



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NİVOLUMABIN ERKEK ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE OLASI
TOKSİSİTESİNE KARŞI HESPERİDİNİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Münevver Nazlıcan ZENGİN

**Kasım 2023
DENİZLİ**

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

**NİVOLUMABIN ERKEK ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE OLASI
TOKSİSİTESİNE KARŞI HESPERİDİNİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Münevver Nazlıcan ZENGİN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ

Denizli, 2023

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öđrenci Adı Soyadı : Münevver Nazlıcan ZENGİN

İmza :

ÖZET

NİVOLUMABIN ERKEK ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE OLASI TOKSİSİTESİNE KARŞI HESPERİDİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Münevver Nazlıcan ZENGİN

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ

Kasım 2023, 70 Sayfa

Nivolumab bir immün kontrol noktası inhibitörü olup etkili bir immünoterapi ilacıdır. Hesperidin güçlü antioksidan aktiviteye sahip bir flavonoiddir. Bu tez çalışmasında nivolumabın testis dokusunda neden olabileceği olası toksisiteye karşı hesperidin potansiyel etkileri araştırıldı. Araştırmada 32 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar her grupta 8 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı; Kontrol, Nivolumab (3 mg/kg), Hesperidin (50 mg/kg), Nivolumab (3 mg/kg) + Hesperidin (50 mg/kg). 30 gün süren ilaç uygulamaları sonrasında hayvanlar sakrifiye edildi, kan ve testis doku örnekleri alındı. Testis dokusundaki oksidatif hasarı belirlemek için Elisa, Real Time PCR ve histopatolojik analizler yapıldı. Elde edilen sonuçlar nivolumabın total oksidan ve antioksidan dengeyi bozarak oksidatif strese neden olduğunu ve diğer yandan hesperidin antioksidan aktiviteyi artırarak oksidatif hasarı azalttığı belirlendi. Nivolumab serum testosteron düzeyini önemli ölçüde azalttı bunun yanında hesperidin uygulaması serum testosteron düzeyini artırdı. Ayrıca nivolumab testis dokusunda PI3K, AKT, MTOR ekspresyonlarını azaltarak bu yolağı kesintiye uğrattı. Öte yandan hesperidin uygulaması PI3K, AKT, MTOR ekspresyonları artırarak kontrol seviyesine yaklaştırdı. Ayrıca nivolumab PD-1 ekspresyon seviyelerini azaltırken hesperidin PD-1 ekspresyon seviyelerinde bir değişikliğe neden olmadı. Histopatolojik analizlerde nivolumabın testis dokusunda hasara neden olduğu belirlendi ve söz konusu hasar hesperidin tarafından hafifletildi. İmmünofloresan analizlerde spermatozoidlerde şiddetli düzeyde sitoplazmik 8-hidroksiguanozin (8OhDG) ve Kaspaz-3 ekspresyonları tespit edildi. Hesperidin uygulamasının bu ekspresyonları hafiflettiği gözlemlendi. Birlikte ele alındığında nivolumabın sıçan testis dokusunda oksidatif hasara neden oldu ve hesperidin antioksidan ve anti apoptotik etkileriyle nivolumabın testis dokusunda oluşturduğu hasara karşı önemli koruma sağladı.

Anahtar kelimeler: Nivolumab, Testis, Hesperidin, Monoklonal antikor, PD-1

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2022SABE012)

ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF HESPERIDIN
AGAINST THE POSSIBLE TOXICITY OF NIVOLUMAB ON THE MALE
REPRODUCTIVE SYSTEM**

ZENGIN, Münevver Nazlıcan

Master Thesis, Department of Medical pharmacology

Thesis Advisor: Prof. Osman ÇİFTÇİ (PhD)

November 2023, 70 Pages

Nivolumab is an immune checkpoint inhibitor and an effective immunotherapy drug. Hesperidin is a flavonoid with strong antioxidant activity. In this thesis study, the potential effects of hesperidin against the possible toxicity that nivolumab may cause in testicular tissue were investigated. 32 male Wistar Albino rats were used in the study. The animals were divided into 4 groups, with 8 animals in each group; Control, Nivolumab (3 mg/kg), Hesperidin (50 mg/kg), Nivolumab (3 mg/kg) + Hesperidin (50 mg/kg). After 30 days of drug administration, the animals were sacrificed and blood and testicular tissue samples were taken. Elisa, Real Time PCR and histopathological analyzes were performed to determine oxidative damage in testicular tissue. The results obtained showed that nivolumab caused oxidative stress by disrupting the total oxidant and antioxidant balance, and on the other hand, hesperidin reduced oxidative damage by increasing antioxidant activity. Nivolumab significantly reduced serum testosterone levels, while hesperidin administration increased serum testosterone levels. Additionally, nivolumab interrupted this pathway by reducing the expressions of PI3K, AKT, and MTOR in testicular tissue. On the other hand, hesperidin application increased PI3K, AKT, MTOR expressions and brought them closer to the control level. Additionally, while nivolumab decreased PD-1 expression levels, hesperidin did not cause a change in PD-1 expression levels. Histopathological analysis determined that nivolumab caused damage to the testicular tissue, and this damage was alleviated by hesperidin. In immunofluorescence analysis, severe cytoplasmic 8-hydroxyguanosine (8OhDG) and Caspase-3 expressions were detected in spermatocytes. It was observed that hesperidin application alleviated these expressions. Taken together, nivolumab caused oxidative damage in rat testicular tissue, and hesperidin provided significant protection against the damage caused by nivolumab in testicular tissue with its antioxidant and anti-apoptotic effects.

Keywords: Nivolumab, Testis, Hesperidin, Monoclonal antibody, PD-1

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects
Coordination Unit through Project number 2022SABE012.**

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, ilgi ve emeğini esirgemeyen, bana rehberlik edip yoluma ışık tutan, her daim idol olarak gördüğüm kıymetli danışman hocam, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ'ye,

Yüksek Lisans eğitimimdeki katkılarından dolayı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Hayatımın her anında samimiyetini ve yardımseverliğini esirgemeyen çok kıymetli abim, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Prof. Dr. Serkan YILDIRIM'a

Her koşulda yanımda olan, varlığından dolayı sonsuz şükür duyduğum nişanlım Ahmet Emre KAPLAN'a,

Desteklerini esirgemeyip beni bu günlere getiren canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı.....	3
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Kanser İmmünoterapisinin Tarihsel Gelişimi.....	4
2.2. Başlıca Kanser İmmünoterapi Yöntemleri.....	7
2.2.1. Sitokinler	7
2.2.2. Adoptif immünoterapi.....	8
2.2.3. Onkolitik virüsler.....	9
2.2.4. Kanser aşılıarı.....	10
2.2.5. Kontrol noktası inhibitörleri.....	10
2.3. Programlı Ölüm Reseptörü 1'in İmmun Kontrol Stratejisi	11
2.4. Programlı Ölüm Reseptörü 1'in Sinyalizasyon Mekanizması.....	13
2.5. Nivolumabın Yapısı ve Etki Mekanizması.....	15
2.6. Nivolumabın Farmakokineği ve Klinik Kullanımı.....	16
2.7. Nivolumabın Yan Etkileri.....	18
2.7.1. Genel yan etkiler.....	18
2.7.1.1. Yorgunluk.....	18
2.7.1.2. Ateş, titreme, infüzyon reaksiyonları.....	19
2.7.2. Organa spesifik yan etkiler.....	19
2.7.2.1. Dermatolojik yan etkiler.....	19
2.7.2.2. İshal/kolit.....	19
2.7.2.3. Endokrin yan etkiler.....	19
2.7.2.4. Hepatik yan etkiler.....	20
2.7.2.5. Pnömoni.....	20
2.7.3. Nadir yan etkiler.....	21
2.7.3.1. Nörolojik sendromlar.....	21
2.7.3.2. Renal yan etkiler.....	21
3.1. Hesperidin.....	21
3.1.1. Hesperidinin kimyasal yapısı ve özellikleri.....	22
3.1.2. Hesperidinin farmakokinetik özellikleri	23
3.1.3. Hesperidinin farmakolojik aktiviteleri.....	23
3.1.3.1. Hesperidinin antioksidan aktivitesi.....	23
3.1.3.2. Hesperidinin antiinflamatuvar aktivitesi.....	24

3.1.3.3. Hesperidinin vazoprotektif aktivitesi.....	25
3.1.3.4. Hesperidinin analjezik aktivitesi.....	25
3.1.3.5. Hesperidinin antikarsinojenik aktivitesi.....	25
3.1.3.6. Hesperidinin antimikrobiyal aktivitesi.....	26
3.1.4. Hesperidinin toksisitesi.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	28
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	29
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve İlaç Uygulamaları.....	29
3.4. Deneyin Sonlandırılması Kan ve Doku Örneklerinin Alınması	30
3.5. Testis Dokusu Homojenatların Hazırlanması.....	31
3.6. Doku Total Antioksidan /Oksidan Düzeylerinin Ölçümü	31
3.7. Serum Testesteron Düzeylerinin Ölçümü.....	32
3.8. Real Time PCR Gen Ekspresyon Düzeylerinin Ölçümü.....	32
3.8.1. RNA izolasyonu.....	32
3.8.2. RNA miktar tayini.....	33
3.8.3. Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	34
3.8.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qpcr) analizi	34
3.9. Histopatolojik Analizler.....	35
3.10. Double İmmunofloresan Analizler.....	35
3.11. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. Doku Total Oksidan ve Antioksidan Düzeyi	38
4.2. Serum Testesteron Düzeyi	41
4.3. Gen Ekspresyon Bulguları.....	42
4.4. Histopatolojik Bulgular	42
4.5. Double İmmunofloresan Bulgular	45
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ.....	55
7. KAYNAKLAR.....	57
8. ÖZGEÇMİŞ.....	76

EKLER

Ek-1 Etik Kurul Onayı

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.3.1. T hücresi aktivasyonunu ve işlevini düzenlemede yer alan yardımcı uyarıcı ve aktive ve inhibe edici moleküller.....	12
Şekil 2.5.1. Nivolumabın kristal yapısının şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.5.2. Nivolumabın etki mekanizmasının şematik gösterimi.....	16
Şekil 3.1.1. Hesperidin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 3.3.2. Hayvanların gruplandırılması ve ilaç uygulamalarının yapılması.....	30
Şekil 4.1.1. Testis dokusunda total antioksidan düzeyi.....	39
Şekil 4.1.2. Testis dokusunda total oksidan düzeyi.....	40
Şekil 4.1.3. Testis dokusunda oksidatif stres indeksi.....	40
Şekil 4.2.1. Serum testesteron düzeyi.....	41
Şekil 4.4.1. Testis Dokusu, Normal histolojik görünüm.....	44
Şekil 4.4.2. Testis Dokusu, spermatoisitlerde şiddetli düzeyde dejenerasyon ve nekroz, tubulus duvarında incelme, intertubuler aralıklarda ödem damarlarda hiperemi.....	44
Şekil 4.4.3. Testis Dokusu, Normal histolojik görünüm.....	45
Şekil 4.4.4. Testis Dokusu, damarlarda hiperemi, spermatoisitlerde rejenerasyon çabaları ve mitoz.....	45
Şekil 4.5.1. Testis Dokusu, spermatoisitlerde 8 OHdG ekspresyonu (FITC) spermatoisitlerde Kaspaz-3 ekspresyonu (Texas Red).....	47

TABLULAR

	Sayfa
Tablo 2.3.1.	Çeşitli tümörlerin eksprese ettiği inhibe edici ve uyarıcı ligandları... 12
Tablo 2.4.1.	FDA tarafından onaylanan kontrol noktası inhibitörleri..... 14
Tablo 2.6.1.	Yıllara göre nivolumabın kliniğe giriş süreci..... 17
Tablo 3.3.1.	Deney grupları ve uygulama süreleri..... 29
Tablo 3.8.3.1.	cDNA Sentez Kitinin İçeriği..... 33
Tablo 3.8.4.2.	2X Qpcr sybr-Green MasterMix Kit Prosedürü..... 34
Tablo 3.8.4.3.	Çalışmada kullanılan genlerin reverse ve forward dizileri..... 35
Tablo 4.3.1.	Gen ekspresyon bulguları..... 42
Tablo 4.4.1.	Testis dokularında gözlenen histopatolojik bulguların skorlanması.. 43
Tablo 4.5.1.	Testis dokularında gözlenen immunflorasan bulguların skorlanması 46

