



**PEMBROLİZUMAB VERİLEN SIÇANLARDA OLASI TESTİS TOKSİSİTESİNE KARŞI  
AROMATAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİSİ**

**Neşe BAŞAK TÜRKMEN**

**İnönü Üniversitesi ve Ankara Üniversitesi**

**Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı**

**Ortak Doktora Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ  
Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. Benay CAN EKE**

**Doktora Tezi – 2019**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PEMBROLİZUMAB VERİLEN SIÇANLARDA OLASI TESTİS TOKSİSİTESİNE  
KARŞI AROMATAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİSİ**

**Neşe BAŞAK TÜRKMEN**

**İnönü Üniversitesi ve Ankara Üniversitesi  
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı  
Ortak Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ**

**Ortak Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Benay CAN EKE**


**MALATYA**

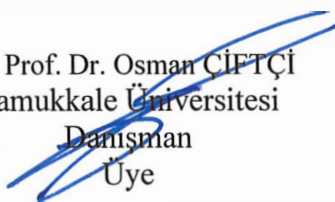
**2019**

## KABUL VE ONAY SAYFASI


İnönü Üniversitesi ile Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüleri Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Ortak Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Neşe BAŞAK TÜRKMEN'nin " Pembrolizumab Verilen Sıçanlarda Olası testis Toksisitesine Karşı Aromataz İnhibitörlerinin Etkisi "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 12/07/2019

  
Prof. Dr. Binay CAN EKE  
Ankara Üniversitesi  
Ortak Danışman  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ  
Pamukkale Üniversitesi  
Danışman  
Üye

  
Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU  
Fırat Üniversitesi  
Üye

  
Doç. Dr. İlker ATEŞ  
Ankara Üniversitesi  
Üye

  
Doç. Dr. Songül ÜNÜVAR  
İnönü Üniversitesi  
Üye

### ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ....../...../2019 tarih ve 2019/.....sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Enstitü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ÖZET .....   | vi   |
| ABSTRACT .....   | vii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....   | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....  | x    |
| TABLolar DİZİNİ.....   | xi   |
| 1. GİRİŞ.....  | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....   | 3    |
| 2.1. Kanser tedavisinde immunoterapinin tarihsel gelişimi .....              | 3    |
| 2.2. Kanser ve İmmunoterapi.....   | 4    |
| 2.3. Kanser İmmunoterapisinde Kullanılan Tedavi Yöntemleri.....              | 6    |
| 2.4. Yeni Nesil İmmunoterapi İlaçları .....                                  | 9    |
| 2.5. Pembrolizumab ve Etki Mekanizması.....                                  | 10   |
| 2.6. Pembrolizumab Yan Etkileri .....  | 10   |
| 2.7. Pembrolizumab ile Yapılmış Çalışmalar .....                             | 11   |
| 2.8. Aromataz Nedir? .....   | 13   |
| 2.9. Aromataz Enzim İnhibitörleri .....                                      | 13   |
| 2.10. Anastrozol ve Farmakolojik Özellikleri.....                            | 14   |
| 2.11. Anastrozolün Yan Etkileri .....  | 17   |
| 2.12. Doğal Aromataz İnhibitörü Resveratrol .....                            | 17   |
| 2.13. Resveratrol Kimyasal Yapısı ve Türevleri .....                         | 18   |
| 2.14. Resveratrolün Biyosentezi ve Mekanizması .....                         | 19   |
| 2.15. Resveratrolün Kardiyovasküler, Antikanser ve Antioksidan Etkileri..... | 19   |
| 3. MATERYAL VE METOT .....   | 21   |
| 3.1. Sıçan Tartım Yöntemi .....  | 24   |
| 3.2. Biyokimyasal Yöntemler .....  | 24   |
| 3.2.1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması.....                              | 24   |
| 3.2.2. Homojenatların Hazırlanması .....                                     | 24   |
| 3.2.3. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçümü .....                   | 24   |
| 3.2.4. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü.....                 | 25   |
| 3.2.5. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü .....              | 26   |
| 3.2.6. Doku Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....                    | 26   |
| 3.2.7. Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü .....                                  | 27   |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.8. Doku Protein Ölçümü .....   | 27 |
| 3.3. Biyokimyasal Analizler İçin İstatiksel Değerlendirme .....                              | 28 |
| 3.4. Spermatolojik Yöntemler.....  | 30 |
| 3.4.1. Organ Ağırlıkları ve Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi .....                   | 30 |
| 3.5. Sperm Analizleri İçin İstatiksel Değerlendirme.....                                     | 31 |
| 3.6. Histolojik Yöntemler .....  | 32 |
| 3.6.1. Histolojik Protokol .....   | 32 |
| 3.6.2. Histolojik Analizler İçin Doku Takip Basamakları.....                                 | 32 |
| 3.6.3. Mayer'in Hematoksilen-Eozin Metodu .....  | 33 |
| 3.6.4. İmmunohistokimyasal Boyama Prosedürü.....   | 34 |
| 3.7. Histolojik İnceleme İçin İstatiksel Değerlendirme.....                                  | 35 |
| 3.8. Serum Testosteron ve PD-1 düzeylerinin Elisa Yöntemiyle Ölçülmesi.....                  | 35 |
| 3.9. Elisa Deneyleeri için İstatistiksel Değerlendirme.....                                  | 36 |
| 4. BULGULAR .....  | 37 |
| 4.1. Haftalık Sıçan Tartım Sonuçları .....   | 37 |
| 4.2. Biyokimyasal Bulgular.....  | 38 |
| 4.3. Spermatolojik Bulgular .....  | 39 |
| 4.4. Histolojik Bulgular .....   | 41 |
| 4.4.1. Kontrol Grubu .....   | 41 |
| 4.4.2. Pembrolizumab (PEMB) Grubu .....  | 42 |
| 4.4.3. Pembrolizumab (PEMB) + Anastrozol ve Pembrolizumab (PEMB) + Resveratrol<br>Grubu..... | 44 |
| 4.4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular.....   | 45 |
| 4.5. Serum Testosteron ve PD-1 düzeylerinin Elisa Yöntemiyle Ölçülmesi.....                  | 47 |
| 4.5.1. Serum Testosteron Düzeyleri.....  | 47 |
| 4.5.2. Serum PD-1 Düzeyleri .....  | 48 |
| 5. TARTIŞMA.....   | 50 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....   | 59 |
| KAYNAKLAR.....   | 61 |
| EKLER .....  | 78 |
| EK 1. Özgeçmiş .....   | 78 |
| EK 2. Deney hayvanları Etik Kurul Kararı.....  | 83 |

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, düzenlenmesi ve deneylerimin yürütülmesi aşamalarında bilimsel desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez süresince bilimsel bilgi ve desteğini her zaman paylaşan ve her zaman anlayış gösteren ikinci danışmanım sayın Prof. Dr. Benay Can EKE' ye ve Anabilim Dalı Başkanım sayın Dr. Öğretim Üyesi Songül ÜNÜVAR'a teşekkür ederim.

Spermatolojik aktivite tayin çalışmalarının gerçekleşmesi ve deneylerin yürütülmesini sağlayan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sayın Prof. Dr. Muhterem AYDIN' a ve histolojik analizlerde yardımını ve manevi ablalığını her zaman hissettiğim sayın Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE' ye teşekkür ederim.

Deney hayvanları ile çalışırken teknik desteklerini esirgemeyen, sayın Onur ÖZKAYA ve eşi Gamze ÖZKAYA' ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın istatistik aşamasında bana yardımcı olan sayın Arş. Gör. Şeyma YAŞAR' a teşekkür ederim.

Sınırsız sevgileri ile çalışma hayatım boyunca benden manevi desteklerini esirgemeyen aileme, eşime ve güleryüzü ile bana hayat sevinci veren oğlum Muhammed Çağrı TÜRKMEN 'e çok teşekkür ederim.

**Neşe BAŞAK TÜRKMEN**

**Malatya, 2019**

## ÖZET

### **Pembrolizumab Verilen Sıçanlarda Olası Testis Toksisitesine Karşı Aromataz İnhibitörlerinin Etkisi**

**Amaç:** Pembrolizumab (PEMB) PD-1'i bloke eden monoklonal antikor olup etkili bir immunoterapi ilacıdır. Anastrozol (ANAST) infertilite önleyici bir aromataz inhibitörüdür. Benzer şekilde resveratrol (RES) de üreme sisteminde etkili antioksidan bir polifenol olup, doğal aromataz inhibitörü olarak işlev görmektedir. Bu çalışma, PEMB ile oluşturulmuş reproduktif hasara karşı ANAST ve RES'in koruyucu etkilerini göstermek amacıyla planlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada 42 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize olarak 6 eşit gruba ayrıldı (n=7); Kontrol, PEMB, PEMB +ANAST, PEMB+RES, RES, ANAST şeklindedir. 30 günlük deney sonunda sıçanlar ketamin-ksilazin anestezisi altında sakrifiye edildi. Sıçanlardan biyokimyasal ve histolojik değerlendirmeler için testis doku örnekleri alındı. Histolojik analizler için dokular rutin doku takip işlemlerinden geçirildi. Biyokimyasal olarak TBARS, GSH, CAT, SOD, GSH-Px düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Spermatolojik olarak sperm hareketliliği, anormal sperm oranı ve epididimal sperm konsantrasyonu incelendi. Elisa yöntemi kullanılarak serum Testosteron ve PD-1 düzeyleri ölçüldü.

**Bulgular:** Laboratuvar analizleri sonucunda PEMB verilen sıçanlarda TBARS düzeyinin anlamlı şekilde arttığı, GSH, SOD, GPx ve CAT düzeylerinin ise azaldığı belirlendi. ANAST ve RES uygulamasının oluşan bu değişimleri tersi yönde değiştirdiği belirlendi. Histolojik açıdan; H-E boyama yöntemi ile kontrol, ANAST ve RES grupları testis örnekleri normal histolojik görünümde izlendi. PEMB grubunda testis dokusunda seminifer tübül yapılarında histolojik hasar saptandı. PEMB+RES ve PEMB+ANAST gruplarında ise bu histolojik hasarda azalma olduğu tespit edildi. Spermatolojik analiz deneylerinde sperm kalitesi ve üreme performansı tespit edildi. Bunun dışında PD-1 ve testosteron seviyelerine Elisa yöntemiyle bakılarak tez desteklendi.

**Sonuç:** PEMB ile oluşturulan reproduktif hasara karşı ANAST ve RES'in tedavi edici etkileri olduğu belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** Pembrolizumab, Testis, Anastrozol, Resveratrol

## ABSTRACT

### The Effect Of Aromatase Inhibitors Against Possible Testis Toxicity In Pembrolizumab Treated Rats

**Aim:** Pembrolizumab (PEMB) is a monoclonal antibody that blocks PD-1 and is an effective immunotherapy drug. Anastrozole (ANAST) is an infertility inhibitor of aromatase. Similarly, resveratrol (RES) is an effective antioxidant polyphenol in the reproductive system and acts as a natural aromatase inhibitor. This study was planned to demonstrate the protective effects of ANAST and RES against PEMB-induced reproductive damage.

**Materials and Methods:** 42 Sprague-Dawley rats were used in the study. Rats were randomly divided into 6 equal groups (n = 7); The control, PEMB, PEMB + ANAST, PEMB + RES, RES, ANAST. At the end of the 30-day experiment, rats were sacrificed under ketamine-xylazine anesthesia. Testicular tissue samples were taken from rats for biochemical and histological evaluations. Tissues were subjected to routine tissue follow-up for histological analysis. Biochemically, TBARS, GSH, CAT, SOD, GSH-Px levels were measured spectrophotometrically. Sperm motility, abnormal sperm rate and epididymal sperm concentration were examined as spermatologically. Serum Testosterone and PD-1 levels were measured using the Elisa method.

**Results:** TBARS levels were significantly increased and GSH, SOD, GPx and CAT levels were decreased in PEMB-treated rats as a result of laboratory analysis. It was determined that ANAST and RES changes these changes in the opposite direction. Histologically; Control, ANAST and RES groups testis samples were observed with normal histological appearance by H-E staining method. Histological damage was detected in seminiferous tubule structures in testicular tissue in PEMB group. In PEMB + RES and PEMB + ANAST groups, this histological damage was decreased. Sperm quality and reproductive performance were determined in spermatological analysis experiments. In addition, PD-1 and testosterone levels were evaluated by Elisa method and the thesis was supported.

**Conclusion:** ANAST and RES have therapeutic effects against reproductive damage caused by PEMB.

**Key words:** Pembrolizumab, Testis, Anastrozole, Resveratrol



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>ANAST</b>                      | : Anastrazol   |
| <b>CAT</b>                        | : Katalaz  |
| <b>CMC</b>                        | : Karboksi metil selüloz   |
| <b>CTLA-4</b>                     | : sitotoksik T lenfosit ilişkili protein   |
| <b>CYP3-A</b>                     | : Sitokrom p4503A  |
| <b>DTNB</b>                       | : 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit)   |
| <b>EDTA</b>                       | : etilen diamin tetra asetik asit  |
| <b>ELIZA</b>                      | : Enzim Bağlı İmmun Deneyi   |
| <b>EGFR</b>                       | : Epidermal büyüme faktörü reseptörü   |
| <b>GECT</b>                       | : Tübül Epitel Kalınlığı   |
| <b>GSSG</b>                       | : Glutasyon disülfid   |
| <b>GSH</b>                        | : Glutasyon  |
| <b>GPx</b>                        | : Glutasyon peroksidaz   |
| <b>Gr</b>                         | : gram   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen peroksit  |
| <b>H-E</b>                        | : Hematoksilen-Eosin   |
| <b>i.p</b>                        | : İntraperitonal   |
| <b>İNÜTFDEHUM</b>                 | : İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve<br>Araştırma Merkezi |
| <b>LH</b>                         | : Luteinleştirici hormon   |
| <b>LDL</b>                        | : düşük yoğunluklu protein   |
| <b>MDA</b>                        | : malondialdehit   |
| <b>Mg</b>                         | : miligram   |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>MSTD</b>  | : Tübül Çapı                                    |
| <b>NADPH</b> | : Nikotinamid adenin dinukleotit fosfat-oksidaz |
| <b>NBT</b>   | : Nitro mavi tetrazolyüm klorür                 |
| <b>Nfκβ</b>  | : Nükleer faktör kappa β                        |
| <b>PBS</b>   | : Fosfat salin tamponu                          |
| <b>PD-1</b>  | : programlanmış hücre ölüm proteini             |
| <b>PDL-1</b> | : programlanmış hücre ligandı                   |
| <b>PEMB</b>  | : Pembrolizumab                                 |
| <b>RES</b>   | : resveratrol                                   |
| <b>ROS</b>   | : Serbest oksijen radikalleri                   |
| <b>SE</b>    | : Standart hata                                 |
| <b>SOD</b>   | : Süperoksit dismutaz enzim                     |
| <b>TBARS</b> | : Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler          |
| <b>TCA</b>   | : Trikloro asetik asit                          |
| <b>TNF</b>   | : Tümör nekrozis faktör                         |
| <b>VEGF</b>  | : Vasküler endotel büyüme faktörü               |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil No</u>  | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Şekil 2.1. İmmünoterapinin tarihçesi .....   | 4               |
| Şekil 2.2. Yeni nesil immunoterapi ilaçlarının etki mekanizmaları .....  | 10              |
| Şekil 2.3. Anastrozol molekül yapısı .....   | 16              |
| Şekil 2.4. Resveratrol açık kimyasal formülü .....   | 18              |
| Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan sıçanlar (İNUTFDEHÜM) .....  | 23              |
| Şekil 3.2. Sıçanlara gavaj yolu ile ilaç uygulaması (İNUTFDEHÜM).....  | 23              |
| Şekil 4.1. Kontrol (A), Anastrozol (B) ve Resveratrol (C) gruplarında testis dokusu normal histolojik görünümde izlendi. H-E; X40.....   | 42              |
| Şekil 4.2. PEMB grubunda ise testiste seminifer tübül yapılarında bozulma (A, B, D, F), vasküler konjesyon (siyah ok) (A), kapsül altında ve intestisyel alanda ödem (siyah yıldız) (A, C), vakuolizasyon (beyaz oklar) (C), seminifer tübül lümenine dökülmüş hücreler (siyah ok) (B, F), tübül lümeninde ödem (Mavi yıldız) (B, D) ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler olduğu (E) gözlemlendi. A: H-E; x10, B,D: H-E; x20, C, E, F: H-E; x40..... | 43              |
| Şekil 4.3. PEMB + ANAST grubu ve PEMB + RES gruplarında ise histopatolojik hasarda azalma olduğu gözlemlendi. Her iki grupta da seminifer tübül yapılarının arasında az miktarda vasküler konjesyon gözlemlendi. (A, B, C, D). Pemb + Anast grubunda ise vakuolizasyonda azalma olduğu tespit edildi (Siyah ok) (B). A, C:H-E; X20, B, D: H-E; X40.....  | 45              |
| Şekil 4.4. Kontrol, PEMB, PEMB + ANAST, PEMB + RES, ANAST ve RES gruplarında spermatogenik seri hücrelerde Kaspaz- 3 immunreaktivite değerlendirilmesi.....  | 46              |

## TABLolar DİZİNİ

| <b>Tablo No</b>   | <b>Sayfa No</b> |
|---|-----------------|
| <b>Tablo 2.1.</b> Kanser tedavisinde kullanılan bazı temel monoklonal antikorlar .....  | 8               |
| <b>Tablo 2.2.</b> Onaylanmış bazı immünoterapötik ilaçların yan etkileri .....  | 11              |
| <b>Tablo 2.3.</b> Aromataz enzim inhibitörlerinin sınıflandırılması .....   | 14              |
| <b>Tablo 2.4.</b> Anastrozol fiziksel ve kimyasal özellikleri.....  | 16              |
| <b>Tablo 2.5.</b> Bazı gıdalardaki resveratrol içerikleri .....   | 18              |
| <b>Tablo 2.6.</b> Resveratrolün fiziksel ve kimyasal özellikleri.....   | 18              |
| <b>Tablo 3.1.</b> Sıçanlara verilen Yem % Bileşimi (İNÜTFDEHÜM) .....   | 22              |
| <b>Tablo 3.2.</b> Biyokimyasal yöntemlerde kullanılan kimyasal maddeler.....  | 29              |
| <b>Tablo 3.3.</b> Biyokimyasal yöntemlerde kullanılan alet ve cihazlar.....   | 30              |
| <b>Tablo 3.4.</b> Histolojik Yöntemlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....  | 35              |
| <b>Tablo 4.1.</b> Haftalık sıçan tartım sonuçları.....  | 37              |
| <b>Tablo 4.2.</b> Sıçanlarda TBARS, GSH, SOD, CAT ve GPx düzeyleri.....   | 38              |
| <b>Tablo 4.3.</b> Sıçanlarda testis ağırlıkları, epididimis ağırlıkları, seminal vezikül ağırlıkları,<br>prostat ağırlıkları .....  | 39              |
| <b>Tablo 4.4.</b> Sıçanlarda sperm motilitesi, epididimal sperm konsantrasyonu ve anormal<br>sperm oranı .....  | 40              |
| <b>Tablo 4.5.</b> Pembrolizumab'ın oluşturduğu tübül çapı (MSTD) ve tübül epitel<br>kalınlığındaki (GECT) değişiklikler üzerine Anastrozol ve Resveratrolün<br>etkileri ..... | 47              |
| <b>Tablo 4.6.</b> Serum testosteron düzeyleri .....   | 48              |
| <b>Tablo 4.7.</b> Serum PD-1 düzeyleri .....  | 49              |

# 1. GİRİŞ

Çağımızın vebası olarak bilinen kanser, hücrelerin düzensiz ve kontrolsüz olarak hızlı bir şekilde bölünüp çoğalmasıyla karakterize edilir (1). Normal hücre bölünmesinden farklı olarak hızlı, kontrolsüz ve apoptozdan kaçarak bölünen hücreler çeşitli doku ve organlarda tümör oluşmasına sebep olmaktadır. Kanser, yüksek morbidite ve mortalitesi sebebiyle dünyada en sık ölüm nedenleri arasında yer almakta olup, bu ölümlerin sebepleri arasında çevresel faktörler, genetik faktörler ve fiziksel faktörlerin (uv, radyasyon) yanında yaş, meslek ve yaşam biçimi de önem arz etmektedir (2-4). Bu faktörlerin bir arada olması DNA hasarıyla beraber hücrelerin mutasyona uğrayıp çoğalmasıyla kansere yol açmaktadır. Çağımızın bu hastalığı, doku ve organ türüne, kanser türüne ve safhasına bağlı olarak değişmekle birlikte temel tedavi metodları arasında operasyon ile kitlenin uzaklaştırılması, kemoterapi ve radyoterapi yer almaktadır (5). Bu tümörlerin tedavisinde radyoterapi ve kemoterapi dışında, vücudun bağışıklık sistemini destekleyen immunoterapi de kullanılmaktadır. İmmunoterapi vücudun immun sistemini daha etkili ve güçlü hale getirerek kanserin büyümesini engelleyen bir tedavi yöntemidir (6). Klasik kemoterapilerden farklı olarak immunoterapi kanserli hücreyi öldürmez, direk bağışıklık sistemini tetikleyerek yeniden düzenler ve güçlendirir. Programlanmış hücre ölümü proteini olarak bilinen PD-1 immun sistem hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir reseptördür (7). Bu reseptör kendi uyarıcı moleküllerine (ligand-PDL-1) bağlandığında bağışıklık sistemi hücreleri (T hücreleri) ve bununla birlikte bağışıklık sistemi pasifleşir. PD-1 reseptörünün kendi uyarıcı moleküllerine bağlanmasını engelleyen ve şu anda yaygın olarak melanoma kanser tedavisinde yaygın kullanılan iki ilaç bulunmaktadır. Bunlar; nivolumab ve pembrolizumab olarak isimlendirilmiştir. Pembrolizumab, PD-1'i bloke eden monoklonal antikor olup etkili bir immunoterapi ilacıdır (8). Sağlıklı bireyde, bağışıklık sisteminin en önemli hücresel bileşenlerinden olan T hücreleri yüzeyindeki PD-1 reseptörleri aracılığı ile kanser hücresi yüzeyindeki PDL-1 reseptörlerine gelip bağlanır. Bu etkileşim sayesinde kanser hücrelerinin immun sistem tarafından tehlikeli olarak tanınmasını engeller ve kanser hücresi immun sistem kontrolünden geçerken apoptoza uğramaz. Bu mekanizma, vücuttaki sağlıklı hücrelerin T hücreleri tarafından düşman olarak algılanmaması için bir koruma yöntemidir. Bu mekanizmanın inhibe edilmesi kanser hücrelerinin immun sistem tarafından yakalanması ve öldürülmesi için önemli bir terapötik hedefdir (9). Kanser alanında immunoterapi ilaçlarının kullanım yaygınlığı gün geçtikçe artmaktadır. İmmun kontrol noktası

düzenleyicisi olarak da bilinen pembrolizumab yan etkileri minimal olan yeni nesil immunoterapi ilaçlardandır.

Bu tez çalışması kapsamında yeni nesil immunoterapi ilacı olan pembrolizumabın erkek sıçanlarda uygulanmasıyla, muhtemel testis toksisitesine karşı, bu toksik etkiyi ortadan kaldıracı tamamlayıcı ve onarıcı terapi uygulaması yapılmıştır. Bu bağlamda bir infertilite önleyici ilaç olan anastrozol ve testis metabolizmasındaki koruyucu rolü ile bilinen, doğal aromataz inhibitörlerinden olan resveratrol tedavisi ayrı ayrı uygulanarak, olası toksik etkinin ortadan kaldırılması ve bu iki ilacın etkileri karşılaştırılarak spermatogenezin devamı amaçlanmıştır. Bu amaçla muhtemel reproduktif toksisite, biyokimyasal, histolojik, spermatolojik ve elisa deneyleriyle değerlendirilmiştir.



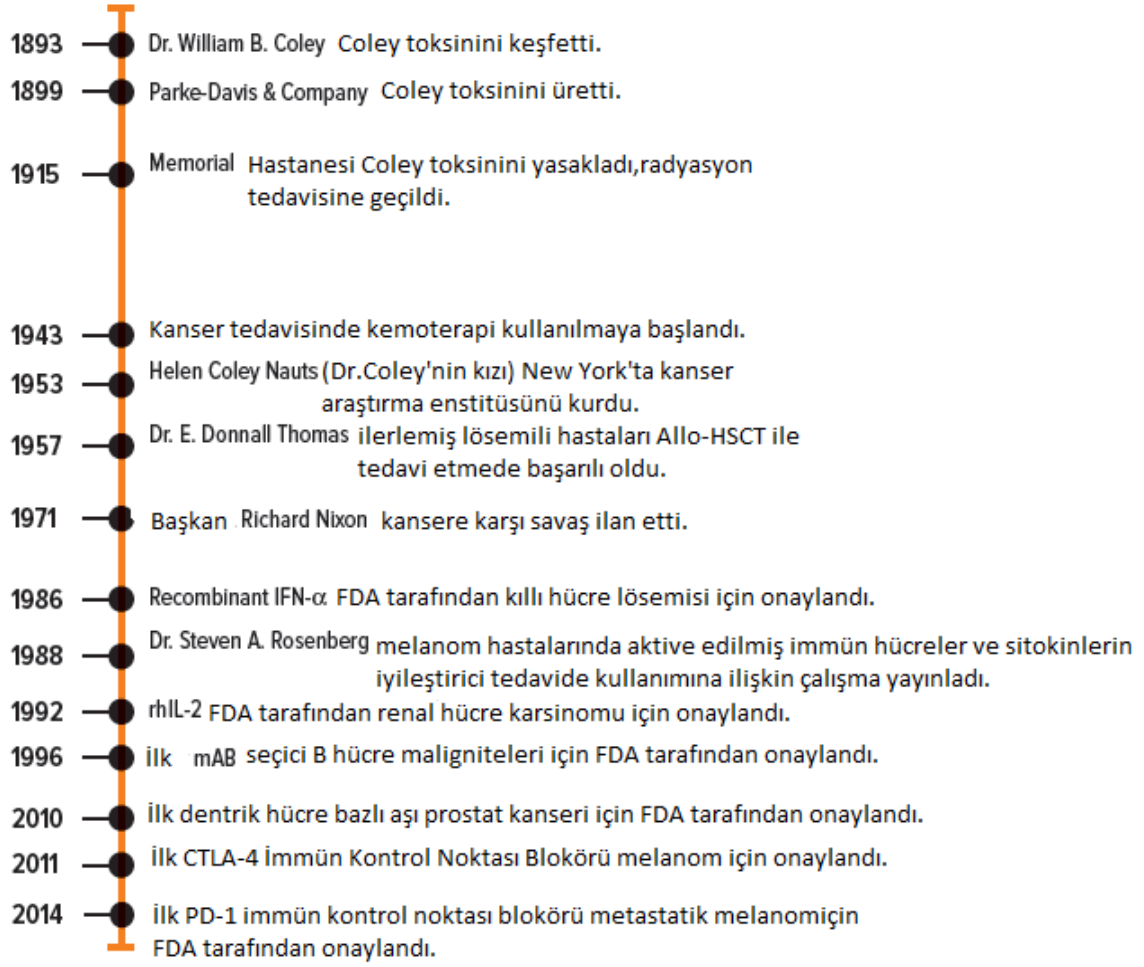
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser tedavisinde immunoterapinin tarihsel gelişimi

Eksojen faktörler sebebiyle gen mutasyonları sonucu oluşan kanser, çağımızın vebası niteliğini halen korumaktadır. Günümüzde ise spesifik olarak tümörü hedefleyen tedavi yöntemlerinin etkili olarak kullanılması için araştırmalar devam etmektedir. İmmunoterapi bu spesifik tedaviler arasında yer almaktadır. Bu tedavi yöntemi bireyin sahip olduğu bağışıklık sisteminin belirli kısımlarını kullanarak tümörle mücadele etmektedir. Bu kısımlar özellikle makrofajlar, NK (natural killer) hücreler, dendritik hücreler, T lenfositler ve B lenfositler olarak bilinmektedir. Bu hücreler kanserli hücreye karşı efektör mekanizma olarak kullanılmaktadır (10).

