoloji ve Metabolizma Hast. Uzm.  
Dip. No: 10451-13919 Uzm. No: 14876/12125/21972

**JÜRİ ÜYESİ**  
Adı-Soyadı : Prof. Dr. Halil Değerken  
Anabilim Dalı : İç Hast / Gastroenter.  
Tarih :  
İmzası :  
**UFUK ÜNİVERSİTESİ**  
Dr. Rıdvan Ege Hastanesi  
Prof. Dr. Halil B. DEĞERKEN  
Gastroenteroloji Uzmanı  
Dip. No: 13031/16499 Uzm. No: 16045/18833

**JÜRİ ÜYESİ**  
Adı-Soyadı : Prof. Dr. İzzetkin Aygün  
Anabilim Dalı : İç Hast / Hemat.  
Tarih :  
İmzası :  
**UFUK ÜNİVERSİTESİ**  
Dr. Rıdvan Ege Hast.  
Prof. Dr. İzzetkin AYGÜN  
İç Hastalıkları-Hematoloji Uzm.  
Dip. No: 6-87

EKLER: Uzmanlık Tezi Değerlendirme formları

## ÖNSÖZ

İhtisas eğitimim süresince, bana tüm zorlukları kolaylaştırmayı öğreten, her konuda destek olan, bilgi ve deneyimlerini aktaran, kendisine birçok şey borçlu olduğum çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Meltem Aylı'ya, eğitim hayatıma ve tezime olan katkılarından dolayı İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gürbüz Erdoğan'a, tüm tez preparatlarımın histolojik değerlendirmesini büyük özveri ile yapan Uzm. Dr. Sinan Özkavukçu'ya, ihtisas eğitimim boyunca bilgilerini paylaştığım İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine ve ayrıca çalışmamıza maddi destek sağlayarak gerçekleşmesini sağlayan Lenfoma Miyeloma Derneği'ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bugüne kadar aralıksız devam eden özveri ve destekleri nedeniyle başta eşim, olmak üzere tüm aileme de ayrıca teşekkür ederim.

G. C. Seval

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay .....	i
Önsöz .....	ii
İçindekiler .....	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini .....	v
Şekiller Dizini .....	vi
Tablolar Dizini .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kronik Miyeloid Lösemi .....	4
2.1.1. Tanım .....	4
2.1.2. Epidemiyoloji .....	4
2.1.3. Klinik Bulgular .....	5
2.1.4. Tanı.....	5
2.1.5. Tedavi.....	6
2.1.5.1. Interferon-Alfa .....	7
2.1.5.2. Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli.....	7
2.1.5.3. Tirozin Kinaz İnhibitörleri .....	7
2.2. Gonadogenez .....	11
2.2.1. Folikülogenez .....	11
2.2.1.1. Primordiyal Folikül Seçimi .....	12
2.2.1.2. Preantral Folikül Gelişimi .....	13
2.2.1.3. Antral Folikül Gelişimi .....	14
2.2.1.4. Folikül Atrezisi.....	15
2.2.2. Spermatogenez .....	16
2.2.2.1. Spermatositogenez Evresi .....	17
2.2.2.2. Mayoz Evresi .....	18
2.2.2.3. Spermiyogenez.....	19
2.3. Tirozin Kinaz İnhibisyonu ve gonadogenez.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	22
3.1. Araştırma Grupları .....	22
3.2. Histolojik Analiz .....	23
3.3. Yöntem .....	24

3.4.	İstatistik Değerlendirmeler .....	25
4.	BULGULAR .....	26
4.1.	Over Fonksiyonlarının Histolojik Değerlendirmesi .....	26
4.2.	Testis Fonksiyonlarının Histolojik Değerlendirmesi .....	29
5.	TARTIŞMA .....	30
6.	SONUÇLAR .....	33
	ÖZET.....	34
	SUMMARY .....	35
	KAYNAKLAR .....	36

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>KML</b>	: Kronik Miyeloid Lösemi
<b>ABL</b>	: Abelson
<b>BCR</b>	: Breakpoint Cluster Region
<b>Ph</b>	: Philadelphia
<b>TKİ</b>	: Tirozin Kinaz İnhibitörleri
<b>SCF</b>	: Stem Cell Faktör
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>AHKHN</b>	: Allojeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli
<b>MSY</b>	: Majör Sitogenetik Yanıt
<b>HE</b>	: Hematoksilin Eozin

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 2.1:** KML tedavisinin tarihsel gelişimi

**Şekil 2.2:** İmatinib etki mekanizması

**Şekil 2.3:** İmatinib ve Nilotinib'in kimyasal yapısı

**Şekil 2.4:** Nilotinib etki mekanizması

**Şekil 2.5:** Folikül gelişim ve atrezisi

**Şekil 2.6:** Seminifer tübül yapısı

**Şekil 2.7:** Germ hücrelerinin geçirdiği evreler

**Şekil 3.1:** Testis diseksiyonu yapılırken

**Şekil 4.1:** Folikül sayılarının nilotinib ve kontrol grubundaki dağılımı

**Şekil 4.2:** Kontrol grubu ovaryumunda HE ile boyama görüntüleri

**Şekil 4.3:** Nilotinib grubundan bir ovaryumun HE ile boyanma görüntüsü

**Şekil 4.4:** Kontrol grubundan bir testisin HE ile boyanma görüntüsü

## TABLULAR DİZİNİ

**Tablo 3.1:** Fare overindeki foliküllerin sınıflandırılması

**Tablo 3.2:** Fare testis seminifer tübüldeki spermatojenik aktivite evrelemesi

**Tablo 4.1:** Nilotinib ve kontrol gruplarında folikül sayıları

**Tablo 4.2:** Kontrol ve nilotinib gruplarında spermatogenez karşılaştırılması



## 1. GİRİŞ

Kronik miyeloid lösemi (KML), myeloid seri hücrelerinin aşırı ve kontrolsüz çoğalmasına yol açan bir hematopoetik pluripotent kök hücre hastalığıdır. 9. kromozomdaki Abelson (ABL) protoonkogeni ile 22. kromozomdaki breakpoint cluster region (BCR) geninin 22. kromozom üzerinde füzyonuna yol açan resiprokal bir translokasyon [t(9;22)q34;q11] sonucu ortaya çıkmış anormal 22. Kromozom olan Philadelphia (Ph) kromozomu KML olgularının yaklaşık %95'inde bulunmaktadır (1, 2).

KML hastalarının %50'sinden fazlası erkektir. KML her yaşta görülmekle birlikte, hastaların %46'sı 20-64 yaşları arasında tanı almaktadır (3). Etiyolojisi bilinmemekle birlikte iyonize radyasyona maruz kalmanın KML riskini arttırdığı bilinmektedir (4).

KML'nin günümüzdeki tedavisi kronik tirozin kinaz inhibisyonudur. Bcr-Abl tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) olan imatinib mesilat 2001 yılında klinik uygulamaya girmiş ve KML tedavisinde çığır açmıştır. 2006 yılında ise ikinci nesil TKİ'leri (nilotinib, dasatinib) klinik kullanıma girmiştir.

TKİ'leri sadece Bcr-Abl'yi değil c-kit, PDGFR A/B, Arg ve c-fms gibi diğer tirozin kinazları da inhibe etmektedir. Bu bir dizi proteinin, gonadal gelişim, implantasyon ve fetal gelişimde anahtar rolleri olduğu bilinmektedir (9).

Primordiyal foliküller, foliküllerin en erken evredeki formlarını temsil ederler ve dormant fazda oldukları düşünülür. Ovaryan rezerv primordiyal foliküllerin sayısı tarafından belirlenir. Özellikle primordiyal folikülleri hedefleyen herhangi bir toksik etki reproduktif yaşam aralığını kısaltabilir. Bunun yanı sıra prematür over yetmezliği oluşumunu indüklemeye riski de daha yüksektir. Prematür ovaryan yetmezliğin altındaki mekanizma ise germ hücrelerinin prematür, kitlesel ve hızlı ölümüdür (apoptozis). Oosite direkt veya indirekt toksik etki tüm bunlara neden olabilir. Oositi çevreleyen steroid üreten somatik hücre katmanlarına (granüloza ve teka hücreleri) toksik etkide bunlara neden olabilir (5).

Seminifer túbüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testiküler androjenleri salgılar (6). Testosteronun testislerde yaptığı lokal etki seminifer túbülilerin sperm üretmesini aktive etmektir ve testosteron yokluğunda spermatogenez görülmez. Seminifer túbül duvarında bulunan spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve túbül lümeni arasını dolduracak dört-sekiz tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşarak spermatozoonları oluştururlar (6, 7, 8).

SCF/c-kit, foliküler gelişim sırasında insan yumurtalıklarında eksprese edilir ve c-kit reseptörlerinin anti-c-kit antikoları ile inhibisyonu atretik foliküllerin sayısını arttırmaktadır. Buna ek olarak; SCF/c-kit primordiyal germ hücre oluşması, primordiyal folikül aktivasyonu, granüloza hücre proliferasyonu, teka hücre toplanması ve mayotik olgunlaşmadaki rolleri nedeniyle, dişi doğurganlığında önemli rol oynamaktadır (13). PDGF proteini de primordiyal ve gelişen foliküllerin oositlerinde bulunur ve PDGF'nin bloke edilmesi primordiyal foliküllerin oranında artışa neden olmaktadır. Bu da PDGF'nin primordiyal folikülden primer foliküle geçiş aşamasında rol oynadığını düşündürmektedir (14).

Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda; c-kit ve onun ligandı olan stem cell faktör'ün (SCF) testiküler gelişim, germ hücrelerin migrasyonu, proliferasyonu ve sağkalımında etkin rolü olduğu gösterilmiştir (10). Buna ek olarak, PDGF de Leyding hücrelerinin olgunlaşmasında önemli bir araçtır (11). Bu nedenle bu gelişimsel sinyal yollarının inhibisyonunun normal sperm ve testosteron üretimi üzerine olumsuz etkileri olabileceği düşünülmektedir (12).

2012 yılında Schultheis ve ark. tarafından ilk kez, 5 haftalık lösemik fare modelinde 150 mg/kg/gün imatinib ile 2 aylık tedavinin spermatogenez ve folikülogenez üzerine olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir. Ancak literatürde ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörlerinin bu yöndeki etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır (56).

İlaç geliştirme aşamasında 180 mg/kg/gün nilotinib verilen erkek erişkin farelerin total epididimal ağırlığında belirgin bir azalma gözlenmesine karşın sperm sayısı ve sperm hareketliliği de dâhil olmak üzere erkek üreme parametrelerinin tedaviden etkilenmediği gözlenmiştir. Bu veri nedeniyle nilotinibin erkek doğurganlığı üzerine

olumsuz etkilerinin olmayacağı düşünölmüştür. Erişkin dişi farelere de >60 mg/kg/gün nilotinib verilmesi ile estrous siklusu, gebelik ve çiftleşme verileri üzerine etki gözlenmemiştir. Bu verilere dayanarak üretici firma nilotinib'in dişi infertilitesine yol açmadığını açıklamıştır (15).

Kemirgenler de dâhil olmak üzere yapılan hayvan çalışmaları bize gonadotoksisite hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. İnsan ve hayvan overleri arasında farklar olmasına rağmen bu hayvan modelleri siklofosfamid ve doxorubisin gibi çeşitli kanser tedavilerinin gonadotoksisitesini göstermekte başarılı olmuştur (16, 66).

Uzun süreli tedavi dozunda nilotinib kullanılmasının spermatogenez ve folikülogenez üzerine etkilerini histopatolojik inceleme ile elde edilen sayısal veriler ile değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Diğer yandan literatürdeki çalışmalar KML modeli oluşturulmuş fareler üzerinde yapılmış, sağlıklı fare modeli üzerine çalışılmamıştır. Mevcut hematolojik malignitenin spermatogenez ve folikülogenez üzerindeki olası etkilerini dışlamak gereklidir. Bu nedenle biz çalışmamızı sağlıklı fareler ile yaptık.

Bizim çalışmamızın amacı; nilotinib tedavisinin fertilitte üzerine etkilerini hayvan modeli üzerinde göstermek olup sağlıklı farelerde folikülogenez ve spermatogenezin kantitatif ölçümleri yapılarak sonuca varmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kronik Miyeloid Lösemi

#### 2.1.1. Tanım

Kronik miyeloid lösemi (KML) myeloid seri hücrelerinin aşırı ve kontrolsüz çoğalmasına yol açan bir hematopoetik pluripotent kök hücre hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yapılan sınıflamalarda miyeloproliferatif bir neoplazi olarak tanımlanır (17). Dokuzuncu kromozomdaki 'Abelson' (ABL) protoonkogeni ile 22. kromozomdaki 'breakpoint cluster region' (BCR) geninin 22. kromozom üzerinde füzyonuna yol açan resiprokal bir translokasyon [t(9;22)q34;q11)] sonucu ortaya çıkmış anormal 22. kromozom olan 'Philadelphia (Ph) kromozomu' KML olgularının yaklaşık %95'inde tesbit edilmektedir (1, 2).