SİMGELER VE KISALTMALAR

8-Ohdg	8-hidroksiguanozin
APC	Antijen sunan hücreler
Cdna	Komplementer DNA
Cmax	Maksimum Kan konsantrasyonu
COX	Siklooksijenaz-2
CTLA-4	Sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili protein 4
EAA	Eğri altında kalan alan
IFN- γ	İnterferon gama
IFN- α	İnterferon alfa
IgG4	İmmunglobulin G4
IL-2	İnterlökin 2
iNOS	Nitrik oksit sentaz
ITIM	İmmünoresseptör tirozin bazlı inhibitör motif
ITSM	İmmünoresseptör tirozin bazlı anahtar motif
LAG-3	Lenfosit aktivasyon geni 3
LD50	Ortalama letal doz
mAB	Monoklonal antikor
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
PBS	Fosfat buffer salin
PD-1	Programlanmış hücre ölüm proteini-1
PDL-1	Programlanmış hücre ölüm ligandı-1
PDL-2	Programlanmış hücre ölüm ligandı-2
ROS	Reaktif oksijen türleri
TAS	Total antioksidan seviyesi
TCR	T-hücresi reseptörü
CAR-T	Kimerik antijen reseptörü
TIL	Tümör infiltratif lenfositler
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
TOS	Total oksidan seviyeleri

1. GİRİŞ

Kanser, vücudun herhangi organ ya da dokusundaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve büyümesi sonucu ortaya çıkan bir hastalık tablosudur. Yüksek mortalitesi nedeniyle 20. yüzyılın en tehlikeli hastalıklarından biri olan kanser, 21. yüzyılda insidans ve prevalansı artarak daha yaygın hale gelmektedir (Nain ve ark., 2015). Kanser gelişiminde biyolojik, kalıtsal ve fiziksel faktörler etkilidir (D'Arcy, 2019). Kanser tedavisi kanser türüne ve safhasına göre değişmekle birlikte genellikle kemoterapi, cerrahi rezeksiyon ve radyoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır (Zugazagoitia ve ark., 2016). Öte yandan, son yıllarda kanser tedavisinde yoğun olarak kullanılmaya başlayan hedefe yönelik immünoterapi yöntemi tedavi başarısı açısından önemli bir potansiyel taşımaktadır (Alturki, 2023). İmmünoterapi sayesinde, vücudun immün sisteminin daha etkili ve güçlü hale getirilmesi ve böylelikle kanser gelişiminin engellenmesi sağlanır. Klasik kemoterapiden farklı olarak immünoterapi kanserli hücreyi öldürmez, bağışıklık sistemini tetikleyerek yeniden düzenler ve güçlendirir (Abbott ve Ustoyev, 2019). İmmünoterapi kanser tedavisi için güçlü bir klinik strateji seçeneği haline gelmiş olup, bu maksatla kullanılan immünoterapi ilaçlarının sayısı da artmaktadır. Halihazırda kanser tedavisi için onaylanmış ondan fazla immünoterapi ilacı mevcutken, henüz klinik deney aşaması devam eden ilaçlar da bulunmaktadır (Cicala ve ark 2022). Bu immünoterapötikler sitokinler, adaptif immunoterapötikler, kanser aşılaları, onkolitik virüsler ve kontrol noktası inhibitörleri şeklinde sınıflara ayrılmaktadır (Filin ve ark., 2020). Bunlar arasında en yoğun ilgi gören kontrol noktası inhibitörleridir. Kontrol noktası inhibitörleri, bugüne kadar en kapsamlı şekilde araştırılan immünoterapi sınıfıdır (Alturki, 2023). En yaygın kontrol noktası inhibisyon stratejisi, programlanmış hücre ölüm reseptörünün blokajıdır. Programlanmış hücre ölüm proteini-1 olarak bilinen PD-1, immün sistem hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir reseptördür. Bu reseptör kendi uyarıcı

moleküllerine, yani programlanmış hücre ölüm ligandına (PDL-1) bağlandığında bağışıklık tepkilerini azaltmaktır (M. Wu ve ark., 2022). Bazı kanser türleri PD-L1'i aşırı eksprese edip, immün sistemin bağışıklık tepkisini baskılayarak kanser gelişimine karşı vücudun savunmasını zayıflatır. Kanser gelişimine zemin oluşturan bu mekanizmanın etkisizleştirilmesi için PD-1 reseptörünün PD-L1'e bağlanmasını engelleyen, dolayısıyla kanser hücreleri tarafından PD-L1 üretiminin bağışıklığı zayıflatmasını önleyen ilaçlar geliştirilmiştir (Yi ve ark., 2022). Bu ilaçlardan biri olan nivolumab (Opdivo), PD-1 reseptörüne yüksek özgüllük ve afinite ile bağlanan immün kontrol noktası inhibitörü antikordur (Shiravand ve ark., 2022). Nivolumab PD-1 fonksiyonunu inhibe ederek, immün hücreleri patolojik immün baskılanmadan kurtarır ve tümör hücrelerini tanıyıp karşı koymalarına olanak tanır (Guo ve ark., 2017). Nivolumab gibi immün kontrol noktası inhibitörlerinin geliştirilmesi, özellikle metastatik melanom hastaları olmak üzere birçok hasta için daha önce mümkün olmayan başarılı bir tedavi sağlamıştır (Scott, 2015). Bununla birlikte, bu hastalar için uzun vadeli sonuçlar araştırma aşamasındadır.

Kanserli hastalarda infertilite bozukluğu çok faktörlü bir sorundur. Çalışmalar kemoterapi, hormon tedavisi veya immünoterapi dahil olmak üzere sistemik tedaviye ihtiyaç duyan hastalar sıklıkla zayıf libido, erektil disfonksiyon dahil olmak üzere çeşitli infertilite problemlerinden muzdariptir (Garutti ve ark., 2021). İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin henüz keşfedilmemiş ancak olası toksik etkilerinden biri de diğer kanser tedavilerinde olduğu gibi reproduktif hasardır (Kim ve ark., 2022). Malign melanomların yaklaşık %30'u, kolorektal karsinomların %15'i, akciğer ve böbrek kanserlerinin %10'u ile mesane ve prostat kanserlerinin %5'inin 50 yaşın altındaki hastalarda meydana geldiği tahmin edilmektedir (Siegel ve ark., 2017). Dolayısıyla genç hastalarda planlanan tedavilerin fertilité üzerindeki etkisinin araştırılması oldukça önemlidir (Duma ve Lambertini, 2020). Öte yandan immünoterapi gibi tedavide henüz yakın geçmişten bu yana kullanılmakta olan stratejilerin erkek reproduktif parametreleri üzerindeki etkileri belirsizliğini korumaktadır. Nivolumab özelinde bakıldığında ise nivolumab tedavisinin spermatogenez ile doğrudan ilişkisinin araştırıldığı yayımlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu noktalar tez konusunun önemi ve özgünlüğü destekleyerek, nivolumabın erkek üreme sistemi üzerindeki olası toksik etkilerine karşı hesperidinin koruyucu etkilerinin araştırılmasına hareket noktası teşkil etmiştir. Bununla birlikte immün kontrol noktası inhibitörlerinin spermatogenez ile ilişkisini belirlemek ve erkek fertilitésinin korunması için önemli bir adımdır.

1.1. Çalışmanın Amacı

Sunulan tez projesinin amacı, bir immunoterapi ilacı olan nivolumabın erkek sıçanlarda oluşturacağı muhtemel testis toksisitesine karşı, bu toksik etkiyi ortadan kaldırabilecek onarıcı bir tedavi uygulanmasıdır. Bu bağlamda antioksidan etkisi bilinen hesperidin uygulanarak toksik etkinin ortadan kaldırılması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kanser İmmünoterapisinin Tarihsel Gelişimi

Kanser, onkojenik süreçleri aktive eden mutasyonlar tarafından başlatılan ve hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğaldığı bir hastalıktır. Kanser gelişiminde, hücre bölünmesinin düzenlenmesi ve programlanmış hücre ölümünde rol oynayan genlerin aktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonların yanı sıra, apoptoza karşı korumada yer alan genlerin inaktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonlar da eşlik eder (Sharma ve Allison, 2015).

Kanser 20. yüzyılın önemli ve yaygın hastalıklarından biridir ve zamanla daha da yaygın hale gelmektedir (Vrinzen ve ark., 2023). Kanser varlığı çeşitli biyobelirteçler ve/veyaradyolojik bulgularla tespit edilebilmektedir. Semptom veya şikayetler nedeniyle başlatılan incelemeler sonucu kanser tanısı konulmasının yanı sıra bazı vakalarda başka incelemeler esnasında tesadüfen de kanser tespiti yapılabilmektedir. Genel olarak, kanser gelişimi yaklaşık olarak 1 milyon hücre sayısı ve 1 cm oluşum büyüklüğüne ulaşıldığında tespit edilebilir ve bu oluşumkitle, tümör, nodül veya lezyon olarak adlandırılabilir (Wilkinson, 2021)

Kanser tedavisinde kemoterapi, cerrahi rezeksiyon, radyoterapi gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Bugüne kadar başarıyla kullanılan cerrahi rezeksiyon yöntemi hala birçok yaygın katı tümör için tek iyileştirici tedavi olmaya devam etmektedir (Debela ve ark., 2021). Sitotoksik ajanların oral veya intravenöz kombinasyonlar halinde uygulandığı kemoterapi yöntemiyle hem dinlenme hem de bölünme aşamasında olan kanser hücreleri üzerinde sitotoksisite oluşturulur. Kanser kemoterapisinin amacı, kanser hücrelerinin çoğalması, istila etmesi ve metastaz yapmasını önlemektir (Nakamura ve Maeda, 2020). Radyasyon tedavisi ise kanserle mücadelede kullanılan lokal bir tedavi tekniğidir. Bunlara ek olarak kanser tedavisinde kemik iliği nakli, periferik kök hücre nakli, hormon tedavisi, fotodinamik terapi,

kriyocerrahi, immünoterapi ve gen terapisi gibi yöntemler de kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2021). Bahsedilen yöntemler erken aşamada birçok kanserin tedavisinde önemlidir, ancak çoğu durumda kanseri erken bir aşamada tespit etmek olanaklı değildir. Ayrıca kanser hücreleri sadece onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin düzensiz ekspresyonuna neden olan mutasyonları barındırmaz, aynı zamanda bu değişiklikler yüzlerce gen ekspresyonunun değişmesine de neden olur. Dolayısıyla tek bir tedavi yöntemi tüm kanser türlerini tedavi edemez. Bu nedenle son yıllarda kanser araştırmalarında hedefe yönelik stratejiler geliştirilmeye başlanmıştır (Falzone ve ark., 2018)

Normal bir hücrenin kanserli bir hücreye dönüşmesi kanserin oluşumunda en kritik olay değildir, asıl problem vücuttaki bağışıklık hücrelerinin yeni oluşan kanser hücrelerini tanıyıp yok edememesidir (Ni ve Dong, 2017). Tümörler, bağışıklık homeostazıyla ilişkili negatif düzenleyici yolları (immün kontrol noktaları) aktive ederek bağışıklık tepkilerini etkili bir şekilde bastırabilir (Pardoll, 2012). İmmün kontrol noktaları, immünojenik homeostazın korunmasında rol oynayan moleküllerdir ve bu nedenle kendi moleküllerine karşı periferik toleransın korunmasına yardımcı olur. İmmün tolerans, yaşam boyunca aşırı otoimmüniteyi önlemede kritik öneme sahiptir (Galluzzi ve ark., 2014). Bununla birlikte, immün kontrol noktası moleküllerinin işleyişindeki bir bozulma, kontrolsüz bir immün yanıtla sonuçlanan dengesizliklere yol açabilir. Bu durum klinik olarak, deri, gastrointestinal, hepatik, pulmoner, mukokutanöz ve endokrin sistemler dahil olmak üzere birçok organ sistemlerine ve dokularına ikincil hasara neden olan otoimmün benzeri/inflamatuar yan etkilerle kendini gösterebilir (Naidoo ve ark., 2015). Bağışıklık tepkisini artırmaya veya engellemeye yönelik bir dizi bağışıklık kontrol noktası molekülü mevcuttur. Bunlar sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili protein 4 (CTLA-4), programlı ölüm-1 reseptörü (PD-1), lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG-3) ve T-hücreli immüno globulin süsin-3 gibi yardımcı inhibitör molekülleri içerir (Y. Zhang ve Zheng, 2020). Son otuz yılda kanserin gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında çok büyük adımlar atılmıştır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Yukarıda bahsedilen bu immün kontrol noktalarının keşfi, tümörlerin immün sistemden kaçış mekanizmalarını ortaya çıkarmış ve geleneksel kemoterapi yaklaşımından uzaklaşarak kanser tıbbında devrim yaratan kanser immünoterapisinin temeli oluşturmuştur (Mahoney ve ark., 2015).

Kanser tedavisi için immün sistemin uyarılması anlamını taşıyan kanser immünoterapisi, immün sistemin kanserle doğal savaşıma yeteneğinin ortaya çıkarılmasını esas alır. Kanser immünoterapisinin altında yatan mekanizmalar kanser tedavisine yönelik diğer yaklaşımlardan önemli ölçüde farklıdır. Bu teknik, kemoterapi veya onkogen hedefli terapilerin aksine dinamik olan ve kanser hücrelerinin tek bir onkojenik düzensizliğini veya diğer otonom özelliklerini hedef almakla sınırlı kalmayan bir antikanser aktivite sergiler (Sharma ve ark., Allison, 2015). Bu nedenle immünoterapi belirli kanser türleri ile mücadele etmek ve hatta iyileştirmek için umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir (Riley ve ark., 2019).