İmmunoterapideki ilk çalışmalardan biri 1866 yılında Wilhelm Busch tarafından Streptococcus bakterileri kullanılarak yapılmıştır. 1868 yılında ise yine aynı bilim adamı sarkoma hastası bir bireyi ameliyat sonrasında aynı enfeksiyonla enfekte ederek tümörün baskılanmasını görmeye çalışmıştır (11). 1891 yılında William Bradley Coley, aynı yöntemi denemek amacıyla, canlı ve inaktif Streptococcus pyogenes ve Serratia marcescens bakterilerinin intratümöral enjeksiyonlarını yapmıştır. Yaptığı bu girişimle malign tümörlü hastasının yıllarca yaşamını sürdürmesini sağlamıştır (12). William Bradley'in yaptığı bu çalışmalar halen yüzeysel mesane kanserine karşı etkili olarak kullanılan BCG (Bacille calmette-Guer) immunoterapisinin kullanımının temellerini oluşturmuştur (13).

1975 yılında George Köhler ve Cesar Milstein monoklonal antikor üretimini sağlamak amacıyla hibridoma teknolojisini geliştirmişler, devamında 1982 yılında monoklonal antikorların insan tümörlerinde ilk başarılı kullanımları ve 1986 yılında muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3)'ün FDA tarafından onaylanması takip etmiştir. 1997 yılında ilk insan monoklonal antikor olan daclizumab'ın FDA tarafından onaylanması ve rituximab'ın malignite için onaylanan ilk monoklonal antikor olması gerçekleşmiştir. Bu gelişmeleri 2000 yılında ilk toksin bağlı monoklonal antikor olan gemtuzumab ozogamisin (Mylotarg)'in ve 2002 yılında radyonüklid bağlı ilk monoklonal antikor olan ibritumomab tiuxetan'ın FDA'den onay alması izlemiştir (14). Son zamanlardaki çalışmalar ise immunosurveillence hipotezi adı verilen bağışıklık sistemine ait bazı hücrelerin, vücutta meydana gelebilecek malign hücreleri yok etmesi üzerine yoğunlaşmıştır (13).



Şekil 2.1. İmmünoterapinin tarihçesi (15)

## 2.2. Kanser ve İmmünoterapi

Günümüz tıbbının en önemli sorunu olan kanser, invaziv özellikte kontrolsüz hücrelerin birikmesiyle oluşmaktadır. Dünyada ölüme sebep olan kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alan kanser, oluşturduğu sosyal ve ekonomik yük sebebiyle önemli bir toplum problemi olmuştur (15-17). Her yıl binlerce insan bu hastalıkla savaştığı, bilim adamlarının ön gördüğü en büyük sebepleri arasında ultraviyole ışınları, radyasyon, virüsler, alkol, sigara, hava kirliliği ve stres yer almaktadır (18).

Kanser tedavisinde kullanılmak üzere yıllardır birçok ilaç geliştirilmekte, ancak net bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Kanser hücrelerinin oluşması ve gelişim sürecinin kompleksliği bu durumu biraz daha zorlaştırmaktadır. Mortaliteyi azaltmak için birçok tanı ve tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Kanser tanısının planlanmasında kan sayımı, biyokimyasal incelemeler, endoskopi, röntgen incelemeleri, ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, magnetik rezonans görüntüleme, biyopsi gibi birçok teşhis yöntemi



kullanılmaktadır (17). Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi en temel tedavi yöntemleridir. Bunlar dışında kanserle tedavide güncel yaklaşımlar olarak kök hücre tedavisi, hormonal tedaviler, hücre bazlı tedaviler (aşılar) ve gen terapide son zamanların önemli araştırma alanlarına sahip olmuştur (19). Ancak bunların yanında insanın kendi bağışıklık sistemini ve savunma mekanizmalarını kullanarak kanserle savaşıma yöntemi olan immunoterapi, göstermiş olduğu minimal yan etkiler sayesinde son yılların en etkin tedavi yöntemleri arasına girmiştir (15). İmmun sistemden saklanan kanserli hücreyi ortaya çıkarmayı başaran immunoterapi, kemoterapiden farklı olarak tümörü değil bağışıklık sistemini hedef almaktadır. Bağışıklık sistemimiz hatalı hücreleri uzaklaştırmak için tasarlanmış bir sistemdir. Bu hatalı hücrelerin birleşmesiyle oluşan kanserin diğer ifade şekli olan tümörler kan ve lenf yoluyla diğer organlara yayılabilen ve organizmayı öldürebilen yapıdadırlar. Yayılma özelliği dışında, anjiyogenez (kan damarlarının oluşması), metastaz, kontakt inhibisyon, apoptozisi baskılama, reseptörlerden daha sık sinyal alma, kontrolsüz şekilde çoğalmayı sağlayan kendi sinyal sistemine sahip olma, telomerleri sabitleyerek sonsuz şekilde replike olma gibi temel özellikleri de bulunmaktadır (19). Kemoterapotik ilaçlarla karşılaştığında yolunu değiştiren kanser hücreleri, organizmanın diğer sağlıklı hücrelerine de zarar vermektedir. Ancak immün sistemi hedef alan immunoterapiler, bağışıklık sistemi üzerinde yapılan bazı değişiklikler sebebiyle, tümörün yeniden sistem tarafından görülebilir hale getirmektedir (20).

Kanser tedavisinde kullanılan immunoterapi ilaçları da, kemoterapotik ilaçlara göre daha az yan etkileri olmasına rağmen, erkek ve kadınlarda infertiliteye yol açmaktadır (21). İnfertilite toplumda hayati tehlikesi olan bir durum olmasa bile dünyada çiftlerin %13-18 i (yaklaşık 60-80 milyon çift) ırk ve etnik grup farkı olmaksızın bu durumdan maalesef etkilenmesine neden olmaktadır (22). Seminifer tüpçüklerde erkek üreme hücresinin oluşumu anlamına gelen spermatogonezin devamı, infertilite tedavisinde en büyük etkendir (23). Spermatogenez, seminifer tübüllerin epitelinde meydana gelmekte, mitoz, mayoz, spermiyogenez ve spermiyasyon olmak üzere 4 evrede gerçekleşmektedir. Morfolojilerine bakıldığında bu aşamalar farelerde 12 sıçanlarda ise 14 aşamada gerçekleşmektedir (24). Spermatogenezde meydana gelen bozukluklar, sperm kalite parametrelerindeki azalmalar ve cinsel işlev bozukluğu gibi olumsuz durumlar antikanser ilaçların üreme sisteminde meydana getirdiği yan etkiler arasında gösterilmektedir (25-28). Kanserli insan ve hayvanlarda yapılan çalışmalara bakıldığında hormon uygulamalarının, sperm ve testiküler doku kriyoprezervasyonunun, testiküler biyopsi aracılığıyla in vitro spermatogenezinin,

testis transplantasyonunun ve çeşitli antioksidan maddeleri ihtiva eden tamamlayıcı ve alternatif uygulamaların, kanser tedavisi kaynaklı meydana gelen erkek üreme sistemindeki yan etkilerinin azaltılması veya önlenmesinde etkili olduğu belirtilmektedir (25-27, 29-31).

### **2.3. Kanser İmmünoterapisinde Kullanılan Tedavi Yöntemleri**

Kanser immünoterapisinde kullanılan 5 adet tedavi yöntemi mevcuttur. Bunlar; monoklonal antikolar, adoptif immünoterapi, sitokinler ve aşılar şeklindedir (32).

#### **1) Monoklonal Antikolar**

İmmünoterapi tedavileri arasında en çok klinik çalışmaya sahip olan monoklonal antikolardır. Monoklonal antikolar ilk olarak Köhler and Milstein tarafından 1975 yılında antijenle immünize edilmiş farelerin B hücreleri ve myelom kanser hücrelerinin oluşturdukları hibridomalardan elde edilmiştir (33). Günümüzde ilaç olarak üretilen monoklonal antikolar; Trastuzumab, Cetuximab, Bevacizumab, Alemtuzumab, Rituximab olup hedef aldıkları başlıca kanserler, melanoma, meme kanseri ve kolon kanseridir. Bunlar vasküler endotelial büyüme faktörü VEGF, EGFR, HER2 gibi kanseri destekleyen büyüme faktörlerini veya CD52 ve CD20 gibi kanser hücrelerinde spesifik olarak üretilen antijenleri hedef almaktadır.

Setuksimab EGFR'yi hedef alan bir monoklonal antikordur. EGFR (epidermal büyüme faktörü) bir tirozin kinaz reseptörü olup, kanser hücre proliferasyonu, tümör büyümesi, anjiyojenez ve metastazda rol alır (34).

Trastuzumab, HER-2 ye bağlanan IgG1 izotipinde bir monoklonal antikordur. HER-2 de, EGFR gibi aynı ailenin bir tirozin kinaz reseptörüdür. Bu büyüme faktörü meme kanserlerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bu sebeple trastuzumab meme kanserlerinde efektif cevap vermektedir (35).

Bevacizumab VEGF'e bağlanan IgG1 izotipinde bir monoklonal antikol olup bu antikol VEGF'e bağlanarak anjiyojenezi inhibe eder (36). VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) anjiyojenez adı verilen yeni damar oluşumunda en önemli faktörlerdendir. Bevacimuzab metastatik kolorektal kanserli hastalarda kullanılmaktadır.

Rituksimab CD20 yi, alemtuzumab ise CD52 yi hedef alan monoklonal antikolardır. CD20 normal ve malign B hücrelerinde bulunan farklılaşma antijeni; CD52 ise tüm lenfositlerde bulunan bir farklılaşma antijenidir.1997'de onaylanan Rituximab kanser

terapisi için klinik onay alan ilk monoklonal antikordur (37, 38). Sonrasında CD20'yi hedef alan Ibritumomab, Tositumomab, Ofatumumab gibi başka monoklonal antikorlar da klinik onay almıştır (39).

## **2) Adoptif İmmunoterapi**

Adoptif immünoterapi, immünolojik olarak aktif hücrelerin, hastalığın tedavisi ve oluşumunun önlenmesi amacı ile hastaya verilmesidir (40). Bu amaçla T hücreleri kullanılmaktadır. Bunlar; TIL (tümör infiltratif lenfositler), kanser spesifik TCR (T hücresi reseptörü) ekspresyonu için düzenlenmiş T hücreleri ve kimerik antijen reseptörü (CAR) ekspresyonu için düzenlenmiş T hücrelerdir (41). Bu tedavi sonrası yüksek dozda hastaya interlökin (IL-2) gerektiği için hastada toksisite oluşturmaktadır. Ayrıca çok fazla işlem gerektirdiği için bu alandaki çalışmalar giderek artmaktadır.

## **3) Sitokinler**

İmmün sistem hücreleri tarafından üretilen kimyasallar olan sitokinler, bağışıklık sisteminin sahip olduğu hücrelerin ve kan hücrelerinin üretiminde etkin bir role sahiptir. Sitokinlerle tedavide de yan etkiler gözlenmektedir. Birçok çeşide sahip olan sitokinler arasında bu tedavi için yaygın olarak üç tanesi kullanılmaktadır (42). Bunlar;

a) interlökinler:IL-2, IL-7, IL-12, IL-21

b) interferonlar: IFN- $\alpha$

c)GM-CSF (granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör): Sargromostim şeklindedir.

## **4)Aşılar**

Kanser immünoterapisindeki yeni gelişmelerden biri, hastanın kendi tümör hücreleri ya da antijenleriyle aşılmasıdır. Bu aşılama yöntemi üç şekilde olabilir. Bunlar;

1) Aşılar adjuvanlarla birlikte verilen rekombinant protein formülasyonunda olabilir.

2) Hastanın kendisinden alınan dendritik hücrelerin tümör hücreleri veya antijenleriyle in vitro ortamda muamelesi sonucu hastaya verilmesi şeklinde olabilir. Bu yöntemin amacı dendritik hücrelerin tümöre karşı sitotoksik T lenfosit oluşumunu sağlamaktır.

3) Kanserli hücre antijenlerini kodlayan cDNA'ları içeren plazmidlerin hastaya verilmesi sonucu, hastanın kendi hücrelerinde ve antijen sunan hücrelerinde bu antijenleri

eksprese etmeye başlayarak bunlara karşı bir bağışıklığın ve T hücre cevabının oluşmasını sağlamaktır (10).

**Tablo 2.1.** Kanser tedavisinde kullanılan bazı temel monoklonal antikorlar (43)

| <b>Monoklonal Antikor</b> | <b>Hedef Antijen</b>                              | <b>Antikorum Tipi</b> | <b>Kullanıldığı Başlıca Kanseler</b>  |
|---------------------------|---|-----------------------|---|
| Rittuximab                | Cluster of Differentiation Antijen 20 (CD20)      | Kimerik, IgG1         | B hücre non-Hodgkin lenfoma   |
| Trastuzumab               | İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) | İnsan, IgG1           | Meme kanseri  |
| Alemtuzumab               | Cluster of Differentiation Antijen 52 (CD52)      | İnsan, IgG1           | B hücre lösemisi  |
| Cetuximab                 | EGFR  | Kimerik, IgG1         | Metastatik kolorektal kanser ve skuamöz hücre kanserleri                            |
| Bevacizumab               | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü                | İnsan, IgG1           | Metastatik kolorektal kanser, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve over kanseri |
| Panitumumab               | Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)         | İnsan, IgG2           | Metastatik kolorektal kanser  |
| Ofatumumab                | CD20  | İnsan, IgG1           | Kronik lenfositik lösemi (KLL)  |
| İpililumab                | Sitotoksik T lenfosit Antijen-4 (CTLA-4)          | İnsan, IgG1           | Metastatik melanoma, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan                         |

## 5) İmmün sistemi destekleyici tedaviler

Bu gruptaki tedavi yöntemleri kanserli hücrenin yok edilmesinden ziyade, vücudun bu hücrelerle olan mücadelesinde ona destek veren tedavileri içermektedir. Bu tedaviler;

- 1) Talidomit, lenalidomit ve pomalidomit gibi immün sistemi stimüle eden ilaçlar, BCG gibi mesane kanseri ve bazı melanomlarda kullanılan bakteriyel tedaviler, bazı cilt kanserlerinin tedavisinde topikal olarak kullanılan Imiquimod (44).
- 2) Mantarlardaki polisakkarit yapısında ilaçlar, (lentinan gibi beta glukanlar) (45).

## 2.4. Yeni Nesil İmmunoterapi İlaçları

Bağıışıklık sisteminin tümörle savaşıması mekanizmasına dayanan immunoterapilerde hedef sistem bağıışıklık sistemi olması sebebiyle birçok kanser tipinde başarılı olabilmektedir. Öncelikli alanı melanom kanseri olan bu ilaçların, akciğer kanseri, böbrek kanseri, mesane kanseri, beyin tümörleri, baş ve boyun kanserleri, kolon kanseri, mide kanseri ve hodgkin lenfomada başarı sağladığı kaydedilmiştir (46). Bu ilaçlarda iki çeşit mekanizma mevcuttur; CTLA-4 sistemi ve PD-1, PDL-1 sistemleridir (47). CTLA-4 (sitotoksik T lenfosit ilişkili protein), immun kontrol noktası olan bir protein reseptörüdür (48). Bu antijen, 1987 yılında Pierr Golstein ve ark. tarafından tanımlanmıştır (49). İmmunoglobulin süper ailesinin bir üyesi olan CTLA-4, T hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. Aktif T hücrelerinin yüzeyinde bulunan bu reseptör fren mekanizması görevi üstlenmektedir. Günümüzde kullanılan anti CTLA-4 ilacı ipilumab etken maddesini içerir (50, 51).

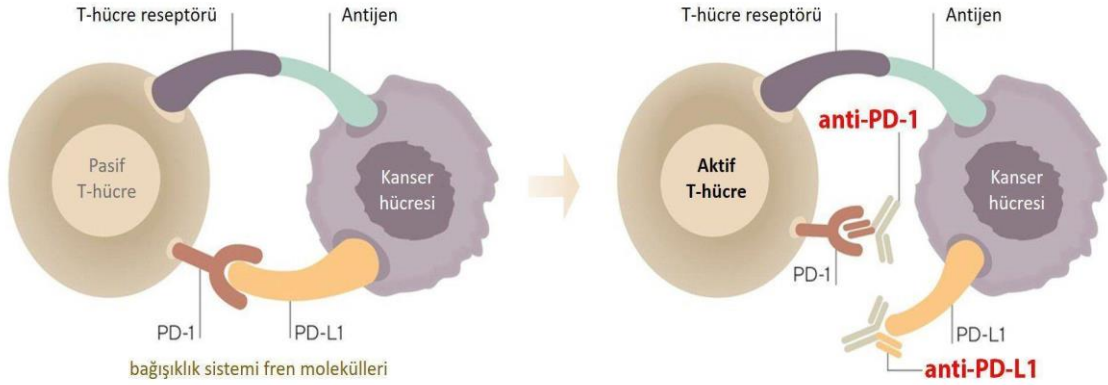
PD-1 aktif T hücrelerinin yüzeyinde bulunan immunoglobulin süper ailesinin bir üyesi olan membran reseptörüdür (52). PDL-1 ise, kanser hücreleri ve periferik dokuların yüzeyinde bulunan, immun sistemi baskılamada önemli rol oynayan bir transmembran proteindir (53). Yaygın kullanılan anti PD-1'e örnek ilaçlar; pembrolizumab ve nivolumab; anti PDL-1 e örnek ilaçlar ise; avelumab, atezolizumab ve durvalumab olarak bilinmektedir (54).

İmmunoterapide bağıışıklık sisteminin aşırı çalışması sonucu görülen bazı yan etkiler gözlenmektedir ancak kemoterapiye göre kıyasla daha az yan etkileri mevcuttur. Bu yan etkiler, bağıışıklık sisteminin kontrolsüz büyüyen hücrelere karşı savaş verirken sağlıklı kısımlara zarar vermesiyle oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar anti-CTLA-4 monoklonal antikolarla yapılan immunoterapilerin yan etkileri, anti-PD-1 ve anti PDL-1 immunoterapilerine göre daha yoğun olduğunu göstermiştir. Kombinasyon immunoterapilerinde, sinerjik etki görülmemekle birlikte, tek ajanla yapılan immunoterapilere göre çok daha sık yan etkiler gözlenmiştir (55-58). Bütün endokrin sistemle birlikte, kalp-damar sistemi, kemik iliği, böbrek, sinir sistemi ve akciğerleri etkileyen bu tedavi yönteminin en sık görülen yan etkileri ise ishal, cilt alerjileri, ağız yaraları, bulantı, kusma, yorgunluk, halsizlik, karaciğer hasarı, endokrinopati, tiroid fonksiyon bozuklukları, hormonal bozukluklar ve pnömotis (akciğer iltihabı) şeklindedir (59).

## 2.5. Pembrolizumab ve Etki Mekanizması

Programlanmış hücre ölümü proteini olarak bilinen PD-1 immun sistem hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir reseptördür (7). Pembrolizumab, PD-1 ve ligandları PDL-1 ve PDL-2 arasındaki etkileşimi engelleyen, monoklonal antikor olup etkin bir immunoterapi ilacıdır. Bağışıklık sisteminin en önemli hücresel komponentlerinden olan T hücreleri yüzeyindeki PD-1 reseptörleri aracılığı ile kanser hücresi yüzeyindeki PDL-1 reseptörlerine gelip bağlanır. Bu etkileşim kanser hücrelerinin immun sistem tarafından tehlikeli olarak tanınmasını engeller ve kanser hücresi immun sistem kontrolünden geçerken apoptoza uğramaz. Bu mekanizma, vücuttaki sağlıklı hücrelerin T hücreleri tarafından düşman olarak algılanmaması için bir koruma yöntemidir. Bu mekanizmanın inhibe edilmesi kanser hücrelerinin immun sistem tarafından yakalanması ve öldürülmesi için önemli bir terapötik hedefdir (9).

Kanser alanında immunoterapi ilaçlarının kullanım yaygınlığı gün geçtikçe artmaktadır. İmmun kontrol noktası düzenleyicisi olarak da bilinen pembrolizumab Avrupa komisyon kararıyla (FDA) 35 ten fazla ülkede onaylanmıştır. En etkin olduğu kanser türü malign melanomdur ancak bununla birlikte baş ve boyun kanseri, mide kanseri, karaciğer kanseri, over kanseri, kolon, rektum ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavilerinde de kullanılmaktadır (60, 61).



**anti-PD-1'a örnek ilaçlar:** Pembrolizumab ve Nivolumab    **anti-PD-L1'a örnek ilaçlar:** Atezolizumab, Durvalumab

**Şekil 2.2.** Yeni nesil immunoterapi ilaçlarının etki mekanizmaları (62)

## 2.6. Pembrolizumab Yan Etkileri

Pembrolizumabın en çok bilinen yan etkileri arasında ensefalopati, pnömoni, kolit, karaciğer ve böbrek problemleri, miyasteni gravis, troid, iltihaplı miyopati, aksonal nöropati,

kardiyak toksisite, cilt lezyonları, interstisyel nefrit, vitiligo ve hemolitik anemi, yorgunluk, kol bacak ağrıları, eller, ayaklar, ayak bileği ya da alt bacak şişmesi ve cilt renginde değişiklikler bulunmaktadır (63-66).

**Tablo 2.2.** Onaylanmış bazı immünoterapötik ilaçların yan etkileri (67-69)

| İlaç adı      | Yaygın Yan Etkileri  |
|---------------|--|
| İpilumab      | Yorgunluk, diyare, kaşıntı, isilik, kolit, hipertiroidi, böbrek yetmezliği, Pnömoni, karaciğer yetmezliği, pankreatit                |
| Nivolumab     | Kaşıntı, Yorgunluk, diyare, anemi, asteni, artralji, pnömoni, pankreatit, kas ağrısı, hiponatremi                                    |
| Pembrolizumab | Anemi, asteni, kolit, kaşıntı, pankreatit, hiponatremi, kas ağrısı, kalp kası iltihabı (miyokardit), kalp yetmezliği, trombositopeni |

## 2.7. Pembrolizumab ile Yapılmış Çalışmalar

Kanser hastalığı tedavisiyle yapılan son yıllardaki çalışmalar, daha çok bağışıklık sistemini güçlendirme odaklarına yöneliktir. Bu tip tedavilerde iki adet bağışıklık noktası hedef olarak seçilmiştir, bu hedef noktaları CTLA-4 (Sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4) ve PD-1 (programlanmış hücre ölüm proteini) dir (58). Bu tez çalışmasında kullanılan PD-1 seçici odaklı geliştirilen pembrolizumab daha çok malign melanom tedavisinde kullanılmış ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir (9). Pembrolizumab çok sayıda malignitede yoğun olarak araştırılan bir monoklonal anti-PD1 antikorudur (70). PD1'in bloke edilmesi, kanserler için önemli bir immünoterapötik stratejidir.

Yapılan bir çalışmada bir fare modelinde, Iwai ve ark. PD-1 eksikliği olan farelerin, tümör hücrelerinin büyümesini inhibe edebildiklerini gösterdi (71). Bu grup ayrıca, PD-L1'in tümör hücrelerinde ekspresyonunun, metastazlarla ilişkili olduğunu ve bu etkileşimin, klinik öncesi fare modellerinde genetik manipülasyon veya antikor tedavisi ile bloke edilmesinin, hayatta kalma oranının artmasına ve önemli antitümör yanıtına yol açtığını gösterdi (71-73). Bu çalışmaların in vitro kısmına bakıldığında ise; Wong ve ark. PD-1'in in vitro blokajının, antijene özgü sitotoksik T hücrelerinin çoğalmasını ve bu hücreler tarafından tip-1 ve tip-2 sitokin üretimini arttırdığını göstermiştir (74). Benzer şekilde, PD-L1 blokajı, tümör hücreleri ile birlikte T hücrelerinin bir kültüründe sitotoksik T hücrelerinin çoğalmasını

yumurtalık kanseri ve küçük hücreli akciğer kanserinde büyük ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (75, 76).

Geçtiğimiz yıllarda, tümör mikro çevresindeki birçok keşif, melanomun yönetiminde değişikliklere yol açmıştır ve özellikle ileri evrelerde olanlara yönelik umutlar artmaktadır. FDA, 2011-2014 yılları arasında yedi yeni ilacı onaylamıştır. İmmun sistemi stimule eden monoklonal antikolar olarak bilinen bu ilaçlar, vemurafenib, dabrafenib ve trametinib, ipilimumab (anti-CTLA-4), pembrolizumab (anti-PD-1) ve nivolumab (anti-PD-1), bağışıklık sistemini uyaran monoklonal antikolar; ve adjuvan tedavi olarak kullanılan anti-proliferatif bir sitokin olan peginterferon alfa-2b dir (77).

CTLA-4'ü hedefleyen immün kontrol noktası inhibitörleri ipilimumab'ın ve her ikisi de PD-1'i hedef alan nivolumab ve pembrolizumabın son klinik gelişimi ve onaylanması, kanser immünoterapisi alanında büyük bir heyecan ve umut uyandırmıştır (78).

Erkek üreme organları olarak testisler, androjen ve sperm üretme özelliğine sahiptir. Bu işlem, sırasıyla interstisyel alanda ve seminifer epitelde meydana gelir. Pembrolizumab ile ilgili yapılan bir çalışmada, PD-1 ve PD-L1 proteinlerinin farelerin testislerinde bulunduğunu ve ilk kez PD-1'in, seminifer tübüllerin germ hücrelerine sık sık lokalize olduğunu ve PD-1 boyamasının da interstisyel alanda da görüldüğü gösterilmiştir (79).

Son zamanlarda küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) ve ileri melanomun tedavisinde pembrolizumab ve nivolumab içeren klinik çalışmaların sonuçlarına göre ise pembrolizumabın, faz III klinik çalışmasında ileri melanomlu hastaların tedavisinde ipilimumab'dan daha üstün olduğu bulunmuştur (80).

İmmünoterapinin kanser tedavisi için yararlı olabileceği olasılığı, ilk olarak 1890'larda William B. Coley'in, Coley toksinleri olarak adlandırılan sitotoksik bakteriyel kültürlerin enjekte edilmesinin kanser hastalarında faydalı etkilere sahip olduğunu gösterdiğini ortaya koymuştur (81). Uzun yıllar immün sistem takibinin kanser tedavisi ve yayılmasının önlemedeki rolü çok tartışılmıştır (82); bununla birlikte, Schreiber ve meslektaşlarının immün yetmezliği olan konakçılarda interferon gama ve tümör immünojenitesini içeren iki çalışmasının, tümör immünolojisine olan ilginin yenilenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (83).