#### 2.1.2. Epidemiyoloji

KML ilk olarak John Hughes Bennett tarafından, 1845 yılında; lökositoz, masif splenomegali ve splenomegalinin nedenini açıklayacak başka bir etyolojinin saptanmadığı iki hastada tarif edilmiş (2). KML'nin yıllık insidansı 1-2/100000 olup erişkin lösemilerinin %15-20'sini oluşturmaktadır. Erkeklerde kadınlardan daha fazla görülür (E/K= 3/2) ve her yaşta görülmekle birlikte, sıklıkla hastalara 50-60'lı yaşlarda tanı konulmaktadır (18). Ancak KML; reproduktif çağıdaki kişilerde de azımsanmayacak oranda görülmektedir, 20-64 yaşları arasında %45,8 oranında görüldüğü bildirilmiştir (3).

KML'de oluşan kromozomal translokasyonun nedeni bilinmemektedir. Ancak Nagazaki ve Hiroşima'ya atılan atom bombaları sonrasında sağ kalanlar arasında KML insidansının yükselmiş olması, radyasyona bağlı DNA hasarı sonucu t(9;22)'nin oluşabileceğini göstermiştir (19).

### 2.1.3. Klinik Bulgular

Hastalığın klinik seyrinde 3 evre bulunmaktadır. Bu üç evre, hastaların tanı anında büyük çoğunluğunu oluşturan kronik evre, hastalık tedavi edilmeyip doğal seyrine bırakıldığında veya tedaviye yanıt alınamadığında gözlemlenebilen ve hastalık progresyonunu gösteren akselere evre veya blastik evre'lerdir.

Kronik evre KML lökosit sayısında artış ile birlikte kemik iliğinde miyeloid proliferasyonu ve maturasyonu ile ortaya çıkan ancak genellikle komplikasyonların görülmediği dönemdir. Tedavi edilmeyen kronik evre KML olgularında hastalık, ortalama 3-5 yıl sonra akselere evreye ilerler. Akselere ve blastik evrelere gidiş riski, hastalığın ilk 2 yılında %10, sonraki yıllarda ise her yıl için %15-20 civarındadır.

Hastaların büyük çoğunluğunda hastalık sinsi bir başlangıç gösterir. Hastaların %20-50'si asemptomatiktir ve bu hastalara genellikle rutin tetkikler sırasında saptanan lökositoz ile tanı konulmaktadır. Semptomatik olan hastalarda da; halsizlik (%34), yorgunluk (%3), kilo kaybı (%20), aşırı terleme (%15), abdominal dolgunluk hissi (%15) ve trombosit disfonksiyonuna bağlı kanama olayları (%21) gibi sistemik semptomlar sıklıkla görülebilmektedir (20). Hastalarda hiperviskozite ve hiperlökositoza bağlı kulak çınlaması, görme bozukluğu, dispne, priapizm, konfüzyon ve koordinasyon bozukluğu gibi semptom ve bulgular akselere ve blastik evrelerde sık görülebilmektedir (21).

### 2.1.4. Tanı

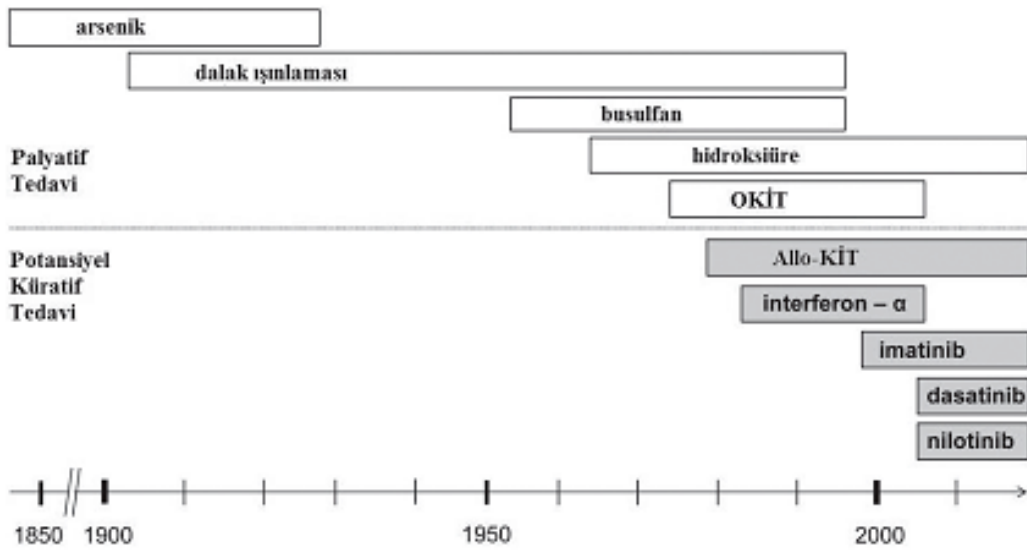
Ph kromozomu 9. Kromozomdaki ABL protoonkogeni ile 22. Kromozomdaki BCR geninin 22. Kromozom üzerindeki füzyonuna yol açan bir translokasyon sonucu ortaya çıkmış anormal 22. Kromozomdur. KML tanılı hastaların %90-95'inde saptanan Ph translokasyonu kromozom 9q34 üzerindeki 3'ABL gen segmentini, kromozom 22q11'deki 5'BCR gen segmentine ekler ve sonuçta hibrit BCR-ABL geni oluşur. Kırılmanın ABL'de sabit BCR'de ise değişken olması, ABL geninin sağlıklı hücreleri transformasyona uğratarak kanser hücresine dönüşmesine neden olduğunu,

BCR geninin ise hastalığın fenotipini belirlediğini ortaya koymuştur. (22). Tipik bir konvansiyonel sitogenetik inceleme sırasında 20 metafaz incelenmelidir.

Bu translokasyon sonucu oluşan BCR-ABL kinaz, RAS, JAK-STAT ve PI-3 kinaz/AKT yollarını (normal öncül hücrelerde hematopoetik büyüme faktörleri tarafından uyarılan yollar) aktive eder. Bunun sonucunda, kemik iliğinde granülositik ve megakaryositik öncüller aşırı çoğalır. Eritroid unsurlar bilinmeyen nedenlerle BCR-ABL kinazın etkilerine bu kadar duyarlı değildir ve o yüzden kemik iliğinde granülositik öncüllerin eritroid öncüllerine olan oranı belirgin biçimde artar. Neoplastik hematopoetik kök hücrelerin ve kemik iliği öncüllerinin dalak ve karaciğere yerleşmesi ektramedüller hematopoezle sonuçlanır ve bu durumda sıklıkla organomegaliye yol açar.

### 2.1.5. Tedavi

Ph (+) KML tedavisi, kısa sayılabilecek bir sürede Allojeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli (AHKHN) ve rekombinant IFN $\alpha$  ile başlayıp son zamanlarda en etkili tedavi seçeneği tirozin kinaz inhibitörleri ile sonlanan çok etkili bir gelişim göstermiştir. Bu tarihsel gelişim Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (23).



Şekil 2.1: KML tedavisinin tarihsel gelişimi (23).

### **2.1.5.1. Interferon-Alfa**

Tirozin kinaz inhibitörlerinden önce uzun süreli ilk tedavi seçeneği olmuştur. IFN- $\alpha$  ile ilgili ilk çalışma 1986 yılında yayınlanmış olup 27 KML hastasının %88,9'unda hematolojik yanıt ve kemik iliğindeki Ph (+) hücre miktarında median %70 azalma gözlenmiştir (24). Bu çalışmayı izleyen daha fazla hasta içeren, çok merkezli, karşılaştırmalı çalışmalarda da hematolojik ve sitogenetik yanıt üzerine etkinliği kanıtlanmıştır. Ancak bütün bu çalışmalarda sağ kalımda önemli uzama sadece sitogenetik yanıt alınan hastalarda görülmüştür. Bir çalışmada tam sitogenetik yanıt alınan hastalarda 10 yıllık sağ kalım yaklaşık %80 bulunmuştur (25)

### **2.1.5.2. Allojeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli (AHKHN)**

KML tedavisinde AHKHN'nin etkinliği ilk kez 1988 yılında 66 hastalık bir seri ile gösterilmiştir (26). Böylece AHKH %50'ye varan remisyon oranları ile imatinib öncesi dönemde KML tedavisinde önemli bir tedavi seçeneği olarak yer almıştır (23). AHKHN'nin en önemli kısıtlayıcıları; alıcının yaşı ve hastalığın evresidir. Ayrıca nakil sonrası erken mortalite olasılığı ve graft-versus-host hastalığı başta olmak üzere çeşitli komplikasyon olasılıkları da vardır. Tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanıma girmesi ile birlikte KML tanısı nedeniyle yapılan transplantasyon sayılarında hızlı bir düşüş olmuştur ve AHKHN, KML için ilk tedavi seçeneği olmaktan çıkmıştır.

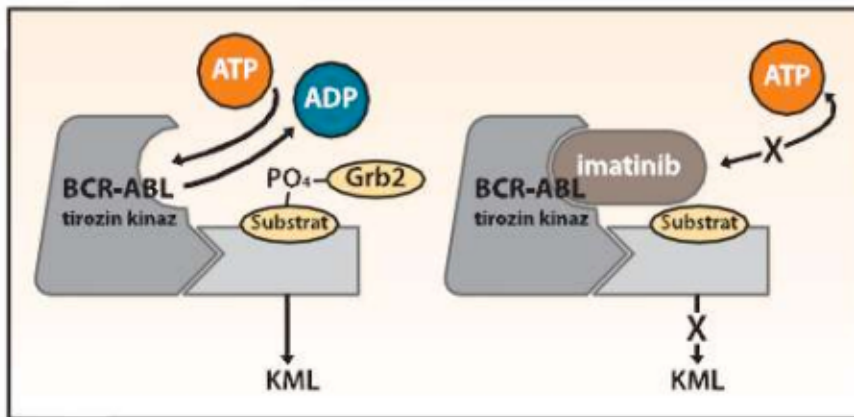
### **2.1.5.3. Tirozin Kinaz İnhibitörleri**

Tirozin kinaz protein fosforilasyonunu sağlayan protein kinaz ailesine mensup bir enzimdir. Fosforilasyona uğrayan aminoasit türü tirozin olduğundan bu enzime tirozin kinaz adı verilmiştir. Tirozin kinaz, proteinlerdeki tirozin rezidülerine ATP'den fosfat grubu transfer edebilir. Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu/aktivasyonunu sağlarlar. Sinyal iletimi,

hücrelerin çoğalması ve apoptozisi gibi işlevleri kontrol ederek burada meydana gelen değişimler kanser gelişiminde ve metastazlarda önemli rol oynar.

Anormal BCR-ABL gen ürünü normale göre daha fazla tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. ABL spesifik tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKİ) selektif olarak lösemik hücre kolonilerinin proliferasyonunu engellediği, normal hücreleri ise daha az etkilediği saptanmıştır.

BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib mesilat (STI571) 1998’de klinik uygulamaya girmiş ve KML tedavisinde önemli bir dönem başlamıştır (27). İmatinib Ph (+) KML ve Akut lenfoblastik lösemi tedavisinde tirozin kinaza yönelik hedeflenmiş selektif bir moleküldür. BCR-ABL otofosforilasyonunun ve substrat fosforilasyonunun inhibisyonunu sağlayarak etkilenen hücrelerin proliferasyonu ve BCR-ABL onkoproteininin etkilerini bloke ederek etki gösterir (28). İmatinib ABL kinaz bölgesindeki aminoasitlere bağlanır ve adenosin trifosfatın bağlanmasını bloke ederek BCR-ABL proteininin inaktif formda kalmasını sağlar. Böylece adenosin trifosfattan fosfat transferini engeller ve sinyal ileti yollarını bloke ederek hücre büyümesinin duraklamasına ve hücre ölümüne neden olur. İmatinib kinaz cebini kapladığı zaman BCR-ABL’nin etkisi inhibe olur, substratı fosforile edilemez (Şekil 2.2) (29).