Kanser için pazarlanan ilk immünoterapiler 1986'da ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından tüylü hücreli lösemi için onaylanan sitokin interferon α 'nın (IFN- α) rekombinant versiyonlarıdır. Erken dönem klinik deneylerde tedavi edilen bazı hastalar için kısmi remisyona sağlanmış, ancak IFN- α 'nın kısa terapötik etki süresi nedeniyle tüylü hücreli lösemi için bir ön tedavi olarak IFN- α 'nın yerini hızla pürin analogları almıştır (Conlon ve ark., 2019). Kısa bir süre sonra, rekombinant interlökin-2 (IL-2), kanser için bir immünoterapi olarak araştırılmış ve 1992'de metastatik böbrek kanseri ve 1998'de metastatik melanom için FDA tarafından onaylanmıştır. IL-2 tedavisi bazı hastalarda kalıcı tam yanıtlar gösterdiği için başlangıçta büyük bir heyecanla karşılanmıştır (Sckisel ve ark., 2015). Bununla birlikte, IL-2'nin yüksek dozlarda kullanılması gerekliliği sitokin salınım sendromu ve vasküler sızıntı sendromu gibi ciddi yan etkilere yol açmıştır (Eno, 2017). Bu tedavilerin ilk klinik araştırmaları umut verici olsa da kanser immünoterapisi alanındaki ilerleme, birçok klinik denemenin başarısızlığından dolayı 2000'lerde büyük ölçüde durmuştur.

Yaklaşık on yıllık başarısız denemelerin ardından, bir otolog dendritik hücre tedavisi ve ilk başarılı terapötik kanser aşısı olan sipuleucel-T 2010 yılında prostat kanseri için onaylanmış, ancak üretim karmaşıklıkları ve diğer sorunlar nedeniyle ilerleme kaydedilememiştir (Hammerstrom ve ark., 2011). Daha sonra, sitotoksik T lenfosit antijeni 4'ü (CTLA4) hedefleyen bir monoklonal antikör olan öncü kontrol noktası inhibitörü ipilimumab 2011'de ilerlemiş melanom için onaylandı. İlerleyen yıllarda, programlanmış hücre ölümü reseptörü 1 (PD-1) ve ligandını (PD-L1) hedefleyen diğer kontrol noktası inhibitörleri dahil olmak üzere yeni immünoterapiler klinik kullanım için geliştirilmiş ve onaylanmıştır (Savoia ve ark., 2016). Günümüzde, kanser tedavisi için onaylanmış çok sayıda immünoterapi ilacı mevcuttur. Bu

immünoterapiler; kontrol noktası inhibitörleri, lenfosit aktive edici sitokinler, CAR-T hücreleri ve diğer hücresele terapiler, yardımcı uyarıcı reseptörlere karşı agonistik antikolar, kanser aşıları, onkolitik virüsler ve bispesifik antikolar gibi sınıflara ayrılmaktadır (Shiravand ve ark., 2022)

Bu büyük ilerlemelere rağmen, immünoterapilerin klinik kullanımı, hem etkinlik hem de güvenlikle ilgili çeşitli zorluklarla karşı karşıyadır (Taefehshokr ve ark., 2022). Etkinlik ile ilgili olarak, her hasta immünoterapilere yanıt vermeyebilir, bu da hasta yanıtlarını tahmin etmeyi zorlaştırır. Ayrıca çoğu immünoterapi, kompakt tümör mikro ortamları gibi katı tümörlerin karşılaştığı iletim engelleri nedeniyle başlangıçta hematolojik kanserlerde değerlendirilmiştir. Son zamanlarda ise kontrol noktası blokajı için aktive edici sitokinler dahil olmak üzere çeşitli immünoterapiler katı tümör tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (Tsimberidou ve ark., 2018). Güvenlik açısından, immünoterapi bazı hastalarda otoimmün yan etkilere yol açabilir. IL-2 terapisinde gözlemlendiği gibi birçok immünoterapi ciddi hipotansiyon, ateş, böbrek fonksiyon bozukluğu ve potansiyel olarak ölümcül olan diğer olumsuz etkilere yol açan sitokin salınım sendromuna ve vasküler sızıntı sendromuna neden olabilir (Scotte ve ark., 2019).

Kanser immünoterapisinin daha güvenli ve daha kontrollü bir şekilde uygulanmasına yönelik yeni yaklaşımlar bu terapötik ajanların iyileştirici potansiyelini artırabilir ve toksisiteyi azaltabilir. Özellikle geliştirilmiş ilaç dağıtım teknolojileri hastalıklı dokularda immünoterapilerin birikmesini artırabilir tümör hücrelerinin daha etkili bir şekilde hedeflenmesini sağlayabilir ve hedef dışı olumsuz etkileri azaltabilir (S. Li ve ark., 2020).

2.2. Başlıca Kanser İmmünoterapi Yöntemleri

İmmünoterapi günümüzde kanseri tedavi etmek için güçlü bir klinik strateji haline gelmiş olup zamanla immünoterapi ilaçlarının sayısı da artmaktadır (Riley ve ark., 2019). Bu immünoterapiler, sitokinler adoptif immünoterapi, kanser aşıları, onkolitik virüsler ve kontrol noktası inhibitörleri olmak üzere sınıflara ayrılırlar (Mahoney ve ark., 2015).

2.2.1. Sitokinler

Sitokinler farklı hücre tiplerine büyüme, farklılaşma ve enflamatuvar veya anti-enflamatuvar sinyaller sağlayan, moleküler ağırlığı genellikle 30 kDa'nın altında olan polipeptid veya glikoprotein yapılarıdır. Sitokinler çoğunlukla bir uyarana yanıt olarak belirli bir süre boyunca salınır ve dolaşımdaki sınırlı yarı ömürleri nedeniyle etkileri oldukça kısa ömürlü olur (Waldmann, 2018). Sitokin hedef hücreleri hücre zarlarında yüksek afiniteli reseptörler bulundurur. Bu reseptörler, sitokin bağlanması sonrasında gen transkripsiyonunda değişikliklere yol açan bir hücre içi sinyali tetikler. Böylece sitokinler proliferasyonu ve farklılaşmayı aktive ederek belirli hücre fonksiyonlarını indükler (Lee ve Margolin, 2011). Çeşitli sitokinler doğrudan bir anti-proliferatif veya pro-apoptotik aktivite ile veya dolaylı olarak, tümör hücrelerine karşı bağışıklık hücrelerinin sitotoksik aktivitesini uyararak tümör hücresi büyümesini sınırlandırır (Nicholas ve Lesinski, 2011). Sitokinlerin immünoterapi olarak kliniğe girişi 1986'da rekombinant IFN- α terapilerinin onaylanmasıyla gerçekleşmiştir (Y. Zhang ve Zhang, 2020). Sitokinlerin stratejisi, kontrol noktası inhibitör yaklaşımlarından farklıdır çünkü enjekte edilen sitokinler, bağışıklık hücrelerinin büyümesini ve aktivitesini doğrudan uyarır. İmmünoterapi için izlenen üç ana sitokin tipi, interferonlar, interleükinler ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktördür (Ardolino ve ark., 2015).

Uzun süren klinik araştırmalar sonucunda IL-2 ve IFN- α , hafif klinik fayda göstermiş ve birkaç kanser türü için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı almıştır. Bununla birlikte, kısmi klinik faydalarına karşın zayıf tolere edilebilirlik ve şiddetli toksisite sergilemeleri beklentileri karşılamamıştır (Propper ve Balkwill, 2022).

2.2.2. Adoptif immünoterapi

Adoptif (üvey) immünoterapi, kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için hastalara özellikle izole edilmiş veya genetik olarak tasarlanmış, ex vivo genişletilmiş T hücrelerinin verilmesidir. Bu amaçla tümör infiltratif lenfositler (TIL) geliştirilmiştir.

TIL'lerin adaptif transferi, kanser hastalarında T hücrelerinin kalıcı klonal repopülasyonuna yol açar. Bu strateji eşliğinde kimerik antijen reseptörü CAR-T hücreleri ve T-hücresi reseptörü (TCR) geliştirilmiştir (Rosenberg ve Restifo, 2015).

CAR-T hücresi yaklaşımında, T hücreleri hasta kanından toplanır ve daha sonra tümör hücrelerinde bulunan bir antijene özgü CAR'ları ifade etmek için genetik olarak tasarlanır. Bu tasarlanmış T hücreleri daha sonra aynı hastaya yeniden uygulanır. CAR-T hücreleri, tümör hücresi ölümünü indüklemek için hücre üzerindeki hedeflenen antijeni tanır (Gross ve ark., 1989). Diğer tedavi seçeneklerinden farklı olarak, CAR-T hücreleri tipik olarak tek seferlik bir tedavidir ve hücreler enjeksiyondan sonra on yıldan uzun bir süre aktivitelerini koruyabilirler. Birçok hasta remisyona girer ve hayatta kalma süresi uzar, ancak CAR-T hücre tedavisinin uzun vadeli etkileri halen araştırılmaktadır (Robbins ve ark., 2011).

CAR-T hücreleri kanser tedavisinde klinik başarı sağlamasına rağmen üretiminin pahalı, teknik olarak karmaşık ve zaman alıcı olması, sitokin salınım sendromu ve nörotoksisite gibi etkilerinin olması kullanımını sınırlandırır (Brentjens ve ark., 2013).

TCR-T hücreleri hem hematolojik kanser hem de katı tümörler için klinik deneylerde test edilen tasarlanmış hücrelerdir. TCR'ler, majör histokompatibilite kompleksleri (MHC'ler) tarafından sunulan tümörle ilişkili hücre içi antijenlere yanıt verir. MHC'den bağımsız CAR-T hücrelerinin aksine, TCR-T hücrelerinin hasta ile MHC uyumlu olması gerekir. TCR-T hücrelerinin prelinik araştırmaları, infüze edilen T hücrelerinin özgüllüğünün çok önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca, TCR-T hücreleriyle yapılan ilk denemelerden elde edilen sonuçlar, T hücrelerinden kaynaklanan toksisiteyi tahmin etmenin zor olduğunu göstermektedir (Beatty ve O'Hara, 2016). Hem CAR-T hücreleri hem de TCR-T hücreleri ile ilişkili toksisitelerin üstesinden gelme ve bunların katı tümörler için uygulanabilirliğini iyileştirmeye yönelik yeni dağıtım teknolojileri geliştirme çalışmaları devam etmektedir (Yi ve ark., 2023).

2.2.3. Onkolitik virüsler

Tümör hücrelerini enfekte etmek için genetiği değiştirilmiş virüslerden yararlanan ve böylece sistemik antitümör bağışıklığını artırmak için proinflamatuvar bir ortamı oluşturan onkolitik virüs terapileri bulunmaktadır (Russell ve ark., 2012). Bir virüs bir

tümör hücrelerini enfekte ettiğinde, hücre patlayana kadar virüs kendi kopyalarını oluşturup bağışıklık sistemine normal dışı bir süreç işlediğine dair uyarı sağlayabilir. Böylelikle, yakındaki tümör hücrelerine (lokal yanıt) veya vücudun diğer bölgelerindeki tümör hücrelerine (sistemik yanıt) karşı bir bağışıklık tepkisine yol açabilir (Stojdl ve ark., 2003).

Özellikle, genetiği değiştirilmiş bir herpes simpleks virüsü olan Imlygic olarak da bilinen talimogene laherparepvec (T-Vec), ilerlemiş melanomlu hastalar için önemli klinik faydalar göstermiş ve rezeke edilemeyen metastatik melanom tedavisi için onaylanmıştır (Andtbacka ve ark., 2015).

Onkolitik virüs tedavisinin yan etkileri, virüs türüne ve virüsün tam olarak neyi hedeflediğine göre değişebilir, ayrıca kanserin yeri ve türü ile hastanın genel sağlık durumundan da etkilenebilir. Onkolitik virüsler, sağlıklı hücreleri enfekte etme ve genel bağışıklık aktivitesini uyarma potansiyelleri nedeniyle bazen bağışıklık sisteminin sağlıklı hücrelere saldırmasına neden olabilir ve kullanımları enfeksiyon riski taşıyabilir (Fukuhara ve ark., 2016).

2.2.4. Kanser aşılıarı

Kanser aşılıarı, T hücresi aracılı antitümör immün tepkilerini tetiklemek için tümöre özgü antijenleri kullanır. Kanser aşısı türleri arasında tümör hücresi lizatı, dendritik hücreler, nükleik asitler (mRNA gibi) veya neoantijenler bulunur (Lin ve ark., 2022). Dendritik hücre aşılıarı en çok çalışılan hücre bazlı kanser aşısı sınıfıdır. Dendritik hücre aşılıarı, kanser hücrelerine saldırmak için T hücrelerini doğrudan aktive etmek üzere tasarlanmıştır. Bir dendritik hücre aşısı olan sipuleucel-T 2010 yılında prostat kanseri tedavisi için onaylanmıştır (Mitsogiannis ve ark., 2022).