Yıllar boyunca, antikolar, sitokinler, terapötik aşılarda dahil olmak üzere, kanser immünoterapisini hedef alan bir dizi farklı yaklaşım denenmiştir. Ancak üretilen her bir



ilacın insan vücudundaki advers etkileri de kaçınılmazdır. Pembrolizumab ile tedavi edilen kanser hastalarında tiroid disfonksiyonu olduğu klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır (84). Bununla birlikte literatür incelendiğinde en çok görülen yan etkiler; kolit, hepatit, adrenokortikotropik hormon yetmezliği, hipotiroidi, tip 1 diyabet, akut böbrek hasarı, miyokardit yorgunluk, döküntü, bulantı, diyare, infüzyon reaksiyonu ve iştah azalmasıdır (85).

## **2.8. Aromataz Nedir?**

Östrojen sentataz olarak bilinen aromataz, mikrozomal enzim sisteminin bir üyesi olup, androjenlerin östrojenlere dönüştürülmesinden sorumlu bir sitokrom P450 enzimidir (86). Bu enzim testiste, leydig ve sertoli hücrelerinde bulunmakla birlikte aynı zamanda kadınların üreme sisteminde, beyin, karaciğer ve yağ dokusunda da bulunmaktadır (87). Aromatazın sebep olduğu artmış östrojen seviyesi, insan vücudunda özellikle meme kanserli hücreler için katalizör görevi görmektedir. Bu sebeple aromataz inhibitörleri kanserli hücrelerin büyümesini yavaşlatmak ve durdurmak adına kullanılmaktadır. Meme kanseri kullanımı dışında diğer malign tümörlerde büyük bir etki göstermediği, ovaryum ve endometriyum kanserlerinde düşük etkili olduğu bilinmektedir (88).

Aromataz inhibitörleri dişilerde ovulasyonu indükleyerek ve endometriyumun tam gelişmesini sağlayarak infertilite tedavisinde kullanılmaktadır. Erkeklerde ise LH ve testosteron seviyesinin yükselmesini sağlamak ve bu durum özellikle testis fonksiyonları azalmış infertil erkeklerde etkin önem arz etmektedir (89). Yapılan çalışmalar aromataz inhibitörlerinin infertilite dışında kemik gelişimini artırdığını da göstermiştir (90).

## **2.9. Aromataz Enzim İnhibitörleri**

Aromataz inhibitörleri steroid ve nonsteroid veya birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılmaktadır. Anastrozol, steroid olmayan üçüncü nesil enzim inhibitörüdür, enzim heme demir ile bağlanarak enzim aktivitesini inhibe etmektedir (91).

Aromataz inhibitörleri infertilite tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu inhibitörler ile enzim bloke edildiğinde testosteron seviyesinde artış ve daha fazla gonadotropin salınımı elde edilmektedir. Düşük testosteron ve yüksek estradiol seviyesi beraberliği spermatogenezi olumsuz yönde etkilediği için, aromataz inhibitörleri erkek infertilitesinde etkin rol oynamaktadır (92). Öte yandan, tipik bir adjuvan endokrin tedavisi olarak düşünülen aromataz enzim inhibitörleri östrojen sentezinin son basamağını katalize eder ve

öncelikle yağ dokusu , kas, cilt ve meme dokusunda bulunur . Bu işlem, aromataz enzim aktivitesinin baskılanması ve dolaşımdaki östrojen seviyelerinin neredeyse saptanamayan seviyelere düşürülmesiyle gerçekleşir (93). Anastrozol (Arimidex), menopoz sonrası kadınlarda tamoksifenin aktivitesini arttırmak veya yerine meme kanseri tekrarını önlemek için tamamen uygun bir aday olarak kabul edilir .Tamoksifen ile yapılan bir çalışmada, anastrozol % 4.8'lik iyi bir sağkalım avantajı sağlamıştır (94).

**Tablo 2.3.** Aromataz enzim inhibitörlerinin sınıflandırılması (95)

| Kuşak   | Non-steroidal          | Steroidal            |
|---------|------------------------|----------------------|
| Birinci | Aminoglutethimid       |                      |
| İkinci  | Roglethimide, Fadrozol | Formestan            |
| Üçüncü  | Anastrozol, Vorozol    | Letrozol, Eksemestan |

Birinci ve ikinci kuşak enzim inhibitörleri etkinlik ve spesifiklikleri az olması sebebiyle klinikte kullanılmamaktadır. Aromotaz inhibitörleri üzerinde yapılan uzun soluklu çalışmalar neticesinde, seçici olarak kullanılanlar anastrozol ve letrozoldür. Enzime geniş dönüşümlü olarak bağlanan bu inhibitörlerin etkileri diğer inhibitörlerle karşılaştırıldığında oldukça iyidir. 1 ile 5 mg doz aralığında östrojenin %99' unu inhibe etmektedirler. Yarılanma ömürleri 45 saat olan aromataz inhibitörleri oral alımı akabinde vücutta tamamen emilir ve sistemik dolaşımdan karaciğer yolu ile temizlenir (95).

### 2.10. Anastrozol ve Farmakolojik Özellikleri

Aromataz inhibitörlerinden olan anastrozol (2,2'- [5-(1H-1,2,4-triazol-1 il-metil)-1,3-fenilen]-bis (2 metilpropionitril) östrojen sentezini inhibe ederek vücuttaki karsinojenik etkiyi önlemektedir (96, 97,98). Selektif bir benzotriazol türevi olan anastrozol güçlü ve seçiciliği yüksek non-steroidal bir aromataz inhibitörüdür. Aromataz inhibitörleri testosteronun estradiol ve androestedionun estrodiona dönüşümünü bloke eder (96-99). Gerçekleşen bu bloke sayesinde estradiolü düşürür. Bunu yaparken, hipotalamusta ve hipofizdeki negatif geri besleme sinyalleri azalır, GnRH ve LH üretimi artar ve testosteron üretimi artar (100). Dolayısıyla, bir aromataz inhibitörü, hipogonadal erkeklerde testosteronun yerini almak için daha güvenli ve daha uygun bir yol olabilir.

Daha önce meme kanseri tedavisinde kullanılan, ağız yoluyla uygulanan güçlü bir aromataz inhibitörü olan anastrozolün, testosteron üretimini arttırdığını ve düşük testosteron düzeyi düşük olan yaşlı erkeklerde serum testosteronunu normalleştirdiğini göstermiştir (101).

Anastrozol 1995 yılında patentlenmiş ve 1997 yılında ise tıbbi kullanım için onay almıştır (102).

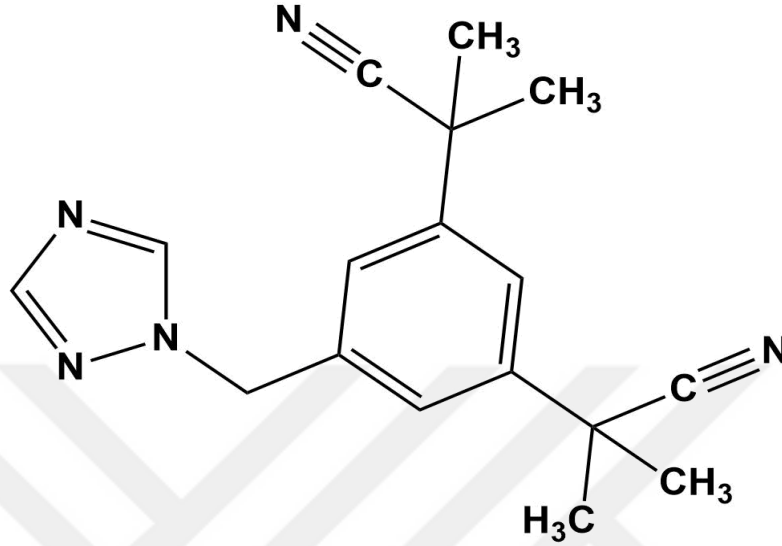
Anastrozol progestojenik ve androjenik aktiviteye sahip değildir. Absorpsiyonu hızlı olup yavaş elimine edilen bir ilaçtır. Anastrozol'un sadece %40'ı plazma proteinlerine bağlanmakta olup plazma konsantrasyonu doz uygulamasından sonra iki saat içinde oluşur. Biyotransformasyonuna bakıldığında mekanizması N-dealkilasyon, hidroksilasyon ve glukuronidasyon şeklinde gerçekleşmektedir. Anastrozol, ağırlıklı olarak CYP3A yoluyla metabolize edilir ve ayrıca, anastrozolün oral emilimini sınırlayabilen bir akış taşıyıcı olan bir *P-gp* substratıdır (103).

Post menopozal dönemdeki meme kanserli kadınlarda adjuvan tedavisinde kullanılması amacıyla onaylanan anastrozol göğüs kanseri tedavisinde özellikle lokal olarak ileri veya metastatik meme kanserini tedavi etmek için ilk basamak tedavi olarak kullanılmaktadır (104).

Anastrozolün oldukça az ve kontrol edilebilir yan etkileri bulunmaktadır. Literatürdeki infertilite çalışmalarına bakıldığında, 2012 yılında Gregoriu ve ark. infertil erkekler için aromataz inhibitörlerinin kullanılmasının hormonal ve semen parametrelerini iyileştirdiği yönünde sonuçlar elde etmiştir (105). Benzer şekilde Turner ve ark. anastrozolün erkek sıçanlarda testiküler fonksiyon üzerine etkilerine bakmışlar ve uygulamanın ardından testis ağırlığında ve plazma FSH konsantrasyonlarında anlamlı bir artış gözlemlemişlerdir (106). Yine aynı çalışmanın histolojik değerlendirmesi spermatogenezin oldukça normal olduğunu göstermiştir. Anastrozole muadili olan letrozol adlı ilaçla 2017 yapılan bir çalışmada ise, letrozolün gonadotropin salınımını sağlayarak testosteron seviyesini önemli ölçüde arttırdığı belirtilmiştir (107). Bu bağlamda anastrozolün testis metabolizmasındaki etkilerini testosteron seviyesini artırarak ve hormonal parametreler üzerinden etki mekanizmasını gerçekleştirdiğini görmekteyiz.

Anastrozolün kemik metabolizması üzerindeki etkilerine bakıldığında, erkek iskelet sağlığında hem testosteron hem de estradiolün önemi göz önüne alınırsa anastrozol tedavisinin kemik sağlığını iyileştirmesi (testosteronu artırarak) veya kemik sağlığını

kötüleştirmesi (estradiölü düşürerek) de mümkündür. Spesifik olarak, erkekleri seçici olarak östrojen eksikliği, seçici olarak androjen eksikliği veya her iki hormonda da eksik kılan çalışmalar, hem testosteronun hem östrojenin normal kemik dönüşümünü sağlamada bağımsız rollere sahip olduğunu göstermiştir (108-111).



Şekil 2.3. Anastrozol molekül yapısı (112)

Tablo 2.4. Anastrozol fiziksel ve kimyasal özellikleri (112)

| Fiziksel ve Kimyasal Özellikler | Bilgi  |
|---------------------------------|--|
| Molekül kapalı formülü          | C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub>   |
| Molekül ağırlığı                | 293,374 g/mol  |
| Sudaki çözünürlük               | 0.5 mg/mL  |
| Absorpsiyon                     | Oral uygulamadan sonra hızla sistemik dolaşıma girer. Tepe plazma konsantrasyonları genellikle aç kalma koşullarında 2 saat içerisinde, sabit durumdaki plazma konsantrasyonları yaklaşık 7 günde elde edilir. |
| Eliminasyon                     | Hepatik metabolizma, anastrozolün eliminasyonunun yaklaşık %85'ini oluşturur. Renal eliminasyon toplam atılımın yaklaşık %10'unu oluşturur   |

## 2.11. Anastrozolün Yan Etkileri

Anastrozolün en bilinen sık yan etkileri, gastrointestinal yakınmalar, zayıflık ve yorgunluktur. Bunun dışında olası diğer yan etkileri asteni, sıcak basması, saçlarda incelme, bel ağrısı, döküntü, baş ağrısı, sersemleme, yüksek tansiyon, eklem ağrısı ve depresyon olarak bilinmektedir. Bunun dışında aromataz inhibitörlerinin en rahatsız edici yan etkileri, kemik yoğunluğu kaybında osteoporoz riski ve kemik devri belirteçlerinde miyalji ve artraljilerde, daha erken bir artış riski bulunan kemik demineralizasyonudur (113, 114).

## 2.12. Doğal Aromataz İnhibitörü Resveratrol

İlk kez Japonya'da 1940 yılında *Veratum grandiflorum* (çöplene bitkisi) reçinelerinden keşfedilen resveratrol, şarap, üzüm suyu, yaban mersini, koyu renkli çikolatalar, şam fıstığı, böğürtlen, İsveç çamı ve yer fıstığında bolca bulunmaktadır (115). Dışarıdan alınan eksojen kaynaklı, antioksidan polifenol olan resveratrol en çok siyah üzümün kabuğunda bulunmakla birlikte, serbest radikallere karşı mücadele eden sistemleri harekete geçirerek vücudu korur. Resveratrolün, göğüs, prostat, mide, kolon, pankreas ve tiroid kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği bilinmektedir (116, 117). Japon ve Çin halkı tıbbında laksatif, damar sertliği ve kalp ritm bozukluklarında kullanıldığı tespit edilmiştir. Son zamanlarda resveratrolün en önemli kaynağı *Polygonum cuspidatum* (japon madımağı) adlı yabani bitkidir, bu bitki Japonya ve Çin'de ilaç olarak kullanılmaktadır. *Polygonum cuspidatum* bitki kökünün kurutulup toz haline getirilerek ilaç formu oluşturulmuştur ve ismi *kojo-kon* olarak bilinmektedir (118).

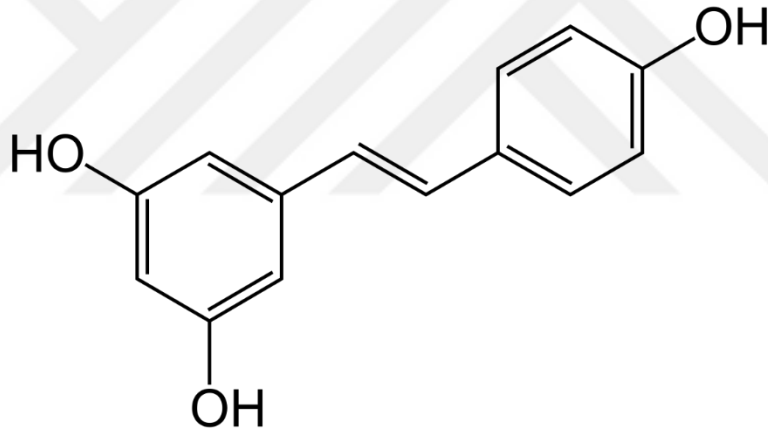
Resveratrolün insan sağlığı üzerine yapılan çalışmalarına bakıldığında, en çok kalp hastalıkları ve kanser üzerine olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, antiinflamatuvar, antikanser, yaşam uzatıcı etki, antioksidan aktivite, kolesterol inhibe edici, hafıza kuvvetlendirici, trombosit aggregasyonunu engellediği ve nörolojik hastalıklardan olan Alzheimer hastalığına iyi geldiği tespit edilmiştir (119-121). Resveratrol, sağlıklı kişiler tarafından alındığında, biyoyararlanımı düşük olması sebebiyle kalp, karaciğer ve böbrek gibi organlarda birikebilmektedir (122, 123). Bununla birlikte resveratrolün biyotransformasyonu karaciğer mikrozomlarında glukuronidasyon ile gerçekleşmekte olup, atılımı büyük oranda idrar yolu ile olmaktadır (124-126).

**Tablo 2.5.** Bazı gıdalardaki resveratrol içerikleri (127)

| Gıda Maddesi            | Miktar (g) | Toplam (mg/g) | Resveratrol |
|-------------------------|------------|---------------|-------------|
| Yer fıstığı (taze)      | 146        | 0.01-0.26     |             |
| Yer fıstığı kaynatılmış | 180        | 0.32-1.28     |             |
| Yer fıstığı yağı        | 258        | 0.04-0.13     |             |
| Kırmızı üzüm            | 160        | 0.24-1.25     |             |

### 2.13. Resveratrol Kimyasal Yapısı ve Türevleri

Resveratrol cis ve trans izomeri şekillerinde bulunmakta olup, yağ, DMSO (di-metil sülfoksit) ve alkolde çözünen bir bileşiktir ve doğada en çok trans konfigürasyonunda bulunmaktadır (128). Resveratrolün açık kimyasal yapısı şekil 2.4 'de verilmiştir.

**Şekil 2.4.** Resveratrol açık kimyasal formülü (129)**Tablo 2.6.** Resveratrolün fiziksel ve kimyasal özellikleri (130)

| Fiziksel ve Kimyasal Özellikler | Bilgi  |
|---------------------------------|--|
| Fiziksel durumu                 | Katı, toz                                      |
| Renk                            | Hafif grimsi beyaz                             |
| Kaynama noktası (°C)            | 253-255  |
| Suda Çözünürlük (mol/L)         | <0.01  |
| Molekül ağırlığı                | 228 g/mol                                      |
| Molekül Kapalı formülü          | C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> |

Resveratrol doğada cis ve trans formunda bulunmakta ancak doğada en çok trans formuna sık rastlanmaktadır. Oral yolla alındıktan yaklaşık yarım saat sonra metabolize olan resveratrol, karaciğer ve oniki parmak bağırsaklarında konjugasyon ile glukuronid ve sülfat metabolitlerine dönüşmektedir. Toksikite çalışmalarına bakıldığında resveratrolün LD50 (%50 letal doz) günlük 2 gr da yüksek olduğunu göstermiştir (128).

#### **2.14. Resveratrolün Biyosentezi ve Mekanizması**

Resveratrolün antioksidan, kalp damar hastalıkları ve kanser üzerindeki antineoplastik etkileri ile ilgili pek çok kaynak mevcuttur. Fitoaleksinin yapısında olan resveratrol bitkilerde sentezlenen antimikrobiyal bir ajandır ve stilben sentaz enzimi tarafından sentezlenmektedir (131). İnsanlarda emilimi çok hızlı ve transepitelyel difüzyonla gerçekleşmektedir. Dağılımına bakıldığında ise %50 oranında plazma proteinlerine bağlı olarak gerçekleştiği bilinmektedir (132). Atılımı sağlayan organ böbrek dokusudur (133).

#### **2.15. Resveratrolün Kardiyovasküler, Antikanser ve Antioksidan Etkileri**

Resveratrolün hızlı metabolizmasını yavaşlatıp terapötik etkinliğini arttırmak amacıyla lipozomlar, polimerik nanopartiküller, mikrosferler, siklodekstrinler gibi çeşitli ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmiştir (134). Bu sistemler sayesinde oldukça geniş bir tedavi çeşitliliği gösteren resveratrolün birçok etkisi insan sağlığı için önem arz etmektedir.

1992 yılında şarabın içinde bulun resveratrolün, kalp hastalıklarını %40 oranında azalttığı gösterilmiştir (135). Özellikle LDL (düşük yoğunluklu protein) düşmesine vesile olmaktadır. LDL kalp hastalıklarının en büyük belirteci olup, atardamar duvarlarına yerleşerek damar sertleşmesine sebep olmaktadır. Buna benzer birçok çalışmada ise resveratrolün platelet toplanmasını ve kolesterol oksidasyonunu elimine ederek, etkin bir serbest radikal süpürücü olduğu gösterilmiştir (136).

Athar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada resveratrolün, prostat, göğüs, akciğer, ovaryum, tiroid kolon, deri ve pankreas kanserlerine karşı; başka bir çalışmada ise lösemi ve lenfomaya karşı antiproliferatif olduğu gösterilmiştir (129, 131). Hücre proliferasyonu, transformasyonu ve tümör gelişiminde önemli rolü olan NFkB (nükleer faktör kapp B)'nin aktivasyonunu azaltan ve TNF $\alpha$  üretimini azaltarak da antikanser etki gösterdiğine dair çalışmalar mevcuttur (137, 138).

Resveratrolün antikanser etkilerini ilk olarak 1997 de Meishiang Jang ve arkadaşları bulmuştur (139). Daha sonra yapılan çalışmalarda meme kanserli hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiştir (140).

Resveratrol tümörün yayılmasını engeller ve bu inhibitör aktivitesini de COX-2 enzim aktivitesini inhibe ederek gerçekleştirir (141).

Çeşitli çalışmalar resveratrolün pıhtılaşmayı da engellediğini ortaya çıkarmıştır. Resveratrolün bu antikoagülan etkisini hücre içi kalsiyum girişini engelleyerek pH birikimini önleyerek yaptığı bilinmektedir. Çünkü kalsiyum konsantrasyonunun hücre içinde artması pH birikimine yol açmakta ve lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır (142).

Adams ve ark. yaptıkları bir çalışmada resveratrolün, LDL oksidasyonunu, antioksidan özelliği sayesinde elimine ederek aterosklerotik hastalıklara karşı koruyucu etkinlik taşıdığını gözlemlemiştir (124).

Literatürdeki yapılan çalışmalara bakıldığında resveratrolün iyi bir antioksidan ve antikanser olduğu bilinmektedir (143). Sahip olduğu antioksidan özelliği sayesinde kanseri değişik evrelerinde durdurduğu, bununla birlikte lipid peroksidasyonu ile iyi bir radikal süpürücü ve oksidatif stresi elimine edici özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (144). Resveratrolün MDA düzeylerini azalttığı, GSH ve SOD düzeylerini de artırdığı bilimsel çalışmalar literatürde mevcuttur (145-148). Benzer şekilde yapılan başka bir çalışmada resveratrolün detoksifikasyon mekanizmalarını düzenleyerek, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon S transferaz enzimlerinin aktivitelerini artırdığı ve oksidatif hasarı azalttığı bildirilmiştir (147).



### 3. MATERYAL VE METOT

Çalışmada en az 250 gr ağırlığında, 3-4 aylık 42 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Kullanılan deney hayvanları, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları araştırma ve üretim merkezinden (İNÜTFDEHÜM) temin edildi. Çalışmaya alınan sıçanlar standart şartlarda (sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere 4'erli gruplar halinde özel kafeslerde bekletildi. Sıçanlara taze su ve yem ad libitum olarak verildi. Deney hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar sırasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınarak (protokol no:2018/A-08); çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı. Deney süresi 1 ay (30 gün) olarak belirlendi. Sıçanların 1 ay boyunca haftada bir canlı ağırlık tartımları yapılarak çalışma sonunda canlı ağırlık ortalamaları değerlendirildi. Sıçanların gruplandırılması sırasıyla aşağıdaki gibidir:

1. Grup: Kontrol grubu (7 adet)
2. Grup: Pembrolizumab (PEMB) grubu (7 adet)
3. Grup: Pembrolizumab (PEMB) + Anastrozol (ANAST) grubu (7 adet)
4. Grup: Pembrolizumab (PEMB) + Resveratrol (RES) grubu (7 adet)
5. Grup: Anastrozol Grubu (ANAST) (7 adet)
6. Grup: Resveratrol Grubu (RES) (7 adet)

Kontrol grubundaki sıçanlara; 30 gün boyunca Anastrozol ve Resveratrol (R5010-038K5202; Sigma) çözücüsü olarak kullanılan CMC (karboksi metil selüloz) uygulandı.

PEMB grubundaki sıçanlara; serum fizyolojik (SF) içerisinde çözülerek hafta bir defa 5 mg/kg/gün olacak şekilde intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı (149).

Pembrolizumab ile birlikte anastrozol uygulanan grupta (PEMB+ANAST); sıçanlara 30 gün boyunca haftada bir defa 5 mg/kg/gün/i.p. PEMB ve 0.2 mg/kg/gün olacak şekilde ANAST gavaj yolu ile uygulandı (150).

Pembrolizumab ile resveratrol tedavisi yapılan grupta (PEMB+RES); sıçanlara 30 gün boyunca haftada bir defa 5 mg/kg/gün/i.p. PEMB ve 20 mg/kg/gün olacak şekilde RES gavaj yolu ile uygulandı (151).

ANAST grubunda; %0,01 CMC içerisinde anastrozol çözülerek 30 gün boyunca her gün 0,2 mg/kg/gün uygulandı.

RES grubunda; %0,01 CMC içinde çözülerek resveratrol, 30 gün boyunca her gün 20 mg/kg/gün olacak şekilde gavaj yolu ile uygulandı.

Çalışmanın sonunda ketamin/ksilazin anestezisi altında sıçanlardan testis doku örnekleri histolojik, biyokimyasal, spermatolojik analizler için alındı. Histolojik olarak ışık mikroskopik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi, immunohistokimyasal değerlendirme için ise Kaspaz-3 boyama yöntemleri kullanıldı. Biyokimyasal değerlendirmeler için ise TBARS ve antioksidan enzimlerin seviyeleri (GSH, CAT, SOD, GSH-Px) ölçüldü. Ayrıca spermatolojik olarak; sperm hareketliliği, anormal sperm oranı (baş, kuyruk, total) ve epididimal sperm konsantrasyonu incelendi. Testosteron ve PD-1 düzeyleri Elisa yöntemiyle ölçüldü.

**Tablo 3.1.** Sıçanlara verilen Yem % Bileşimi (İNÜTFDEHÜM)

| YEM BİLESİMİ                   | ORAN (%)     |
|--------------------------------|--------------|
| Su (en çok)                    | 12           |
| Ham protein (en az)            | 24           |
| Ham selüloz (en çok)           | 7            |
| Ham kül (en çok)               | 8            |
| HCl'de çözünmeyen kül (en çok) | 2            |
| NaCl (en çok)                  | 1            |
| Mineral Karması *              | 1.25         |
| Vitamin Karması **             | 1.25         |
| Metabolik enerji               | 2650 kcal/kg |

\* Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0-2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (%0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

\*\* Vitamin Karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vit. D3 (1000 IU/kg), Vit. E (60 mg/kg), Vit. B2 (4 mg/kg).



**Şekil 3.1.** Çalışmada kullanılan sıçanlar (İNUTFDEHÜM)



**Şekil 3.2.** Sıçanlara gavaj yolu ile ilaç uygulaması (İNUTFDEHÜM)

### **3.1. Sıçan Tartım Yöntemi**

İnönü Üniversitesi deney hayvanları üretim ve araştırma merkezinde, TEM (seri no:562327-35K) marka tartı aleti kullanılarak, sıçanların 1 ay boyunca haftada bir canlı ağırlık tartımları yapıldı. Çalışma sonunda canlı ağırlık ortalamaları değerlendirildi.

### **3.2. Biyokimyasal Yöntemler**

#### **3.2.1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması**

Çalışmamızın 30. gününde sıçanlar ketamin-ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilerek alınan testis doku örnekleri, malondialdehit MDA, SOD, CAT, GSH-Px, GSH ve protein deney prosedürleri uygulanıncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

#### **3.2.2. Homojenatların Hazırlanması**

Derin dondurucudan alınan dokular tartıldıktan sonra cam tüplere alındı. Üzerine 1/10 (a/h) oranında dilüe edilerek %1,15'lik potasyum klorür ilave edilip, soğukluk muhafaza edilecek şekilde homojenizatörde 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika kadar homojenizasyonu sağlandı. Hazırlanmış olan homojenatlarda doku MDA ve CAT ölçümleri yapıldıktan sonra geriye kalan homojenatlar  $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 45 dakika 3500 rpm' de süpernetant elde etmek için santrifüj edildi. Alınan süpernatantlarda protein, GSH, GSH-Px ve SOD enzim aktiviteleri ölçüldü.