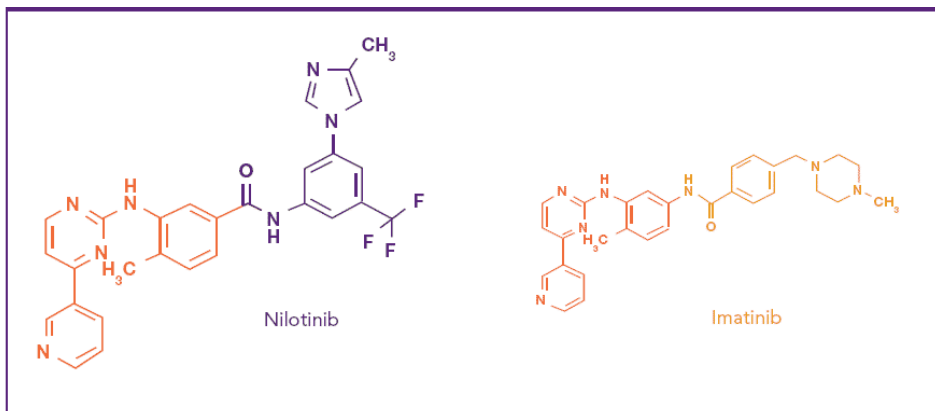
Şekil 2.2: İmatinib etki mekanizması (29)



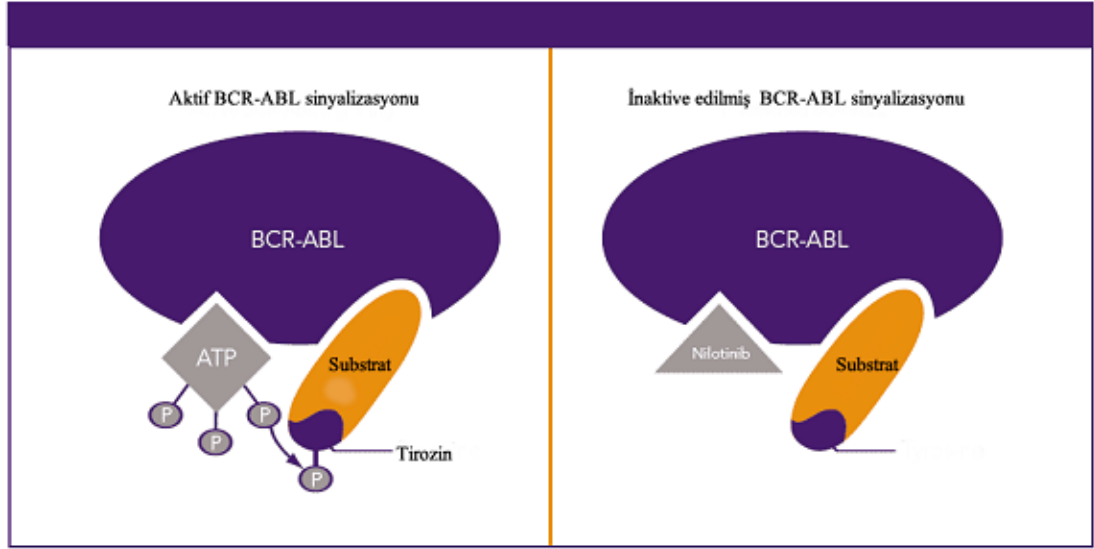
Randomize bir faz III çalışma olan IRIS çalışmasında yeni tanı alan KML hastalarında imatinib mesilat ile interferon-alfa/Ara-C kombinasyonu karşılaştırılmıştır (30). Majör sitogenetik yanıt oranı (MSY) ilk yıl sonunda imatinib alan kolda %83, interferon/Ara-C alan grupta ise % 20 saptanmış, bu da imatinib mesilatın ilk basamak KML tedavisinde standart seçenek olmasına sebep olmuştur. IRIS çalışmasında 60 aylık izlemde imatinib alan hastalarda majör sitogenetik yanıt %92, tam sitogenetik yanıt ise %87 saptanmış ve elde edilen sitogenetik yanıtın sürekli olduğu görülmüştür (31).

İmatinib ile tedaviye başlanan hastaların %20-25'inde, ilaç direnci nedeniyle alternatif tedaviye gerek duyulmaktadır (32) Birkaç yıldır dasatinib ve nilotinib, tam sitogenetik yanıt oranlarının %40-60 olarak bildirilmesine dayanılarak; imatinib intolerant ve ya dirençli KML hastalarının ikinci kuşak tedavisinde kullanılmaktadırlar (33).

Nilotinib (AMN107) molekülü ilk kez 2005 yılında Weisberg ve ark. tarafından tanımlanmıştır (Şekil 2.3) (35). İmatinib bazlı yeni bir aminoprimidin olan nilotinib, imatinib ile aynı yolu kullanarak BCR-ABL sinyalizasyonunu inhibe eder (Şekil 2.4) (36). Ancak imatinibe göre BCR-ABL affinitesi 50 kat daha fazladır ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda hücre içi konsantrasyonu imatinibden 7-10 kat daha yüksektir (34). İmatinib direncine neden olan bazı BCR-ABL mutasyonlarına da etkili olduğu hayvan çalışmalarında gösterilmiştir.



Şekil 2.3: İmatinib ve Nilotinib'in kimyasal yapısı (35)



**Şekil 2.4:** Nilotinib etki mekanizması (36)

Kronik evredeki KML hastalarında nilotinib ile 6. ayda tam sitogenetik yanıt oranı imatinibe direçli olgularda % 30, imatinibi tolere edemeyen olgularda ise % 35 bulunmuştur (67). Dasatinib ile yapılan bir çalışmada yine kronik evredeki imatinibe direçli olgularda 6. aydaki tam sitogenetik yanıt %22, imatinibi tolere edemeyenlerde ise %56 bulunmuştur (68). İlk basamak tedavide kullanıldıkları faz II çalışmalarda tam sitogenetik yanıt oranı 12. ayda nilotinib (2x400 mg/gün) ile %96-97, dasatinib ile %92 olarak bildirilmiş ve bunu imatinib ile yeni nesil TKİ'lerin karşılaştırıldığı çalışmalar izlemiştir (69,70). Bu çalışmalarda da hem dasatinib hem de nilotinib ile 12. aydaki tam sitogenetik yanıt oranları imatinib koluna göre daha yüksek bulunmuştur (dasatinib 100 mg/gün vs imatinib sırasıyla %77 vs %66,  $p < 0,0001$ ) (nilotinib 2x300 mg/gün vs imatinib sırasıyla %80 vs %65,  $p < 0,0001$ ) (34,35). Bu veriler anılan yeni nesil TKİ'lerin ilk basamak tedaviler için bazı ülkelerde ruhsatlandırılmalarına yol açmıştır. Dasatinib ve nilotinib, her ikisi de BCR-ABL geninde gelişen T315I mutasyonuna etkisizdirler.

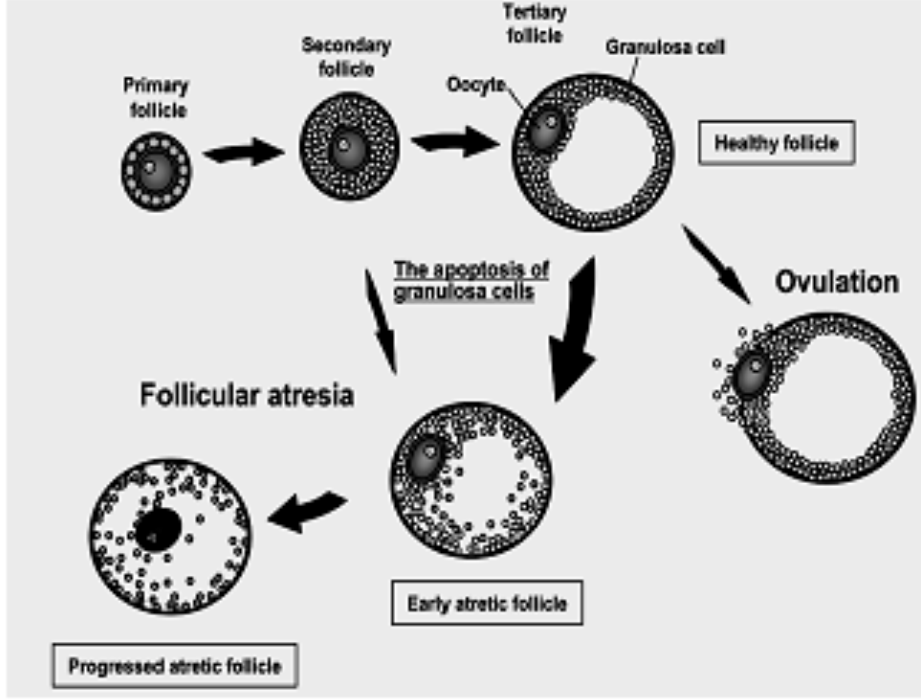
## 2.2. Gonadogenez

### 2.2.1. Folikülogenez

Folikülogenez, büyüyen foliküllerin havuzundan primordiyal folikülün gelişmesi ile başlar ve ovulasyon veya atrezi ile sonuçlanır. Kadınlarda folikülogenez uzun bir süreçtir, bir primordiyal folikülün ovulasyon evresine büyüyüp gelişmesi için yaklaşık olarak bir yıllık bir gelişimi gerektiren primordiyal foliküllerden seçilmektedir (71). Preantral fazı üç büyük grupta incelenmektedir: Primordiyal, primer ve sekonder folikül evresi. Primordiyal folikülden tamamıyla gelişmiş bir sekonder folikül oluşumu için yaklaşık olarak 290 gün veya 10 düzenli menstruel siklus kadar süre gerekmektedir. Antral faz ise dört büyük gruba ayrılmaktadır: küçük (klas 2,3,4,5), orta (klas 6 ), büyük (klas 7 ) ve preovulatuvar graafian folikül evresi (klas 8) . Klas 3 evresinde görülen antrum formasyonu sonrasında (0,4 mm çap), folikülün büyümesi hızlanmaktadır. Antrum formasyonu ile 20 mm'lik preovulatuvar folikül arasında yaklaşık olarak 60 gün veya iki düzenli menstruel siklus bulunmaktadır (37) (Şekil 2.5).

Folikülogenez over korteksinde meydana gelmektedir. Dört majör gelişim evresi bulunmaktadır;

- 1-Primordiyal folikül seçimi
- 2-Preantral folikül gelişimi
- 3-Antral (graafian ) folikül gelişimi
- 4-Folikül atrezisi.



Şekil 2.5: Folikül gelişim ve atrezisi (38)

### 2.2.1.1. Primordiyal folikül seçimi

Primordiyal foliküller overin temel reproduktif birimleri olarak görülmektedir. Çünkü tüm dominant foliküllerin dolayısıyla da menstruel siklusun kaynağını oluşturmaktadırlar. Arrest olmuş primordiyal folikülden büyüyen foliküller havuza girilmesi, recruitment veya primordiyalden primer foliküle geçiş olarak adlandırılmaktadır.

Histolojik olarak primordiyal folikül, mayozun profaz evresinde arrest olmuş küçük bir primer oosit (~25µm çaplı), tek katlı yassı veya kollumnar dizilim gösteren granuloza hücresi ve bazal lamina içermektedir. Bazal lamina sayesinde granuloza hücresi ve oosit mikroçevrede bulunan diğer hücrelerle direkt temasta olmazlar. Primordiyal foliküller bağımsız bir kanlanmaya sahip değildirler, dolayısıyla endokrin sistemden daha sınırlı olarak etkilenmektedirler. Tüm primordiyal foliküller (oositler), insan fetusunda gebeliğin 6. ve 9. ayları arasında gelişmektedir. Dolayısıyla, kadın yaşamını reproduktif sürecinde yeralan tüm oositler doğumdan itibaren vardır. Bir kadının overlerindeki yumurta veya folikül sayısı o kadının

over rezervi olarak değerlendirilmektedir (39). Primordiyal folliküllerin bir kısmı büyüyüp gelişirken bazıları da dejenere olur, ölürlür. Böylece sayıları doğumda 2 milyon, ergenlikte ise 400 bin seviyesine iner.

Granüloza hücrelerinin mitotik potansiyel kazanması ve şekillerinde yassıdan küboidal epitele dönüşüm folikül seçiminin histolojik göstergeleri olarak değerlendirilmektedir. Bunu gen aktivasyonu ve oosit gelişimi takip eder. Klinik önemine rağmen kadında folikül seçiminin nasıl kontrol edildiği hakkında henüz bilgi yoktur.