2.2.5. Kontrol noktası inhibitörleri

Bağışıklık kontrol noktaları, bağışıklık toleransının devamlılığını sağlayan ve ortak uyarıcı yolakları fizyolojik olarak dengeleyen inhibitör yolaklardır, ancak bunlar genellikle kanser hücreleri tarafından immün sürveyanstan kaçmak için kullanılır

(Morrissey ve Yan, 2020). Kontrol noktası inhibitörleri ise ko-inhibitör sinyal yollarını kesintiye uğratarak antitümör immün yanıtlarını yeniden canlandırmak ve tümör hücrelerin immün aracılı eliminasyonunu teşvik etmek için tasarlanmıştır (Pasquali ve ark., 2017). Kontrol noktası inhibitörleri bugüne kadar en kapsamlı şekilde araştırılan immünoterapi sınıfıdır. En yaygın iki kontrol noktası inhibisyon stratejisi, PD-1/PD-L1 blokajı ve CTLA-4 inhibisyonudur (Michot ve ark., 2016).

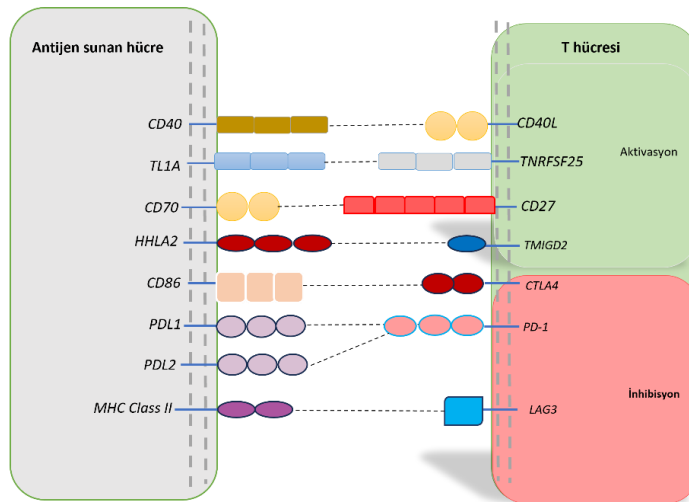
CTLA-4, T hücreleri üzerinde eksprese edilen ve T hücresi aktivasyonunu negatif olarak düzenleyen inhibitör moleküldür. Daha önceki çalışmalar, CTLA-4'ün antikörlerle bloke edilmesinin etkili bağışıklık tepkilerini indükleyebileceğini ve tümör gerilemesine yol açabileceğini göstermiştir (Lipson ve Drake, 2011). Bir CTLA-4 monoklonal antikoru (mAb) olan ipilimumab, T hücresi aktivasyonunu artırma yeteneği nedeniyle kanser tedavisi için onaylanan ilk kontrol noktası inhibitörüdür (Sondak ve ark., 2011).

PD-1 normal dokularda eksprese edilir ve PDL-1 ligandına bağlandığında T hücre aracılı lenfosit proliferasyonunu ile sitokin sekresyonunu baskılayarak immün toleransı düzenler. Bu yüzden tümör hücreleri de immün sürveyanstan kaçmak için anormal şekilde PD-L1 eksprese eder. PD-1 veya PD-L1'in inhibisyonu, T hücrelerinin sitotoksik yeteneğini aktive ederek tümör gerilemesine neden olur. Halihazırda PD-1 veya PD-L1'i hedefleyen ve birçok kanser türü tedavisi için onaylanmış antikörler mevcuttur (Ohaegbulam ve ark., 2015).

2.3. Programlı Ölüm Reseptörü 1'in İmmün Kontrol Stratejisi

Bağışıklık yanıtları, T hücresi aktivasyonu ve işlevini düzenlemede yer alan yardımcı uyarıcı ve aktive/inhibe edici molekülleri (Şekil 2.3.1.) içeren karmaşık bir denge ağı tarafından modüle edilir. Yardımcı uyarıcı moleküller pozitif sinyaller ileterek T hücrelerinin aktivasyonunu destekler. Bağışıklık kontrol noktaları olarak da bilinen inhibe edici moleküller ise T hücresinin tepkisizliğini, toleransını veya apoptozunu tetiklemek için negatif sinyaller ileterek periferik toleransın korunmasında ve otoimmün hastalıkların önlenmesinde anahtar rol oynar (Farhangnia ve Akbarpour, 2022). T hücrelerinin aktivasyonu antijen sunan hücreler (APC) tarafından iletilen en az iki sinyal

gerektirir. İlk sinyal bir majör histokompatibilite kompleksine bağlı peptid formunda sunulan antijendir. T hücresi reseptörü tarafından tanınan peptit T hücresi tepkisine özgüllük sağlar. İkinci sinyal T hücresi yüzeyinde bulunan reseptörlerle etkileşime giren APC'ler üzerindeki yardımcı uyarıcı ligandlar tarafından sağlanır. T hücreleri optimum proliferasyon, farklılaşma ve hayatta kalma için ortak uyarıcı sinyallere ihtiyaç duyar (Y. Zhang ve Zhang, 2020)



Şekil 2.3.1. T hücresi aktivasyonunu ve işlevini düzenlemede yer alan yardımcı uyarıcı ve aktive ve inhibe edici moleküller.

Aktive edici ligandlar (yeşil gölgeleme), inhibe edici ligandlar (kırmızı gölgeleme); CTLA4, sitotoksik T lenfosit antijeni 4; HHLA2, HERV-H LTR ile ilişkili protein 2; LAG3, lenfosit aktivasyon geni 3 proteini; PD1, programlanmış hücre ölümü proteini 1; PDL, programlanmış hücre ölümü 1 ligandı; TL1A, TNF benzeri ligand 1A; TMIGD2, transmembran ve immüoglobulin alanı içeren protein 2 T

Tümörler ise yukarıda bahsi geçen antitümör bağışıklık tepkilerini aktif olarak inhibe eder. Bunu antitümör bağışıklık tepkisinden kaçınmaya yardımcı olan inhibe edici ligandları eksprese edip tümör çevresinde immünsupresif ortam oluşturarak yaparlar (Mahoney ve ark., 2015) Çeşitli tümörlerin eksprese ettiği inhibe edici ve uyarıcı ligandlar Tablo 2.3.1.'deki gibidir.

Tablo 2.3.1. Çeşitli tümörlerin eksprese ettiği inhibe edici ve uyarıcı ligandları.

LİGANDLAR	TÜMÖR EKSPRESYONU	REFERANSLAR
PDL1	Melanom, böbrek kanseri, baş boyun kanseri, servikal glioblastoma, özofagus kanseri, meme kanseri, hodgkin lenfoma	(Grosso ve ark., 2013)
PDL2	Özofagus kanseri, ovaryum kanseri, pankreas kanseri, kolrektal kanser, hodgkin lenfoma	(Brown ve ark., 2003)
B7-H3	Prostat kanseri, mide kanseri, ovaryum kanseri	(Zang ve ark., 2010)
HHLA2	Meme kanseri, akciğer kanseri, tiroid kanseri, melanom, pankreas kanseri, karaciğer kanseri, kolon kanseri, prostat kanseri	(Janakiram ve ark., 2015)
CD30	Hodgkin lenfoma	(Pallesen ve ark., 1988)
CD155	Prostat kanseri, pankreas kanseri, glioblastoma	(Sloan ve ark., 2004)
B7-H4	Özofagus kanseri, ovaryum kanseri, pankreas kanseri, melanom	(Quandt ve ark., 2011)

2.4. Programlı Ölüm Reseptörünü 1'in Sinyalizasyon Mekanizması

Tümör kaynaklı bağışıklık baskılanmasına aracılık eden gelişmiş kontrol noktası moleküllerinin iyi bir örneği PD-1'dir. 1992'de Ishida ve ark. PD-1 genini ilk kez izole etmiş ve adlandırmıştır. CD28 immünoglobulin süper ailesinin bir üyesi olan PD-1, 55-60 kDa tip I zar proteinidir (Ishida ve ark., 1992). Hücre dışı bir IgV alanı, transmembran bölgesi ve bir hücre içi kuyruktan oluşur. Bu proteinin sitoplazmik kuyruğu, biri immünoresptör tirozin bazlı inhibitör motife (ITIM) ve diğeri immünoresptör tirozin bazlı anahtar motifine (ITSM) ait olan iki tirozin kalıntısı içerir (Saresella ve ark., 2012).

PD-1 monositler, T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler ve tümör infiltre edici lenfositler gibi çeşitli bağışıklık hücrelerinde eksprese edilir. Sağlıklı koşullar altında aktive edilmiş T lenfositlerin hücre yüzeyinde eksprese edilen PD-1'in normal işlevi, kendi antijenlerine yani otoimmün reaksiyonlara karşı istenmeyen aşırı bağışıklık tepkilerini azaltmaktır (Jubel ve ark., 2020)

PD-1 ligandları ise (PD-L1 ve PD-L2), spesifik immün ve immün olmayan hücrelerde immünoglobulin benzeri tip 1 transmembran proteinleri olarak eksprese edilir. Her iki ligand da sağlıklı dokularda ve çeşitli tümörlerde çok sayıda hücrede yapısal

olarak eksprese edilir veya indüklenebilir. PD-L1, hematopoietik olmayan dokularda özellikle de vasküler endotelde düşük seviyelerde eksprese edilir. PD-L2 ise sadece lenfoid dokuda veya kronik inflamatuvar ortamlarda bulunan antijen sunan hücrelerde eksprese edilir (Dong ve ark., 2017). Bu ligandların eksprese edildiği yerlere göre PD-L1'in periferik dokularda istenmeyen T-hücresi fonksiyonunu azalttığı, PD-L2'nin ise lenfoid organlarda T hücreleri aktivasyonunu kontrol ettiği düşünülmektedir. Afiniteleri dikkate alındığında PD-1'in PD-L1 ile bağlanma afinitesi PD-L2'nin afinitesinden üç kat daha fazladır. PD-L2 hakkında birkaç rapor olmasına rağmen kanser immüno-supresyonundaki rolü hakkında çok az bilgi mevcuttur (Naidoo ve ark., 2015).

Esasında fizyolojik olarak PD-1/PD-L1 yolu, normal dokuyu hasardan korumak için inflamasyon derecesini kontrol etme ihtiyacının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Tümör hücreleri ve hematopoietik hücrelerdeki PDL-1 ekspresyonları interferon gama (IFN- γ) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin uyarılmasıyla belirlenir (Shiner ve ark., 2014). Tümör mikroçevresinde aktive edilmiş T hücreleri IFN- γ ve interlökinler gibi sitokinlerin salınmasına neden olur. Buna bağlı olarak lokal dokularda PD-L1 ekspresyonu indüklenir. Yukarı regüle edilmiş PD-L1, PD-1'e bağlanarak T hücreleri reseptörü aracılığıyla tetiklenen T hücreleri aktivasyonunu inhibe eder. Böylece çevredeki normal dokuya karşı bağışıklık tepkisini azaltır (Dermani ve ark., 2019).

Daha önce bahsedildiği üzere tümörler antitümör bağışıklık tepkisinden kaçınmak için inhibe edici ligandları eksprese ederler. PD-L1 bazı tümörlerde özellikle de melanomlarda aşırı eksprese edilen ligandlardan biridir. Sonuç olarak PD-L1'i aşırı eksprese eden bir tümör, kendisini sitotoksik T hücreleri (CD8+) aracılı hücre ölümünden koruyarak bağışıklık tepkisinden kaçınır. Bu yüzden PD-L1, tümör hücrelerinin immün kaçışında önemli bir role sahiptir (Poulet ve ark., 2016).

PD-1 ve PD-L1 etkileşiminin bloke edilmesi immüno-supresif koşulları tersine çevirebilir ve böylece tümörü öldürmek için pozitif bir bağışıklık tepkisini kolaylaştırabilir. Bu amaçla PD-1 blokajı tümör büyümesi üzerindeki etkileri hem hayvan modellerinde hem de klinik ortamlarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Guo ve ark., 2017). Süregelen araştırmalar, yeni terapötik anti-PD-1 mAb'lerin pembrolizumab (Keytruda) ve nivolumabın (Opdivo'nun) geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır (S. Gettinger

ve ark., 2015). Son yıllarda ise atezolizumab, avelumab ve durvalumab gibi anti-PD-L1 monoklonal antikoları, melanom, metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri, mesane kanseri ve deri Merkel hücreli karsinomu dahil olmak üzere çeşitli maligniteler için klinik çalışmalarda olumlu yanıtlar göstermiştir (Simsek ve ark., 2019). FDA tarafından onaylanan PD-1/PDL-1'i hedefleyen immün kontrol inhibitörleri Tablo 2.4.1. 'de verilmiştir.