#### **3.2.3. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçümü**

Doku MDA düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Ohkawa ve ark. (152) tarafından önerilen metoda göre yapıldı. MDA tayini; aerobik şartlar altında ve pH:3,5'te, doku homojenatının TCA ile çöktürülüp, kaynayan su banyosu içerisinde bir saat inkubasyonu sağlandıktan sonra, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA (tiyobarbitürik asit) ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü yöntemidir.

Çalışma yöntemi:

Numunelerin deney tüplerinde hazırlanması:

| MDA                   | Numune (mL) | Kör (mL) |
|-----------------------|-------------|----------|
| %10 luk TCA çözeltisi | 2,5         | 2,5      |
| Homojenat             | 0,5         | -        |
| Standart              | -           | -        |
| Distile su            | -           | 0,5      |

Hazırlanan tüpler su banyosunda 15 dakika inkübasyondan sonra soğutularak santrifüj edildi. Elde edilen süpernetantlara 1 ml TBA eklenerek 95 °C de 50 dk son inkübasyon işlemi uygulandı ve 532 nm de spektrofotometrede okundu.

### 3.2.4. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

Dokudaki SOD enzim aktivitesi Sun ve ark. (153) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı. SOD tayini; ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilmiş olan süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Açığa çıkan süperoksit radikallerinin NBT'yi indirgemesi ile renkli formazan ürünü spektrofotometrik olarak ölçülür ve 560 nm'de maksimum düzeyde absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamlarda indirgenme meydana gelerek mavimsi renk oluşur. Ortamda SOD varken indirgenme olmayıp mavi-mor renk oluşmaz ve enzim aktivite göstermesinden dolayı daha açık bir renk ortaya çıkar.

Çalışma yöntemi:

Numunelerin deney tüplerinde hazırlanması

| SOD  | Kör (mL) | Numune (mL) |
|--|----------|-------------|
| Assay reaktifi (Ksantin, Na <sub>2</sub> EDTA, NBT, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , BSA) | 2,850    | 2,850       |
| Süpernatant  | -        | 0,100       |
| Distile su   | 0,100    | -           |
| XO (Ksantin oksidaz,167 U/L)   | 0,050    | 0,050       |

Hazırlanan deney tüpleri vorteksledi, 20 dk oda şartlarında inkübe edildikten sonra ortamdaki reaksiyon  $\text{CuCl}_2$  ile durdurularak 560 nm de okundu.

### 3.2.5. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü

Glutasyon peroksidaz, redükte glutasyonu kullanarak  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin suya dönüşümünü sağlayan bir enzimdir. Dokulardaki GSH-Px aktivitelerinin tayini Beutler (154) yöntemiyle yapıldı. GSH-Px tayini;  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında GSH'yi okside glutasyon GSSG (glutasyon disülfid)'a dönüşmesini katalize eder.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat) yardımıyla tekrar GSH'a dönüştürülür. GSH-Px aktivitesi, deney ortamındaki NADPH'nin  $\text{NADP}^+$ 'ya çevrilmesi ile optik yoğunlukta meydana gelen absorbans farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesidir.

Çalışma Yöntemi:

Numunelerin deney tüplerinde hazırlanması:

| GSH-Px                       | Numune (mL) | Kör (mL) |
|------------------------------|-------------|----------|
| Fosfat tamponu               | 2,65        | 2,65     |
| Redükte GSH                  | 0,10        | 0,10     |
| NADPH                        | 0,10        | 0,10     |
| GSH redüktaz                 | 0,01        | 0,01     |
| $\text{NaN}_3$ (sodyum azid) | 0,01        | 0,01     |
| Distile su                   | -           | 0,02     |
| Süpernatant                  | 0,02        | -        |

Hazırlanan tüpler 30 dk oda sıcaklığında inkübasyondan sonra, 0.10 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenerek 340 nm de 2 dk boyunca 15 saniye aralıklarla okundu.

### 3.2.6. Doku Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz, katalitik aktivitesiyle  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi ayrıştırarak su ve oksijene dönüştürür. Dokulardaki CAT enzim aktivitelerinin tayini Aebi (155) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı. CAT tayininde hidrojen peroksit, 240 nm dalga boyundaki maksimum absorbans gösterir. Deney ortamına ilave edilen  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin CAT enzimi tarafından parçalanarak, ultraviyole spektrumda bir absorbans azalmasıyla takip edilir. Absorbansta görülen bu azalma enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

### Çalışma Yöntemi

Numunelerin deney tüplerinde hazırlanması:

| CAT                                     | Kör (mL)  | Numune (mL) |
|---|-----------|-------------|
| Fosfat Tamponu                          | 2,99      | -           |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> çözeltisi | 0,01      | 2,99        |
| Sonifikasyon<br>homojenat               | edilmiş - | 0,01        |

Tüpe homojenat eklendikten hemen sonra küvet kapağı kapatılarak, 240 nm de 5 dk boyunca 30 sn aralıklarla absorban azalması kaydedildi.

### 3.2.7. Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü

Dokulardaki GSH aktiviteleri Ellman (156) tarafından ditiyonitrobenzoik asit geri çevirim metodu olarak tanımlanan yöntemle göre tayin edildi. GSH tayini; DTNB (5,5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoik asit], sülfidril bileşikleri tarafından redükte edilip bir disülfit bileşiği olan sarı renkteki kompleksi oluşturur. Bu sarı renkli bileşik optik dansitesi 412 nm dalga boyunda ölçülüp GSH aktivitesi saptanır.

Çalışma Yöntemi:

Numunelerin deney tüplerinde hazırlanması:

| GSH                                      | Kör (mL) | Numune (mL) |
|--|----------|-------------|
| Tris-EDTA tamponu                        | 2        | 2           |
| Süpernatant (%10 TCA ile<br>çöktürülmüş) | -        | 0,5         |
| Distile su                               | 0,5      | -           |

Hazırlanan tüpler spektrofotometre okutmasından önce, 0.1 ml DTNB ilave edilerek karıştırıldı, 5 dk inkübasyondan sonra 412 nm de okutuldu.

### 3.2.8. Doku Protein Ölçümü

Homojenat ve süpernatant kısımlardaki protein miktarı tayinleri Lowry ve ark. (157) tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçüldü.

Alkali bakır ayırıcındaki  $Cu^{++}$  peptid bağları ile kompleks oluşturup her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlar. Folin-Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilen karışıma ilave edilince mor-mavi bir renk oluşur ve bu renk 700 nm’de spektrofotometrede okundu.

Çalışma Yöntemi:

A reaktifi:  $CuSO_4$  ve Sodyum sitrat içerir

B reaktifi:  $Na_2CO_3$  ve NaOH içerir

C reaktifi: 50 (B) reaktifi / 1 (A) reaktifi oranıyla hazırlanır

Numelerin deney tüplerinde hazırlanması:

| Protein  | Kör (mL) | Numune (mL) |
|--|----------|-------------|
| C reaktifi   | 2,5      | 2,5         |
| Süpernatant  | -        | 0,010       |
| Standart   | -        | -           |
| Distile su   | 0,5      | 0,5         |
| Tüpler vortekslenir, 25 °C de 10 dk bekletilir ve hemen: |          |             |
| D reaktifi (Folin-cicolteu)                              | 0,250    | 0,250       |

Hazırlanan tüpler, vortekslendi, 25 °C de ve karanlıkta 30 dk bekletildikten sonra 700 nm de okundu.

### 3.3. Biyokimyasal Analizler İçin İstatiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler için, “SPSS for Windows 12.0” programı kullanıldı. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanıldı. Farklılık bulunan gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar Post-hoc Duncan testi ile yapıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edilerek,  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



**Tablo 3.2.** Biyokimyasal yöntemlerde kullanılan kimyasal maddeler

|   |                         |
|---|-------------------------|
| Amonyum sülfat                                    | Merck 1216              |
| Bakır-2-klorür                                    | Merck 2733              |
| Bakır-2-sülfat                                    | Merck 1.02787           |
| Disodyum etilendiamintetraasetik asit dihidrat    | Sigma E5134             |
| Disodyum hidrojen fosfat-2-hidrat                 | Merck 6580              |
| 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit                | AppliChem 69-78-3       |
| Etanol  | Riedel 32221            |
| Folin&ciocalteus-phenol Reaktifi                  | Sigma F9252             |
| Glutasyon peroksidaz                              | Sigma G6137             |
| Glutasyon redüktaz                                | Sigma G3664             |
| Hidrojen peroksit (%35)                           | Merck 1.08600           |
| Hidroklorik asit (%37)                            | Merck 1. 00314          |
| İndirgenmiş glutasyon                             | Sigma G4251             |
| İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat | Sigma N1630             |
| Ksantin   | Sigma X7375             |
| Ksantin oksidaz                                   | Sigma X4376             |
| Kloroform   | Merck 2431              |
| Nitroblue tetrazolyum klorür                      | Sigma N6639             |
| Potasyum dihidrojen fosfat                        | Merck 4873              |
| Potasyum hidroksit                                | Merck 5032              |
| Potasyum klorür                                   | Merck 4936              |
| Sığır serum 29lbümini                             | Fluka 05470             |
| Sodyum azid                                       | Riedel 35088            |
| Sodyum hidroksit                                  | Sigma S-0899            |
| Sodyum karbonat                                   | Merck 1. 06398. 1000    |
| Sodyum klorür                                     | Merck 1. 06404. 1000    |
| Sodyum potasyum tartarat                          | Merck 8085. 1000        |
| 1,1',3,3'- Tetraetoksipropan                      | Acros Organics 122-31-6 |
| 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo- <i>p</i> -dioksin      | AccuStandard D-404N     |
| Trikloroasetik asit                               | Merck 807               |
| Tris tamponu                                      | Sigma T6066             |
| 2-Tiyobarbitürik asit                             | Merck 1. 08180. 0025    |

**Tablo 3.3.** Biyokimyasal yöntemlerde kullanılan alet ve cihazlar

|                                   |                    |
|-----------------------------------|--------------------|
| Balon joje (5, 10, 25, 50 ml)     | Isolab             |
| Beher (25, 50, 100 ml)            |                    |
| Bidistile su cihazı               | Hoschizakı         |
| Cam tüp (16x100 mm)               | Isolab             |
| Erlen (25, 50, 100, 250 ml)       |                    |
| Hassas terazi                     | RADWEG-AS220.R2    |
| Homojenizatör                     | IKA-T10            |
| İnkübatör                         | Nüve FN500         |
| Manyetik karıştırıcı              | Wisestir MSH-20A   |
| Mavi ve sarı pipet ucu            | Isolab             |
| Mikro pipet (10-100, 100-1000 µl) | Thermo Labsystems  |
| pH metre                          | WTW pH 340i        |
| Sogutmalı santrifüj               | Sigma              |
| -20°C soğutucu                    | Arçelik            |
| Spektrofotometre                  | Schimadzu          |
| Spektrofotometre küveti           | UV-6030            |
| Su banyosu                        | Memmert            |
| Vorteks                           | Scilogex           |
| Sonifikatör                       | Sonics-vibra cell™ |
| Elisa okuyucu                     | Biotek             |

### 3.4. Spermatolojik Yöntemler

#### 3.4.1. Organ Ağırlıkları ve Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Testis, epididimis, seminal veziküller ve prostat gibi organların hayvanlardan alındıktan sonra ağırlıkları tartılarak değerler kaydedildi ve sperm parametreleri değerlendirildi.

Epididimal sperm konsantrasyonu, Türk ve ark. ve Sönmez ve ark. (158, 159) tarafından tarif edilen modifiye bir yöntem kullanılarak, hemasitometre ile belirlendi. Sağ epididim, bir petri kabına alınarak 1 mL %0.09 NaCl (serum fizyolojik) içinde anatomik makas yardımı ile trimlendi. İnce bir şekilde kıyıldı. 2 dakika boyunca anatomik pens

yardımı ile işlem devam etti. Daha sonra tüm spermelerin epididim dokusundan izotonik içine akışkanlığını sağlamak için oda sıcaklığında 4 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, epididimal doku-sıvı karışımı, süpernatani doku parçacıklarından ayırmak için süzgeçten geçirilerek filtre edildi. Tüm epididimal spermeleri içeren süpernatani sıvı, kırmızı kan hücrelerinin sayımı için tasarlanmış pipetin 0.5 çizgisine kadar kapiler tüpün içine çekildi. 0.595 M sodyum bikarbonat, %1 formalin ve %0.025 eozin içeren çözelti, pipetin 101 çizgisine kadar ampule çekildi. Pipetin içindekiler pipet uçlarının baş parmak ile işaret parmağı arasında tutulması ve ileri- geri hareketlerle kuvvetlice çalkalanarak karıştırıldı. Pipetin ampülü, karıştırmayı mümkün kılan küçük bir cam boncuk içerir. Sperm içermeyen seyrelticilerin kılcal kısımdan boşaltılmasını sağlamak için pipetten yeterli çözelti dışarı atıldı. Elde edilen bu çözeltide seyreltme oranı 1: 200 oranındadır. Seyreltilmiş sperm süspansiyonunun yaklaşık 10 µL'si, geliştirilmiş Neubauer'in (Derin 1/10 mm, LABART, Darmstadt, Almanya) her iki sayma kısmına aktarıldı ve 5 dakika bekletildi. Her iki bölmedeki sperm hücreleri, 200x büyütmede ışık mikroskobunun yardımı ile sayıldı. Sperm motilitesi (%), Sönmez ve ark (160) tarafından açıklandığı gibi ısıtma tablalı bir ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi. Bu işlem için, 37 ° C'ye kadar ısıtılmış bir ışık mikroskobuna bir lam yerleştirildi ve daha sonra birkaç damla Tris tampon çözeltisi [0.3 M Tris (hidroksimetil) aminometan, 0.027 M glikoz, 0.1 M sitrik asit] eklenerek yapıldı. Lam üzerine bırakılmış ve bir pipet ile sol kauda epididiminden elde edilen çok küçük bir sıvı damlası, Tris tampon çözeltisine eklenmiş ve bir bistüri ucu yardımı ile karıştırılmıştır. Sperm hareketliliğinin yüzdesi, görsel olarak 400x büyütmede değerlendirildi. Her numunede üç farklı alandan hareketlilik tahminleri yapıldı. Ardışık üç tahminin ortalaması, nihai hareketlilik puanı olarak kullanıldı. Morfolojik anormal spermelerin yüzdesini belirlemek için eozin-nigrosin (% 1,67 eosin, % 10 nigrosin ve 0,1 M sodyum sitrat) ile boyanan lam hazırlandı. Hazırlanan numuneler daha sonra 400x büyütmede ışık mikroskobu altında görüntüledi. Her lam da (her grupta 2100 hücre) toplam 300 sperm hücresi incelenerek, spermatozoanın baş, kuyruk ve toplam anormallik oranları yüzde olarak ifade edildi.

### **3.5. Sperm Analizleri İçin İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel değerlendirmeler, “SPSS/PC (Version 22; SPSS)” paket programı kullanılarak yapıldı. Alınan sonuçlar ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edilerek,  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bütün gruplar arasındaki sperm karakteristiklerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA)

kullanıldı. Önemlilikler, TUKEY-HSD testi ile ikili karşılaştırmalar yapılarak değerlendirildi.

### 3.6. Histolojik Yöntemler

Histolojik deneyler için alınan testis doku örnekleri %10'luk formalin içerisinde tespit edildi. Takip işlemlerinden geçirilen dokular parafin bloklar içerisine alındı. Hazırlanan bloklardan mikrotom (Leica RM 2245) ile 5 µm kalınlığında kesitler alınarak, kesitlere Hematoksilen ve eozin boyama metodu uygulandı. Leica 280 ışık mikroskopunda ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sisteminde (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK) incelenerek fotoğraflar çekildi. İmmunohistokimyasal boyama için alınan kesitler polilizin kaplı lamlar üzerine alındı. Alınan kesitlere Kaspaz-3 boyama metodu uygulandı.

#### 3.6.1. Histolojik Protokol

Histolojik inceleme için alınan testis doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi.

#### Histolojik protokol için tespit maddesi ve süresi

| <b>FİKSATİF</b> | <b>MADDELER</b> | <b>MİKTAR</b> | <b>TESPİT SÜRESİ</b> |
|-----------------|-----------------|---------------|----------------------|
| Formaldehit     | Formaldehit     | 7 mL          | 24 saat              |
| Solüsyonu       | Distile su      | 93 mL         |                      |

Formaldehit içerisinde tespit edilen dokulara rutin histolojik doku takip işlemleri uygulandı.

#### 3.6.2. Histolojik Analizler İçin Doku Takip Basamakları

|               |        |
|---------------|--------|
| %70 alkol     | 1 saat |
| %80 alkol     | 1 saat |
| %96 alkol     | 1 saat |
| %96 alkol     | 1 saat |
| Absolüt alkol | 1 saat |
| Absolüt alkol | 1 saat |
| Ksilen        | 1 saat |
| Ksilen        | 1 saat |
| Parafin I     | 1 saat |

Parafin II 1 saat

Yukarıdaki takip işlemlerinden geçirildikten sonra alınan testis doku örnekleri parafin bloklar içerisine gömüldü. Hazırlanan bloklardan mikrotom (Leica RM 2245) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlere Hematoksilen- Eozin (H-E) boyama metodu uygulandı ve Leica 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sistemi (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK) ile incelenerek fotoğraflandı. İmmunohistokimyasal boyama için alınan kesitler polilizin kaplı lamlar üzerine alındı. Alınan kesitlere Kaspaz-3 boyama metodu uygulandı.

### 3.6.3. Mayer'in Hematoksilen-Eozin Metodu

Lamlara alınan doku örnekleri bir saat etüvde bekletildi ve doku çevresinde bulunan parafinin erimesi sağlandı. Daha sonra kesitlere sırası ile aşağıda verilen boya metodu uygulandı.

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| Ksilen I            | 5 dakika  |
| Ksilen II           | 5 dakika  |
| Ksilen III          | 5 dakika  |
| %96 alkol           | 3 dakika  |
| %96 alkol           | 3 dakika  |
| %96 alkol           | 3 dakika  |
| Absolüt alkol       | 3 dakika  |
| Absolüt alkol       | 3 dakika  |
| Distile suda yıkama | 2 dakika  |
| Mayer Hematoksilen  | 10 dakika |
| Çeşme suyu          | 20 dakika |
| Eozin               | 2 dakika  |
| %96 alkol           | 3 dakika  |
| %96 alkol           | 3 dakika  |
| %96 alkol           | 3 dakika  |
| Ksilen I            | 5 dakika  |
| Ksilen II           | 5 dakika  |
| Ksilen III          | 5 dakika  |

H-E ile boyanmış preparatlarda seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıkları ölçüldü (Tablo 4.5). Ölçümler, her preparattan 100 adet seminifer tübül sayılarak gerçekleştirildi.

### 3.6.4. İmmunohistokimyasal Boyama Prosedürü

Testis dokularından alınan 5 µm'lik kesitler, immunohistokimyasal boyama için polizin kaplı lamalar üzerine alındı.

|   |            |
|---|------------|
| Ksilol I  | 5 dakika   |
| Ksilol II   | 5 dakika   |
| Ksilol III  | 5 dakika   |
| %100 alkol  | 3 dakika   |
| %96 alkol   | 3 dakika   |
| %80 alkol   | 3 dakika   |
| Distile su  | 5 dakika   |
| Antijen Retrieval Aşaması                                 | 15 dakika  |
| Oda ısısında soğutma                                      | 20 dakika  |
| Distile su  | 5 dakika   |
| PBS (Fosfat Salin Tamponu)                                | 5 dakika   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Hidrojen Peroksit) Aşaması | 10 dakika  |
| PBS (Fosfat Salin Tamponu)                                | 5 dakika   |
| Protein Bloke Aşaması (Süper Blok)                        | 5 dakika   |
| Primer Antikor Aşaması                                    | 2 saat     |
| PBS (Fosfat Salin Tamponu)                                | 2x5 dakika |
| Sekonder Antikor  | 10 dakika  |
| PBS (Fosfat Salin Tamponu)                                | 2x5 dakika |
| Streptavidin Peroksidaz (HRP) Aşaması                     | 10 dakika  |
| AEC Kromojen Aşaması                                      | 10 dakika  |
| PBS (Fosfat Salin Tamponu)                                | 5 dakika   |
| Distile su  | 5 dakika   |
| Mayers Hematoksilen                                       | 40 sn      |
| Çeşme Suyu  | 5 dakika   |
| Distile Su  | 5 dakika   |
| Aqueous mount ile kapatma                                 |            |

**Tablo 3.4.** Histolojik Yöntemlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| %96 lık alkol                          | Sigma-aldrich-SZBD0210V       |
| Ksilen                                 | Tekkim-250418134001           |
| Parafin                                | Isolab                        |
| Hemotoksilen                           | Merck-HX125420                |
| Eozin                                  | Bes Lab-092018.001            |
| Large Volume Ultra V Block             | Thermo scientific-AUB150113AC |
| PBS                                    | Bio Optica-4411               |
| Sitrat tampon                          | Bio Optica-2012               |
| Large volume Anti-Polyvalent HRP (RTU) | Thermo scientific-PHL150128   |
| AEC substrate sistem                   | Thermo scientific-HA26739     |
| Aqueous mount                          | Thermo scientific-391373      |
| Kaspaz-3                               | Thermo scientific-1197P1312A  |

### 3.7. Histolojik İnceleme İçin İstatiksel Değerlendirme

İstatiksel analizler SPSS 13 programı ile yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılığın önemli olup olmadığı Bonferroni-Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılarak değerlendirildi. Alınan sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) ile ifade edilerek,  $p < 0.0001$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3.8. Serum Testosteron ve PD-1 düzeylerinin Elisa Yöntemiyle Ölçülmesi

Elisa deneyleri için gerekli biyolojik materyal her grupta 7 hayvandan alınan 4 mL kan, oda sıcaklığında 2500 g de, 10 dk santrifüj edilerek serumlara ayrıldı ve analizler yapılmaya dek  $-80^{\circ}\text{C}$  de saklandı.

Elisa deneylerinde kullanılan testosteron EIA (sunred lot no:201903; Cat no: SRB-T-86337) kiti ve rat PD-1 (YL-Biont-cat no: YLA1582RA) kiti ticari olarak alındı ve deneyler kit prosedürüne uygun şekilde yapıldı. Ölçümler, BİYO-TEK elisa okuma cihazında, KC-junior programı kullanılarak 450 nm de Elisa plaka okuyucusunda ölçülmüştür. Numunelerdeki testosteron ve PD-1 miktarları doğrusal bir regresyon yöntemi kullanılarak standart eğrilerden hesaplandı.

### **3.9. Elisa Denevleri için İstatistiksel Değerlendirme**

Elde edilen bulguların istatistik analizleri SPSS 12.0 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi, Tek Yönlü Varyans Analiz Testi (ANOVA-Tukey) testi, aynı grup içinde zamana bağlı değişikliklerin belirlenmesi ise bağımlı T testi kullanılarak hesaplandı.





## 4. BULGULAR

### 4.1. Haftalık Sıçan Tartım Sonuçları

**Tablo 4.1.** Haftalık sıçan tartım sonuçları

| Gruplar                     | 1.hafta | 2.hafta | 3.hafta | 4.hafta | P <sub>2</sub><br>değeri |
|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|--------------------------|
|                             | (gram)  | (gram)  | (gram)  | (gram)  |                          |
| Ortalama ± Standart Sapma   |         |         |         |         |                          |
| <b>Kontrol</b>              | 297±46  | 311±43  | 322±44  | 325±45  | <b>0.011</b>             |
| <b>PEMB</b>                 | 241±24  | 251±28  | 255±26  | 258±28  | 0,068                    |
| <b>RES</b>                  | 276±24  | 281±20  | 278±35  | 281±33  | 0,718                    |
| <b>PEMB+RES</b>             | 320±66  | 327±65  | 333±66  | 327±66  | 0,510                    |
| <b>ANAST</b>                | 281±44  | 283±45  | 282±44  | 281±42  | 0,902                    |
| <b>PEMB+ANAST</b>           | 273±20  | 283±19  | 282±23  | 278±24  | 0,652                    |
| <b>P<sub>1</sub> değeri</b> | 0,056   | 0,057   | 0,064   | 0,068   |                          |

P<sub>1</sub>: gruplar arasındaki farklılık

P<sub>2</sub>: gruplar açısından haftalar arasındaki farklılık

n=7; haftalık tartımlar 7 sıçanın ortalaması olarak verilmiştir.

Tablo 4.1 de haftalık sıçan tartım sonuçları verilmiştir. Verilen haftalık sıçan tartım sonuçlarına göre, gruplar açısından haftalar arasında sadece kontrol grubunda 1 ile 4.hafta arasında gözlenmiştir (p=0.011). Haftalar açısından gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir.

#### Tartımlar için istatistiksel analiz yöntemi:

Veriler ortalama±standart sapma ile özetlendi. İstatistiksel analizlerde haftalar açısından gruplar arasında farklılık Kruskal-Wallis testi ile gruplar açısından haftalar arasında farklılık ise Friedman testi ile değerlendirildi. p≤0.05 değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi. Analizlerde IBM SPSS Statistics 25.0 (161) ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı tarafından geliştirilen Kruskal Wallis yazılımı (162) kullanıldı.

## 4.2. Biyokimyasal Bulgular

**Tablo 4.2.** Sıçanlarda TBARS, GSH, SOD, CAT ve GPx düzeyleri (ORT±SEM, n=7)

| Gruplar                | TBARS<br>(nmol/ml)     | GSH<br>(nmol/ml)         | CAT<br>(k/g protein)      | SOD<br>(IU/mg<br>protein) | GPx<br>(IU/mg<br>protein) |
|------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Kontrol</b>         | 4,98±1,25 <sup>a</sup> | 185,8±19,3 <sup>a</sup>  | 0,096±0,0051 <sup>a</sup> | 32,45±2,56 <sup>a</sup>   | 254,4±19,3 <sup>a</sup>   |
| <b>PEMB</b>            | 8,86±1,55 <sup>b</sup> | 107,4±14,2 <sup>b</sup>  | 0,054±0,0045 <sup>b</sup> | 21,52±1,74 <sup>b</sup>   | 186,9±14,9 <sup>b</sup>   |
| <b>RES</b>             | 5,13±1,38 <sup>a</sup> | 197,3±23,5 <sup>a</sup>  | 0,102±0,0049 <sup>a</sup> | 30,16±1,85 <sup>a</sup>   | 267,7±23,5 <sup>a</sup>   |
| <b>PEMB+<br/>RES</b>   | 7,06±1,26 <sup>b</sup> | 175,9±18,6 <sup>ac</sup> | 0,081±0,0055 <sup>c</sup> | 29,58±1,64 <sup>a</sup>   | 216,6±20,2 <sup>c</sup>   |
| <b>ANAST</b>           | 4,68±0,98 <sup>a</sup> | 183,6±21,7 <sup>a</sup>  | 0,095±0,0061 <sup>a</sup> | 33,81±2,04 <sup>a</sup>   | 263,8±21,4 <sup>a</sup>   |
| <b>PEMB+<br/>ANAST</b> | 6,93±1,42 <sup>b</sup> | 156,4±16,4 <sup>c</sup>  | 0,079±0,0043 <sup>c</sup> | 30,15±1,84 <sup>a</sup>   | 209,1±18,2 <sup>c</sup>   |

Aynı sütundaki a, b, c, d küçük harfleri gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir (p < 0.05)

a: Kontrol, RES ve ANAST grupları arasında fark (p > 0,05) bulunmamaktadır.

b: Pembrolizumab, ile diğer gruplar arasında fark (p < 0,05) bulunmaktadır.

c: PEMB+ANAST ve PEMB+ANAST grupları arasında fark (p > 0,05) bulunmamaktadır.