### **2.2.1.2. Preantral folikül gelişimi**

Primer folikül, oosit etrafında tek kat olarak dizilen bir veya daha fazla küboidal granüloza hücresi görülmesi ile tanımlanır. Primer folikülde izlenen major gelişmeler FSH reseptörü ekspresyonu, oosit büyümesi ve farklılaşmasıdır. Primer folikül gelişimi süresince granüloza hücreleri FSH reseptörü eksprese ederler (40). Hayvanlarda yüksek FSH düzeyleri primer folikül gelişimini uyarmaktadır (41). Primer folikül gelişimi oositte meydana gelen dikkat çekici değişikliklere eşlik etmektedir. Preantral period boyunca oosit ~25 µm'den ~120 µm' ye büyümektedir. Bu devasa büyüme oosit genomunun reaktivasyonu sonucu oluşmaktadır. Bazı oosit mRNA'larının genetik okunması sonucunda oluşan proteinler oositin büyüme ve farklılaşmasına katkıda bulunmaktadır. Oosit tarafından üretilen bazı yeni büyüme faktörlerinin de preantral folikülogenezin regülasyonunda önemli rol alabileceği düşünülmektedir (42).

Preantral folikülogenezin devam etmesinden dolayı folikülün yapısı değişmeye başlar. Sekonder folikül gelişimi sırasında görülen majör değişiklikler granüloza hücre sayısındaki artış ve teka hücrelerinin ortaya çıkışıdır. Primer folikülden tam gelişmiş bir sekonder folikül oluşumunda oosit tarafından üretilen, otokrin ve parakrin etki gösteren büyüme faktörleri rol oynar. Sekonder folikül gelişimi granüloza hücresinin ikinci tabakasının ortaya çıkışı ile başlamaktadır. Bu basamak primerden sekondere geçiş olarak bilinmektedir. Granüloza hücreleri küboid epitelden stratifiye veya psödöstratifiye epitele değişim gösterir (43).

Sekonder folikül gelişimi aynı zamanda teka gelişimi ile karakterizedir. Primer/sekonder dönüşümü sırasında bazal lamina etrafında stroma hücresi benzeri bazı hücreler ortaya çıkmaktadır. Sekonder folikül gelişiminin devamı ile birlikte iki primer teka tabakası oluşmaktadır; interstisyel hücrelere değişen içteki internal teka tabakası ve düz kas hücrelerine değişen dıştaki eksternal teka tabakası, teka gelişmesi ayrıca anjiogenez yoluyla çok sayıda küçük damar yapılarının gelişmesi ile birlikte olmaktadır. Sonuçta, gonadotropinlerin ve besinlerin buraya ulaşmasına ve artıklarıyla, sekrete edilen maddelerin buradan uzaklaştırılmasına olanak sağlamak üzere, folikül çevresinde kan dolaşımı başlar.

Preantral fazın sonucunda tam gelişmiş bir sekonder folikülde şu temel yapılar seçilebilmektedir: Zona pelusida ile çevrelenmiş tamamıyla gelişmiş bir oosit, yaklaşık 9 katlı bir granüloza hücre tabakası, bazal lamina, teka interna, teka eksterna ve teka dokusu içinde kapiller ağ (43).

### **2.2.1.3. Antral folikül gelişimi**

Graaf folikülü, içerisinde folikül sıvısı olarak adlandırılan bir sıvı olan bir kavite veya antrum ile karakterizedir. Bu nedenle antral folikül teriminin graaf folikülünün eşanlamlısı olarak kullanımı doğru olmaktadır. Foliküler sıvı plasma karakterlidir ve oosit ve granüloza hücresinin sekresyonları ile oluşmaktadır. Graafian folikül gelişiminin başlaması, oositin bir kutbunda sıvı dolu bir kavitenin belirmesi ile karakterizedir. Bu olay kavitasyon veya antrum oluşumunun başlaması olarak tanımlanır (44).

Graaf folikülü, gelişimi büyümesi ve anlaşılmasını kolaylaştırabilmek amacıyla boyuta göre dört evreye ayrılmaktadır. Her dominant folikülün sırasıyla küçük (1-6mm), orta (7-11mm), büyük (12-17mm) ve preovulatar (18-23) evreleri tamamlamak için bir şansı vardır (44). Folikül atrezisi genellikle küçük veya orta evresinde görülmektedir. Graaf foliküllerinin miktarı ve boyutu, yaşa ve menstruel sıklusa göre değişiklik gösterebilmektedir. Artan foliküler sıvı birikimi ve hücre proliferasyonu siklusun foliküler fazı boyunca dominant folikülün aşırı derecede

büyümesinden sorumludur. Atretik folikül boyutunu sınırlandıran foliküller sıvı formasyonunun ve mitozun durmasıdır (45).

Teka eksterna otonomik sinirler ile inerve olan düz kas hücrelerinden olmaktadır (44). Teka eksternanın fizyolojik önemi henüz bilinmemektedir. Teka interna, teka interstisyel hücreleri olarak tanımlanan yeni epitelooid hücre popülasyonundan oluşmaktadır. Ultrastüktürel özellikleri, aktif olarak steroid sentezleyen hücrelerdeki gibidir; örneğin sitoplazmaları lipid damlaları ile doludur, tübüler kristalleri olan mitokondrileri ve düz endoplasmik retikulumları bulunmaktadır. Teka interstisyel hücreler LH ve insulin reseptörleri bulundurmaktadırlar. LH ve insülin uyarısı ile yüksek düzeylerde androjen sentezi, özellikle de androstenedion sentezi gerçekleştirilmektedirler (46).

Graaf folikülünde granüloza hücrelerinin ve oositin dağılımı tam olarak şekillenmiş ve yerleşmiştir. Bu üç boyutlu organizasyon dört farklı granüloza subünitinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır: Membran, perantral alan, kumulus ooforus ve korona radiata. Tüm granüloza hücreleri Graaf folikülü gelişimi sürecinde FSH reseptörü eksprese etmesine rağmen, her granüloza hücre grubu kendi içinde FSH düzeyine kendi bulunduğu konuma göre farklı yanıt verebilmektedir (43).

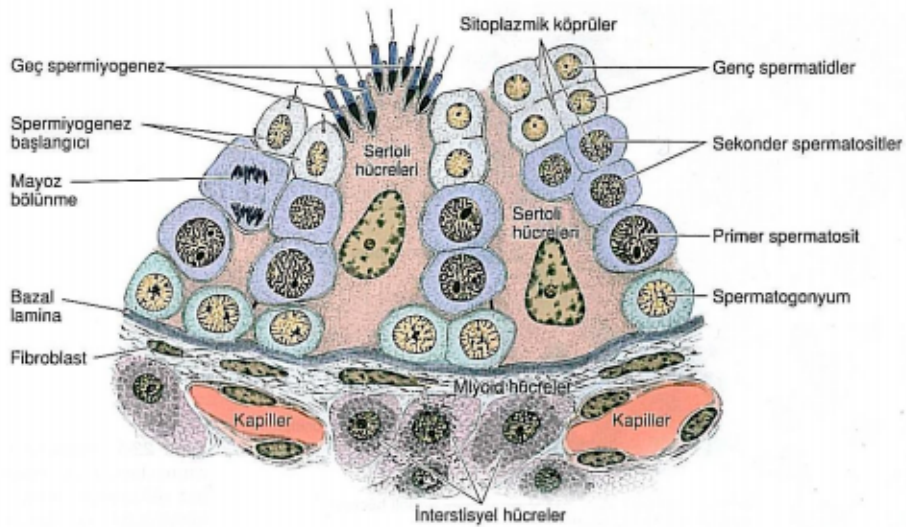
#### **2.2.1.4. Folikül atrezisi**

Memelilerdeki foliküllerin (oositlerin) %99'u atreziyle yaşamlarını kaybetmektedirler. Atrezideki temel nokta oosit ve granüloza hücrelerinde apoptozisin aktivasyonudur. FSH'un apoptozisi önlemedeki önemi FSH'nın folikülün yaşamasını sağlayıcı faktör olduğu düşüncesini doğurmuştur (44).

## 2.2.2. Spermatogenez

Testisin glandüler dokusu, seminifer tübüllerdir. Her lobülde 1-4 kadar sayıda tübüli seminiferi kontorti denilen aşırı kıvrımlı, 30-70 cm uzunluğunda, 150 ile 250  $\mu\text{m}$  çapında tübüller ile bunların arasını dolduran gevşek bağ dokusu ve bezin stroması olan interstisyum bulunur. Tek bir insan testisinde seminifer tübüllerin toplam uzunluğu 250 metreyi bulur (47). Tübüli seminiferi kontortiler testisin ekzokrin kısmını meydana getirirler. Salgılama biçimi aktif holokrin olup, salgılama materyali canlı hücre spermium'dur. Seminifer tübüller lobülün tepesine doğru kıvrımlarını kaybederek, tübüli rektillerle devam eder. Bunlar da mediastinumda birbirleriyle anastomozlaşarak rete testis denilen bir sisteme dönüşürler. Seminifer tübüllerin içeriği rete testis kanallarına boşaltılır. Rete testiste meydana gelen bozukluklar infertiliteye neden olabilmektedir (48).

Her bir seminifer tübül bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir seminifer epitel'den (germinal epitel) oluşur. Seminifer tübülü saran tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olarak bulunan en içteki katman düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış myoid hücrelerden oluşur. Seminifer tübül epiteli iki tip hücreden meydana gelir. Bunlar destek hücreleri (Sertoli hücreleri) ile spermatogenez seri hücreleridir (Şekil 2.6) (6).



Şekil 2.6: Seminifer tübül yapısı (6)



Seminifer túbüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testiküler androjenleri salgılar (6). Testosteronun testislerde yaptığı lokal etki seminifer túbülilerin sperm üretmesini aktive etmektir ve testosteron yokluğunda spermatogenez görülmez. Seminifer túbül duvarında bulunan spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve túbül lümeni arasını dolduracak dört-sekiz tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşarak spermatozoonları oluştururlar (6,7,8).

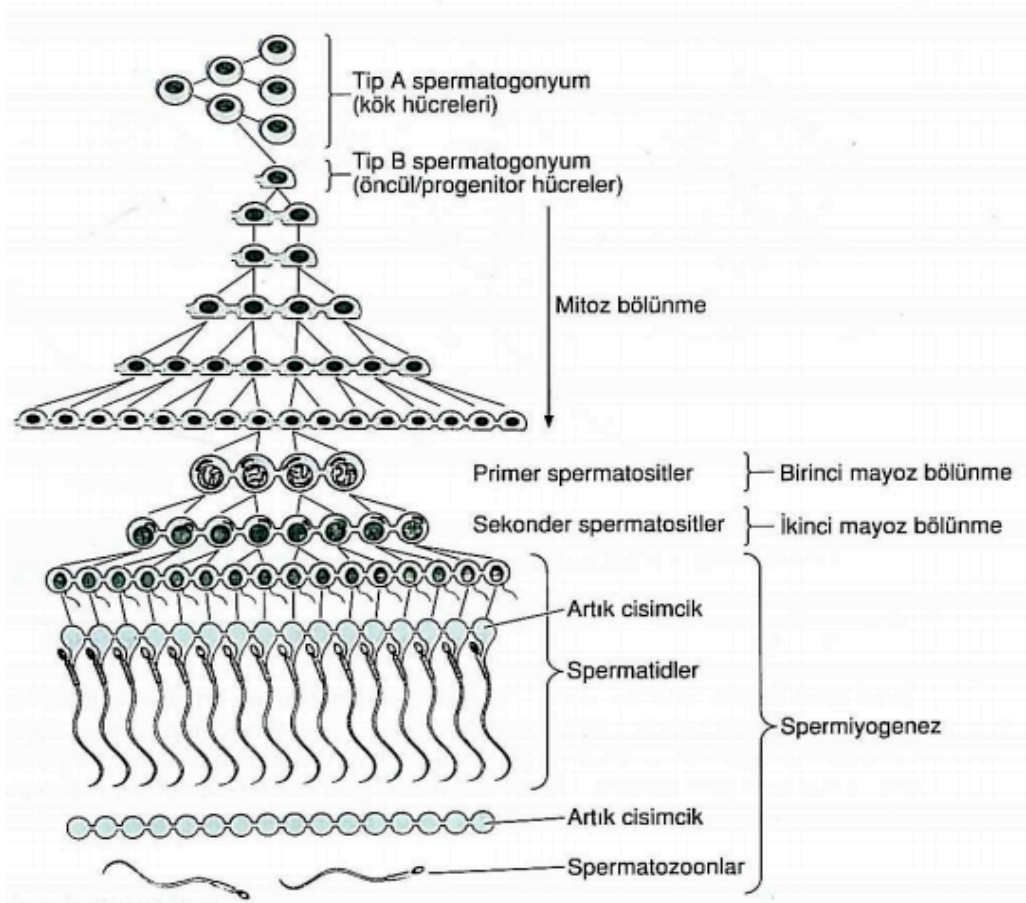
Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu olay üç faza ayrılır:

- Spermatositogenez
- Mayoz
- Spermiyogenez

### **2.2.2.1 Spermatositogenez evresi**

Bu evre spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden primer spermatositlerin oluşma sürecidir (72). Bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş germ hücreleri olan, spermatogonyumlar ile başlar. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler.