Tablo 2.4.1. FDA tarafından onaylanan kontrol noktası inhibitörleri

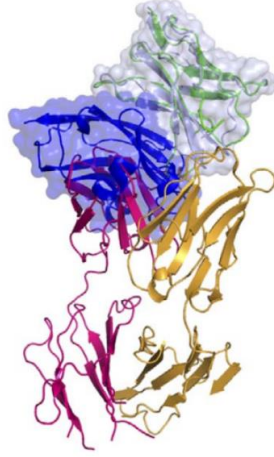
PD1-PDL1	Pembrolizumab (PD1)	FDA onaylı
	Nivolumab (PD1)	FDA onaylı
	Cemiplumab (PD1)	FDA onaylı
	Dostarlimab (PD1)	FDA onaylı
	Atezolizumab (PDL1)	FDA onaylı
	Avelumab (PDL1)	FDA onaylı
	Durvalumab (PDL1)	FDA onaylı

PD-1/PD-L1 inhibitörlerinin antikanser ajanlar olarak faydaları olmasına rağmen kullanımlarında birçok sınırlama vardır. Bunlardan biri, tümör dokularının zayıf geçirgenliğinin PD-1/PD-L1 antikor ilaçlarının genel olarak düşük yanıtla sonuçlanmasına neden olmasıdır (Wu ve ark., 2020). Ek olarak immün kontrol noktası inhibitörleri, herhangi bir organ sisteminde immünolojik toleranstaki değişikliklerden kaynaklı immün bağlantılı yan etkiler ortaya çıkarabilir. Ayrıca sıklıkla deride olmak üzere gastrointestinal sistemde, karaciğerde ve endokrin sistemde yan etkiler meydana geldiği bildirilmiştir (Naidoo ve ark., 2015).

2.5. Nivolumabın Yapısı ve Etki Mekanizması

Nivolumab (BMS-936558, ONO-4538 veya MDX1106, ticari adı Opdivo; Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, ABD), bir PD-1 immün kontrol noktası inhibitörü antikordur (Rendon ve Rayi, 2022). Genel bir immünglobulin yapısına (Şekil 2.5.1) sahip olan nivolumab, spesifik olarak immünoglobulin sınıfının mmünoglobulin G4

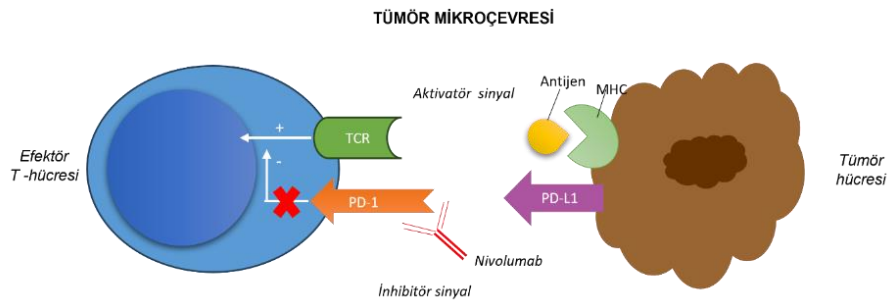
(IgG4) alt sınıfına aittir. PD-1 bir tür I transmembran proteindir. PD-1 ile etkileşime girmesinde hem ağır hem de hafif zincir etkili olur (Tan ve ark., 2017).



Şekil 2.5.1. Nivolumabın kristal yapısının şematik gösterimi. (Tan et al., 2017)

Yeşil renkte gösterilen programlanmış ölüm-1 (PD-1) reseptör proteini ile Nivolumab'ın Fab bölgesi. PD-1 bağlanma yüzeyi mavi renk olarak gösterilmiştir. Ağır zincirler turuncu renkte gösterilmiştir, hafif zincirler ise mor renkle gösterilmiştir.

Nivolumab PD-1 reseptörüne yüksek özgüllük ve afinite ile bağlanıp, tümör hücrelerinin sitotoksik T hücresi aracılı hücre ölümünden kaçmak için aşırı eksprese ettiği PD-L1 ve PD-L2 ligandlarının PD-1'e bağlanmasını önler (J. R. Brahmer ve ark., 2012). Böylece T hücrelerine gönderilen PD-1 inhibitör sinyalini bloke eder ve bağışıklık sistemi hücrelerini patolojik immün baskılanmadan kurtararak onların tümör hücrelerini tanımasına ve karşı koymasına olanak tanır. Başka bir deyişle nivolumab PD-1 reseptörünü doğrudan bloke ederek önceden var olan adaptif immün yanıtı artırır (Topalian ve ark., 2012). Nivolumabın etki mekanizması Şekil 2.5.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5.2. Nivolumabın etki mekanizmasının şematik gösterimi.

Kısaltmalar: MHC, majör doku uyumluluk kompleksi; TCR, T-Hücre Reseptörü; PD-1, programlanmış ölüm-1; PD-L1, programlanmış ölüm ligandı-1; PD-L2, programlanmış ölüm ligandı-2

2.6. Nivolumabın Farmakokineği ve Klinik Kullanımı

Nivolumab, 30 dakikalık intravenöz infüzyon şeklinde uygulanır. En yaygın doz rejimleri iki haftada bir 240 mg veya dört haftada bir 480 mg'dır. Dozlama endikasyona bağlıdır. Nivolumab maksimum konsantrasyonda (Cmaks) ve konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki alanda (EAA) dozla orantılı bir artışla birlikte lineer farmakokinetiğine sahiptir. Nivolumab doruk plazma konsantrasyonuna infüzyonun başlamasından sonra 1-4 saat sonra erişir ve serum yarılanma ömrü 12-20 gün arasındadır. Dozdan bağımsız zamanla değişen klerensi ile lineer farmakokinetiğine sahiptir. Nivolumabın santral ve periferik dağılım hacimleri sırasıyla 3,63 L ve 2,78 L'dir (Peer ve ark., 2022).

Nivolumab tedavisi genellikle iyi tolere edilir ve uygun bir güvenlik profili sergiler. Nivolumab metastatik melanom, küçük hücreli/küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, renal hücreli karsinom ve primer kemoterapiden sonra baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, plevral mezotelyoma, ürotelyal karsinom, hepatoselüler karsinom, klasik hodgkin lenfoma ve özofagus skuamöz hücreli karsinom tedavisi için onaylanmış olup diğer kanser türlerine karşı da etkili olma potansiyeli taşımaktadır (S. N. Gettinger ve ark., 2015). Tablo 2.6.1'de nivolumabın kliniğe giriş süreci hakkında bilgi sunulmuştur.

Tablo 2.6.1. Yıllara göre nivolumabın kliniğe giriş süreci

30 Mayıs 2022	Rezeke Edilemeyen İleri veya Metastatik Özofagus Skuamöz Hücreli Karsinom (ABD Gıda ve İlaç İdaresi)
20 Ağu 2021	Yüksek Riskli Ürotelyal Karsinomlu Hastaların Adjuvan Tedavisi (ABD Gıda ve İlaç İdaresi)
16 Nis 2021	Metastatik Mide Kanseri, ve Özofagus Adenokarsinomu Kemoterapi ile Kombine Kullanımını (FDA)
22 Ocak 2021	Opdivo'nun (nivolumab) Cabometyx (cabozantinib) ile Kombinasyonunu İleri Renal Hücreli Karsinomlu Hastalarda Birinci Basamak Tedavi (FDA)
2 Ekim 2020	Opdivo (nivolumab) + Yervoy'u (ipilimumab) Daha Önce Tedavi Edilmemiş Rezeke Edilemez Malign Plevral Mezotelyoma için İlk ve Tek İmmünoterapi Tedavisi (FDA)
26 Mayıs 2020	FDA, Opdivo (nivolumab) + Yervoy (ipilimumab) ile Sınırlı Kemoterapinin Metastatik veya Tekrarlayan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinin Birinci Basamak Tedavisi (FDA)
11 Temmuz 2018	Opdivo (nivolumab) + Düşük Dozlu Yervoy (ipilimumab) Kombinasyonu Daha Önce Tedavi Edilmiş Metastatik Kolorektal Kanseri Tedavisi
2 Şubat 2017	Önceden Tedavi Edilmiş Lokal Olarak İleri veya Metastatik Ürotelyal Karsinom tedavisi
10 Kasım 2016	Baş ve Boyun Kanseri Tedavisi (FDA)
17 Mayıs 2016	Hodgkin Lenfoma Tedavisi (FDA)
23 Kasım 2015	Metastatik Renal Hücreli Karsinom Tedavisi (FDA)
22 Aralık 2014	Gelişmiş Melanoma tedavisi (FDA)

2.7. Nivolumabın Yan Etkileri

Son 15 yılda kemoterapi ve radyoterapi tedavilerine immünoterapide kullanılan monoklonal antikorlar eklenmiş kanser tedavisinde daha uzun ömürler elde edilmiştir. İmmünoterapilerin kemoterapi tedavilerinde olduğu gibi toksisiteleri vardır. Genel olarak tüm kontrol noktası inhibitörleri insan vücudunda potansiyel olarak otoimmün olayları indükleyebilir (Weber ve ark., 2015).

Tedaviye bağlı otoimmünite nörolojik, solunum, kas-iskelet sistemi, kardiyak ve hematopoietik gibi herhangi bir sistemde ortaya çıkabilir. En sık etkilenen organlar deri, bağırsaklar, karaciğer, akciğerler, gözler ve endokrin bezleridir (Weber ve ark., 2015).

Şu anda, nivolumab tedavisi altında akut kalp yetmezliği rabdomiyoliz ve miyozite bağlı dispne gibi yaşamı tehdit eden nadir yan etkilerle başvuran hastalar bildirilmiştir (Palaskas ve ark., 2020; Stuby ve ark., 2020).

2.7.1. Genel yan etkiler

2.7.1.1. Yorgunluk

Anti-PD-1/ PD-L1 ajanları içeren çalışmalarda en yaygın yan etki yorgunluktur. 2012 yılında nivolumabın Faz I çalışmalarında hastaların %16-24'ünde tedaviye bağlı yorgunluk ortaya çıkmıştır (Robert ve ark., 2015). Diğer çalışmalarda da tedaviye bağlı yorgunluk rapor edilmiştir (Postow, 2015). Yorgunluk sıklıkla rapor edilmesine rağmen genellikle hafiftir ve diğer sistemik semptomlarla ilişkili değildir. Yorgunluğa neden olan spesifik mekanizma bilinmese de immün kontrol noktası tedavisi ile ilişkili endokrinopatilere bağlı olabilir (J. Brahmer ve ark., 2015).

2.7.1.2. Ateş, titreme, infüzyon reaksiyonları

Ateş, titreme ve infüzyon reaksiyonlarının nivolumab dahil olmak üzere birçok immünoterapötik antikanser ajanın yan etkisi olduğu bilinmektedir. Bu toksisitelerin gelişiminin altında yatan mekanizmanın, sitokin salımı ve bir bağışıklık tepkisinin spesifik olmayan aktivasyonundan kaynaklandığı varsayılmaktadır (Rombouts ve ark., 2020).

2.7.2. Organa spesifik yan etkiler

2.7.2.1. Dermatolojik yan etkiler

Deri döküntüsü, immün kontrol noktası mAb tedavisiyle ilişkili yaygın olarak görülür. Döküntü, kaşıntı ve vitiligo gibi dermatolojik yan etkileri olan melanom hastalarının toplu bir güvenlik analizinde, nivolumab alan hastaların %34'ünde bu toksisiteler gözlenmiştir (Ellis ve ark., 2020). Bu toksisitelerin, hastanın tümör hücreleri ve dermo-epidermal bileşke üzerinde birlikte eksprese edilen ortak bir antijenin blokajından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Hasan Ali et al., 2016).

2.7.2.2. İshal/kolit

İshal ve kolit immün kontrol noktası inhibitörlerinin gastrointestinal sistemle ilişkili yan etkileri olarak daha önce bildirilmiştir (Kubo ve ark., 2017). Nivolumab tedavisi alan birçok hastada ishal ve kolit rapor edilmiştir (Yanai ve ark., 2020).

2.7.2.3. Endokrin yan etkiler

Endokrin bezlerle ilişkili tipik toksisiteler arasında hipofizit, hipotiroidizm, hipertiroidizm, tiroidit ve adrenal yetmezlik yer almaktadır (Grouthier ve ark., 2020). Daha önce sunulan bir vaka raporunda nivolumab tedavisi alan hastada primer adrenal yetmezlik bildirilmiştir (Seki ve ark., 2017). Bunun yanında nivolumab kullanımı daha yaygın olarak tiroid disfonksiyonu ve melanom hastalarının %9'unda otoimmün tiroidit ile ilişkili bulunmuştur (Zeng ve ark., 2017). Endokrin ilişkili yan etkiler arasında tiroid fonksiyonunun düzelebileceği, ancak kortikosteroid ve gonadal eksen disfonksiyonunun muhtemelen kalıcı olduğu bulgusu mevcuttur (Yamauchi ve ark., 2017).