TBARS, SOD, CAT, GSH ve GPx düzeylerine ait değerler Tablo 4.2 de verilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda PEMB verilen sıçanlarda oksidatif hasarın göstergesi olan TBARS düzeyinin kontrol ve diğer tüm gruplara arttığı tespit edildi. Bununla birlikte anastrozol ve resveratrol tedavisinin pembrolizumabın neden olduğu TBARS artışını azalttığı ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. Bu gruplara ek olarak yalnızca anastrozol ve resveratrol verilen gruplarla, kontrol grubu arasında farklılıklar olsa da istatistiksel olarak anlamlı değişimlerin olmadığı saptandı.

Bununla birlikte pembrolizumab uygulamasının antioksidan savunma sistemi elemanları olan GSH, SOD, GPx ve CAT düzeylerinde istatistik olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu tespit edildi. Ancak resveratrol ve anastrozol tedavileri yani PEMB+RES ve PEMB+ANAST gruplarında, GSH, SOD, CAT ve GPx düzeylerinde, pembrolizumaba bağlı olan azalmayı istatistiksel olarak anlamlı derecede artırıp normal değerlere yaklaştırdığı belirlendi. Hatta SOD düzeylerine bakıldığında, kontrol,

PEMB+RES ve PEMB+ANAST grupları arasında kontrol grubuyla istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

TBARS düzeylerine benzer olarak, kontrol, RES ve ANAST grubunda, GSH, SOD, CAT ve GPx antioksidan enzim seviyelerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı. Parametreler incelendiğinde resveratrol tedavisinin anastrozol tedavisine göre daha çok kontrol grubuna yaklaştığı belirlendi.

### 4.3. Spermatolojik Bulgular

**Tablo 4.3.** Sıçanlarda testis ağırlıkları, epididimis ağırlıkları, seminal vezikül ağırlıkları, prostat ağırlıkları (ORT±SEM, n=7)

| Gruplar           | Testis ağırlıkları |              | Epididimis ağırlıkları |              | Seminal<br>vezikül<br>ağırlıkları | Prostat<br>ağırlıkları |
|-------------------|--------------------|--------------|------------------------|--------------|-----------------------------------|------------------------|
|                   | SAG                | SOL          | SAG                    | SOL          | ORT ±<br>SEM                      | ORT ±<br>SEM           |
|                   | ORT ±<br>SEM       | ORT ±<br>SEM | ORT±<br>SEM            | ORT ±<br>SEM |                                   |                        |
| <b>Kontrol</b>    | 1,581±0,05         | 1,544±0,06   | 0,683±0,03             | 0,649±0,01   | 0,798±0,07                        | 0,422±0,04             |
| <b>PEMB</b>       | 1,523±0,06         | 1,486±0,07   | 0,567±0,05             | 0,579±0,03   | 0,662±0,04                        | 0,277±0,01             |
| <b>RES</b>        | 1,510±0,04         | 1,569±0,03   | 0,634±0,03             | 0,660±0,03   | 1,395±0,06                        | 0,520±0,05             |
| <b>PEMB+RES</b>   | 1,403±0,09         | 1,477±0,10   | 0,693±0,05             | 0,704±0,04   | 0,537±0,05                        | 0,287±0,03             |
| <b>ANAST</b>      | 1,370±0,07         | 1,316±0,06   | 0,610±0,03             | 0,522±0,03   | 0,661±0,08                        | 0,253±0,02             |
| <b>PEMB+ANAST</b> | 1,392±0,04         | 1,338±0,05   | 0,552±0,03             | 0,540±0,01   | 0,579±0,06                        | 0,244±0,01             |

Gruplar testis ağırlıkları, epididimis ağırlıkları, seminal vezikül ağırlıkları ve prostat ağırlıkları açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Üreme sistemi organ (testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat) ağırlıklarındaki değişimler Tablo 4.3 de sunuldu. Tablodan görüleceği üzere yapılan pembrolizumab uygulaması ve beraberinde resveratrol ve anastrozol tedavisi üreme sistemi organ ağırlıklarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak herhangi bir değişime neden olmamıştır.

**Tablo 4.4.** Sıçanlarda sperm motilitesi, epididimal sperm konsantrasyonu ve anormal sperm oranı (ORT±SEM, n=7).

| GRUPLAR           | Sperm motilitesi (%)    | Epididimal sperm konsantrasyonu (milyon/ gram doku) | Anormal sperm oranı (%) |                        |                         |
|-------------------|-------------------------|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|
|                   |                         |   | Baş                     | Kuyruk                 | Total                   |
|                   |                         |   | ORT ± SEM               | ORT ± SEM              | ORT ± SEM               |
| <b>Kontrol</b>    | 89,72±1,48 <sup>a</sup> | 223,57±2,38 <sup>a</sup>                            | 3,57±0,42 <sup>a</sup>  | 3,14±0,40 <sup>a</sup> | 6,71±0,56 <sup>a</sup>  |
| <b>PEMB</b>       | 59,14±2,09 <sup>b</sup> | 141,28±10,70 <sup>b</sup>                           | 7,85±0,34 <sup>b</sup>  | 6,57±0,57 <sup>b</sup> | 14,28±0,80 <sup>b</sup> |
| <b>RES</b>        | 91,00±1,70 <sup>a</sup> | 222,42±3,35 <sup>a</sup>                            | 3,28±0,35 <sup>a</sup>  | 3,00±0,30 <sup>a</sup> | 6,28±0,42 <sup>a</sup>  |
| <b>PEMB+RES</b>   | 77,92±2,70 <sup>c</sup> | 184,85±5,23 <sup>c</sup>                            | 4,57±0,36 <sup>c</sup>  | 4,71±0,60 <sup>c</sup> | 9,28±0,80 <sup>c</sup>  |
| <b>ANAST</b>      | 90,32±2,89 <sup>a</sup> | 225,71±2,95 <sup>a</sup>                            | 3,28±0,42 <sup>a</sup>  | 3,28±0,35 <sup>a</sup> | 6,57±0,52 <sup>a</sup>  |
| <b>PEMB+ANAST</b> | 75,94±4,22 <sup>d</sup> | 150,85±3,26 <sup>d</sup>                            | 5,00±0,30 <sup>d</sup>  | 5,28±0,35 <sup>d</sup> | 10,28±0,52 <sup>d</sup> |

a : Kontrol, RES ve ANAST grupları arasında istatistiksel olarak (p<0,05) düzeyinde fark görülmemiştir.

b : Pembrolizumab, ile diğer gruplar arasında fark (p<0,05) bulunmaktadır.

c : PEMB+RES grubu ile diğer gruplar arasında fark (p<0,05) bulunmaktadır.

d : PEMB+ANAST grubu ile diğer gruplar arasında fark (p<0,05) bulunmaktadır.

Tablo 4.4’ de sperm karakteristikleri olan sperm motilitesi, anormal sperm oranı ve epididimal sperm konsantrasyonları verilmiştir. PEMB uygulamasının sperm motilitesi ve konsantrasyonunda, kontrol grubu, RES ve ANAST gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu belirlendi. Tedavi gruplarında (PEMB+ANAST ve PEMB+RES) ise yapılan tedavi sonucu sperm motilitesi, konsantrasyonu ve anormal sperm oranında, PEMB grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Bu bağlamda kombine tedavinin pembrolizumabın neden olduğu etkileri tersine çevirdiği belirlendi. Kontrol, RES ve ANAST gruplarında arasında ise istatistiksel olarak bir fark olmadığı saptandı.

Bununla birlikte PEMB uygulamasının anormal sperm miktarında (Kafa, kuyruk, total) istatistiksel olarak önemli düzeyde artışa sebep olduğu ve bu artışın resveratrol ve anastrozol tedavisi ile azaldığı belirlendi. Azalmanın önemli düzeyde olduğu ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkın olup, kontrol grubuna yaklaştığı saptandı.

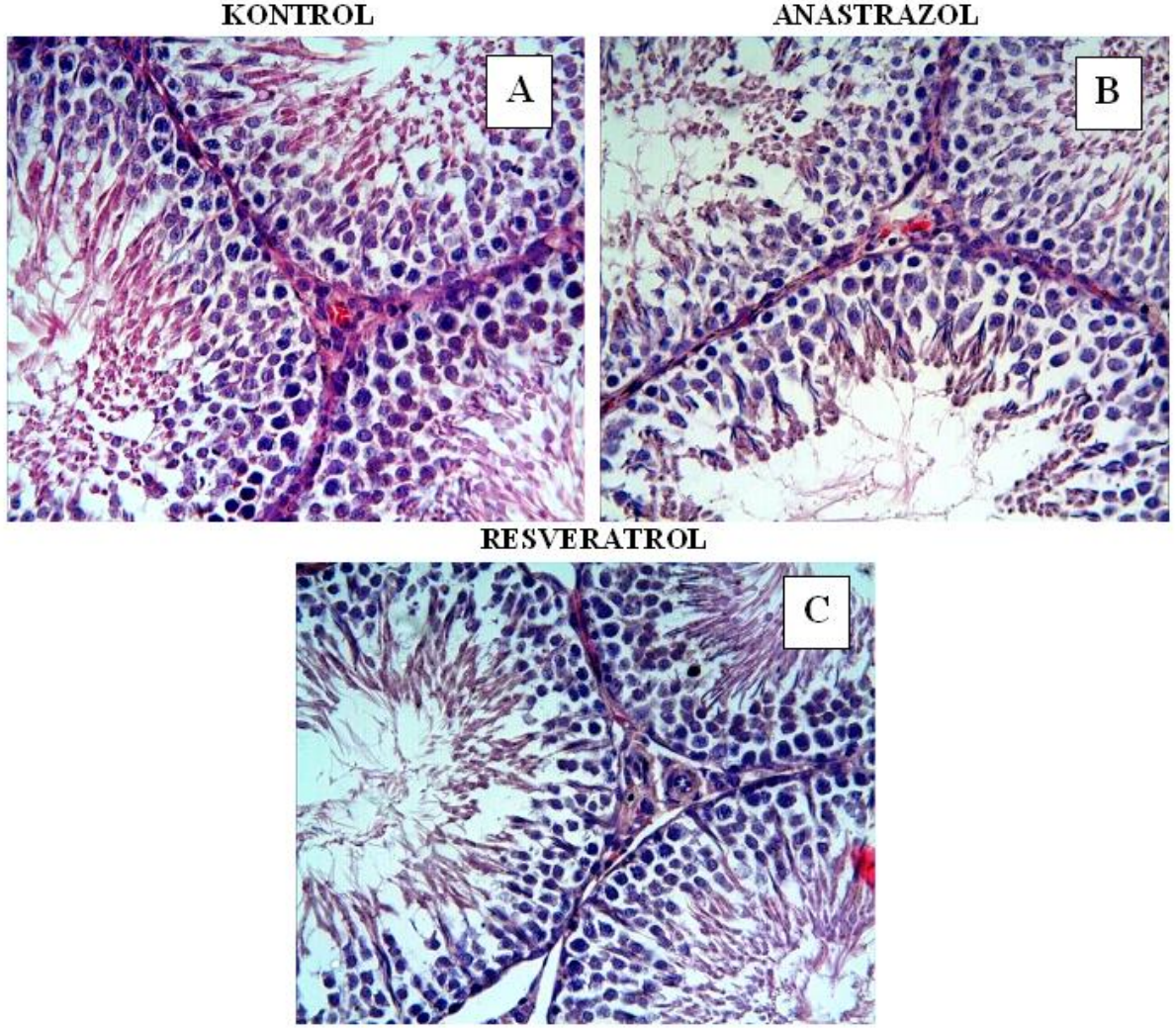
#### **4.4. Histolojik Bulgular**

##### **Işık Mikroskopik Bulgular:**

Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçanların testislerinin genel görünümünü saptamak için H-E boyaları uygulanmıştır.

##### **4.4.1. Kontrol Grubu**

Kontrol, Anastrazol (ANAST) ve Resveratrol (RES) gruplarında testis dokusu normal histolojik görünümde izlendi. Kontrol grubuna (Şekil 4.1 A) ait Hematoksilen- Eozin (H-E) ile boyanan testislerde seminifer tübül, interstisyel bağ dokusu ve Leydig hücreleri ile seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücrelerin dizilişi normal histolojik görünümdeydi. Anastrazol (Şekil 4.1 B) ve Resveratrol (Şekil 4.1 C) gruplarında ise testis dokusunun histopatolojik görünümünün kontrol grubuna oldukça benzer olduğu tespit edildi.

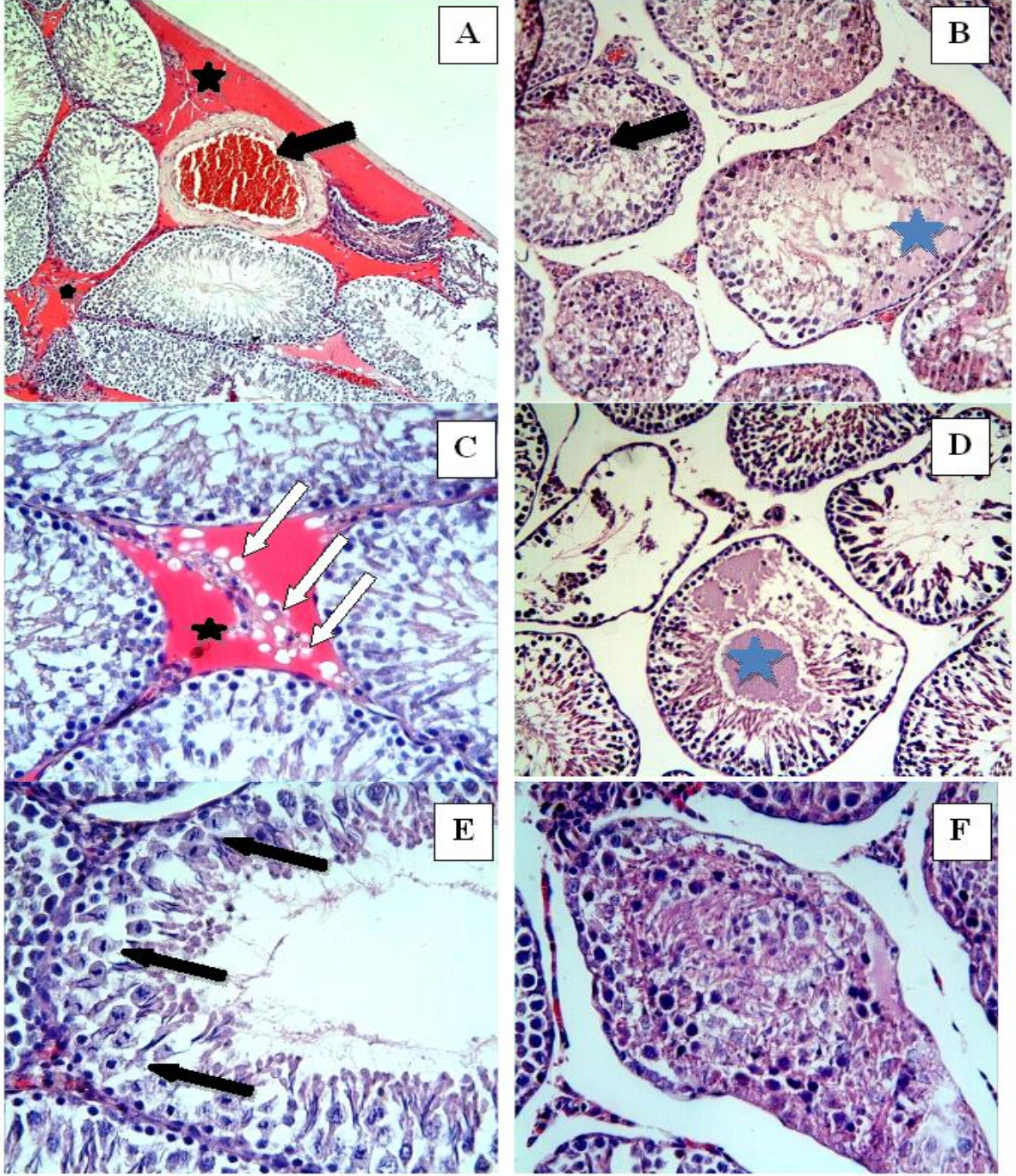


**Şekil 4.1.** Kontrol (A), Anastrazol (B) ve Resveratrol (C) gruplarında testis dokusu normal histolojik görünümde izlendi. H-E; X40

#### **4.4.2. Pembrolizumab (PEMB) Grubu**

PEMB grubunda testis dokusunda yoğun histopatolojik hasar olduğu gözlemlendi. Bu hasarlar; seminifer tübül yapılarında bozulma (Şekil 4.2 A, B, D, F), vasküler konjesyon (siyah ok) (Şekil 4.2 A), kapsül altında (siyah yıldız) ve intestisyel alanda ödem (siyah yıldız) (Şekil 4.2 A, C), vakuolizasyon (beyaz oklar) (Şekil 4.2 C), seminifer tübül lümenine dökülmüş hücreler (siyah ok) (Şekil 4.2 B, F), tübül lümeninde ödem (mavi oklar) (Şekil 4.2 B, D) ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler (Şekil 4.2 E) gözlemlendi.

## PEMBROLİZUMAB (PEMB)



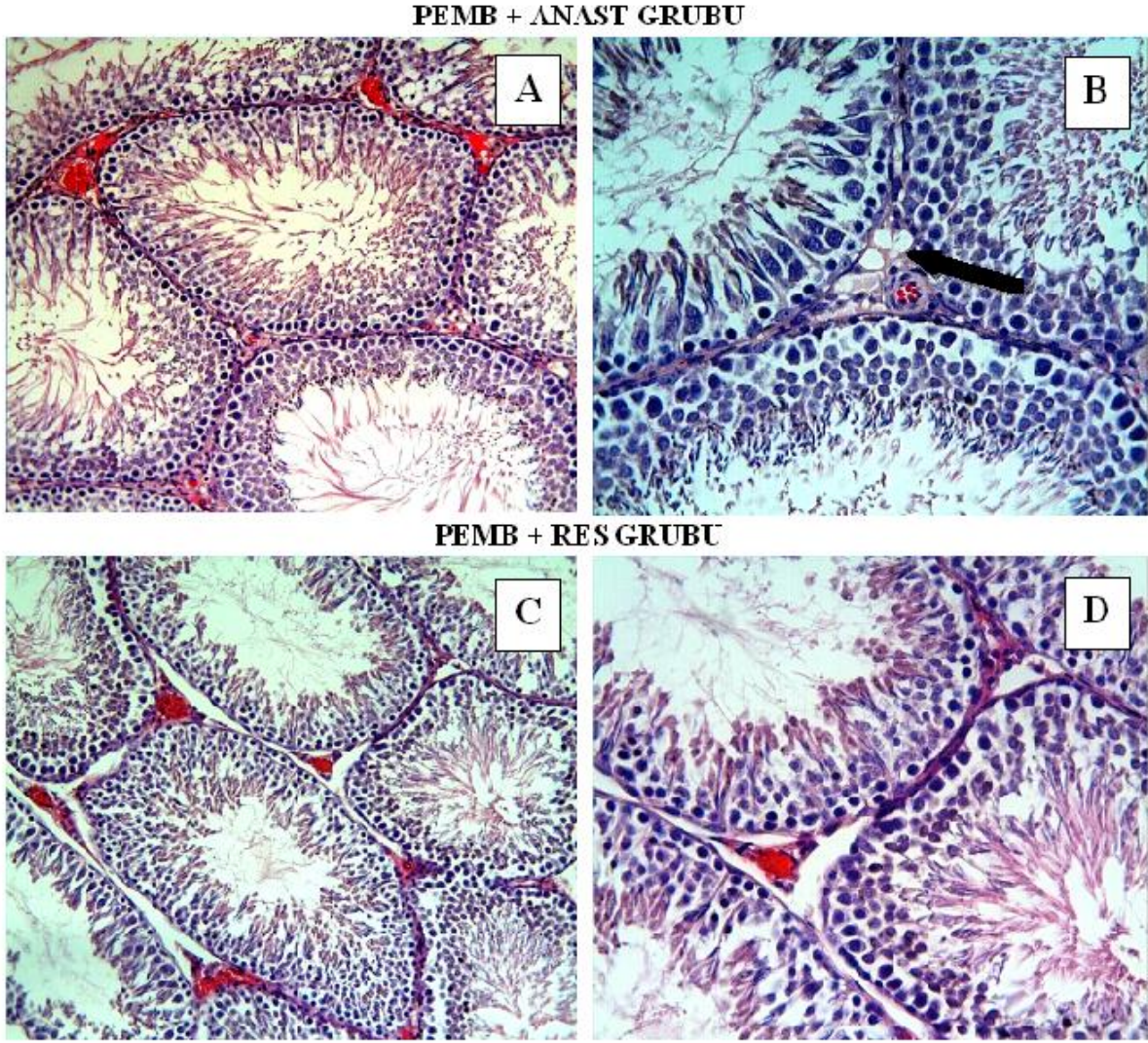
**Şekil 4.2.** PEMB grubunda ise testiste seminifer tübül yapılarında bozulma (A, B, D, F), vasküler konjesyon (siyah ok) (A), kapsül altında ve interstisyel alanda ödem (siyah yıldız) (A, C), vakuolizasyon (beyaz oklar) (C), seminifer tübül lümenine dökülmüş hücreler (siyah ok) (B, F), tübül lümeninde ödem (Mavi yıldız) (B, D) ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler olduğu (E) gözlemlendi. A: H-E; x10, B,D: H-E; x20, C, E, F: H-E; x40.

#### **4.4.3. Pembrolizumab (PEMB) + Anastrozol ve Pembrolizumab (PEMB) + Resveratrol Grubu**

PEMB + ANAST ve PEMB + RES gruplarını oluşturan sıçanların testis örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde, histopatolojik hasarın her iki grupta da belirgin şekilde azaldığı, spermatogenik hücrelerin korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.3 A, B, C, D). İnterstisyel alanda bulunan damarlarda az miktarda vasküler konjesyon ve vakuolizasyon (siyah ok) (Şekil 4.3 B) olduğu gözlemlendi. Ayrıca lümene dökülen spermatogenik seri hücrelerde ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücrelerde, interstisyel alanda görülen vakuolizasyon ve ödemde belirgin derecede azalma olduğu tespit edildi.



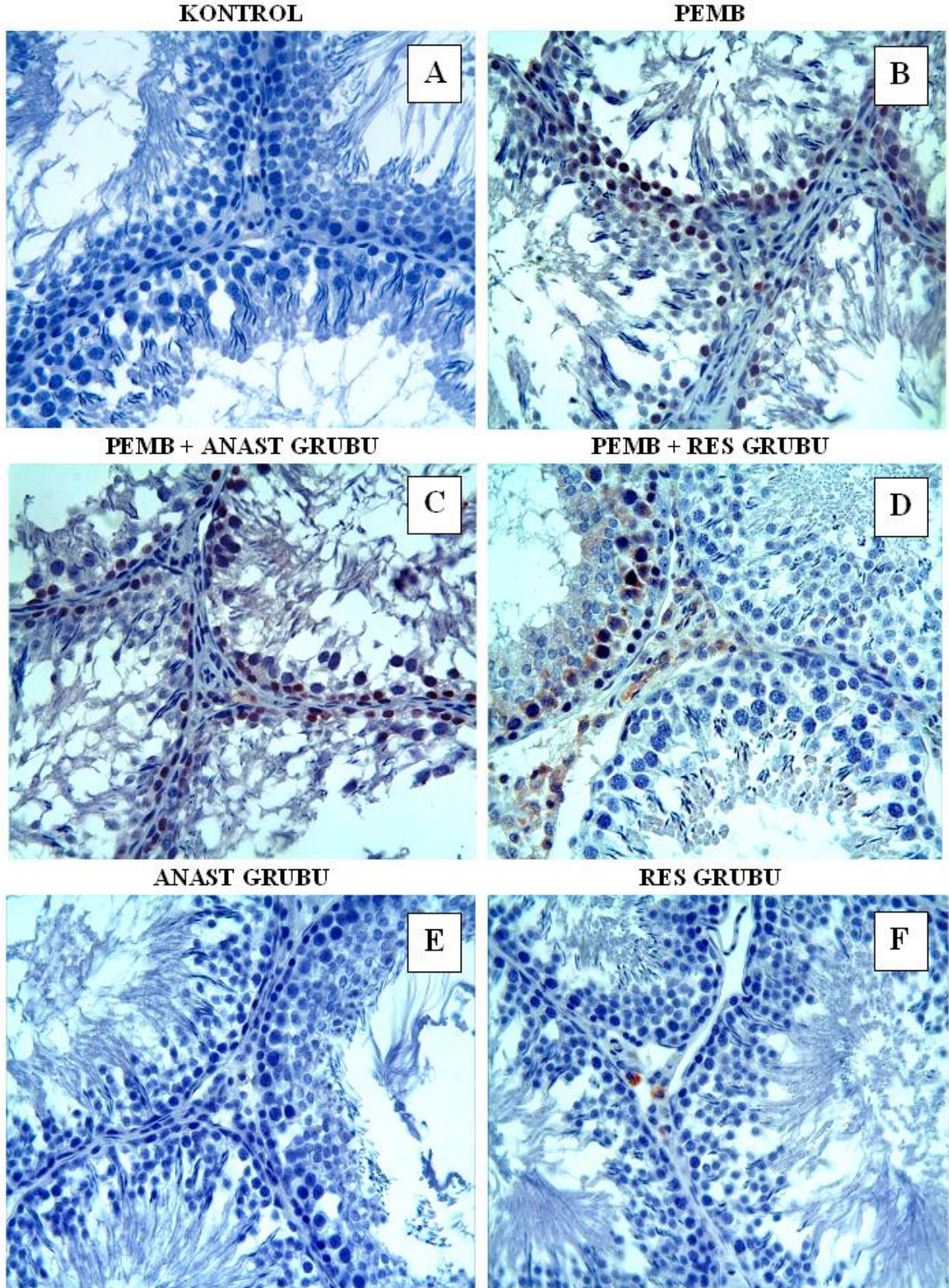




**Şekil 4.3.** PEMB + ANAST grubu ve PEMB + RES gruplarında ise histopatolojik hasarda azalma olduğu gözlemlendi. Her iki grupta da seminifer tübül yapılarının arasında az miktarda vasküler konjesyon gözlemlendi. (A, B, C, D). Pemb + Anast grubunda ise vakuolizasyonda azalma olduğu tespit edildi (Siyah ok) (B). A, C:H-E; X20, B, D: H-E; X40.

#### 4.4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol, PEMB, PEMB + ANAST, PEMB + RES, ANAST ve RES gruplarında spermatogenik seri hücrelerde Kaspaz-3 immunreaktivite değerlendirilmesi yapıldı. PEMB grubunda belirgin derecede yoğun boyanmış Kaspaz-3 pozitif hücreler gözlemlendi. PEMB + ANAST ve PEMB + RES gruplarında Kaspaz-3 pozitif boyanmış hücrelerin sayısında ve boyanma yoğunluğunda belirgin derecede azalma olduğu tespit edildi. Kontrol, ANAST ve RES gruplarında ise herhangi bir Kaspaz-3 immunreaktivitesi gözlenmedi.