İnsanda morfolojik olarak ayrılabilen 3 tip spermatogonyum vardır: koyu tip A spermatogonyum, soluk renkli boyanan açık tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum. Koyu tip A spermatogonyum spermatogenik serinin kök hücre rezervi olarak görev yapar. Zaman zaman tip B spermatogonyuma farklılaşan açık tip A spermatogonyuma bölünür. Tip B spermatogonyum ise primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositle spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynarlar (Şekil 2.7) (8).



Şekil 2.7: Germ hücrelerinin geçirdiği evreler (6)

### 2.2.2.2. Mayoz evresi

Primer spermatositlerin ardışık iki mayoz bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu spermatidlerin oluştuğu evredir (8).

### 2.2.2.3. Spermiyogenez

Spermatidlerin farklılaşma süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu evredir (8).

Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak ortamdaki uzaklaşması ile spermatidler arasında birbirinden ayrılır. İnsanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki süreç yaklaşık 64 gündür (6,8). Bu süreç dalgalanmalar şeklinde oluşur, her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümünü açıklar. Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonların bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. Seminifer epitel siklusu; germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her siklus yaklaşık  $16 \pm 1$  gün sürer ve spermatogenez dört siklustan sonra biter (7, 49).

### 2.3. Tirozin kinaz inhibisyonu ve gonadogenez

TKİ'leri sadece Bcr-Abl'yi değil c-kit, Platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü alfa ve beta (PDGFR A/B), Arg ve c-fms gibi diğer tirozin kinazları da inhibe etmektedirler. Bu bir dizi proteinin, gonadal gelişim, implantasyon ve fetal gelişimde anahtar rolü olduğu bilinmektedir (9).

Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda; c-kit ve onun ligandı olan stem cell faktör'ün (SCF) testiküler gelişim, germ hücrelerin migrasyonu, proliferasyonu ve sağkalımında etkin rolü olduğu gösterilmiştir (12). Buna ek olarak, PDGF de Leyding hücrelerinin olgunlaşmasında önemli bir araçtır. Bu nedenle bu gelişimsel sinyal yollarının inhibisyonunun normal sperm ve testesteron üretimi üzerine olumsuz etkileri olabilir (11).

Nurmio ve ark. (12) yapmış olduğu çalışmada; immatür erkek sıçanlara 3 gün süreyle, 150 mg/kg imatinib mesilat'ın içme suyunda çözülerek verilmesi ile germline kök hücre havuzu oluşmasında gecikme, tip A spermatogonyum

proliferasyonunda azalma ve germ hücre apoptozunda uyarılma gözlenmiştir. Ayrıca PDGFR-aracılı mezenkimal myoid öncüllerin proliferasyonunda ve seminifer tübül uzunluğunda azalma izlenmiştir.

Bütün bu olumsuz sonuçlara rağmen literatürde imatinib kullanırken sağlıklı çocuk sahibi olan erkek hastalar bulunmaktadır. Ramasamy ve arkadaşları (50) 2007 yılında 4 erkek KML hastasında imatinib altında 5 sağlıklı gebelik oluşturduğunu bildirmişlerdir. 2008 yılında İtalya'dan Breccia ve ark. (51) 5 imatinib kullanan erkek KML hastasının sağlıklı çocuk sahibi olabildiğini açıklamışlardır. En büyük seri 2014 yılında Pakistan'dan Iqbal ve ark. yaptığı prospektif bir çalışmadan gelmiştir (52). Konsepsiyon sırasında imatinib kullanan 40 erkek KML tanılı hastada 62 gebelik bildirilmiş olup bu gebeliklerin 57'si (%95) sorunsuz olarak sonuçlanmıştır.

Genel olarak bütün bu kanıtlar göz önüne alındığında; hayvan çalışmalarında androjen üretimi azalıp oligospermi ve jinekomasti geliştiği gösterilmiş de olsa imatinib kullanan KML erkek hastalarında konsepsiyon normal gebelik ile sonuçlanabilir (53, 54).

İkinci kuşak tirozin kinazların spermatogenez üzerine etkisi ile ilgili hiç hayvan çalışması bulunmamakta sadece ilaç geliştirme aşamasında 180 mg/kg/gün nilotinib verilen erkek erişkin farelerde total epididimal ağırlığında belirgin bir azalma gözlendiği sperm sayısı ve sperm hareketliliği de dâhil olmak üzere erkek üreme parametrelerinin tedaviden etkilenmediği bildirilmiştir. Bunun üzerine üretici firma nilotinibin erkek doğurganlığı üzerine olumsuz etkilerinin olabileceğini bildirmiştir (15). Nilotinib altında eşinde gebelik bildirilen erkek KML vakası henüz literatürde bulunmamaktadır.

SCF/c-kit, foliküler gelişim sırasında insan yumurtalıklarında sentezlenir ve c-kit reseptörlerinin anti-c-kit antikoları ile inhibisyonu atretik foliküllerin sayısını arttırmaktadır (13). Buna ek olarak; SCF/c-kit primordiyal germ hücre oluşması, primordiyal folikül aktivasyonu, granüloza hücre proliferasyonu, teka hücre toplanması ve mayotik olgunlaşmadaki rolleri nedeniyle, dişi doğurganlığında önemli etkileri bulunmaktadır (55).

PDGF proteini de primordiyal ve gelişen foliküllerin oositlerinde bulunur ve PDGF'nin bloke edilmesi primordiyal foliküllerin oranında artışa neden olmaktadır. Bu da PDGF'nin primordiyal folikülden primer foliküle geçişi sağladığını düşündürmektedir (14).

2012 yılında Schultheis ve ark. tarafından ilk kez, 5 haftalık lösemik fare modelinde 150 mg/kg/gün imatinib ile 2 aylık tedavinin spermatogenez ve folikülogenez üzerine olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir (56).

Literatürde imatinib altında sağlıklı doğum yapan vaka serileri bulunmaktadır. 2006 yılında Ault ve ark. 10 kadın KML hastasının gebelik sonuçlarını bildirmişlerdir (57). Bu gebeliklerden 2 tanesi spontan düşük ile sonuçlanırken diğer gebeliklerin sorunsuz geçtiği ve sağlıklı bebek doğduğu belirtilmiştir. 2014 yılında en geniş seriyi yayınlayan Iqbal ve ark., 21 kadın KML hastasında 28 gebelik görüldüğünü ve bunların 19'unun (%67,9) sorunsuz olarak doğuma ulaştığını bildirilmişlerdir. Doğan bebeklerde konjenital anomali izlenmediği belirtilmiştir (52).

Literatürde ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörlerinin folikülogenez üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. İlaç geliştirme aşamasında erişkin dişi farelere >60 mg/kg/gün nilotinib verilmesi ile estrous siklusu, gebelik ve çiftleşme verileri üzerine etkisi gözlenmemiştir. Bu verilere dayanarak üretici firma nilotinib'in dişi infertilitesine yol açmadığını açıklamıştır (15). Ancak bu iddiayı doğrulayan klinik veri sadece 2 olgudan ibarettir (58, 59). Conchon ve ark. (58) bildirmiş olduğu KML tanılı 30 yaşında kadın olgu, nilotinib altında 2 kez gebe kalmış ve 2 tane sağlıklı bebek doğurmuştur. Ayrıca 2013 yılında Zhou ve ark. yayınlamış olduğu TKİ kullanan KML hastalarında gebelik insidansı ile ilgili tek merkez deneyiminde, bildirilen 25 gebelikten 1 tanesinin nilotinib altında oluştuğu bildirilmiştir (59).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda üretilen, 5 haftalık, ağırlıkları 20-22 g arasında değişen daha önce çiftleşmemiş 20'şer adet dişi ve erkek olmak üzere toplam 40 adet C57b16 cinsi fare kullanıldı.

Denekler çalışma boyunca, tabanı ve yanları plastik, üstü demir tel örgü ile kapalı olan, fare veya sıçanlar için özel üretilmiş standart kafeslerde yaşatıldı. Her kafese bir grup yani on fare konuldu. Kafesin tabanı daima kuru ağaç talaşı ile kaplıydı. Bu talaş iki günde bir kez değiştirildi. Fareler, deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşulları ( $22\pm 1$  °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda (07.00/19.00)) altında, küçük deney hayvanları için özel üretilmiş %21 ham protein içeren pellet türü fabrikasyon yem ve günlük içme suyu ile beslendiler.

Bu çalışma Kobay DHL A.Ş. Yerel Etik Kurulunun 18 Mart 2013 tarih ve 67 karar no'lu izniyle (Ek 1) ve "National Institute Of Health Guide for the care and use of laboratory animals" kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi.

#### 3.1. Araştırma Grupları

Deneysel çalışma her biri randomize seçilen 10 fareden oluşan 4 grup üzerinden yapıldı.

Grup I (n=10): nilotinib verilen dişi fareler

Grup II (n=10): nilotinib verilen erkek fareler

Grup III (n=10): kontrol dişi fareler

Grup IV (n=10): kontrol erkek fareler

Nilotinib grubundaki; her fareye 0,4 mg nilotinib (Novartis Pharma, Basel, İsviçre) içme suyuna katılarak 2 ay süreyle verildi. Nilotinib için ticari ismi Tasigna <sup>TM</sup> (Novartis), (200 mg kapsül) olan preparat kullanıldı.

Nilotinib dozu (20 mg/kg, oral), günümüzde kullanılan dozun klinik çalışmalarda ölçülen plasma konsantrasyonuna dayalı olarak seçilmiştir. (21). Bu doz için 200 mg kapsülün içindeki etken madde 200 cc içme suyunda çözüldü ve karışımın homojen dağıldığı gözlemlendikten sonra 0,4 cc çekilerek nilotinib gruplarındaki farelerin suluklarına ilave edildi. Aynı zamanda kontrol grubundaki farelere (n=10 dişi ve 10 erkek) de ilaç içermeyen içme suyu sulukla verildi.

Nilotinib dişi grubundan bir fare, çalışmanın 15. gününde doğal nedenlerle öldü. Çalışmaya bu grup 9 fare ile devam etti.

### 3.2. Histolojik Analiz

2 ayın sonunda servikal dislokasyon ile sakrifiye edilen farelerin ovaryumları ve testisleri laparotomik yöntemle çıkarıldıktan sonra tespit edilmek için overler %10 nötr-tamponlu formalin ve testisler de Bouin solüsyonuna aktarıldı (Şekil 3.1.).

Bouin solüsyonu:

- Suda doyurulmuş Pikrik asit: 300 cc
- %40 Formalin: 100 cc
- Glasiyal asetik asit: 20cc içermektedir



Şekil 3.1: Testis diseksiyonu yapılırken

24 saat tespit işleminden sonra aşağıda gösterilen takip yöntemi uygulandı;

A) Dehidratasyon

- %50 Alkol: 1 saat × 2
- %70 Alkol+3 damla doymuş lityum karbonat çözeltisi
- %80 Alkol: 2 saat × 2
- %95 Alkol: 1 gece × 2
- %100 Alkol: 1.5 saat × 2

B) Şeffaflandırma

- Amil Asetat: 5.5 saat

C) İnfiltrasyon (Emdirme)

- Yumuşak parafin: 1 saat
- Yumuşak+sert parafin: 3 saat
- Sert parafin: 2 saat

D) Gömme

- Sert parafine gömülür

Elde edilen parafin bloklardan LEICA RM2125RT tipi mikrotomla 6 µm kalınlığında kesitler alınıp HE (Hematoksin Eozin) yöntemi ile boyanıp Nikon Eclipse E200 mikroskobuyla incelenmiştir.

### 3.3. Yöntem

Overler için her 10 kesit ve testisler için de her 50 kesit 100x ve 400x büyütmede mikroskopta incelenmiştir.

Overlerde; primordiyal, primer ve sekonder evrelerdeki folikül sayıları kaydedilmiştir. Foliküler atrezi insidansı evre 1-3 arasında morfolojik olarak skorlandırılmıştır (Tablo 3.1). Küçülmüş oosit ve/veya piknotik granuloza hücreleri atrezi kriteri olarak sayılmıştır. Antral foliküller ve korpus luteum sayıları kaydedilmemiştir.