2.7.2.4. Hepatik yan etkiler

Nivolumab tedavisi sırasında hafif ila orta derecede aspartat aminotransferaz yükselmeleri sık sık görülür, ancak genellikle kendi kendini sınırlar (Grover ve ark., 2018). Serum alanin aminotransferaz yükselmeleri hastaların %1 ila %4'ünde görülür ve genellikle geçici olarak tedavinin kesilmesine yol açar. Önemli olarak hastaların %1 ila %2'sinde serum enzim yükselmeleri şiddetli bir immün aracılı karaciğer hasarına dönüşür (X. Zhang ve ark., 2016). Bu yüzden nivolumab gibi kontrol noktası inhibitörü tedavisi alan hastaların rutin karaciğer testleri ile izlenmesi önerilir. Nivolumab alan hastaların bir kısmında kolestatik karaciğer hasarı gelişir (Kopecký ve ark., 2019). Bağışıklık aracılı karaciğer hasarının kolestatik formları genellikle hepatoselüler formlardan daha sonra ortaya çıkar ve sıklıkla karın ağrısı ve sarılık eşlik eder. Alkalen fosfataz seviyeleri belirgin şekilde yükselirken, aminotransferaz seviyelerinde daha düşük bir artış gözlenir (Kambhampati ve ark., 2019).

2.7.2.5. Pnömoni

Genel olarak akciğer parankiminin iltihabı olarak tanımlanan pnömoninin, tek başına veya kombinasyon halinde anti-PD-1/PD-L1 tedavisi alan hastalarda görülme sıklığı %10'dan düşüktür. Bu toksisite, nivolumabın erken faz çalışmasında tedaviye bağlı ölümlere yol açmıştır (Koyama ve ark., 2018). Pnömoni nivolumab alan hastalarda tedaviye başladıktan sonra 7- 24 ay gibi geniş bir aralıkta gelişebilir. Yapılan meta analiz çalışmalarında ve vaka raporlarında nivolumab alan hastalarda ilaca bağlı pnömoni geliştiği bildirilmiştir. Akciğer kanseri hastalarda nivolumabın indüklediği immün ilişkili pnömoni insidansı diğer hastalara göre daha yüksektir (Su ve ark., 2019).

2.7.3. Nadir yan etkiler

2.7.3.1. Nörolojik yan etkiler

Nörolojik yan etkiler, kontrol noktası inhibitörleriyle yapılan tedavilerde nadir görülen fakat oldukça önemli komplikasyonlardır. Merkezi sinir sistemi bozuklukları ile karşılaştırıldığında, periferik sinir sistemi semptomları daha sık ve daha ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. Nivolumab tedavisine bağlı ölüme yol açan bir Guillain-Barre sendromu vakası bildirilmiştir. Aseptik menenjit ve enterik nöropati nadir görülen nörolojik toksisitelere dendir (Tanaka ve ark., 2016).

2.7.3.2. Renal yan etkiler

Nivolumabın hem tek başına hem de kombine verildiği hastalarda interstisyel nefrit vakaları bildirilmiştir. Klinik seyir genellikle asemptomatiktir, kreatinin düzeyi yavaş yavaş yükselir ve çoğu hasta kortikosteroid kullanımıyla iyileşir (Escandon ve ark., 2017).

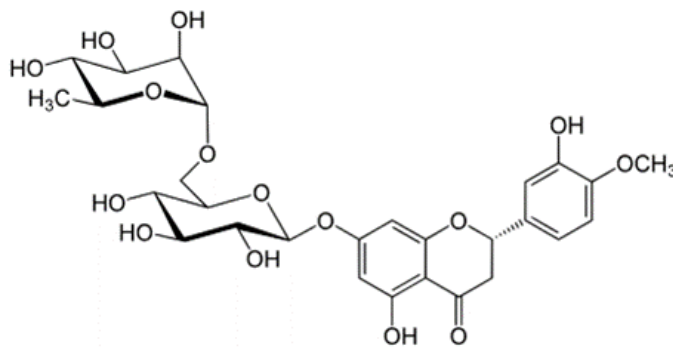
3.1. Hesperidin

Flavonoidler bitkilerde yaygın olarak bulunan bir fenolik bileşik sınıfıdır. Antikanser ve antiinflamatuvar etkiler dahil olmak üzere birçok biyolojik özelliğe sahiptirler. Sarı renkli olmaları nedeniyle latince sarı anlamına gelen flavus sözcüğünden türetilerek flavonoid adını almışlardır (C. Li ve Schluesener, 2017). Flavonoidler, üç karbonlu bir piran halkası (C) ile bağlanan iki benzen halkasına (A ve B) ve temel bir 15 karbonlu flavon iskeletine (C6-C3-C6) sahiptir. İskelet yapılarının farklı olmasına göre flavon, flavonol, flavonon, biflavonoid ve kalkan gibi türleri vardır (Dias ve ark., 2021). İlk olarak Fransız kimyacı Lebreton tarafından narenciye kabuğundan izole edilen hesperidin, flavonoidlerin alt sınıflarından biri olan flavanon türü bir bileşiktir. Hesperidin portakal, greyfurt, mandalina ve limon gibi turuncgillerin karakteristik bileşimidir (Yumol ve Ward, 2018). Son zamanlarda ön plana çıkan antioksidan, antiinflamatuvar, antihiperlipidemik, kardiyoprotektif, antidiyabetik, antihipertansif,

antiaterojenik ve venotonik gibi farmakolojik etkileri (kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Tıp 2 diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik ve psikiyatrik bozukluk gibi hastalıkların tedavisinde faydalı bulunmuştur (Parhiz ve ark., 2015).

3.1.1. Hesperidin kimyasal yapısı ve özellikleri

Flavanonlar C4 atomunda bir keton grubuna sahip olmaları ve C halkasında C2 ve C3 atomları arasında çift bağ olmaması ile flavonoidlerden ayrılır (Maciej Serda ve ark., 2013). Hesperidin (Şekil 3.1.1) kimyasal açıdan bir flavanon glikozittir ve bir aglikon hesperetin parçasından oluşur. Suda düşük çözünürlüğe sahip katı bir maddedir. Hesperidin moleküler formülü $C_{28}H_{34}O_{15}$, moleküler ağırlığı 610,1898 g/mol ve erime sıcaklığı yaklaşık $260^{\circ}C$ olup görünümü beyazdan sarıya kristal bir tozdur (Garg ve ark., 2001).



Şekil 3.1.1. Hesperidin kimyasal yapısı

3.1.2. Hesperidin farmakokinetik özellikleri

Hesperidin suda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle sınırlı bir biyoyararlanıma sahiptir ve yaklaşık %20 olduğu tahmin edilmektedir. Hesperidin glikozid halinde ya da glikozid bağları kırılarak absorbe edilir. Hesperetin diyetle alınan hesperidin absorpsiyonu için deglikozile olmuş halidir. Oral alımdan sonra hesperidin ve aglikon hesperetin bağırsak ve karaciğer dokusunda yoğun bir şekilde metabolize

edilir (Y. M. Li ve ark., 2008). Hesperidin ince bağırsakta glukozidazlar ile hidrolize edilemezler ancak kolon içine girdiklerinde kolondaki enterositlere absorbe edilmeden önce kolonik mikrobiyota tarafından hesperetin aglikonuna hidrolize edilirler (Crescenti ve ark., 2022). Hesperidinin aksine, hesperetin aglikonu pasif difüzyon ile doğrudan ince bağırsak enterositine alınabilir. Emilen hesperetin incebağırsak, kolon ve karaciğerde; UDP-glukuronosil transferazlar ve sülfotransferazlar tarafından metabolize edilir (Takumi ve ark., 2012).

3.1.3. Hesperidinin farmakolojik aktiviteleri

Hesperidin antioksidan, antiinflamatuvar, hipolipidemik, vazoprotektif, analjezik antikanserojenik gibi önemli farmakolojik aktivitelere sahiptir. Hesperidinin kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar, psikiyatrik bozukluklar, karsinom ve benzeri dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği kanıtlanmıştır (Ganeshpurkar ve Saluja, 2019).

3.1.3.1. Hesperidinin antioksidan aktivitesi

Oksidatif hasar, hücrelerde ve dokularda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artması ve/veya biyolojik sistemin bu reaktif ürünleri detoksifiye etme yeteneğinin azalması sonucunda oksidan/antioksidan dengenin bozulmasıyla ortaya çıkan bir durumdur. Oksidatif hasar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere birçok patolojik durumda ilişkilendirilmiştir (Burton ve Jauniaux, 2011). Antioksidan bileşikler, özellikle de flavonoidler bu hastalıkların önlenmesinde önemli bir koruyucu rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar esas olarak hesperidinin peroksinitrit ve hidrojen peroksit gibi çeşitli oksidanlara karşı koruyucu özelliklerine odaklanmıştır (Fadlinizal Abd Ghafar ve ark., 2010). Birçok çalışmada hesperidinin reaktif oksijen türlerini nötralize ettiğini ve antioksidan savunma sistemini güçlendirdiğini göstermiştir (Cao ve ark., 2018; Hajimahmoodi ve ark., 2014; Wilmsen ve ark., 2005). Hesperidin, A ve B halkalarında bir 2-hidroksil grubuna ve B halkasında metoksi grubuna ek olarak, C halkasının 4-okso fonksiyonu ve C4-C8 çift bağı hesperidinin güçlü radikal süpürücü

aktivitelerinden sorumludur. Hidroksil gruplarının varlığı radikal yakalama aktivitesini artırır. Daha fazla hidroksil grubu içeren flavonoller de hesperidin gibi güçlü serbest radikal ve süperoksit anyon radikal temizleyicilerdir (Aggarwal ve ark., 2020).

3.1.3.2. Hesperidinin antiinflamatuvar aktivitesi

İnflamasyon, enfeksiyonlara fiziksel veya kimyasal hasara ve serbest radikal bombardımanına karşı vücudun hızlı immünolojik reaksiyonudur ve farklı sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla çeşitli proinflamatuvar mediatörlerin veya sitokinlerin aşırı üretimini içeren karmaşık bir biyolojik süreçtir (Barber, 2015). İnflamatuvar hastalıklarda, indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimlerinin yanı sıra TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi çeşitli sitokin seviyelerinde de yükselmeler meydana gelir (Sethi ve ark., 2012). Hesperidin proinflamatuvar sitokinleri ve inflamatuvar enzimleri baskılayarak inflamasyona karşı koruma sağlar (Lorzadeh ve ark., 2019). Hesperidinin çeşitli çalışmalarda IL-6, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerini azalttığı, aynı zamanda siklooksijenaz 2 (COX-2) genlerinin transkripsiyonu inhibe ederek inflamatuvar değişiklikleri baskıladığı bildirilmiştir (Parhiz ve ark., 2014). Ayrıca hesperidin uygulamasının lipopolisakkarit ile oluşturulan inflamasyonda adjuvant artrit modellerinde ve birçok inflamasyon modelinde TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerini düşürdüğü gözlenmiştir.(R. Li ve ark., 2010; Rotimi ve ark., 2016).

3.1.3.3. Hesperidinin vazoprotektif aktivitesi

Hesperidin mikrovasküler geçirgenliği azaltır ve endotel hücrelerini hipoksiden korur. Bu özellikleri nedeniyle kronik venöz yetmezliğin tedavisinde kullanılmaktadır (Huwait ve Mobashir, 2022). Öyle ki hesperidin içeren ve vazoprotektör olarak reçete edilen ilaçlar dahi bulunmaktadır. Örneğin, Daflon ticari adıyla reçete edilen ilaç, %10 hesperidin içermekte olup, kronik venöz yetmezlik ve hemoroidal ataklar gibi venöz bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadır (Hosawi, 2023).

3.1.3.4. Hesperidinin analjezik aktivitesi

Hesperidinin analjezik etkisinin değerlendirildiği farklı çalışmalarda etki mekanizması tam olarak bilinmese de periferik nosiseptif nöronları uyaran prostaglandinler gibi endojen mediyatörlerin inhibisyonu yoluyla analjezik etki gösterdiği düşünülmektedir (Hosawi, 2023).

3.1.3.5. Hesperidinin antikarsinojenik aktivitesi

Hesperidinin bildirilen antikanser etkileri antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteleri ile ilişkilendirilmiştir (Stanisic ve ark., 2018). Hesperidin çok sayıda hücrenel hedefle etkileşip apoptozu indükleyerek ve hücre döngüsünü durdurarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği, ayrıca tümör hücrelerinde metastazı ve anjiyogenezi inhibe ettiği belirlenmiştir (Aggarwal ve ark., 2020). Apoptoz indüksiyonu ve hücre döngüsünün durdurulması hesperidinin kanser hücrelerine karşı etkisinin en önemli mekanizmaları arasındadır. İn vitro antikarsinojenik etkisinin yanında in vivo etkinliği de kanıtlanmıştır (Ahmadi ve ark., 2015).