**Şekil 4.4.** Kontrol, PEMB, PEMB + ANAST, PEMB + RES, ANAST ve RES gruplarında spermatogenik seri hücrelerde Kaspaz- 3 immunreaktivite değerlendirilmesi

**Tablo 4.5.** Pembrolizumab'ın oluşturduğu tübül çapı (MSTD) ve tübül epitel kalınlığındaki (GECT) değişiklikler üzerine Anastrozol ve Resveratrolün etkileri.

| Gruplar             | Tübül Çapı (MSTD)          | Tübül Epitel Kalınlığı (GECT) |
|---------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <b>Kontrol</b>      | 294,77 ± 2,81 <sup>a</sup> | 86,16 ± 0,90 <sup>a</sup>     |
| <b>PEMB</b>         | 252,40 ± 2,42 <sup>b</sup> | 41,91 ± 0,81 <sup>b</sup>     |
| <b>RES</b>          | 288,43 ± 2,91 <sup>a</sup> | 75,07 ± 1,05 <sup>a</sup>     |
| <b>PEMB + RES</b>   | 272,00 ± 4,56 <sup>c</sup> | 64,01 ± 0,87 <sup>c</sup>     |
| <b>ANAST</b>        | 291,36 ± 3,31 <sup>a</sup> | 79,28 ± 1,18 <sup>a</sup>     |
| <b>PEMB + ANAST</b> | 263,29 ± 4,50 <sup>c</sup> | 58,43 ± 1,24 <sup>c</sup>     |

Aynı sütundaki a, b, c küçük harfleri gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir. (P<0.0001)

a = Kontrol, RES ve ANAST grubu arasında farklılık bulunmamaktadır.

b= PEMB grubu tüm gruplarla ile farklılık göstermektedir.

c = Yalnızca PEMB+ANAST ve PEMB+RES grupları arasında farklılık yoktur, diğer tüm gruplar ile farklılık göstermektedir.

#### **4.5. Serum Testosteron ve PD-1 düzeylerinin Elisa Yöntemiyle Ölçülmesi**

##### **4.5.1. Serum Testosteron Düzeyleri**

Deney ve kontrol gruplarına ait serum testosteron düzeyleri tabloda 4.6 da verilmiştir. Tablo 4.6 incelendiğinde, testosteron düzeylerinin PEMB uygulamasına bağlı olarak kontrol ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli (p<0.01) düzeyde azaldığı, PEMB+ANAST ve PEMB+RES tedavi gruplarında ise aynı düzeylerin PEMB grubuna göre istatistiksel olarak (p<0.01) belirgin düzeyde arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte RES ve ANAST gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış kaydedilmiştir. PEMB+RES ve PEMB+ANAST grupları arasında etkin olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

**Tablo 4.6.** Serum testosteron düzeyleri (n=7)

| <b>Gruplar</b>    | <b>Testosteron (ng/l)</b> |
|-------------------|---------------------------|
| <b>Kontrol</b>    | 485,3±28,4 <sup>a</sup>   |
| <b>PEMB</b>       | 314,5±21,5 <sup>b</sup>   |
| <b>RES</b>        | 515,4±31,3 <sup>ac</sup>  |
| <b>PEMB+RES</b>   | 407,6±24,6 <sup>d</sup>   |
| <b>ANAST</b>      | 534,8±33,8 <sup>c</sup>   |
| <b>PEMB+ANAST</b> | 435,2±25,2 <sup>d</sup>   |

Aynı sütündeki a, b, c, d küçük harfleri gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir (p <0.01)

a ; Kontrol ile diğer gruplar arasında fark (p<0,01) bulunmaktadır.

b : Pembrolizumab, ile diğer gruplar arasında fark (p<0,01) bulunmaktadır.

c : ANAST grubu ile diğer gruplar arasında fark (p<0,01) bulunmaktadır.

d: PEMB+RES ve PEMB+ANAST grupları arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir.

#### **4.5.2. Serum PD-1 Düzeyleri**

Kontrol ve deney gruplarına ait serum PD-1 düzeyleri tablo 4.7 de verilmiştir. PD-1 düzeylerinin PEMB uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna göre önemli düzeyde istatistiksel olarak azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte PEMB+RES ve PEMB+ANAST grupları ile PEMB grubu arasında anlamlı bir fark yoktur. Çünkü verilen tedavilerin PD-1 düzeylerini artırması ilacın etkinliğini azaltacaktır. Kontrol, RES ve ANAST grupları arasında da istatistiksel bir fark kaydedilmemiştir.

**Tablo 4.7.** Serum PD-1 düzeyleri (n=7)

| <b>Gruplar</b>    | <b>PD1 (ng/l)</b>      |
|-------------------|------------------------|
| <b>Kontrol</b>    | 9,83±1,03 <sup>a</sup> |
| <b>PEMB</b>       | 5,24±0,82 <sup>b</sup> |
| <b>RES</b>        | 9,39±0,95 <sup>a</sup> |
| <b>PEMB+RES</b>   | 5,91±0,86 <sup>b</sup> |
| <b>ANAST</b>      | 9,60±1,07 <sup>a</sup> |
| <b>PEMB+ANAST</b> | 5,62±0,96 <sup>b</sup> |

Aynı sütundaki a, b küçük harfleri gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir (p <0.01)

a; Kontrol, RES ve ANAST grupları arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir.

b; PEMB, PEMB+RES ve PEMB+ANAST grupları arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir.

## 5. TARTIŞMA

Tümör biyolojisi ve immünolojisi bilgisi arttıkça, bağışıklık sistemi ile kanser arasındaki etkileşimlerin karmaşık doğasına yönelik hedeflenen etkenlerin geliştirilmesi odak noktası olmaya başlamıştır (163, 164). İmmünoterapiler bu anlamda etkin bir kanser tedavisi yöntemi haline gelmiştir. Son 15 yıl içerisinde, immünoterapide kullanılan monoklonal antikorlar, kemoterapi ve radyoterapi tedavilerine eklenerek kanser tedavisinde daha uzun yaşam süreleri elde edilmiştir. Günümüzde özellikle modern kanser tedavi araştırmaları bu konu üzerine yoğunlaşmıştır. İmmünoterapilerin de kemoterapi tedavilerinde olduğu gibi toksisiteleri mevcuttur (67-69).

Testis immün ayrıcalıklı/korunmuş bir organdır ve immün ayrıcalıklı olmasına sebep olan mekanizma kan testis bariyeridir (165). İmmünoterapi ilaçlarıyla yapılan toksisite çalışmaları bu kimyasalların, biyokimyasal, histolojik ve spermatolojik değişiklikleri indükleyerek testiküler yapıya zarar verdiklerini ve reproduktif hasara neden olduklarını açık bir şekilde göstermiştir (167,168,169). Bu hasarın mekanizması ya da mekanizmalarından biri oksidatif strestir. Buradan hareketle, erkek infertilitesinde antioksidan potansiyeli birçok çalışmayla ispat edilmiş, doğal aromataz inhibitörü olan resveratrolün (166-168) ve bu çalışmada kullanılan sentetik aromataz inhibitörlerinden anastrozolün koruyucu anlamda uygulanması oksidatif stresi azaltabileceği ve bu bağlamda da pembrolizumabın testislerde meydana getirdiği oksidan saldırısına karşı engelleyici aktivite göstereceği hipotezi kurulmuştur. Bu amaçla oksidatif stres durumu, biyokimyasal, histolojik ve spermatolojik inceleme, serum testosteron ve serum PD-1 düzeyleri ile değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada, pembrolizumabın testis dokusunda önemli oksidatif, histopatolojik ve spermatolojik hasara neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara paralel olarak, pembrolizumabın testosteron ve PD-1 seviyelerini düşürdüğü elisa yöntemiyle ortaya konulmuştur. Bu bağlamda 20 mg/kg/gün dozunda resveratrol ve 2 mg/kg/gün dozunda anastrozol uygulamasının beklentimiz yönünde aktivite gösterdiğini ve TBARS seviyelerini azaltıp SOD, CAT, GSH-Px, GSH-redüktaz düzeylerini artırarak; sperm konsantrasyon ve motilitesini artırıp anormal sperm oranını azaltarak pembrolizumabın sıçanlarda oluşturduğu oksidatif, histopatolojik ve spermatolojik hasarları önlediğini saptadık ve bu bulguları Elisa çalışmalarıyla destekledik.

## **Biyokimyasal Değerlendirme**

Oksidatif stres, lipit peroksidasyonunun belirteci olan TBARS ile SOD, CAT, GPx (enzimatik) enzimlerinden ve GSH (enzimatik olmayan) enzimlerinden oluşan antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik durumu olup dönüşümsüz hücre hasarı ve birçok enzimin inaktivasyonuna neden olabilmektedir (169). Oksidatif stres sonucu meydana gelen ROS lehindeki artışlar oksidatif hasar olarak görülebilmektedir (170, 171). ROS'lar en dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulundurlar ve bu elektronlar yüksek enerjili olduğu için ROS'u oldukça aktif duruma getirmektedir (172). Vücutta hücrelerin zarar görmemesi için ROS'ların sürekli olarak dengede tutulması gerekir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde hücreler hasar görür ve birçok patolojik durum ortaya çıkmaktadır (173). Bu bağlamda ROS'ların artışı membran bütünlüğünü sağlayan fosfolipidlerin, proteinlerin, DNA ve RNA gibi moleküllerin bütünlüğünü de tehdit etmekte, metabolik disfonksiyon ve kanser gibi birçok hastalığın sebebi olabilmektedir (174, 175). Dokularda oluşabilecek serbest radikaller ve diğer ROS ürünleri, SOD, CAT, GSH-Px, GSH-redüktaz gibi antioksidan savunma sistemleri tarafından etkili bir biçimde detoksifikasyona uğrayarak temizlenebilmektedir. ROS üretimi ve bunların yüksek aktivite gösterebilme özellikleri en az 30 yıldır bilinmesine rağmen hayati organlar üzerindeki çeşitli pato-fizyolojik etkileri hala büyük ilgi konusudur (176).

Testis çoklu doymamış lipit içerikli hücreler içermesi ve bu hücrelerin antioksidan sistemle donatılmış olması nedeniyle oksidatif stresin ana hedef organlarından (177). Serbest radikaller yüksek reaktivitelerinden dolayı hücre zarında bulunan doymamış yağ asitleri ile etkileşerek lipit peroksidasyonunu başlatabilmektedir. Oluşan lipit peroksitler kolaylıkla yıkılarak başta MDA olmak üzere birçok sekonder ürünler meydana getirebilmektedir (178). Bu ürünlerin çok çabuk bir şekilde ortamda farklı ürünlere dönüşmesi ve saptanmalarının zorluğu nedeniyle, bu çalışmada lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak TBA ile MDA arasında oluşan tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) düzeyleri analiz edilmeye çalışılmıştır.

Günümüzde, birçok kemoterapotik ve immunoterapotik ajanın toksik etkileri onların serbest radikal oluşumunu artırmasıyla ilgili olduğu bilinmektedir. Bilindiği gibi pembrolizumabın kullanımının halen yeni olmasından dolayı, deneysel olarak sıçanlara verilen pembrolizumabın ve pembrolizumab gibi yeni onaylanmış birçok immunoterapi

ilacının neden olduğu oksidatif hasar hakkında literatürde yeterli bilgi yoktur. Bu bağlamda, çalışmamız literatürdeki testis dokusunda, PEMB'in neden olduğu oksidatif hasarı ortaya koyan ilk çalışmalardan biri olacaktır. Yapılan çalışmadaki verilere göre PEMB uygulanan grubun testis dokusunda MDA düzeyinin anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır. MDA artışıyla lipitlerdeki oksidatif hasarın sonuçları tespit edilmiştir ve PEMB uygulanan testis dokusunda oksidatif hasar oluştuğu saptanmıştır.

Çok sayıda maddenin antioksidan etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılmaktadır. Oksijen metabolizması gerçekleştirilen tüm hücrelerde bulunan SOD, GSH-Px ve CAT enzimleri serbest oksijen radikalleri hasarına karşı en önemli savunma mekanizmalarını oluşturan enzimatik antioksidanlardır (179, 180). SOD, süperoksit radikallerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler oksijene parçalanmasını hızlandırarak, CAT ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin etkisizleştirilmesini katalize ederek etkilerini gösterirler (181). Bu enzim aktiviteleri çeşitli ksenobiyotiklere hafif derecede maruz kalındığında artmakta, yüksek düzeylerde olduğunda ise enzim aktivitelerinde inhibisyonlar görülebilmektedir (182).

Vo ve ark., *Z. zanthoxyloides* adı verilen hidroetanolik kök ekstraktının siklofosamid kaynaklı miyelosupresyon ve oksidatif stresi değerlendirmek için yaptıkları çalışmada CAT, SOD ve GPx'te anlamlı bir artış olduğunu göstermiştir (183).

Sammer ve ark. yaptıkları bir çalışmada resveratrolün erkek sıçanlarda doksorubisin kaynaklı serbest radikal üretimine ve kardiyotoksisiteye karşı koruyucu etkileri olup olmadığını incelemiş ve sonuç olarak verilen sıçanlarda MDA seviyesinde önemli bir artışa ve kalp dokusunda GSH düzeyinde önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte sıçanların resveratrol ile tedavisi kalpte MDA üretimini önemli ölçüde azaltmıştır (184).

Shaati 2018 yılında yaptığı bir çalışmada sisplatin ile verilmiş sıçanlarda, antioksidan enzim seviyelerinin (SOD, CAT, GSH, GPX) düştüğünü göstermiş ve beraberinde resveratrol ile tedavisinde sperm parametresini iyileştirdiğini göstermiştir (185).

Mehmet ve ark. metotraksatin total antioksidan kapasiteyi azalttığı ancak verilen resveratrolün bu etkiyi tersine çevirdiğini ortaya koymuştur (186).

Mojica ve ark. farelerin sperminde demir / askorbat tarafından indüklenen oksidatif hasar üzerindeki antioksidan aktivitesini değerlendirmişler ve bunun sonucunda resveratrol



ile muamele edilmiş spermatozada, ROS oluşumunda önemli bir düşüş, demir ile muamele edilmiş spermatozoaya göre lipid peroksidasyon konsantrasyonunda önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar resveratrolün spermatozoa üzerindeki oksidatif hasarın ürettiği zararlı etkileri önleyebilecek antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve doğurganlığın korunmasını sağladığını göstermektedir (167).

Anastrozol ile ilgili sıçanlarda testis dokusu üzerine oksidatif stresin araştırıldığı bir literatür bildiğimiz kadarıyla yoktur. Daha çok meme kanserli hastalarda olgu sunumu mevcuttur. Yalnızca bir çalışmada, Erdemir ve ark. obezitenin semen parametreleri üzerindeki etkilerini değerlendirirken sıçanlara artı anastrozol verip sonuçlarını incelemiştir. Sonuçlara göre anastrozolün oksidatif stresi engellediği gösterilmiştir (187).

Bu tez çalışmasında testis dokusunda, MDA parametresine ek olarak SOD ve CAT enzim aktivitelerine bakılarak sıçanların oksidatif stresten ne düzeyde etkilendiği araştırılmıştır. Son zamanlarda birçok tıbbi alan uygulamasında kullanılan antioksidan bir bileşik olan resveratrol ve aynı inhibitör etkiyi gösteren sentetik olarak üretilen anastrozol uygulanan sıçanların testis dokusunda SOD aktivitesi düzeyleri artmıştır. SOD enzimi aktivitesindeki bu artış oksidatif hasarın oluşmasını önlemeye çalışmıştır. Ayrıca aynı tedavi gruplarına (PEMB+ANAST ve PEMB+RES) ait CAT aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı artışlar gözlenmiştir.

Normal hücrelerde enzimatik savunma sistemi dışında birçok enzimatik olmayan savunma sistemi de bulunmaktadır. Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan ve hücrelerin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin %90 kadarını oluşturan glutatyon (GSH), zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rollere sahiptir. GSH radikal kaynaklı hasara karşı koyarken antioksidan enzimlere substrat olarak görev yapar ve bir radikal süpürücü gibi davranır (188). Bu bileşiğin aktif bir şekilde hücre dışına çıkarılması GSH tükenmesine yol açmaktadır. Bu bağlamda GSH düzeylerinde, PEMB grubunda, kontrol grubuna göre azalma olduğu saptanmıştır. PEMB uygulanan grubun GSH düzeyinde azalma olması, yapılan analizlerin birbirini destekler nitelikte olduğunun göstergesidir. Testisteki GSH havuzunun azalması, serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan antioksidan etkinliğinin azalması anlamına gelmektedir. Oksidasyonu engeleyen mekanizmanın etkinliğinin azalmasıyla testiste oksidatif hasar saptanmıştır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada immunoterapi ilacı olan PEMB uygulaması ile MDA seviyesinin anlamlı bir şekilde miktarda arttığını ve SOD, CAT, GSH-Px, GSH

seviyelerinin de anlamlı şekilde azaldığını bulduk. PEMB+ANAST ve PEMB+RES tedavi gruplarında ise oluşan hasarın resveratrol ve anastrozol tarafından azaltıldığını gözlemledik. Aynı gruplarda MDA seviyesi azalırken SOD, CAT, GSH-Px ve GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu.

### **Spermatolojik Değerlendirme**

Pembrolizumab uygulaması epididimal sperm konsantrasyonu ve motilitesini azaltmış, anormal sperm oranını artırmış ve organ ağırlıklarında (testis ağırlıkları, epididimis ağırlıkları, seminal vezikül ağırlıkları ve prostat ağırlıkları açısından) azalmaya neden olmuştur. Ancak organ ağırlıklarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Yücel C ve ark. yaptığı, sisplatin tedavisinin testis dokusu ve spermatogenez üzerindeki yıkıcı etkilerinin retinoik asit uygulanarak azaltıldığını gösteren çalışmasında, 7 mg/kg dozunda verilen sisplatinin sıçanlarda sperm hareketliliği ve sayısını belirgin şekilde azalttığını bulmuştur ve bu sonuç çalışmamızla paralellik göstermiştir (189). Bununla birlikte, aynı çalışma retinoik asitle tedavi edilen gruplarının sperm hareketliliği ve sayısını artırdığını, anormal sperm sayısını azalttığını bulmuştur. Bizim çalışmamızda da, bahsi geçen çalışmayla benzer olarak PEMB+RES ve PEMB+ANAST gruplarında, PEMB grubuna kıyasla sperm kalitesinde etkili bir artış olduğunu; anormal sperm oranı azalırken sperm konsantrasyon ve motilitesinde güçlü bir artış olduğunu tespit ettik. PEMB uygulamasından sonra sperm hareketindeki bu azalma ve anormal sperm konsantrasyonundaki artışların sebebi, artan serbest radikal üretimi, azalmış antioksidan enzimler ve pembrolizumabın sperm oluşumundaki metabolik yollardan biri olan spermin flagellum hareketi için gereksinim duyduğu ATP tükenmesi ile açıklanabilir. Bu bağlamda PEMB toksisitesi oluştuğunda, antioksidan özelliklerinden dolayı ANAST ve RES tedavisi faydalı olabilir ve PEMB'in neden olduğu kısırlığı olumlu yönde etkileyebilir.

Literatürdeki pembrolizumab ile ilgili infertilite çalışmaları henüz tamamlanmamıştır. Sperm üretimi ve işlevinin sağlıklı olabilmesi ve üreme sisteminin düzgün çalışması için kullanılan ilaçların testis toksisitesi ile ilgili çalışmalar tamamlanmalıdır. İlk immunoterapi çalışması ise GCT (relaps edilmiş germ hücreli tümörü) hastalarında yapılmıştır ancak klinik olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir. Aynı çalışmada testis kanseri hastalarından alınan tümör örneklerinde sık PD-L1 ekspresyonu

bildirilmiştir, bu hastaların PD-1 veya PD-L1 inhibisyonunu hedef alan immünoterapi yaklaşımlarından potansiyel olarak faydalanabileceğini düşündürmektedir (190).

Başka bir çalışmada Turner ve ark. anastrozole tedavi edilen sıçanların çoğunda normal spermatogenezis testisleri görülmüştür, ancak bazı seminifer tübülleri anormal germ hücrelerinin kaybını göstermiştir (106).

Anastrozol etki mekanizmasına benzer olarak ilaç dışı doğal aromataz inhibitör görevini üstlenen resveratrol de östrojen inhibisyonunda etkin besin maddesi olarak yer almaktadır. Antioksidan polifenol olan resveratrol en çok siyah üzümün kabuğunda bulunmaktadır. Serbest radikallere karşı mücadele eden sistemleri harekete geçirerek vücudu korur. Resveratrolün, göğüs, prostat, mide, kolon, pankreas ve tiroid kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği bilinmektedir. Bir çalışmada Reddy ve ark. sisplatinle indüklenmiş testis toksisitesine karşı RES'in testis ve epididimiste oksidatif hasarı iyileştirdiği görülmektedir (191). Benzer şekilde azoksimetan, doksorubisin, metotreksat gibi kemoterapötik ajanlarla indüklenmiş sıçanlarda RES'in koruyucu rolü ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (192-194). Uğuralp ve ark. 2005 yılında RES'in deneysel testiküler torsiyon sonrasında sıçan germ hücrelerinin apoptozunu azalttığını göstermişlerdir (195). Bu bağlamda RES'in testis metabolizmasındaki koruyucu rolü, sperm üretimini artırması oksidatif stresi azaltarak apoptotik mekanizma üzerinden sağladığı literatürlerle desteklenmektedir. Çalışmamızda bu bulgularla uyumlu olarak ANAST ve RES tedavisinin PEMB'nin neden olduğu fonksiyonel testiküler hasarı etkin şekilde azalttığını gözlemledik.

### **Histopatolojik Değerlendirme**

Perret ve ark. yaptığı çalışmada testis dokusunda pembrolizumab tedavisinin histopatolojik hasarı artırdığını belirlemişlerdir (196). Benzer şekilde 2018 yılında yapılmış bir tez çalışmasında paklitakselin oluşturduğu testis hasarı incelendiğinde, dokularda paklitaksel grubunda germinal epitelde düzensizlikler, nekrotik tübüllerin sayısında artış, intersitisyel bağ dokusu alanlarında genişleme ve hemoraji gözlenmiştir (197). Tedavi olarak verilen resveratrol bu etkileri tersine çevirmiştir. Çalışmamızda yer alan histopatolojik sonuçlara göre Şekil 4.2'de görüldüğü üzere PEMB grubunda testis dokusunda seminifer tübül yapılarında bozulma, vasküler konjesyon, kapsül altında ve intestisyel alanda ödem, vakuolizasyon, seminifer tübül lümenine dökülmüş hücreler, tübül lümeninde ödem ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler olduğu gözlemlendi. Ek olarak,

bulgularımız ANAST ve RES birlikte kullanıldığında histopatolojik hasarın azaldığını göstermektedir. Bu hasarlar çoklu doymamış membran lipidi içeren hücrelerin oksidatif atak sonucunda zarar görmesi sonucunda oluşmuş olabilirler.

Kurus ve ark. azoksimetan (AOM) kaynaklı testis hasarında, AOM alan gruplarda, tunika albugineanın bağ dokusunda artış, atrofi, germ hücrelerinin sayısı ve spermatojenik hücre sayısındaki azalma, tübüllerde dejeneratif değişiklikler olduğu bulundu. RES tedavisinin, etkilenen seminifer tübüllerin sayısını, AOM'a kıyasla anlamlı şekilde azalttığını göstermiştir (193).

Anastrozol güçlü ve seçici bir aromataz inhibitörüdür (198). Turner ve ark. yaptıkları bir çalışmada, anastrozolu sıçanların içme suyuna katmışlar ve anastrozol ile tedavi edilen sıçanlardan alınan testislerin histolojik değerlendirmesine baktıklarında spermatogenezin iyi derecede normal olduğunu ortaya koymuşlardır (106). Bu tez çalışmasında yapılan çalışmalarla paralel olarak histopatolojik etkilerin, pembrolizumabın indüklediği testis dokusunda oksidan ve antioksidan arasındaki dengesizliğe bağlı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca bu durum sperm fonksiyonunu azaltarak erkek kısırlığına da katkıda bulunabilir. Bu sebeple, anastrozol ve resveratrol ile tedavi edilen testis dokusunda oksidatif stresin azalması kısırlık açısından çok önemlidir. Ayrıca bu oksidatif stresin azalmasının resveratrol ve anastrozolün antioksidan özelliklerine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Hemotoksilen boyamaya ek olarak bu çalışmada tübül çağı (MSTD) ve tübül epitel kalınlığı (GECT)'da ölçülmüştür. Tablo 4.5'de görüldüğü gibi PEMB grubunda MSTD ve GECT değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma söz konusudur. PEMB+ANAST ve PEMB+RES grubunda ise, MSTD ve GECT değerleri PEMB grubuna göre etkili bir artış göstermiş olup, hasarın kısmen tolere edilmiş olduğunu işaret etmektedir. Ancak iki tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur. Bu bilgiler ışığında PEMB in testiküler dokuda ciddi hasar oluşturduğu ve anastrozol ve resveratrolün ayrı ayrı bu hasarı azalttığını gözledik.

Çalışmamızda apoptotik hücreler, immunohistokimyasal yöntemle kaspaz-3 aktivitesi kullanılarak belirlendi. Kaspazlar, hücre intiharı olarak bilinen apoptoz olayı esnasında önemli rol oynayan sistein-proteinaz grubu enzimlerdir ve apoptoz sırasında meydana gelen bazı hücresel değişiklikler bu enzimlerin etkin olduğu durumlar sonucunda gerçekleşir (202). Doksorubisin ile yapılan bir çalışmada, 7.5 mg/kg/hafta dozda uygulanan

Wistar grubu sıçanlarda, tedaviden 21 ve 28 gün sonra, testisler, eksik bir hücre tabakası ile sonuçlanan büyük miktarda germ hücresi kaybını sergilemiştir (203). Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizde çalışmamızda PEMB grubunda yoğun olarak boyanmış Kaspaz-3 pozitif hücreler olduğunu, PEMB+ANAST ve PEMB+RES grubunda ise pozitif boyanmış hücre sayısında ve boyanma yoğunluğunda belirgin derecede azalma olduğunu tespit ettik. Kontrol, RES ve ANAST gruplarında ise Kaspaz-3 immünreaktivitesi gözlenmemiştir.

### **Serum Testeseron ve PD-1 seviyelerinin Elisa yöntemiyle değerlendirilmesi**

Bu çalışma, serum testosteron seviyesinin, sıçanlarda PEMB maruziyeti ile belirgin bir şekilde azaldığını göstermiştir. Bununla birlikte ANAST ve RES tedavisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tek başına verildiklerinde serum testosteron seviyelerini değiştirmedir. Öte yandan, her iki tedavide de (PEMB+ANAST ve PEMB+RES) ayrı ayrı PEMB'in testosteron düzeyleri üzerindeki toksik etkisini tersine çevirdi ve testosteron seviyelerini arttırdı.