<b>Folikül Evresi</b>	<b>Tanım</b>
<b>Primordial</b>	Küçük, gelişmemiş oositin etrafında tek katlı skuamöz epitel hücreleri
<b>Primer</b>	Gelişmekte olan oosit ve belirgin nükleolus etrafında tek katlı küboidal granuloza hücreleri, foliküler antrum yok
<b>Sekonder (antral)</b>	Gelişmekte olan oosit ve büyük nükleolus etrafında iki ve ya daha fazla katlı granuloza hücreleri, folliküler antrum yok
<b>Tersiyer (Graafian)</b>	Bir antral alan içeren bir folikülün içinde tümüyle gelişmiş oosit

**Tablo 3.1:** Fare overindeki foliküllerin sınıflandırılması (60)

Testislerde; sirküler kesit alınmış 24 seminifer tübülü spermatogenik aktivite indeksi oluşturmak için kullanıldı ve fonksiyonlar hakkında ek bilgi sağlamak için tübül çapları oküler mikrometre ile ölçüldü. Tablo 3.2’de spermatojenik aktivite evrelemesi görülmektedir.

<b>Tübül Özelliği</b>	<b>Evre</b>
<b>Germ hücre yok</b>	0
<b>Germ hücre var, fakat mitotik evreler olmadan</b>	+
<b>Mitotik evre var, fakat matür spermatozoa olmadan</b>	++
<b>Spermatidler ve/ve ya spermatozoa var</b>	+++

**Tablo 3.2:** Fare testis seminifer tübüldeki spermatogenik aktivite evrelemesi (61).

### 3.4. İstatistiksel Değerlendirmeler

Verilerin analizi Statistical Package for Social Science (SPSS) 16 paket programında yapıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi. Sayısal değişkenler arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde “t-Test” kullanıldı. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Over Fonksiyonlarının Histolojik Değerlendirmesi

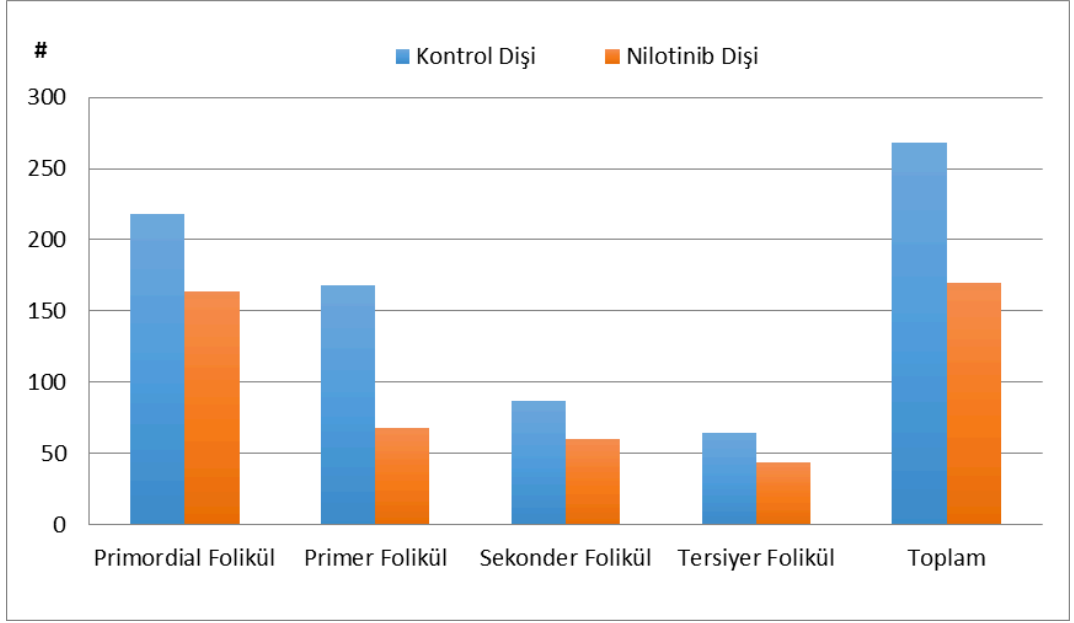
Nilotinib grubundan 1 dişi fare çalışmanın 15. gününde doğal nedenlerle öldüğü için nilotinib grubunun istatistiği 9 dişi fare ile yapılmıştır.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nilotinib alan dişi farelerin folikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlenmiştir ( $268\pm110$  vs.  $170\pm60$ ;  $p=0,03$ ).

Kontrol ve nilotinib gruplarındaki farelerin folikül dağılımları Şekil 4.1'de görülmektedir. Primordiyal, sekonder ve tersiyer folikül sayıları nilotinib grubunda kontrol grubuna göre azalmış olmasına rağmen istatistiksel fark izlenmedi ( $p>0,05$ ). Sadece primer folikül sayısı nilotinib grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlendi ( $168\pm56$  vs.  $68\pm25$ ;  $p=0,02$ ) (Tablo 4.1.).

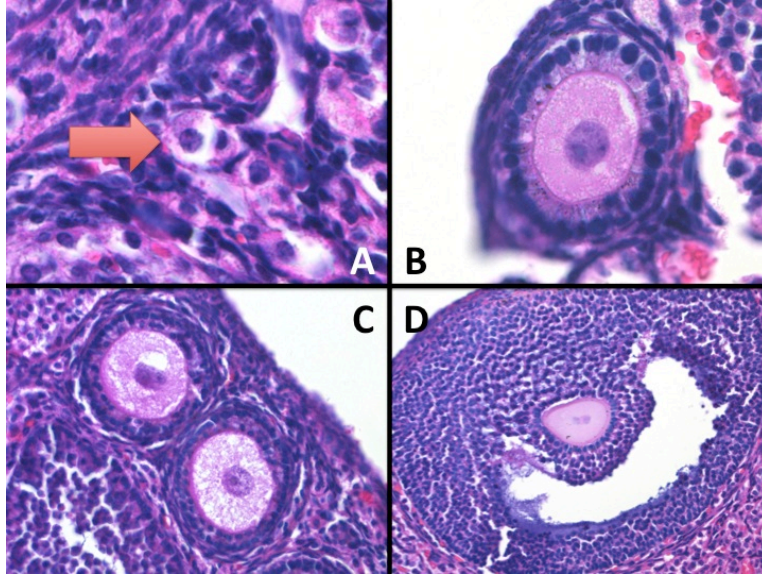
	Primordiyal Folikül	Primer Folikül	Sekonder Folikül	Tersiyer Folikül	Toplam Folikül
<b>Kontrol grubu</b>	218±47	168±56	87±29	64±24	268±110
<b>Nilotinib grubu</b>	164±29	68±25	60±23	44±12	170±60
<b>P değeri</b>	0,17	0,02*	0,32	0,33	0,03*

**Tablo 4.1:** Nilotinib ve kontrol gruplarında folikül sayıları (ortalama±SD), (\*-gruplar arası değişimlere göre olan istatistiksel fark  $p<0,05$ )



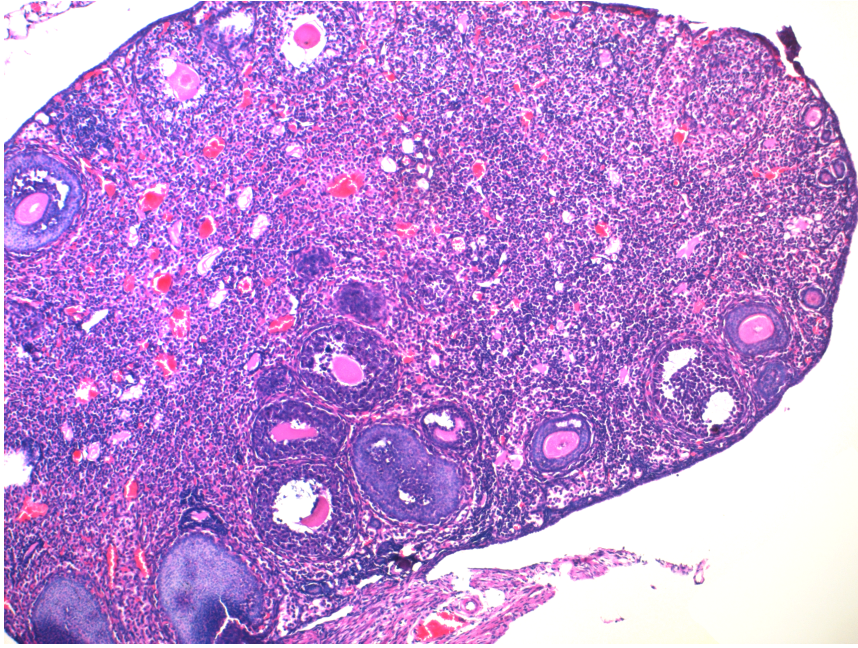
**Şekil 4.1:** Folikül sayılarının nilotinib ve kontrol grubunda dağılımı

Morfolojik atrezi işaretleri bütün folikül evrelerinde nadir olarak görüldü. Bütün evrelerdeki foliküllerin antral evreye ilerlemeleri mevcuttu ve korpus luteum görülmedi (Şekil 4.2.).



**Şekil 4.2:** Kontrol grubu ovaryumunda HE ile boyama görüntüleri; **A.** (Büyütmex10) Primordiyal folikül, **B.** (Büyütmex100) Primer Folikül, **C.** (Büyütmex40) Sekonder Folikül, **D.** (Büyütmex100) Tersiyer Folikül

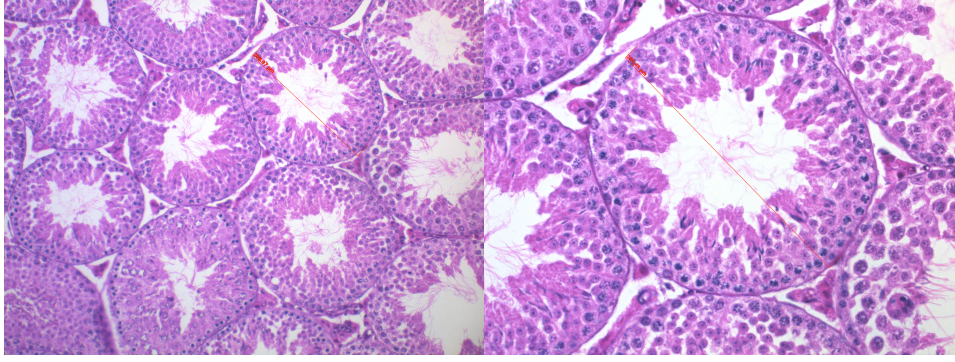
Nilotinib grubunda; over yapısı düzensiz izlendi. Korteks ve medulla arasının, normalde olması gerekenden daha dar olduğu görüldü. Normal hiyerarşik düzenleri içerisinde gelişmişlik derecesine göre periferden medullaya doğru organize olması gereken foliküller, nilotinib grubunda seyrek ve dağınık olarak izlendi (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3:** Nilotinib grubundan bir ovaryumun HE ile boyanma görüntüsü (Büyütme x10)

## 4.2. Testis Fonksiyonlarının Histolojik Değerlendirmesi

Testislerin morfolojik görüntüleri kontrol ve nilotinib grupları arasında benzerdi (Şekil 4.4.). Tübülde veya intertisyel alanlarda patolojik bulgu izlenmedi.



**Şekil 4.4:** Nilotinib grubundan bir testisin HE ile boyanma görüntüsü, **A.** (Büyütme x 40) testis morfolojik görüntüsü, **B.** (Büyütme x 100) bir seminifer tübülün görüntüsü

Kontrol ve nilotinib gruplarındaki farelerden alınan her seminifer tübül örneğinde spermatid veya spermatozoa olan aktif spermatogenez gözlemlendi. Spermatojenik aktivite indeksi her iki grupta da benzerdi (Tablo 4.2;  $p=0,241$ ).

Kontrol ve nilotinib gruplarında ortalama seminifer tübül çap değerleri arasında istatistiksel fark izlenmedi (Tablo 4.2;  $p=0,475$ ).

	N	Seminifer Tübül Çapı ( $\mu\text{m}$ )	Spermatojenik İndeks
<b>Kontrol grubu</b>	10	190,61 $\pm$ 8,33	3,1
<b>Nilotinib grubu</b>	10	194,32 $\pm$ 7,26	3,4

**Tablo 4.2:** Kontrol ve nilotinib gruplarında spermatogenez karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SD), gruplar arası değişimlere göre olan istatistiksel fark  $p>0,05$ .

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada sağlıklı fare modelinde nilotinib kullanımının spermatogenez ve folikülogenez üzerine etkisini araştırdık. Çalışmamız; uzun süreli KML tedavi dozunda nilotinib kullanımının gonadogenez üzerine etkisini histopatolojik parametreler ile gösteren ilk çalışma olması açısından önemlidir.