3.1.3.6. Hesperidinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Bitki flavonoidleri bakteri, mantar ve virüsler gibi patojenik mikroorganizmalara karşı korunmada önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte geleneksel antibiyotiklere karşı yüksek mikrobiyal direnç oranı flavonoidlerin antibiyotiklere uygun alternatifler olduğunu düşündürmüştür (Iranshahi ve ark., 2015). Flavonoidlerin antibakteriyel etkilerinin kesin mekanizmaları net değildir, ancak bakteriyel DNA sentezi ve sitoplazmik membran geçirgenliği gibi çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür

(Kawaguchi ve ark., 2004). *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* ve *Enterobacter cloacae* ve *Helicobacter pylori*'ye karşı hesperidin'in antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bildiren çalışmalar mevcuttur (Corciova ve ark., 2015).

Antiviral etkinliğin değerlendirildiği çalışmalarda hesperidin dahil olmak üzere flavonoidlerin Herpes simpleks virüsü tip 1 ve 2 ile rotavirüs, enterovirüs 71'e karşı viral büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (Iranshahi ve ark., 2015).

Hesperidin'in çeşitli biyolojik aktiviteleri incelenmiştir, ancak antifungal aktiviteleri hakkında kısıtlı literatür bilgisi mevcuttur. Hesperidin'in *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium semitectum* ve *Penicillium expansum* dahil olmak üzere gıda mantarı kontaminantları üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Salas ve ark., 2011).

3.1.4. Hesperidin'in toksisitesi

Son yıllarda hesperidin, çeşitli hastalıkların tedavisi için büyük ilgi görmesine rağmen bugüne kadar zehirlenme vakası bildirilmemiştir. Ayrıca hesperidin alımından sonra meydana gelen sistemik bir yan etki de raporlanmamıştır. Mevcut akut oral toksisite çalışmalarında letal dozunun (LD50) 4837.5 mg/kg olduğu gösterilmiştir. Hem erkek hem de dişi Sprague-Dawley sıçanlar üzerinde yapılan sub-kronik oral toksisite çalışmasında hesperidin'in oral uygulaması sonucu yan etki gözlemlenen en düşük konsantrasyonu 1000 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle, hesperidin, insan ve hayvan çalışmalarında iyi bir güvenlilik profili göstermiştir (Y. Li ve ark., 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada 250-300 gr (3-4 aylık) ağırlığında erişkin Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Çalışmada yer alan hayvanlar standart bakım koşulları altında (25°C, % 50-60 nem, 12 saat gün ışığı/karanlık periyodunda) pleksiglas kafeslerde barındırıldı. Ticari pelet yem ve su adlibitum olarak verildi. Tüm deneysel işlemler Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (PAUHDEK-2022/25) alındıktan sonra Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım Kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirildi.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Karboksimetil Selüloz (TCI, C0045)

Hesperidin (Molekula 520-26-3)

Nivolumab (Opdivo)

PBS (Gibco)

Etanol (Riedel-de haen)

Kloroform (Riedel-de haen)

2-propanol (Riedel-de haen)

Trizol (BIOBASIC, BS410A)

Nükleaz içermeyen su (A.B.T.)

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 320)
 Elisa plaka okuyucu (BioTek)
 Bullet Blender (Next Advance, NY)
 StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems)
 Thermal cycler (BioCycler TC-S)
 NanoDrop (ND-1000)
 Distile su cihazı (New Human Power I S-UV)
 Soğutucu (-20) (Beko)
 Medikal soğutucu (+4) (Labor İldam)
 Soğutucu (-80) (Panasonic)
 Vorteks (Nüve NM110)
 Hassas terazi (Precisa XB220A)
 İnkübatör (Heidolph Duomax 1030)

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve İlaç Uygulamaları

Hayvanlar her grupta 8 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Deney grupları ve uygulama süreleri Tablo 3.3.1' de verildiği gibidir.

Tablo 3.3.1. Deney grupları ve uygulama süreleri

Grup Sayısı	Gruplar	Hayvan Sayısı	Uygulama Süresi
1. Grup	Kontrol	8	30 gün
2. Grup	Hesperidin	8	30 gün
3. Grup	Nivolumab	8	30 gün
4. Grup	Nivolumab + Hesperidin	8	30 gün

Kontrol Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 30 gün boyunca hesperidinin çözücüsü olarak kullanılan % 0.1'lik karboksi metil selüloz oral gavaj ile uygulandı ve haftada 2 kez intraperitoneal olarak salin uygulandı.

Hesperidin Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 30 gün boyunca gün aşırı olarak 50 mg/kg hesperidin 0.1'lik karboksi metil selüloz içerisinde çözülerek oral gavaj yolu ile uygulandı.

Nivolumab Grubu: Bu gruptaki sıçanlara nivolumab 3 mg/kg dozunda haftada 2 kez 30 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulandı.

Nivolumab + Hesperidin Grubu: Bu gruptaki sıçanlara deney süresi boyunca gün aşırı hesperidin 50 mg/kg (oral gavaj) ve haftada 2 kez nivolumab 3 mg/kg dozda intraperitoneal uygulandı.

Deney süresi boyunca hayvanların genel durumları (anormal davranış, ağrı, iştah ve itrah fonksiyonları) günlük olarak izlendi.



Şekil 3.3.2. Hayvanların gruplandırılması ve ilaç uygulamalarının yapılması

3.4. Deneyin Sonlandırılması Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Otuz günlük deney periyodunun bitiminde, son uygulamadan 24 saat sonra intramuskuler yolla uygulanan ketamin/ksilazin (Ketalar 80 mg/kg, Xylazin bio 8 mg/kg)

ile genel anestezi oluşturuldu. Anestezinin derinliği (solunum, mukoz membranların rengi vb.) periyodik olarak gözlemlendi. Anestezi altındaki sıçanlardan intrakardiyak punksiyon ile kan örnekleri alındı ve testis dokuları çıkarıldı. Kan örneklerinden sanrifüj ile serum elde edildi. Elde edilen serumlardan ELISA yöntemiyle kan testesteron düzeyleri ölçüldü. Testis dokularının bir kısmı biyokimyasal ve moleküler analizler için ayrıldı. Testis dokusunda ELISA yöntemiyle total antioksidan/oksidan düzeyleri ölçüldü. Moleküler analizlerde PD-1, PI3K, AKT, MTOR primer çiftlerinin RT-PCR ile gen ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Histopatolojik analizler için testis dokusunun diğer bir kısmı %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Hemotoksilen eozin boyama ve immunofloresan incelemeler için kullanıldı.

3.5. Testis Dokusu Homojenatların Hazırlanması

Homojenizatör (Bullet Blender Storm Next Advance, NY) kullanılarak dokular mekanik olarak homojenize edildi. Öncelikle dokular distile suyla yıkandıktan sonra uygun boyutta (300 mg) parçalanarak hassas terazide tartıldı. Ardından 1,5 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine alındı. Bu aşamada dokular 3 kez 1 ml soğuk fosfat buffer salin (PBS) ile yıkandı ve sıvı aspire edildi. Numune hacminin 2 katı tampon (PBS) eklendi ve üzerine doku kütlesine eşit miktarda boncuk (1,6 mm stainless steel bead) eklendi. Mikrosantrifüj tüpleri kapatılarak Bullet Blender'a yerleştirildi (8 rpm'de 4 dakika) homojenize edildi. Homojenat yeni bir eperndorfa alındı 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

3.6. Doku Total Antioksidan /Oksidan Düzeylerinin Ölçümü

Doku homojenizasyonu sonrasında elde edilen süpernatant örnekleri kullanılarak Total antioksidan/oksidan düzeyleri elisa yöntemi ile ölçüldü. Rat TAS (Cat.No E1710Ra) ve Rat TOS (Cat.No e1512ra) ticari kitleri kullanıldı. ELISA plaka

okuyucusunda (BioTek, Kc Junior Software) 450 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. Dikey (Y) ekseninde her standart için ortalama optik dansiteyi ve yatay (X) ekseninde konsantrasyonu gösteren standart eğri grafiği oluşturularak serum testosteron düzeyleri hesaplandı. Bütün prosedür kit protoklüne uygun olarak gerçekleştirildi.

3.7. Serum Testosteron Düzeylerinin Ölçümü

Her grupta 8 sıçandan alınan kan örnekleri 2000-3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi. Serum testosteron düzeyinin ölçümü için rat testosteron ELİSA kiti (Cat. No: E0259Ra) kullanıldı. ELISA plaka okuyucusunda (BioTek, Kc Junior Software) 450 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. Dikey (Y) ekseninde her standart için ortalama optik dansiteyi ve yatay (X) ekseninde konsantrasyonu gösteren standart eğri grafiği oluşturularak serum testosteron düzeyleri hesaplandı. Bütün prosedür kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

3.8. Real Time PCR Gen Ekspresyon Düzeylerinin Ölçümü

3.8.1. RNA izolasyonu

Total RNA izolasyon kiti One Step RNA Reagent (BIOBASIC, BS410A) kullanılarak izolasyon yapıldı. Moleküler analizler için ayrılan testis doku örnekleri (50-100 mg) 1,5 ml hacimli mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 1 ml One Step RNA Reagent eklendi. One Step RNA Reagent içerisindeki doku örnekleri homojenizatör (Bullet Blender Storm Next Advance, NY) kullanılarak 10 dakika homojenize edildi. Homojenize testis doku örneklerinin üzerine her bir 1 ml One Step RNA Reagent için 200 µl kloroform eklendi. Kısa bir vorteks (15 saniye) sonrası oda ısısında 15 dakika bekletildi. Ardından, +4°C de 13000 g'de 15 dk santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj sonrası en üstte RNA, orta kısımda DNA ve en alt kısımda protein şeklinde faz ayrımı gerçekleşti.

Üstte oluşan RNA'yı içeren şeffaf faz dikkatli bir şekilde steril mikrosantrifüj tüpüne alındı. RNA'nın presipitasyonu için alınan şeffaf fazın üzerine 500 µl izopropanol ilave edildi. Ardından oda ısısında 10 dk bekletilip +4°C de 13000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra RNA molekülleri tüpün dibinde pelet halinde çöktü. Tüpte bulunan süpernatant kısmı RNA peletine zarar vermeden uzaklaştırıldı. RNA peletinin üzerine yıkama amacıyla 200 µl %70'lik etanol eklenerek +4°C de 13000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant tüp içerisinden alındı. Pelet kurutulup etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 40 µl ddH₂O eklenerek peletin çözündürülmesi sağlandı.

3.8.2. RNA miktar tayini

NanoDrop (ND-1000) spektrofotometre ile 1 µl'deki RNA miktarı ve saflığı ölçüldü. Örneklerde protein veya DNA kirliliği saptanmadığı için herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadı.

3.8.3. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Komplementer DNA (cDNA) elde etmek için ticari olarak satın alınan High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific- Cat.No: 4368814) kullanıldı. Bütün aşamalar kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. cDNA sentez kiti içerisine elde edilen RNA'lardan son konsantrasyon 2 µg/µl olacak şekilde RNA eklenerek Thermal Cycler (Applied Biosystems, katalog no: 4375786) cihazı ile cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3.8.3.1. cDNA Sentez Kitinin İçeriği

Bileşen	Hacim
10X RT Buffer	2 µl
25X Dntp mix (100Mm)	0.8 µl
10X Random Primer	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcritase	1 µl
RNAaz içermeyen su	4.2 µl
RNA örneği	10 µl (2 µg)
Total Reaksiyon Hacmi	20 µl

Tablo 3.8.3.1’de verildiği gibi son hacim 20 µl olacak şekilde 10 µl karışım hazırlandı. Hazırlanan karışımın üzerine konsantrasyonu 2 µg olarak ayarlanan total RNA eklendi. Hazırlanan RNA örneği içeren karışım termal döngü cihazına yerleştirildi. Termal döngü cihazında reaksiyon şartları (25°C’de 10 dakika, 37 °C’de 120 dakika, ve 85°C’de 5 dakika) ayarlandı ve çalıştırıldı. Bu şekilde elde edilen cDNA molekülleri Real-Time PCR çalışması için -20 °C’de muhafaza edildi.

3.8.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qpcr) analizi

Bu tez çalışması kapsamında tüm gruplardaki PI3K, AKT, MTOR ve PD-1 gen ekspresyon değişimlerini incelemek amacıyla 2X Qpcr sybr-Green MasterMix (A.B.T.™ Laboratories, Turkey) kiti kullanılarak qPCR analizi yapıldı. Normalizasyonu sağlamak amacıyla iç kontrol (*housekeeping*) geni olarak β-Aktin kullanıldı. Kit prosedürüne göre Tablo 3.8.4.2’de gösterildiği gibi 96 kuyucuklu plakada reaksiyon koşulları sağlandı. Plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle (Applied Biosystems™ 96-Well Reaction Plate seal) kapatıldı. StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazına yüklenen plaka, 40 döngü olacak şekilde, 95°C’de 5 dk, 95°C’de 15 sn ve 60°C’de 1 dk olarak amplifiye edildi.