Yapılan birçok çalışmada ANAST ve RES tedavisinin testosteron düzeylerinin anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir. Bir çalışmada anastrozol ile tedavi edilen sıçanlarda testosteron konsantrasyonlarının, tedavinin ilk 19 haftasında anlamlı olarak arttığını göstermiştir (106). Benzer şekilde anastrozolün spermatogeneze etkisiyle ilgili yapılan bir çalışmada, anastrozol ile tedavi edilen hastanın testosteronunun normalleşmesine, LH ve folikül uyarıcı hormon (FSH) seviyelerinin normalleşmesine, serum estradiol seviyelerinin baskılanmasına ve spermatogenez ve fertilitenin normalleşmesine yol açtı (199). Testosterondaki benzer artışlar, eugonadal yaşlı erkeklere günde 2 mg anastrozol verilen kısa süreli bir çalışmada da bildirilmiştir (200). Anastrozol ile aynı etken maddeye sahip olan letrozol adlı ilaçla yapılan bir çalışmada ise, metotreksat kaynaklı testiküler toksisiteye karşı, bu ilaç spermatogenezi ve sperm canlılığını geliştirmiş, ayrıca oksidatif stres belirteçleri ve hücrel sitokinlerin seviyelerini düşürmüştür (201).

Resveratrol ile yapılan çalışmalara bakıldığında, sisplatin ile uygulama yapılan sıçanlarda, resveratrol tedavisinin testosteron, FSH ve LH düzeylerini düzenlediği gözlenmiştir (185).

Özatic ve ark. testis toksisitesi oluşturdukları farelerde, resveratrolün testis germ hücreleri üzerindeki koruyucu rollerini araştırmışlar ve 20 mg/kg dozda uyguladıkları resveratrol ile testosteron seviyelerinde önemli artışlar gözlemlemişlerdir (202).

Bilindiği gibi pembrolizumab yeni onaylanan bir ilaç olması sebebiyle sıçanlarda testosteron düzeyleri üzerindeki etkileri ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Pembrolizumabın spermatogenezde sebep olduğu hasarın, LH reseptörü ekspresyonu, mitokondriyal sitokrom P450 de bozulma ve bu enzimin aktivitesinin azalması, bu nedenle testosteron üretimindeki ilk adımlara müdahale etmesi ile etkileşime girerek ortaya çıkabileceğini düşündük. Bu bağlamda yapılan tez çalışması pembrolizumab ilacı ile hormonal parametrelerin incelenmesi açısından literatüre kazandırılacak çalışmalar arasındadır.

Üreme sistemi sertoli, leydig, germ hücreleri ve kan damarlarından oluşmaktadır. Sertoli hücrelerinin PDL-1 salgılayarak T hücrelerinin testis aktivitesini kontrol ettiği ve böylelikle inflamasyonu önlediği bilinmektedir (203). Onisto ve ark. PD-1 reseptörünün spermatogenezin düzenlenmesinde ve erkek fertilitesinde aktif rol oynadığını ortaya koymuşlardır (204). Bu bağlamda PEMB uygulaması PD-1 reseptör blokajına sebep olarak testiste sperm üretiminin durmasına sebep olabilir.

Bu tez çalışmasında PD-1 ekspresyon seviyeleri Elisa sonuçları ile değerlendirildi. Ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde PEMB uygulaması yapılan sıçanlarda serum PD-1 düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. Ancak tedavi olarak verilen RES ve ANAST, PD-1 seviyelerini değiştirmedi. PD-1 seviyesi bu tedavi sonucu artmış olsaydı, PD-1 sayısının artışına bağlı olarak ilacın etkinliğinde azalma görülebilirdi. Bu bağlamda elde ettiğimiz sonuç beklenen ve istenilen bir sonuçtur. Çalışmamıza benzer olarak, Zhang ve ark. yaptıkları bir çalışmada kanser ağrısı olan hastaların PD-1 ifade oranını normal hastalardan daha yüksek olarak bulmuştur (205). Liu ve ark. hepataselüler karsinomlu hastalarda kan serumlarında PD-1 seviyelerinin artmış olduğunu göstermiştir (206). Çalışmalara bakıldığında sıçanlarda PEMB toksisitesine bağlı olarak serumda PD-1 ifadeleri değerlendirilmemiştir. Aynı şekilde RES ve ANAST tedavisinin, bugüne kadar PD-1 ile ilişkilendirildiği çalışmalar görülmemektedir. Bu bağlamda yapılan bu çalışma literatüre kazandırılacak ilk çalışmalardan biri olması açısından önem arz etmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antikanser ilaçların bulunması ve yeni ilaçların geliştirilmesi, yaşam süresinin uzaması ve hayat kalitesinin artması açısından çok büyük önem taşımaktadır. Üretilen ilaçların yan etkileri ve bu konu üzerine yapılan erkek fertilité çalışmalarına bakıldığında, gelecekte önemli bir infertilite sıkıntısı yaşanacağı mevcuttur. Yan etkilerin azaltılmasına yönelik günümüzdeki tedaviler hormon, antioksidan uygulaması ve sperma kriyoprezervasyonu olarak bilinmektedir.

Bu tez çalışması sonucunda erkek sıçanlarda testis dokusunda immunoteröpötik ilaçlardan PEMB'in neden olduğu reproduktif hasara karşı, aromataz inhibitörlerinde olan sentetik anastrozol ve doğal aromataz inhibitörü olan resveratrolün koruyucu etkileri olduğu gözlemlendi.

Histopatolojik olarak PEMB ile hasar oluşturulan grupta testiste, seminifer tübül yapılarında bozulma, vasküler konjesyon, kapsül altında ve intestisyel alanda ödem, vakuolizasyon, seminifer tübül lümenine dökülmüş hücreler, tübül lümeninde ödem ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler olduğu tespit edildi. PEMB+ ANAST ve PEMB + RES gruplarını oluşturan sıçanların testis örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde, histopatolojik hasarın her iki grupta da belirgin şekilde azaldığı, spermatogenik hücrelerin korunduğu gözlemlendi. İmmunohistokimyasal olarak ise PEMB grubunda belirgin derecede yoğun boyanmış Kaspaz-3 pozitif hücreler gözlemlendi. PEMB + ANAST ve PEMB + RES gruplarında Kaspaz-3 pozitif boyanmış hücrelerin sayısında ve boyanma yoğunluğunda belirgin derecede azalma olduğu tespit edildi. Kontrol, ANAST ve RES gruplarında ise Kaspaz-3 immunreaktivitesi gözlenmedi. Bu bağlamda PEMB uygulaması histopatolojik hasarı artırırken, anastrozol ve resveratrol ile ayrı ayrı yapılan aromataz inhibitör tedavileri oluşan hasarı gidermiştir.

Biyokimyasal analizlerde 5 mg/kg/hafta dozunda uygulanan PEMB doku hasarı göstergesi olan TBARS seviyesini anlamlı ölçüde artırmış; antioksidan sistem parametreleri olan SOD, CAT, GPx (enzimatik) ve GSH (enzimatik olmayan) seviyelerini belirgin şekilde azaltmıştır. Bunun sonucunda da anormal sperm oranı artmış ve sperm motilite ve konsantrasyonu azalmıştır. 5 mg/kg/hafta dozunda PEMB ile beraber 20 mg/kg/gün dozunda RES ve 2 mg/kg/gün dozunda ANAST uygulanması sonucunda TBARS seviyesi azalmış ve SOD, CAT, GPx ve GSH seviyeleri artmıştır. Bu değişiklikler anlamlı ölçüde olup sperm konsantrasyonu ve motilitesinin artması ve anormal sperm oranının azalması ile kendisini

göstermiştir. Benzer şekilde PEMB ilacına maruz kalan sıçanlarda testosteron seviyeleri azalırken tedaviyle birlikte hormonal parametreler kontrol grubuna yaklaşmıştır. Bununla birlikte PEMB uygulamasıyla sıçanlarda testis dokusunda PD-1 seviyeleri azalmış, verilen tedaviler bu ifade seviyelerini değiştirmemiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması anastrozol ve resveratrol uygulamasının, sıçanlarda pembrolizumab ile oluşturulan testis hasarını biyokimyasal ve histopatolojik olarak azalttığını ve spermatogenezin devamlılığını sağladığını göstermektedir. Anastrozol ve resveratrolün reproduktif koruyuculuğu üzerine daha fazla çalışma yapılabilir. Yeni nesil ilaç olan pembrolizumab ilacını alan hastalarda infertilite açık bir şekilde tehdit etkenidir. Bu bağlamda ilacın kullanımıyla alakalı toksik etkiler dikkate alınmalı ve toksisiteyi engelleyici alternatif tedavi yöntemleri araştırılmalıdır.



## KAYNAKLAR

1. Cancer Facts & Figures. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2010.html> 01 06 2019.
2. Casciato DA, Lowitz BB. *Manual of Clinical Oncology*, 2<sup>nd</sup> ed. Little Brown and Company, Boston, 1988:462.
3. Fırat D, Küçüksu N. *Kanser Konusunda Genel Bilgiler*, 1.baskı. Ankara, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu yayınları,1987.
4. Williams G. *Genotoxic and Epigenetic Carcinogens Safety Evaluation and Regulation of Chemicals 2. Impact of Regulations-Improvement of Methods*, 2<sup>nd</sup>ed. Basel, Karger, 1985:251-6.
5. Breast Cancer Facts & Figures. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/breast-cancer-facts-figures.html> 18 05 2019.
6. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med* 2016, 14-73.
7. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* 2018, 153-67.
8. Smit EF, Haanen J. Pembrolizumab in Small-Cell Lung Cancer: In Search of the Best Biomarker. *J Clin Oncol* 2017, 35: 3794-5.
9. Longoria TC, Tewari KS. Evaluation of the pharmacokinetics and metabolism of pembrolizumab in the treatment of melanoma. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2016, 12: 1247-53.
10. Aslan G. Tümör İmmünolojisi. *Turk J Immunol* 2010, 15: 7-13.
11. Kudrin A. Cancer immunotherapy: Paradigms, practice and promise. *Hum Vaccin Immunother* 2013, 9:1553-4.
12. Eskander RN, Tewari KS. Immunotherapy: an evolving paradigm in the treatment of advanced cervical cancer. *Clin Ther* 2015, 37: 20-38.
13. Parish CR. Cancer immunotherapy: the past, the present and the future. *Immunol Cell Biol* 2003, 81: 106-13.
14. Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* 2003, 9: 269-77.
15. Friedman C, Postow M. Managing Immunotherapy-related Side Effects. *Oncol Hematol Review*, 2015, 11:143-4.
16. Kutluk T, Kars A. *Kanser Konusunda Genel Bilgiler*, 6.Baskı. Ankara,Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, 1994:9-14.

17. Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 11 th ed. Philadelphia, 2010, 464: 989-90.
18. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *World J Clinical Oncol* 2016, 7: 54.
19. Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Health Sci Jour* 2016, 154.
20. Tuncer M. Kanser in ülkemiz ve dünyadaki önemi, hastalık yükü ve kanser kontrol politikaları. İçinde:Özgül N, Olcayto E, Gültekin M (editörler). *Türkiye’de Kanser Kontrolü*, 1.baskı. Ankara, Sağlık Bakanlığı Yayınları 2009, 5-9.
21. Skurla M, Rybar R. Obesity and reduced fertility of men. *Ceska gynekol* 2018, 83: 212-17.
22. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 2002, 77: 873-82.
23. Poongothai J, Gopenath T, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 2009, 50: 336-47.
24. Walker WH. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* 2009, 74: 602-07.
25. Delbes G, Hales BF, Robaire B. Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Basic Sci Repro Med* 2009, 16: 14-22.
26. Ragheb AM, Sabanegh J, Edmund S. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Med Chem* 2010, 10: 92-102.
27. Schrader M, Müller M, Straub B, Miller K. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects. *Reprod Toxicol* 2001, 15: 611-17.
28. Demirci U, Benekli M, Büyükberber S, Coşkun U. Lateside effects of cancer therapy. *Int J Hematol Oncol* 2010, 4: 61.
29. Agarwal A, Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum Fertil* 2010, 13: 217-25.
30. Meistrich M. Restoration of spermatogenesis by hormone treatment after cytotoxic therapy. *Acta Paediatr* 1999, 88: 19-22.

31. Tempest H, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A, Martin R. Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Hum Reprod* 2007, 23: 251-8.
32. Barbaros B. Kanser İmmünoterapisi. *Erciyes Üni Fen Bilim Enst Derg* 2015, 31.
33. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nat* 1975, 256: 495-7.
34. Hamid O. Emerging treatments in oncology: focus on tyrosine kinase (erbB) receptor inhibitors. *J Am Pharm Assoc* 2004, 44: 52-8.
35. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001, 344: 783-92.
36. Los M, Roodhart JM, Voest EE. Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *The oncol* 2007, 12: 443-50.
37. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, Wey K, Royson I, Davis T, Levy R. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997, 90: 2188-95.
38. Wood AM. Rituximab: an innovative therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Health syst pharm* 2001, 58: 215-29.
39. Elloumi J, Jellali K, Jemel I, Aifa S. Monoclonal antibodies as cancer therapeutics. *Rec Pat on Bio* 2012, 6: 45-56.
40. Özet G, Baykal Y, Özet A, Alanoğlu G. Adoptif İmmünoterapi. *T Klin Tıp Bilimleri Der* 1996, 16: 329-32.
41. Harris TJ, Drake CG. Primer on tumor immunology and cancer immunotherapy. *J Immunother Canc* 2013, 1-12.
42. Aslan G. Tümör İmmünolojisi. *Turk J Immunol* 2010, 15: 7-13.
43. Şakalar Ç, İzgi K, Canatan H. Kanser immün terapi ve monoklonal antikolarlar. *FÜ Sağ Bil Tıp Derg* 2013, 27: 105- 11.
44. American Cancer Societya. Cancer Immunotherapy <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy.html>. 16 Nisan 2019.

45. Chen Y, Hu D, Cheong K, Li J, Xie J, Zhao J, Li S. Quality evaluation of lentinan injection produced in China. *J Pharm Biomed Anal* 2013, 78: 176-82.
46. Naidoo J, Page D, Li B, Connell L, Schindler K, Lacouture M, Postow M, Wolchok J. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann Oncol* 2015, 26: 2375-91.
47. Heinzerling L, Ott PA, Hodi FS, Husain AN, Tajmir-Riahi A, Tawbi H, Pauschinger M, Gajewski TF, vd. Cardiotoxicity associated with CTLA4 and PD1 blocking immunotherapy. *J Immunother Canc* 2016, 4: 50.
48. Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 1988, 18: 1901-5.
49. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nat* 1987, 328: 267-70.
50. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995, 182: 459-65.
51. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Scie* 1995, 270: 985-8.
52. Syn NL, Teng MW, Mok TS, Soo RA. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet Oncol* 2017, 18: 731-41.
53. Erdogdu IH. MHC Class 1 and PDL-1 Status of Primary Tumor and Lymph Node Metastatic Tumor Tissue in Gastric Cancers. *Gastroentero Res Prac* 2019, 1-7.
54. Constantinidou A, Alifieris C, Trafalis DT. Targeting Programmed Cell Death-1 (PD-1) and Ligand (PD-L1): A new era in cancer active immunotherapy. *Pharmacol Ther* 2018, 194:84-106.
55. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* 2016, 39: 98-106.
56. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrin A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Natu* 2014, 515: 563-7.

57. Johnson DB, Balko JM, Compton ML, Chalkias S, Gorham J, Xu Y, Hicks M, Puzanov I, Alexander MR, Bloomer T, Becker J, Slosky D, Philips E, Pilkinton M, Owens LC, Kola N, Plautz G, Reshef D, Deutsch J, Deering R, Olenchock B, Lichtman A, Roden D, Seidman CE, Koralnik I, Seidman J, Hoffman R, Taube J, Diaz LA, Anders R, Sossman JA, Mosleji JJ. Fulminant myocarditis with combination immune checkpoint blockade. *N Engl J Med* 2016, 375: 1749-55.
58. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, Walsh LA, Postow MA, Wong P, Ho TS, Hollmann TJ, Bruggeman C, Kannan K, Li Y, Elipenahli C, Liu C, Harbison CT, Wang L, Ribas A, Wolchok JD, Chan TA. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2014, 371: 2189-99.
59. Puzanov I, Diab A, Abdallah K, Bingham C, Brogdon C, Dadu R, Hamad L, Kim S, Lacouture ME, LeBoeuf NR, Lenihan D, Onofrei C, Shannon V, Sharma R, Silk AW, Skondra D, Suarez-Almazor ME, Wang Y, Wiley K, Kaufman HL, Ernstoff MS. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *J Immunother Canc* 2017, 5: 95.
60. Emens LA. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Canc Res* 2018, 24: 511-20.
61. Pillai RN, Behera M, Owonikoko TK, Kamphorst AO, Pakkala S, Belani CP, Khuri FR, Ahmed R, Ramalingam SS. Comparison of the toxicity profile of PD-1 versus PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer: A systematic analysis of the literature. *Canc* 2018, 124: 271-7.
62. Hematology/oncology cancer approvals-safety notifications. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/hematologyoncology-cancer-approvals-safety-notifications>.17.05.2019
63. Collins LK, Chapman MS, Carter JB, Samie FH. Cutaneous adverse effects of the immune checkpoint inhibitors. *Curr Probl Canc* 2017, 41: 125-8.
64. Diamantopoulos PT, Tsatsou K, Benopoulou O, Anastasopoulou A, Gogas H. Inflammatory Myopathy and Axonal Neuropathy in a Patient With Melanoma Following Pembrolizumab Treatment. *J Immunother* 2017, 40: 221-3.
65. Feng S, Coward J, McCaffrey E, Coucher J, Kalokerinos P, O'Byrne K. Pembrolizumab-induced encephalopathy: a review of neurological toxicities with immune checkpoint inhibitors. *J Thor Oncol* 2017, 12: 1626-35.

66. Makarios D, Horwood K, Coward JIG. Myasthenia gravis: An emerging toxicity of immune checkpoint inhibitors. *Eur J Canc* 2017, 82: 128-36.
67. Yervoy (ipilimumab) package insert. Princeton, NJ: Bristol-Myers Squibb Company. 2015, 1-3.
68. Opdivo (nivolumab) injection package insert. Princeton, NJ: Bristol-Myers Squibb Company. 2017, 2-4.
69. Keytruda (pembrolizumab) injection package insert. Whitehouse Station, NJ: Merck Sharp and Dohme Corp. 2017, 1-5.
70. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Wolchok JD, Hersey P, Joseph R, Weber JS, Dronca R, Mitchell TC, Patnaik A, Zarour HM, Joshua AM, Zhao Q, Jensen E, Ahsan S, Ibrahim N, Ribas A. Five-year survival outcomes for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001. *Ann Oncol* 2019, 100-15.
71. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci* 2002, 99: 12293-7.
72. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies DB, vd. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Canc Res* 2005, 65: 1089-96.
73. Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, Okada Y, Komoto S, Watanabe C, Kurihara C, Kawaguchi A, Nagao S, Azuma M, Yagita H, Miura S. Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. *Int J Oncol* 2009, 35: 741-9.
74. Wong RM, Scotland RR, Lau RL, Wang C, Korman AJ, Kast W, Weber JS. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *Int immunol* 2007, 19: 1223-34.
75. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC, David O, Burow M, Gordon A, Dhurandhar N, Myers L, Berggren R, Hemminki A, Alvarez RD, Emilie D, Curiel DT, Chen L, Zou W. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 2003, 9: 562.
76. Zhang Y, Huang S, Gong D, Qin Y, Shen Q. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cell Mol Immunol* 2010, 7: 389.

77. Giavina-Bianchi MH, Giavina-Bianchi PFJ, Festa CN. Melanoma: tumor microenvironment and new treatments. *An Bras Dermatol* 2017, 92: 156-66.
78. Swaika A, Hammond WA, Joseph RW. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Mol Immunol* 2015, 67: 4-17.
79. Wang LL, Li ZH, Duan YG, Yuan SQ, Mor G, Liao AH. Identification of programmed cell death 1 and its ligand in the testicular tissue of mice. *Am J Reprod Immunol* 2019, 81:13079.
80. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil C, Lotem M, Larkin J, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Hamid O, Mateus C, Shapira-Frommer R, Kosh M, Zhou H, Ibrahim N, Ebbinghaus S, Ribas A. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2015, 372: 2521-32.
81. Nauts HC, Fowler GA, Bogatko FH. A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study. *Acta Med Scan Suppl* 1953, 276: 1-103.
82. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Scie* 2011, 331: 1565-70.
83. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nat* 2001, 410: 1107-11.
84. Delivanis DA, Gustafson MP, Bornschlegl S, Merten MM, Kottschade L, Withers S, Dietz AB, Ryder M. Pembrolizumab-Induced Thyroiditis: Comprehensive Clinical Review and Insights Into Underlying Involved Mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 2017, 102: 2770-80.
85. Bajwa R, Cheema A, Khan T, Amirpour A, Paul A, Chaughtai S, Patel S, Patel T, Bramson J, Gupta V, Levitt M, Asif A, Hossain M. Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors (Programmed Death-1 Inhibitors and Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4 Inhibitors): Results of a Retrospective Study. *J Clin Med Res* 2019, 11: 225-36.
86. Koltan SO, Güvenal T. İnfertilite Tedavisinde Aromataz İnhibitörleri. *Türkiye Klinikleri JCOG* 2012, 5: 92-6.

87. Inkster S, Yue W, Brodie A. Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80: 1941-7.
88. Bulun SE, Simpson ER. Aromatase expression in women's cancers. *Adv Exp Med Biol* 2008, 630: 112-32.
89. BJA F. *Aromatase Inhibitors*, 2<sup>nd</sup> ed. Germany, Birkhauser, 2008:1-21.
90. Mohamed I, Yeh JK. Alfacalcidol prevents aromatase inhibitor (Letrozole)-induced bone mineral loss in young growing female rats. *J Endocrinol* 2009, 202: 317-25.
91. Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rabaglio M, Smith I, Wardley A, Price KN, Goldhirsch A. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med* 2005, 353: 2747-57.
92. Shuling L, Sie Kuei ML, Saffari SE, Jiayun Z, Yeun TT, Leng JPW, Viardot-Foucault V, Nadarajah S, Chan JKY, Hao TH. Do men with normal testosterone-oestradiol ratios benefit from letrozole for the treatment of male infertility? *Reprod Biomed Online* 2019, 38: 39-45.
93. Kubatka P, Sadlonova V, Kajo K, Nosolova G, Ostatnikova D, Adamicova K. Chemopreventive effects of anastrozole in a premenopausal breast cancer model. *Anticancer Res* 2008, 28: 2819-23.
94. Gangadhara S, Bertelli G. Long-term efficacy and safety of anastrozole for adjuvant treatment of early breast cancer in postmenopausal women. *Ther Clinical Risk Manag* 2009, 5: 291-00.
95. Yaşa C. İnfertilitesi olan olguların IVF sikluslarında aromataz inhibitörleri kullanımının klinik etkinliğe katkılarının araştırılması. İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, İstanbul:İstanbul Üniversitesi, 2010.
96. Ding H, Fang L, Xin W, Tong Y, Zhou Q, Huang P. Cost- effectiveness analysis of fulvestrant versus anastrozole as first- line treatment for hormone receptor- positive advanced breast cancer. *Eur J Cancer Care* 2017, 26: 1273.
97. Ellis MJ. Lessons in precision oncology from neoadjuvant endocrine therapy trials in ER+ breast cancer. *The Breast* 2017, 34: 104-07.
98. Nave R, Klein S, Müller A, Chang X, Höchel J. Absence of Effect of Intravaginal Miconazole, Clindamycin, Nonoxynol- 9, and Tampons on the Pharmacokinetics of an Anastrozole/Levonorgestrel Intravaginal Ring. *J Clin Pharma* 2018, 58: 97-106.
99. Wilkinson K. Anastrozole (Arimidex). *Clin J Oncol Nurs* 2004, 8: 87-8.



100. Veldhuis JD, Dufau M. Estradiol modulates the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. *J Clin Invest* 1987, 80: 631-8.
101. Leder BZ, Finkelstein JS. Effect of aromatase inhibition on bone metabolism in elderly hypogonadal men. *Osteoporos Int* 2005, 16: 1487-94.
102. Fischer J, Ganellin CR, Ganesan A, Proudfoot J. *Analogue-based drug discovery*, 1<sup>st</sup> ed. Germany, Wiley VCH, 2010:83.
103. Zhang Y, Wu J, Zhou Y, Yin Y, Chen H. Effects of psoralen on the pharmacokinetics of anastrozole in rats. *Pharma Biol* 2018, 56: 433-9.
104. Wellington K, Faulds DM. Anastrozole: in early breast cancer. *Drugs* 2002, 62: 2483-90.
105. Gregoriou O, Bakas P, Grigoriadis C, Creatsa M, Hassiakos D, Creatsas G. Changes in hormonal profile and seminal parameters with use of aromatase inhibitors in management of infertile men with low testosterone to estradiol ratios. *Fertil Steril* 2012, 98: 48-51.
106. Turner K, Morley M, Atanassova N, Swanston I, Sharpe R. Effect of chronic administration of an aromatase inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. *J Endocrinol* 2000, 164: 225-38.
107. Verma R, Krishna A. Effect of Letrozole, a selective aromatase inhibitor, on testicular activities in adult mice: both in vivo and in vitro study. *Gen Comp Endocrinol* 2017, 241: 57-68.
108. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* 2000, 106: 1553-60.
109. Kyvernitakis I, Albert U, Kalder M, Winarno A, Hars O, Hadji P. Effect of anastrozole on hormone levels in postmenopausal women with early breast cancer. *Climact* 2015, 18: 63-8.
110. Leder BZ, LeBlanc KM, Schoenfeld DA, Eastell R, Finkelstein JS. Differential effects of androgens and estrogens on bone turnover in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88: 204-10.
111. Lee H, Finkelstein JS, Miller M, Comeaux SJ, Cohen RI, Leder BZ. Effects of selective testosterone and estradiol withdrawal on skeletal sensitivity to parathyroid hormone in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91: 1069-75.
112. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2187> 22 Mayis 2019.

113. Gaillard S, Stearns V. Aromatase inhibitor-associated bone and musculoskeletal effects: new evidence defining etiology and strategies for management. *BCR* 2011, 13: 205.
114. Kalam A, Talegaonkar S, Vohora D. Effects of raloxifene against letrozole-induced bone loss in chemically-induced model of menopause in mice. *Mol Cel Endocrinol* 2017, 440: 34-43.
115. Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 2005, 16: 449-66.
116. Hu C, Liu Y, Teng M, Jiao K, Zhen J, Wu M, Li Z. Resveratrol inhibits the proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells by suppressing EZH2 through the modulation of ERK1/2 signaling. *Cell Biol Toxicol* 2019: 1-12.
117. Rodriguez-Enriquez S, Pacheco-Velazquez SC, Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Robledo-Cadena DX, Hernandez-Resendiz I, Garcia-Garcia JD, Belmont-Diaz J, Lopez-Marure R, Hernandez-Esquivel L, Sanchez-Thomas R, Moreno-Sanchez R. Resveratrol inhibits cancer cell proliferation by impairing oxidative phosphorylation and inducing oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019, 370:65-7.
118. Savouret JF, Quesne M. Resveratrol and cancer: a review. *Biomed Pharma* 2002, 56: 84-7.
119. Chan MM. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharma* 2002, 63: 99-104.
120. Rodrigo R, Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006, 142: 317-27.
121. Wang J, Ho L, Zhao Z, Seror I, Humala N, Dickstein DL, Thiyagarajan M, Percival SS. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates A $\beta$  neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Faseb J* 2006, 20: 2313-20.
122. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 2003, 36: 79-87.
123. Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee M-J, Yang CS. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agricult Food Chem* 2004, 52: 935-42.
124. Adams MR, Kinlay S, Blake GJ, Orford JL, Ganz P, Selwyn AP. Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanisms in the genesis of ischemic syndromes. *Annu Rev Med* 2000, 51: 149-67.