Hematolojik malignitesi olan genç hastalar uygulanacak tedavilerde; reproduktif potansiyellerini ve başarılı gebelik sonuçlarını değiştirebilecek riskler konusunda bilgilendirilmelidirler. Tedavi öncesinde sperm ve over dokusunun saklatılması ileride çocuk sahibi olmak isteyen hastalar için önemli bir seçenektir. Ancak dikkat edilmesi gereken nokta; kriyopreservasyon için saklanacak dokuda malign hücre varlığıdır. Lösemi tanılı 9 (3 KML, 5 AML, 1 MDS) hastanın kriyopreservasyon işlemi öncesinde yapılan doku değerlendirmesinde 3 KML'li hastanın over dokusunda Bcr-Abl (+) saptanmıştır (62) Nadir de olsa KML'de de doku tutulumu görülebilir. Özellikle blastik evrede testisküler veya ovaryan tutulum olabileceği bildiren vakalar mevcuttur (73). Bütün bu olasılıkları göz önüne alarak biz çalışmamızda sağlıklı fare modelini kullanmayı tercih ettik. Böylece sadece ilacın gonadlar üzerindeki etkisini inceleyebilmemiz mümkün oldu.

KML'nin günümüzdeki tedavisi kronik tirozin kinaz inhibisyonudur. Bcl-Abl tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) olan imatinib mesilat 2001 yılında klinik uygulamaya girmiş ve KML tedavisinde çığır açmıştır. 2006 yılında ise ikinci nesil TKİ (nilotinib, dasatinib) klinik kullanıma girmiştir. Yakın zamanda yayınlanan STIM çalışmasında; kalıcı moleküler yanıt sağlanan hastalarda imatinib tedavisinin güvenle kesilebileceği bildirilmiştir (63). Bu olumlu sonuçlar; doğurganlık çağındaki çocuk sahibi olmak isteyen birçok hastanın beklentilerini arttırmıştır. Ancak tirozin kinaz inhibitörlerinin; potansiyel gonadotoksisite ve dölleme üzerindeki olası etkileri hakkında kesin veriler bulunmamaktadır. TKİ'den sadece imatinib ile ilgili hayvan çalışmaları mevcuttur bunların da sonuçları kafa karıştırıcıdır.

Yapılan bir fare çalışmasında 3 gün süreyle 150 mg/kg/gün imatinibin oral yolla verilmesi ile PDGFR ve c-Kit tirozin kinazlarının inhibe olduğu ve postnatal testiküler gelişimin engellendiği gözlenmiştir (12). Literatürde de 11 yaşında erkek KML hastasında imatinib tedavisi altında incelenen semen analizinde oligoazospermi tesbit edilmiştir (11). Ancak literatürde imatinib ile sağlıklı çocuk sahibi olan erkek KML hastaları da mevcuttur. 2003-2014 yılları arasında erkek KML hastalarından toplam 109 gebelik bildirilmiştir. Bu gebeliklerden 103 tanesi sağlıklı doğum ile sonuçlanmıştır (64,57,50,51,53, 59, 52).

Bizim spermatogenez üzerine etkisini değerlendirdiğimiz nilotinib molekülü ile ilgili yapılmış olan tek çalışma; ilaç geliştirme aşamasında üretici firma tarafından yapılmıştır. 180 mg/kg/gün nilotinib verilen erkek erişkin farelerde total epididimal ağırlığında belirgin bir azalma gözlendiği ancak sperm sayısı ve sperm hareketliliği de dâhil olmak üzere erkek üreme parametrelerinin tedaviden etkilenmediği bildirilmiştir. Bunun üzerine üretici firma nilotinibin erkek doğurganlığı üzerine olumsuz etkilerinin olabileceğini bildirmiştir (15). Nilotinib altında gebelik bildirilen erkek KML vakası da henüz literatürde bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızda nilotinibin spermatogenez üzerine etkisi histopatolojik parametreler ile değerlendirildi. Testis rezervini göstermede önemli bir parametre olan seminifer tübül çapı ölçülerek eş zamanlı spermatojenik aktivite indeksi hesaplandı. Kontrol grubunda ortalama seminifer tübül çapı  $190,6 \pm 8,3$  iken nilotinib grubunda  $194,3 \pm 7,3$  olarak ölçüldü ( $p=0,475$ ).

Germ hücre, mitotik evre, spermatid ve spermatozoa görülüp görülmemesine göre puanlanarak hesaplanan spermatojenik indeks ise her iki grupta da benzer olarak bulundu (3,1 vs 3,4;  $p > 0,005$ ).

Elde ettiğimiz bu sonuçlarla üretici firmanın sonuçlarının aksine uzun süreli tedavi dozunda nilotinib ile spermatogenezin etkilenmediği ilk kez gösterilmiştir.

Tirozin kinaz inhibisyonunun folikülogenez üzerine etkisi de hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir. Yapılan lösemik fare modeli çalışmasında; 150 mg/kg/gün imatinib ile 2 ay tedavi edilen dişi farelerde folikülogenez üzerine etkisi gözlenmemiş (56). Ancak insanda farklı olarak 28 yaşında KML tanısı ile imatinib kullanan kadın

hastada imatinib tedavisinin ikinci yılında primer ovarian yetmezlik geliştiği bildirilmiştir (74).

Bugüne kadar imatinib kullanan 220 kadında gebelik bildirilmiştir, bu gebelikler sırasında spontan kürtaj ve düşük oranları normal popülasyondan farklı bulunmamıştır (65).

Literatürde ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörlerinin folikülogenez üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. İlaç geliştirme aşamasında erişkin dişi farelere >60 mg/kg/gün nilotinib verilmesi ile estrous siklusu, gebelik ve çiftleşme verileri üzerine etkisi gözlenmemiştir. Bu verilere dayanarak üretici firma nilotinib'in dişi infertilitesine yol açmadığını açıklamıştır (15). Ancak bu iddiayı doğrulayan klinik veri sadece 2 olgudan ibarettir (58,59). 2009 yılında Conchon ve ark. bildirmiş olduğu olgu sunumunda; 30 yaşında, KML tanısı ile nilotinib kullanan kadın hastanın 2 yıl ara ile iki sağlıklı doğum gerçekleştirdiği bildirilmiştir (58). 2013 yılında Zhou ve ark. tarafından yayınlanmış olan TKİ kullanan KML hastalarında gebelik insidansı ile ilgili tek merkez deneyiminde, bildirilen 25 gebelikten 1 tanesinin nilotinib altında oluştuğu ve sağlıklı bir bebek doğurduğu bildirilmiştir.

Biz de çalışmamızda nilotinib'in over rezervine etkisini folikül sayılarındaki değişikliğe göre değerlendirdik. Üretici firma verilerinden farklı olarak, folikül sayılarında nilotinib verilen dişi fare grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (268±110 vs. 170±60; p= 0,03). Primer folikül sayısı nilotinib grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalmışken (168±56 vs. 68±25; p=0,02) diğer folikül evrelerine göre dağılımları arasında nilotinib ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi (p>0.005).

Bizim çalışmamız ile nilotinib tedavisinin folikülogenez üzerine olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir. Ancak over rezervinin folikül sayısı ile eş zamanlı olarak Estradiol, FSH, LH ve AMH gibi hormonal ölçümlerle konfirme edildiği randomize, kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.



## 6. SONUÇLAR

Bu çalışmada sağlıklı fare modelinde nilotinibin spermatogenez ve folikülogenez üzerine etkisi histopatolojik parametreler kullanılarak değerlendirildi. Fareler cinsiyetlerine ve nilotinib verilip verilmemesine göre dört grup şeklinde sınıflandırıldı.

Buna göre;

Folikül sayılarında nilotinib verilen dişi fare grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ( $268 \pm 110$  vs.  $170 \pm 60$ ;  $p=0,03$ ).

Primer folikül sayısı nilotinib grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmış izlendi ( $168 \pm 56$  vs.  $68 \pm 25$ ;  $p=0,02$ ). Diğer folikül evrelerine göre dağılımları arasında nilotinib ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ( $p>0.005$ ).

Kontrol ve nilotinib erkek fare grupları arasında seminifer tübüllerin çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $190,61 \pm 8,33$  vs.  $194,32 \pm 7,26$ ;  $p=0,475$ ).

Kontrol ve nilotinib gruplarındaki farelerden alınan her seminifer tübül örneğinde spermatid veya spermatozoa olan aktif spermatogenez gözlemlendi. Spermatojenik aktivite indeksi her iki grupta da benzerdi ( $p=0.241$ ).

Sonuç olarak; bu çalışma ile sağlıklı fare modelinde KML tedavi dozunda ve uzun süreli nilotinib kullanılması ile folikülogenezin baskılandığı gösterilmiştir. Ancak over rezervinin folikül sayısı ile eş zamanlı olarak hormonal ölçümlerle konfirme edildiği randomize, kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

## ÖZET

### **KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ TEDAVİ DOZUNDAKİ NİLOTİNİB'İ SPERMATOGENEZ VE FOLİKÜLOGENEZ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN SAĞLIKLI FARE MODELİNDE GÖSTERİLMESİ**

**Seval GC.,** **Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Tezi, Ankara 2014.**

KML (Kronik myeloid lösemi), myeloid seri hücrelerinin aşırı ve kontrolsüz çoğalmasına yol açan bir hematopoetik pluripotent kök hücre hastalığıdır. Philadelphia translokasyonu [t(9;22)q34;q11] sonucu ortaya olan Philadelphia (Ph) kromozomu KML olgularının yaklaşık %95'inde bulunmaktadır. KML hastalarının çoğunluğunu erkekler oluşturmaktadır ve bunların %46'sı 20-64 yaşları arasında tanı almaktadır. Ph (+) KML'nin günümüzdeki tedavisi tirozin kinaz inhibisyonuna dayanmaktadır. Literatürde tirozin kinaz inhibitörlerinin; potansiyel gonadotoksisite ve dölleme üzerindeki olası etkileri hakkında kesin veriler bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı sağlıklı fare modelinde nilotinib tedavisinin fertilité üzerine etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda Kobay Deneý Hayvanları Laboratuvarı'nda üretilen, 5 haftalık, ağırlıkları 20-22 g arasında değişen daha önce çiftleşmemiş 20'şer adet diři ve erkek olmak üzere toplam 40 adet C57bI6 cinsi fare kullanıldı. Fareler cinsiyetlerine ve nilotinib verilip verilmemesine göre dört grup şeklinde sınıflandırıldı. Nilotinib grubundaki her fareye 0,4 mg nilotinib içme suyuna katılarak 2 ay süre ile verildi. Kontrol grubundaki farelere de ilaç içermeyen içme suyu verildi. Sakrifiye edilen farelerin ovaryumları ve testisleri tesbit edildi ve parafin bloklar hematoksilen eozinle boyandı. Folikül sayılarında nilotinib verilen diři fare grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (268±110 vs. 170±60; p= 0,03). Kontrol ve nilotinib erkek fare grupları arasında seminifer tübüllerin çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (190,61±8,33 vs. 194,32±7,26; p=0,475). Kontrol ve nilotinib gruplarındaki farelerden alınan her seminifer tübül örneğinde spermatid veya spermatozoa olan aktif spermatogenez gözlemlendi. Spermatojenik aktivite indeksi her iki grupta da benzerdi (p=0.241). Bizim çalışmamız ile sağlıklı fare modelinde KML tedavi dozunda ve uzun süreli nilotinib kullanılması ile folikülogenezin baskılandığı gösterilmiştir. Ancak over rezervinin folikül sayısı ile eş zamanlı olarak hormonal ölçümlerle konfirme edildiği randomize, kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Kronik Myeloid Lösemi, nilotinib, spermatogenez, folikülogenez

## SUMMARY

### THE EFFECT OF CML TREATMENT DOSES NİLOTİNİB ON SPERMATOGENESIS AND FOLLICULOGENESIS IN A HEALTHY MOUSE MODEL

Seval GC., Ufuk University Faculty of Medicine, Thesis in Hematology, Ankara 2014.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematopoietic pluripotent stem cell disease where myeloid cells lead to uncontrolled proliferation. A translocation [t(9;22)q34;q11], called Philadelphia chromosome (Ph) is found in approximately 95% of CML patients. Majority of CML patients are male and 46% of them are between 20 and 64 years of age. Current treatment of Ph (+) CML is based on the inhibition of tyrosine kinase inhibitors (TKI), especially second generation drugs. Aim of this study is to determine the effect of nilotinib on spermatogenesis and folliculogenesis which is used routinely to treat CML. Here we present the results of testicular and ovarian changes after nilotinib administration to five-week old male and female C57b16 mice. Mice received 0,4 mg of nilotinib per day dissolved in the drinking water for 2 months. Control group received only drinking water. Treatment dose was determined according to the clinical studies regarding the plasma concentrations (20 mg/kg, orally). After sacrifice of both groups, testicular and ovarian tissues were fixed and paraffin sections were stained with hematoxyline-eosin. The numbers of follicles were significantly differ between nilotinib and control groups (268±110 vs. 170±60; p= 0.03). Mean tubular diameter measurements were 190,61±8,33 vs. 194,32±7,26 in control and nilotinib groups, respectively (p=0.475). Virtually every seminiferous tubule from all animals had active spermatogenesis with either spermatids or spermatozoa present. Spermatogenic activity index were not significantly different between control and nilotinib groups (p=0.241). We showed the suppression of long term nilotinib treatment on folliculogenesis.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, nilotinib, spermatogenesis, folliculogenesis