125. Aumont V, Krisa S, Battaglia E, Netter P, Richard T, Mérillon J-M, Magdalou J, Sabolovic N. Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans-and cis-resveratrol in human. *Arch Biochem Biophys* 2001, 393: 281-9.
126. Bertelli A, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement J. Plasma, urine and tissue levels of trans-and cis-resveratrol (3, 4', 5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int J Tissue Reac* 1996, 18: 67-71.
127. Lamuela-Raventos RM, Waterhouse AL. Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method. *J Agricult Food Chem* 1993, 41: 521-3.
128. Ndiaye M, Kumar R, Ahmad N. Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here? *Ann New York Academy of Sci* 2011, 1215: 144-9.
129. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5: 493-06.
130. Haneke KE. Review of toxicological literature, trans-resveratrol(501-36-0). National Institute of Environmental Health Sciences. North Carolina 2002.
131. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol and Appl Pharma* 2007, 224: 274-83.
132. Burkon A, Somoza V. Quantification of free and protein- bound trans- resveratrol metabolites and identification of trans- resveratrol- C/O- conjugated diglucuronides – Two novel resveratrol metabolites in human plasma. *Mol Nutr Food Res* 2008, 52: 549-57.
133. Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011, 1215: 9-15.
134. Herath W, Khan SI, Khan IA. Microbial metabolism.Part 14. Isolation and bioactivity evaluation of microbial metabolites of resveratrol. *Nat Prod Res* 2013, 27: 1437-44.
135. Renaud Sd, Lorgeil M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lanc* 1992, 339: 1523-6.
136. Frankel E, Waterhouse A, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lanc* 1993, 341: 1103-4.
137. Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB. Suppression of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor- $\kappa$ B, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Canc Res* 2002, 62: 4945-54.

138. Holmes-McNary M, Baldwin AS. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I $\kappa$ B kinase. *Canc Res* 2000, 60: 3477-83.
139. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2015, 1348: 20-31.
140. Gambini J, Ingles M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Mas-Bargues C, Abdelaziz K, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Borras C. Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 2015:837042.
141. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Scie* 1997, 275: 218-20.
142. Dobrydneva Y, Williams RL, Blackmore PF. Trans- Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin- stimulated human platelets. *British J Pharma* 1999, 128: 149-57.
143. Leonard SS, Xia C, Jiang B-H, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 309: 1017-26.
144. Gambelli L, Santaroni G. Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *J Food Compos Anal* 2004, 17: 613-8.
145. Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Şehirli AÖ, Demiralp E, Şener G, Omurtag GZ. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep* 2012, 39: 4589-96.
146. Chander V, Tirkey N, Chopra K. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin protects against cyclosporine-induced nephrotoxicity through nitric oxide dependent mechanism. *Toxicol* 2005, 210: 55-64.
147. Rubiolo J, Vega F. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species. *Biomed Pharma* 2008, 62: 606-12.
148. Sebai H, Sani M, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N. Cardioprotective effect of resveratrol on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat. *Drug Chem Toxicol* 2011, 34: 146-50.
149. Lindauer A, Valiathan C, Mehta K, Sriram V, de Greef R, Elassaiss- Schaap J, de Alwis D. Translational pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of tumor growth

- inhibition supports dose- range selection of the anti-PD- 1 antibody pembrolizumab. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2017, 6: 11-20.
150. Steffens JP, Santana LCL, Pitombo JCP, Ribeiro DO, Albaricci MCC, Warnavin SC, Kantarci A, Spolidorio LC. The role of androgens on periodontal repair in female rats. *J Periodontol* 2018, 89: 486-95.
  151. Turkmen R, Birdane YO, Demirel HH, Kabu M, Ince S. Protective effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress, biochemical and histopathological changes induced by sub-chronic oral glyphosate-based herbicide in rats. *Toxicol Res* 2019, 8: 238-45.
  152. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytic Biochem* 1979, 95: 351-58.
  153. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinic Chem* 1988, 34: 497-9.
  154. Beutler E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*, 2<sup>nd</sup> ed. New York, Grune Stratton, 1975:67.
  155. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 1984, 121-26.
  156. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959, 82: 70-7.
  157. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193: 265-75.
  158. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Yüce A, Çeribaşı AO. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenol* 2007, 67: 778-85.
  159. Sönmez M, Yüce A, Türk G. The protective effects of melatonin and vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reprod Toxicol* 2007, 23: 226-31.
  160. Sönmez M, Türk G, Yüce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenol* 2005, 63: 2063-72.
  161. IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows version 25.0. Armonk, Ny; IBM Corp:2017.
  162. Arslan AK, Yaşar Ş, Çolak C, Yoloğlu S. R shiny paketi ile Kruskal Wallis H testi için İnteraktif bir Web uygulaması. *Sağl Bil Derg* 2018, 49.
  163. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro J-M, Buque A, Senovilla L, Baracco EE, Bloy N, Castoldi F. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* 2014, 5: 12472-508.

164. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* 2012, 62: 309-35.
165. Kaur G, Mital P, Dufour J. Testisimmune privilege-Assumptions versus facts. *Animal Rep* 2013, 10: 3-15.
166. Alamo A, Condorelli RA, Mongioi LM, Cannarella R, Giacone F, Calabrese V, La Vignera S, Calogero AE. Environment and Male Fertility: Effects of Benzo-alpha-Pyrene and Resveratrol on Human Sperm Function In Vitro. *J Clin Med* 2019, 8.
167. Mojica-Villegas MA, Izquierdo-Vega JA, Chamorro-Cevallos G, Sanchez-Gutierrez M. Protective effect of resveratrol on biomarkers of oxidative stress induced by iron/ascorbate in mouse spermatozoa. *Nutri* 2014, 6: 489-03.
168. Ourique GM, Pes TS, Saccol EM, Finamor IA, Glanzner WG, Baldisserotto B, Pavanato MA, Goncalves PB, Barreto KP. Resveratrol prevents oxidative damage and loss of sperm motility induced by long-term treatment with valproic acid in Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* 2016, 68: 435-43.
169. Skaper SD, Fabris M, Ferrari V, Dalle Carbonare M, Leon A. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Radic Biol Med* 1997, 22: 669-78.
170. Alsharif NZ, Hassoun EA. Protective effects of vitamin A and vitamin E succinate against 2, 3, 7, 8- tetrachlorodibenzo- p- dioxin (TCDD)- induced body wasting, hepatomegaly, thymic atrophy, production of reactive oxygen species and DNA damage in C57BL/6J mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004, 95: 131-8.
171. Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci Bangal* 1999, 77: 658-66.
172. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Rad Res* 2010, 44: 479-96.
173. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klin Gel* 1998, 11: 342-6.
174. Hajeer A, Dababneh A, Makki R, Thomson W, Poulton K, Gonzalez- Gay M, Garcia- Porrua C, Matthey D, Ollier W. Different gene loci within the HLA- DR and TNF regions are independently associated with susceptibility and severity in Spanish rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antig* 2000, 55: 319-25.
175. Rindfleisch JA, Muller D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Phys* 2005, 72: 1037-47.

176. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 2004, 10: 141-7.
177. Chainy G, Samantaray S, Samanta L. Testosterone- induced changes in testicular antioxidant system. *Androl* 1997, 29: 343-9.
178. Gülcü F. Kronik Hiperhomosisteinemi Olusturulan Ratlarda Alfa-Lipoik Asidin Plazma ve Çesitli Dokularda Oksidan Antioksidan Sistem Üzerine Etkilerinin Arastırılması. Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Elazığ:Fırat Üniversitesi, 2006.
179. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 2008, 4: 89-96.
180. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy Y, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2010, 3: 91-100.
181. Seven A, Candan G. Antioxidant defense systems. *Cerrahpaşa J Med* 1996, 27:1-54.
182. İlhan N. Deneysel olarak karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan kobaylarda oksidan ve antioksidan sistemin incelenmesi. Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı. Doktora tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, 1998.
183. Ikumawoyi V, Awodele O, Rotimi K, Fashina A. Evaluation of the effects of the hydro-ethanolic root extract of *Zanthoxylum zanthoxyloides* on hematological parameters and oxidative stress in cyclophosphamide treated rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2016, 13: 153-9.
184. Al- Harthi SE, Alarabi OM, Ramadan WS, Alaama MN, Al- Kreathy HM, Damanhoury ZA, Khan LM, Osman AMM. Amelioration of doxorubicin- induced cardiotoxicity by resveratrol. *Molecul Med Rep* 2014, 10: 1455-60.
185. Shati AA. Resveratrol improves sperm parameter and testicular apoptosis in cisplatin-treated rats: Effects on ERK1/2, JNK, and Akt pathways. *Syst Biol Reprod Med* 2019, 65:236-9.
186. Vadi M. Resveratrolün metotreksat uygulanan ratlarda total oksidan-antioksidan durumuna ve DNA hasarına etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 2017.
187. Erdemir F, Atılğan D, Markoc F, Boztepe O, Suha-Parlaktas B, Sahin S. The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters. *Acta Urol Espanol* 2012, 36: 153-9.

188. Sen S, Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health. *Oxidative Stress: Diagnos Prevent Ther* 2011, 1-37.
189. Yucel C, Arslan FD, Ekmekci S, Ulker V, Kisa E, Erdogan Yucel E, Ucar M, Ilbey YO, Çelik O, Basok BI, Kozacıoğlu Z. Protective Effect of All-Trans Retinoic Acid in Cisplatin-Induced Testicular Damage in Rats. *World J Mens Health* 2019, 37: 249-56.
190. Adra N, Einhorn LH, Althouse SK, Ammakkanavar NR, Musapatika D, Albany C, Vaughn D, Hanna NH. Phase II trial of pembrolizumab in patients with platinum refractory germ-cell tumors: a Hoosier Cancer Research Network Study GU14-206. *Ann Oncol* 2017, 29: 209-14.
191. Reddy KP, Madhu P, Reddy PS. Protective effects of resveratrol against cisplatin-induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2016, 91: 65-72.
192. El-Sheikh AA, Morsy MA, Al-Taher AY. Multi-drug resistance protein (Mrp) 3 may be involved in resveratrol protection against methotrexate-induced testicular damage. *Life Sci* 2014, 119: 40-6.
193. Kurus M, Bay Karabulut A, Taslidere E, Oflu O. Preventive effects of Resveratrol against azoxymethane- induced testis injury in rats. *Androl* 2017, 49:12674.
194. Türedi S, Yuluğ E, Alver A, Kutlu Ö, Kahraman C. Effects of resveratrol on doxorubicin induced testicular damage in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2015, 67: 229-35.
195. Uguralp S, Usta U, Mizrak B. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *European J Pediatr Surg* 2005, 15: 333-6.
196. Perret RE, Josselin N, Knol AC, Khammari A, Cassecuel J, Peuvrel L, Dreno B. Histopathological aspects of cutaneous erythematous-papular eruptions induced by immune checkpoint inhibitors for the treatment of metastatic melanoma. *Int J Dermatol* 2017, 56: 527-33.
197. Bilici P. Paklitakselin oluşturduğu testis hasarı üzerine resveratrolün koruyucu etkisinin incelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri:Erciyes Üniversitesi, 2018.
198. Plourde PV, Dyroff M, Dukes M. Arimidex: a potent and selective fourth-generation aromatase inhibitor. *Breast Cancer Res Treat* 1994, 30: 103-11.
199. Roth MY, Amory JK, Page ST. Treatment of male infertility secondary to morbid obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008, 4: 415-9.



200. Taxel P, Kennedy DG, Fall PM, Willard AK, Clive JM, Raisz LG. The effect of aromatase inhibition on sex steroids, gonadotropins, and markers of bone turnover in older men. *J Clin Endocrinol Metabol* 2001, 86: 2869-74.
201. Makary S, Abdo M, Fekry E. Oxidative stress burden inhibits spermatogenesis in adult male rats: testosterone protective effect. *Can J Physiol Pharmacol* 2017, 96: 372-81.
202. Özatik FY, Özatik O, Yiğitaslan S, Ünel ÇÇ, Erol K. Protective role of resveratrol on testicular germ cells in mice with testicular toxicity. *Turk J Urol* 2017, 43: 444-50.
203. Luca G, Calvitti M, Baroni T, Basta G, Angeletti G, Neri LM, Becchetti E, Capitani S. Sertoli cell-induced adult rat islet beta-cell mitogenesis: causative pathways. *Diabet Nutr Metabol* 2003, 16: 1-6.
204. Onisto M, Graziotto R, Scannapieco P, Marin P, Merico M, Slongo M, Foresta C. A novel gene (PD1) with a potential role on rat spermatogenesis. *J Endocrinol Invest* 2000, 23: 605-8.
205. Zhang J, Zhang H, Luo Y. Association Between Activation of the Programmed Cell Death-1 (PD-1)/Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Pathway and Pain in Patients with Cancer. *Med Sci Monit* 2019, 25: 1275-82.
206. Liu W, Chai L, Liang J, Lu Z, Yang S. Increased expressions of programmed death 1 (PD-1) and its ligands in peripheral CD3 (+) T cells and CD19 (+) B cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Chinese J Cell Mol Immunol* 2016, 32: 1243-7.

## EKLER

### EK 1. Özgeçmiş

#### Genel Bilgiler

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| DÜZENLEME TARİHİ                 | 18.06.2019  |
| T.C. KİMLİK NO                   | :21352592098  |
| ADI SOYADI                       | : NEŞE BAŞAK TÜRKMEN  |
| YAZIŞMA ADRESİ                   | :İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik<br>Toksikoloji Anabilim Dalı |
| DOĞUM TARİHİ ve YERİ             | :27/07/1986 - BURSA   |
| TEL: 0 224 817 11 84             | GSM: 0 534 222 95 72  |
| E-POSTA: nese.basak@inonu.edu.tr | nesebasak86@gmail.com   |

#### Eğitim

| ÖĞRENİM DÖNEMİ | DERECE           | ÜNİVERSİTE  | ÖĞRENİM ALANI  |
|----------------|------------------|---|----------------|
| 2001-2004      | Lise             | Türkan Sait Yılmaz Anadolu<br>Lisesi/Orhaneli/BURSA | SAYISAL        |
| 2004-2008      | Lisans           | Süleyman Demirel<br>Üniversitesi/ISPARTA            | KİMYA          |
| 2008-2010      | Yüksek<br>Lisans | Süleyman Demirel<br>Üniversitesi                    | BİYOKİMYA      |
| 2012-2014      | Yüksek lisans    | İnönü Üniversitesi                                  | F. Toksikoloji |
| 2015-          | Doktora-         | İnönü Üniversitesi                                  | F. Toksikoloji |

### Akademik ve Mesleki Deneyim:

| Görev Dönemi | Ünvan               | Bölüm                     | Kuruluş            |
|--------------|---------------------|---------------------------|--------------------|
| 2012-        | Araştırma Görevlisi | Farmasötik<br>Toksikoloji | İnönü Üniversitesi |

### Çalışılan Projeler:

- 1) Taurin ve Kapsaisin ile dioxin kaynaklı infertilite ve/veya sterilitenin engellenmesi/İNUBAP-2013/67-araştırmacı
- 2) Akut Yanık travmalarda flavonoid yapılı hesperidinin tedavi edici etkilerinin araştırılması/İNÜBAP-2013/109-araştırmacı
- 3) Naringenin di-n-butylphthalate esterlerinin neden olduğu reproduktif hasara karşı koruyucu etkilerinin araştırılması/İNÜBAP-2013-198-araştırmacı
- 4) Rat beyin iskemi reperfüzyon modelinde glisiretinik asit'in etkinliği/İNÜBAP-2013-205-araştırmacı
- 5) Yeni sentezlenen karben bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin araştırılması/2014-17-araştırmacı
- 6) Çeşitli Toksik Kan Gazlarının invitro olarak oluşturduğu genetik ve biyokimyasal değişikliklerin tespiti/ İNÜBAP-2015-38-araştırmacı
- 7) Çeşitli Kanser Türlerine Karşı Etkili Yeni Metal Komplekslerinin İlaç etkin maddesi olarak geliştirilmesi için patent alımı/İNUBAP-Güdümlü-2013-55-araştırmacı
- 8) Antikanser aktivite gösteren bileşiklerde DNA hasarının gösterimine yönelik alt yapının geliştirilmesi/ İNÜBAP-2014-19-araştırmacı
- 9) Yeni Sentezlenen 3(2H)-piridazinon Türevlerinin Beyin ve Karaciğer Kanserli Hücre Hatlarına Karşı sitotoksik Etkilerinin Araştırılması – TUBİTAK-113S838-Bursiyer

- 10) **Ratlarda subaraknoid kanama modelinde sertralinin muhtemel olumlu etkilerinin araştırılması-2016-44-araştırmacı**
- 11) **Rat overinde iskemi reperfüzyon modelinde glisiretinik asit ve nerolidol'ün etkinliği-2016-62-araştırmacı**
- 12) **Ratlarda iskemi reperfüzyon ve diğer deneysel mikrocerrahi yöntemlerinin oluşturulabilmesi için mikrocerrahi mikroskobu temini ile nörobilim laboratuvarı alt yapısının güçlendirilmesi-2016-30-araştırmacı**
- 13) **İrinotekanın karaciğer, böbrek ve testis üzerine yan etkilerine karşı curcuminin etkisi.2016-araştırmacı**
- 14) **Erkek Sıçanlarda İrinotekanın Neden Olduğu Reprodüktif Hasara Karşı Elajik Asitin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması-2016/32-araştırmacı**
- 15) **Dobler flowmetri cihazı temini ile nörobilim laboratuvarı alt yapının geliştirilmesi-2016/31-araştırmacı**
- 16) **Bakır sülfat toksisitesi oluşturulan ratlarda krisin ve flunüksin megluminin yem tüketimi, canlı ağırlık, antioksidan durum, bazı kan ve yangi parametreleri üzerine etkileri-VF.14.11-araştırmacı**

#### **Doktora süresince Yapılan Uluslararası Yayın Listesi:**

- 1)Demirci S, Doğan A, Başak N, Telci D, Dede B, Orhan C, Tuzcu M, Şahin K, Şahin N, Özercan İ and Şahin F. A Schiff base derivative for effective treatment of diethylnitrosamine-induced liver cancer in vivo. *Anticancer Drugs*. 2015 Jun;26(5):555-64. doi: 10.1097/CAD.0000000000000221.
- 2) Ciftci O, Ozcan C, Kamisli O, Cetin A, Basak N, Aytac B. Hesperidin, a Citrus Flavonoid, Has the Ameliorative Effects Against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in a C57BL/J6 Mouse Model. *Neurochem Res*. 2015 Jun;40(6):1111-20. doi: 10.1007/s11064-015-1571-8. Epub 2015 Apr 10.
- 3) Saral S, Ozcelik E, Cetin A, Saral O, Basak N, Aydın M, Ciftci O. Protective role of Diospyros lotus on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Andrologia* 2016 *Andrologia*. 2016 Apr;48(3):308-17. doi: 10.1111/and.12448. Epub 2015 Jul 14.
- 4) Oguzturk H, Ciftci O, Cetin A, Kaya K, Disli OM, Turtay MG, Gürbüz S, Basak N. Beneficial effects of hesperidin following cis-diamminedichloroplatinum-induced damage in heart of rats. *Niger J Clin Pract*. 2016 Jan-Feb;19(1):99-103. doi: 10.4103/1119-3077.173707.

- 5) Kaya K, Ciftci O, Cetin A, Tecellioğlu M, Başak N. Beneficial Effects of  $\beta$ -Glucan against Cisplatin Side Effects on The Nervous System in Rats. *Acta Cir Bras.* 2016 Mar;31(3):198-205. doi: 10.1590/S0102-865020160030000008.
- 6) Baykalır B, Çiftci O, Çetin A, Oztanır M, BT Neşe..The protective cardiac effects of B-myrcene after global cerebral ischemia/reperfusion in C57BL/J6 mouse. *Acta Cir Bras.* 2016 Jul;31(7):456-62. doi: 10.1590/S0102-865020160070000005
- 7) Doğan A, Demirci S, B T Nese, Çağlayan AB, Aydın S, Telci D, Kılıç E, Şahin K, Orhan C, Tuzcu M, Işın A, Ekici D, Şahin F. Schiff base-Poloxamer P85 combination prevents prostate cancer progression in C57/Bl6 mice-kabul edildi. *Prostate.* 2016 Jun 24. doi: 10.1002/pros.23229. [Epub ahead of print]
- 8) Melekoglu R, Ciftci O, Cetin A, Basak N, Celik E. The beneficial effects of Montelukast against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in female reproductive system in rats. *Acta Cir Bras.* 2016 Aug;31(8):557-63. doi: 10.1590/S0102-865020160080000009.
- 9) Demirci S, Doğan A, B T Nese, Telci D, Rizvanov A, Sahin F. Schiff base-Poloxamer P85 combination demonstrates chemotherapeutic effect on prostate cancer cells in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, volume 86, february 2017,492-501.
- 10) Demirci S, Doğan A, B T Nese, Telci D, Çağlayan AB, Beker MÇ, Kiliç E, Özkan F, Dede B, Şahin F. Poloxamer P85 increases anticancer activity of Schiff base against prostate cancer in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs.* 2017 Jun 13. doi: 10.1097/CAD.0000000000000528. [Epub ahead of print]
- 11) Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Basak N, Celik E. The Effects of Body Mass Index on Second-Trimester Amniotic Fluid Cytokine and Matrix Metalloproteinase Levels. *Gynecol Obstet Invest.* 2018 Jan 20. doi: 10.1159/000455192. [Epub ahead of print]
- 12) Ciftci O, Ozdemir Z, Acar C, Sozen M, B T Nese, Ayhan İ, Gozukara Bağ H. Five novel synthesized pyridazinone derivatives had the cytotoxic and apoptotic effects in SHSY5Y and HEP3B cancer cell line. 2018, letters in organic chemistry.15, issue 4 doi: 10.2174/1570178614666170707154210
- 13) Gul Baykalır B, Ciftci O, Cetin A, B T Nese. The protective effect of fish oil against cisplatin induced eye damage in rats. *Cutan Ocul Toxicol.* 2018 Jun;37(2):151-156. doi: 10.1080/15569527.2017.1361438. Epub 2018 Aug 25.
- 14) Durak MA, Oztanır MN, B T Nese, Çiftçi O, Taşlıdere A, Tecellioğlu M, Önder A. Chrysin prevents brain damage caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/J6 mouse model. *Turk J Med Sci.* 2016 Dec 20;46(6):1926-1933. doi: 10.3906/sag-1508-119.
- 15) Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Cetin A, Basak N. Beneficial effects of curcumin and capsaicin on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a rat model. *J Ovarian Res.* 2018 Apr 26;11(1):33. doi: 10.1186/s13048-018-0409-9
- 16) Çiftçi O, B T Nese, Taşlıdere A. Curcumin protects heart tissue against irinotecan-induced damage in terms of cytokine level alterations, oxidative stress, and histological damage in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018 May 2. doi: 10.1007/s00210-018-1495-3.

- 17) Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Cetin A, Basak N. The beneficial effects of nerolidol and hesperidin on surgically induced endometriosis in a rat model. *gynecological endocrinology. Gynecol Endocrinol.* 2018 May 7:1-6. doi: 10.1080/09513590.2018.1469611.
- 18) Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Alan S, Basak N. The Protective Effects of Glycyrrhetic Acid and Chrysin against Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Ovaries. *Biomed Res Int.* 2018 May 14;2018:5421308. doi: 10.1155/2018/5421308. eCollection 2018.
- 19) Tatlı Seven P, Gül Baykalır B, Seven İ, Parlak Ak T, B T Nese, Güllüoğlu H. The protective effects of chrysin and flunixin meglumine against excess copper in male rats. *Turk J Vet anim sci.* 2018 42:376-387
- 20) Cetinkaya EA, Ciftci O, Alan S, Oztanır MN, Basak N. The efficacy of hesperidin for treatment of acute otitis media. *Auris Nasus Larynx.* 2019 Jul 30. pii: S0385-8146(17)30756-3. doi: 10.1016/j.anl.2018.07.005. [Epub ahead of print]
- 21) Ciftci O, Taslidere A, B T Nese, Ozcan C. The beneficial effects of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid on the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mouse model. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2018 Jul 27:1-9. doi: 10.1080/08923973.2018.1490318. [Epub ahead of print]
- 22) Yilmaz E, Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Cetin A, Basak N. The therapeutic effects of curcumin and capsaicin against cyclophosphamide side effects on the uterus in rats. *Acta Cir Bras.* 2018 Jun;33(6):499-507. doi: 10.1590/s0102-865020180060000004.
- 23) Ciftci O, Duman AS, B T Nese, Taslidere A. Beta-glucan prevents toxic effects of 2,3,7,8-TCDD in terms of oxidative and histopathological damage in heart tissue of rats. *BJPS,* 2018.
- 24) Ozdemir Z, B T Nese, Ayhan İ, Çiftçi O, and Uysal M. Synthesis of New 6-[4-(2-Fluorophenyl)piperazine-1-yl]-3(2H)-pyridazinone-2-acetyl-2-(substitutedbenzal) hydrazone Derivatives and Evaluation of Their Cytotoxic Effects in Liver and Colon Cancer Cell Lines. 2019
- 25) Seven Tatlı P, Gül Baykalır B, Parlak Ak T, Seven İ, Basak N, Yaman M. The protective effects of propolis and flunixin meglumine on feed intake, antioxidant status and histological parameters in liver and kidney tissues against excess copper in rats. *Ankara Üniv Vet Fak Derg,* 65, 395-406, 2018
- 26) Oğuztürk H, Ciftçi O, Taşlıdere A, Turtay MG, Gürbüz S, Basak N, Fırat C, Yücel N, Güven T. Investigating the therapeutic effects of flavonoid structured hesperidin in acute burn traumas. *Fresenius environmental bulletin.* 27;8;5446-54.2018

## EK 2. Deney hayvanları Etik Kurul Kararı



**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi : 14-02-2018  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol no.su : 2018/A-08  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Sprague Dawley  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 72 Adet  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı: 3-6 ay

Doç. Dr. Osman ÇİFTÇİ'nin yürütücüsü olduğu "*Pembrolizumab verilen sıçanlarda olası testis toksisitesine karşı aromataz inhibitörlerinin etkisi*" isimli 2018/A-08 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

|   |  |  |
|---|--|--|
| <br>Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ<br>Başkan                   | <br>Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR<br>Başkan Yardımcısı | <br>Prof. Dr. Metin ATAMBAY<br>Üye               |
| <br>Prof. Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN<br>Üye<br>KATILMADI | <br>Prof. Dr. Başak KAYHAN<br>Üye                | <br>Doç. Dr. Şengül YÜKSEL<br>Üye                |
| <br>Vet. Hek. Özge ÖZYALIN<br>Üye<br>KATILMADI        | <br>Akın ÖZ<br>Sivil Üye<br>KATILMADI            | <br>Av. M. Umut YALÇIN<br>Sivil Üye<br>KATILMADI |