## KAYNAKLAR

1. Nowell PC., Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.* 1960; 25: 85-109.
2. Geary CG. The story of chronic myeloid leukemia. *Br J Hematol* 2000; 110(1):2-11
3. Wang AH., Wang YY., Yao Y., Xu ZZ., Zhou L., Wang L., Zhang L., Chen Y., Shen ZX., Hu J., Li JM. Summary of 615 patients of chronic myeloid leukemia in Shanghai from 2001 to 2006. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010; 29: 20.
4. Preston DL., Kusumi S., Tomonaga M. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma,1950-1987. *Radiat Res.* 1993; 137 (2 Suppl):S68-97.
5. Oktem O., Oktay K. Preservation of Menstrual Function in Adolescent and Young Females. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1135:237-243.
6. Junqueira LC., Carneiro J. (2006) *Temel Histoloji.* 10. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
7. Ross MH., Pawlina W. *Histology a Text and Atlas.* 5th ed. 2006 Philadelphia, Saunders.
8. Gartner PG., Hiatt JL. *Color Text Book of Histology.* 3rd ed. 2006 Philadelphia, WB Saunders Co.
9. Chuah C. Imatinib does not impair gonadal function. *Leukemia Research* 2012; 36: 262– 263.
10. Mauduit C., Hamamah S., Benahmed M. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 1999; 5(5):535–45.
11. Mariani S., Basciani S., Arizzi M., Spera G., Gnessi L. PDGF and the testis. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:11–7.
12. Nurmio M., Toppari J., Zaman F., Andersson AM., Paranko J., Soder O. Inhibition of tyrosine kinases PDGFR and C-Kit by imatinib mesylate interferes with postnatal testicular development in the rat. *Int J Androl* 2007; 30(4):366–76.
13. Carlsson IB., Laitinen MP., Scott JE., Louhio H., Velentzis L., Tuuri T. Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development

and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. *Reproduction* 2006; 131(4):641–9.

14. Nilsson EE., Detzel C., Skinner MK. Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction* 2006; 131(6):1007–15.

15. Apperley J. CML in pregnancy and childhood. *Best Practice & Research Clinical Hematology* 2009; 22:455-474.

16. Plowchalk DR., Mattison DR. Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991; 107:472-481.

17. Tefferi A., Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008; 22(1): 14-22.

18. Smith A., Howell D., Patmore R., Jack A., Roman E. Incidence of hematological malignancy by sub-type: a report from the Hematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer.* 2011; 105(11):1684-92.

19. Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R., Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 341(3):164.

20. Savage DG., Szydlo RM., Goldman JM. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukemia seen at a referral center over a 16-year period. *Br J Haematol.* 1997; 96(1):111.

21. Kantarjian HM., Dixon D., Keating MJ. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer.* 1998; 61(7): 1441-6.

22. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.* 2003; 394(15):1451-64.

23. Pavlu J., Szydlo RM., Goldman JM. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood* 2011; 117(3): 755-63.

24. Talpaz M, McCredie K, Kantarjian H, Trujillo J, Keating M, Gutterman J. Chronic myelogenous leukemia: haematological remissions with alpha interferon. *Br J Haematol.* 1986; 64(1):87-95.

25. Kloke O., Niederle N., Qiu JY. Impact of interferon alpha-induced cytogenetic improvement on survival in chronic myelogenous leukemia. *Br J Haematol.* 1993; 83 (3): 399-403.

26. Martin PJ., Clift RA., Fisher LD., Buckner CD., Hansen JA., Appelbaum FR., Doney KC., Sullivan KM., Witherspoon RP., Storb R. HLA-identical marrow

transplantation during accelerated-phase chronic myelogenous leukemia: analysis of survival and remission duration. *Blood*. 1988; 72(6):1978-84.

27. Hughes TP., Kaeda J., Branford S. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 349(15):1423-32.

28. O'Dwyer ME., Druker BJ. STI571: an inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukaemia. *Lancet Oncol* 2000; 1:207-11.

29. Mughal TI., Goldman JM. Molecularly targeted treatment of chronic myeloid leukemia: beyond the imatinib era. *Front Biosci*. 2006; 1;11:209-20.

30. O'Brien SG., Guilhot F., Larson RA. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:994-1004.

31. Druker BJ., Guilhot F., O'Brien SG. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355: 2408–2417.

32. Gora-Tybor J., Robak T. Targeted drugs in Chronic Myeloid Leukemia. *Curr Med Chem* 2008; 15(29): 3036-51.

33. Baccarani M., Cortes J., Pane F. European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet *J Clin Oncol*. 2009; 27(35):6041-6051.

34. Pinilla-Ibarz J., Flinn I. The expanding options for front-line treatment in patients with newly diagnosed CML. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012; 84(2): 287-99.

35. Weisberg E., Manley PW., Breitenstein W., Brügger J., Cowan-Jacob SW., Ray A., Huntly B., Fabbro D., Fendrich G., Hall-Meyers E., Kung AL., Mestan J., Daley GQ, Callahan L., Catley L., Cavazza C, Mohammed A., Neuberg D., Wright RD., Gilliland DG., Griffin JD. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 2005; 7: 129-141.

36. Schindler T., Bornmann W., Pellicena P., Miller WT., Clarkson B., Kuriyan J. Structural mechanism for STI-57 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 2009; 289:1938-1942.

37. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses, *Endocrine Reviews*. 1996; 17:121.

38. Chun SY., Billig H., Tilly JL., Furuta I., Tsafiriri A., Hsueh AJ Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin like growth factor I. *Endocrinology*. 1994; 135: 1845-1853.

39. Faddy MJ., Gosden RG., Gougeon A., Richardson SJ., Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause, *Human Reproduction*. 1992; 7:1342.
40. Oktay K., Briggs D., Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997; 82:3748.
41. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S The primordial to primary follicle transition, *Molecular and cellular Endocrinology* 2000; 163:53.
42. Eppig JJ., Chesnel F., Hirao Y. Oocyte control of granulosa cell development: How and why, *Human Reproduction* 1997; 12:127.
43. Erickson GF, Shimasaki S The physiology of folliculogenesis: The role of novel growth factors. *Fertility & sterility* 2001; 76:943.
44. Erickson GF. The graafian follicle: A functional definition. In: Adashi EY(ed) *Ovulation: Evolving Scientific and Clinical Concepts*. Springer-Verlaag, New York, 2000; 31:233-239.
45. Çolgar U. *Reproduktif Endokrinoloji ve İnfertilite* 1. baskı. İstanbul: İstanbul medikal yayıncılık 2006:9-16.
46. Erickson GF. (1993) Normal regulation of ovarian androgen production, *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1993; 11:307.
47. Junqueira CL., Carneiro J., Kelley OR. *Basic histology* 8th edition. 1993 Çev. Y. Aytakin. Barış kitabevi, İstanbul.
48. Ganong WF. *Review of medical physiology*. 16th edition. Appleton and Lange, California, 1993 p: 387-408.
49. Fawcett DW. *A Textbook of Histology*. 12 th ed. 1994 New York, Chapman&Hall.
50. Ramasamy K., Hayden J., Lim Z., Mufti GJ., Ho AY. Successful pregnancies involving men with chronic myeloid leukemia on imatinib therapy. *Br J Haematol* 2007; 137:374-5.
51. Breccia M., Montefusco E., Frustaci A., Pacilli M., Alimene G. Male patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib involved in healthy pregnancies: Report of five cases. *Leukemia Research* 2008; 32: 505-520.
52. Iqbal J., Ali Z., Khan AN., Aziz Z Pregnancy outcomes in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate: short report from a developing country. *Leukemia&Lymphoma* 2014 [Epub ahead of print].

53. Shash E., Bassi S., Cocorocchio E., Colpi GM., Cinieri S., Peccatori FA. Fatherhood during imatinib. *Acta Oncol* 2011; 50(5):734–5.
54. Gambacorti-Passerini C., Tornaghi L., Cavagnini F., Rossi P., Pecori-Giraldi F., Mariani L. Gynocomastia in men with chronic myeloid leukemia after imatinib. *The Lancet* 2003; 363: 1954-6.
55. Hutt KJ., McLaughlin EA., Holland MK. Kit ligand and c-kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Mol Hum Reprod* 2006; 12(2): 61-9.
56. Schultheis B., Nijmeijer BA., Yin H., Gosden RG., Melo JV. Imatinib mesylate at therapeutic doses has no impact on folliculogenesis or spermatogenesis in a leukaemic mouse model. *Leuk Res* 2012; 36(3):271–4.
57. Ault P., Kantarjian H., O'Brien S., Faderl S., Beran M., Rios MB. Pregnancy among patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol* 2006; 24(7):1204–8.
58. Conchon M., Sanabani S., Bendit I. Two successful pregnancies in a woman with chronic myeloid leukemia exposed to nilo-tinib during the first trimester of her second pregnancy: case study. *J Hematol Oncol* 2009; 2:42.
59. Zhou L., You JH., Wu W., Li JM., Shen ZX., Wang AH. Pregnancies in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia Research* 2013; 37: 1216-1221.
60. Faddy MJ., Telfer E., Gosden RG. The kinetics of pre-antral follicle development in ovaries of CBA/Ca mice during the first 14 weeks of life. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20: 551-60.
61. Schlatt S., Kim SS., Gosden R. Spermatogenesis and ateroidogenesis in Mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction* 2002; 124: 339-46.
62. Meirow D., Hardan I., Dor J., Fridman E., Elizur S., Ra'anani H., Slyusarevsky E., Amariglio N., Schiff E., Rechavi G., Nagler A., Ben Yehuda D. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. *Hum Reprod.* 2008; 23(5):1007-13.
63. Mahon FX., Rea D., Guilhot J., Guilhot F., Huguet F., Nicolini F. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(11):1029–35.



64. Hensley ML., Ford JM. Imatinib treatment: Specific issues related to safety, fertility, and pregnancy. *Semin Hematol* 2003; 40(Supp 2): 21-5.
65. Pye SM., Cortes J., Ault P., Hatfield A., Kantarjian H., Pilot R. The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood* 2008; 111:5505-8.
66. Morita Y., Perez GI., Paris F. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med.* 2000; 10: 1109–1114.
67. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood.* 2007;110(10):3540-6.
68. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia.* 2008;22(6):1200-6.
69. Cortes JE, Jones D, O'Brien S. Nilotinib as front-line treatment for patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):392–7.
70. Cortes JE, Jones D, O'Brien S. Results of dasatinib therapy in patients with early chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):398-404
71. Hakuno N., Koji T., Yano T., Kobayashi N., Tsutsumi O., Taketani Y., Nakane PK. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 1996; 137: 1938-1948
72. Moore KL., Persaud TVN. *The Developing Human.* 8th.Ed. 2007 China, Saunders
73. Borker A., Advani SH. Testicular involvement in blastic crisis of chronic myeloid leukemia. *Indian Pediatr.* 2005 Nov;42(11):1166-7.
74. Constantinou C., Vasiliki D., Rotas E. Primary ovarian insufficiency associated with imatinib therapy. *N Engl J Med* 2008; 358;10.

## KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	Protokol Numarası	67
	Protokol Adı	Fare modelinde tedavi dozundaki nilotinib'in spermatogenez ve folikülogenezini etkilemesi
	Başvuru Tarihi	03/03/2013
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Güldane CENGİZ SEVAL
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Ankara Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Onay Numarası	67
	Onay Tarihi	18.03.2013
	Onay Bilgileri	Proje amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde Etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
<b>KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ</b>	Etik Kurul Başkanı Veteriner Hekim A. Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	<i>AAK</i>
	Etik Kurul Üyesi Doç.Dr M.Orhan ULUDAĞ	<i>M.ULUDAĞ</i>
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Sağlık Teknikeri Özge AVŞAR	<i>AVŞAR</i>
	Etik Kurul Üyesi Dr Buğra Adil BUYRUKÇU	<i>Buğra A. Buyrukcu</i>
	Etik Kurul Üyesi Doç. Dr Cihangir ÇAKICI	<i>Cihangir ÇAKICI</i>
	Etik Kurul Üyesi Dilara GÜNTAV	<i>GÜNTAV</i>
	Etik Kurul Üyesi Fatih ALTINSOY	<i>ALTINSOY</i>