Tablo 3.8.4.2. 2X Qpcr sybr-Green MasterMix Kit Prosedürü

Reaksiyon Koşulları	Hacim
A.B.T.™ 2X Qpcr SYBR-Green MasterMix (with ROX)	10 µl
cDNA	1 µl
Primer (Reverse+ Forward)	1 µl
RNAaz içermeyen su	8 µl
Total Reaksiyon Hacmi	20 µl

Deney sonunda her örnek için eşığı geçen döngü sayısı (threshold cycle, Ct) elde edildi. Her örnek referans gen olan β -Aktin ifadesine göre normalize edilerek ΔCt değerleri Gene Globe RT-PCR analizi RT 2 Profiler™ PCR Array Data Analysis programı aracılığıyla hesaplandı. Elde edilen değerler $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılarak gen ifadesi, kat değişimi değerleri olarak gösterildi. Genlerin reverse ve forward dizileri Tablo 3.8.4.3’de verildi. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yazılımları kullanılarak tasarlandı.

Tablo 3.8.4.3. Çalışmada kullanılan genlerin reverse ve forward dizileri

Gen İsmi	Primer Dizisi
PD-1	Forwad TCCTAGTGGGTATCCCCGTG
	Reverse TTGTGTCCAGCTTCTCTGGC
PI3K	Forwad GCCCAGGCTTACTACAGAC
	Reverse AAGTAGGGAGGCATCTCG
AKT	Forwad AGTCCCCACTCAACAACTTCT
	Reverse AAGTAGGGAGGCATCTCG
MTOR	Forwad CAGTTCCGCCAGTGGACTAAG
	Reverse GCTGGTCATAGAAGCGGAC
β-Aktin	Forwad TGACAGGATGCAGAAGGAGA
	Reverse TAGAGCCACCAATCCACACA

3.9. Histopatolojik Analizler

Testis doku örnekleri 48 saat %10’luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Bu dokular fiksasyon sonrası dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5 μ m kalınlığında kesitler 50-100 μ m aralıklarla seri olarak alındı. Alınan kesitlere hemotoksilen eosin boyaması yapılarak histopatolojik değişiklikler değerlendirildi. Kesitler histopatolojik bulgulara göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

3.10. Double İmmunofloresan Analizler

İmmunofloresan inceleme için adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınan doku kesitleri, deparafinize ve dehidre edildi. Dokulara primer antikorlar (8 OHdG Kat No: sc-66036, Sulandırma Oranı: 1/100, US; Caspase 3 Kat No: sc-7272, Sulandırma Oranı: 1/100, US) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun inkübe edildi. Sekonder işaretleyici olarak immunfloresans sekonder antikör kullanılıp (FITC Cat No: ab6785 Dilüent Oranı: 1/500 UK) karanlık ortamda 45 dk bekletildi ardından dokulara ikinci primer antikörler (8-OHdG Kat No: s-66036, Sulandırma Oranı: 1/100, US; H2A.X Kat No: I0856-1, Sulandırma Oranı: 1/100, UK) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun inkübe edildi. Daha sonra sekonder işaretleyici olarak immunfloresan sekonder antikör kullanılıp (Texas Red Cat No: ab6719 Dilüent Oranı: 1/500 UK) karanlık ortamda 45 dk bekletildi. Bir sonraki adımda kesitlere *mounting medium*'lu DAPI (Kat no: D1306 Sulandırma Oranı: 1/200 UK) damlatılıp 5 dk karanlık ortamda bekletildikten sonra dokular lamel ile kapatıldı. Boyanan dokular floresans ataçmanlı mikroskopta incelendi (Zeiss AXIO ALMANYA).

3.11. İstatistiksel Analiz

Serum testosteron düzeylerinin ve doku total antioksidan/oksidan düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmalarda varyans analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Varyans analizini takiben çoklu karşılaştırmalar içinde Post-hoc Tukey testleri yapıldı. Veriler ortalama ve standart sapma (ortalama \pm SD) olarak sunuldu. Sonuçların yorumlanmasında $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Real-Time PCR verilerinin analizi, Gene Globe RT-PCR RT 2 Profiler™ PCR Array Data Analysis programı (Qiagen) aracılığıyla $\Delta\Delta CT$ yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Histopatolojik incelemede semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıkların analizi için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, ikili grupların mukayesesi için Mann Whitney U testi kullanıldı.

İmmunfloresan boyamalar sonucu elde edilen resimlerden pozitif boyanmaların yoğunluğunu belirlemek amacıyla; her resimden 5 adet rastgele alan seçilip ve ZEISS Zen Imaging Software programında değerlendirmeleri yapıldı. Veriler, alan %'si için ortalama±SD cinsinden istatistiksel olarak tanımlandı. Pozitiflik veren immünoreaktif hücreleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi yapıldı. Test sonucunda $P < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi ve veriler ortalama \pm SD olarak sunuldu.

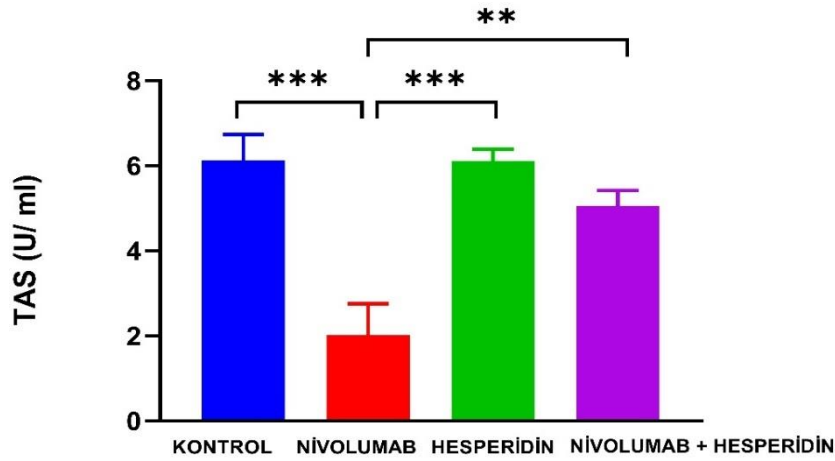
İstatistiksel analizler IBM SPSS (Chicago, IL, USA 25.0) paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

Wistar Albino sıçanlarda nivolumab kaynaklı olası testiküler toksisiteye karşı hesperidin uygulamasının etkileriyle elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur. Çalışma kapsamında oksidatif stres parametreleri (TAS-TOS), serum testosteron düzeyleri, gen ekspresyon seviyeleri incelenmiş, histopatolojik ve immunohistokimyasal analizler yapılmıştır. Elde edilen bulgular grafik ve tablo şeklinde sunulmuştur.

4.1. Doku Total Oksidan ve Antioksidan Düzeyi

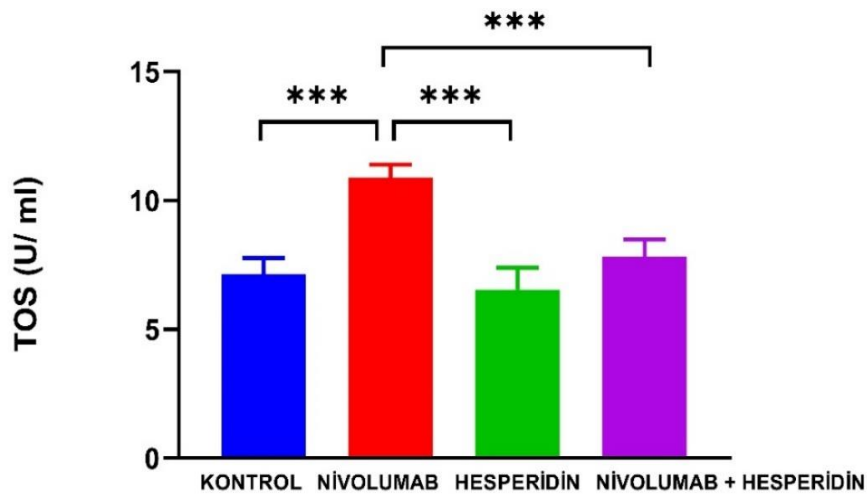
Yapılan çalışmada testis dokusunun doku total oksidan ve antioksidan düzeyleri ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Total antioksidan seviyeleri Şekil 4.1.1’de, total oksidan seviyeleri Şekil 4.1.2’de ve oksidatif stres indeksi Şekil 4.1.3’te sunulmuştur.



Şekil 4.1.1. Testis dokusunda total antioksidan düzeyi.

TAS: Total antioksidan seviyesi. Veriler ortalama \pm SD olarak sunulmuştur, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$)

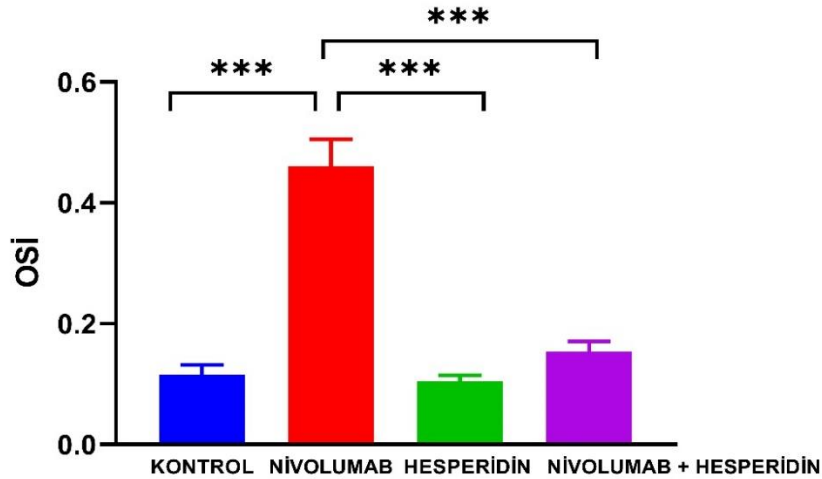
Testis dokusunda oksidatif hasarla ilişkili olarak total antioksidan seviyeleri değerlendirildiğinde nivolumab verilen grupta kontrol ve hesperidin grubu ile kıyaslandığında total antioksidan seviyelerinin azaldığı bulundu ($p < 0,001$). Bunun yanında nivolumab ile birlikte hesperidin uygulamasının nivolumabın neden olduğu total antioksidan seviyelerindeki azalmayı önlediği gözlemlendi ($p < 0,05$). Ek olarak kontrol ve nivolumab+hesperidin grubu arasında farklılıklar olsa da söz konusu fark anlamlı düzeyde değildi ($p > 0,05$).



Şekil 4.1.2. Testis dokusunda total oksidan düzeyi.

TOS: Total oksidan seviyesi. Veriler ortalama \pm SD olarak sunulmuştur, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$)

Nivolumab grubunda total oksidan seviyelerinin kontrol, hesperidin ve hesperidin +nivolumab gruplarına göre belirgin bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,01$). Kontrol, hesperidin ve hesperidin + nivolumab gruplarında ise oksidan seviyeleri benzerdi. Söz konusu gruplarda farkın anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$).



Şekil 4.1.3. Testis dokusunda oksidatif stres indeksi.

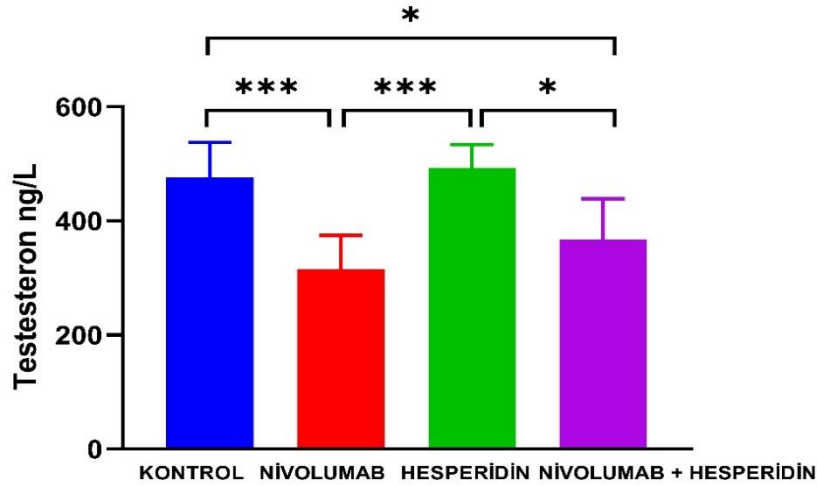
OSİ: Oksidatif stres indeksi. Veriler ortalama \pm SD olarak sunulmuştur, *** $p<0,001$; ** $p<0,01$ * $p<0,05$

Oksidatif stres indeksi değerlendirildiğinde kontrol, hesperidin ve hesperidin +nivolumab gruplarında oksidatif stres indeksi benzer bulundu ve bu gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Nivolumab grubunda ise oksidatif stres indeksi diğer gruplarla karşılaştırıldığında oldukça yüksek bulundu ($p<0,01$).

4.2. Serum Testosteron Düzeyi

Gruplara ait serum testosteron düzeyleri Şekil 4.2.1’de verilmiştir. Serum testosteron düzeyleri, kontrol ve hesperidin gruplarında birbirlerine yakındı ve elde edilen sonuçlar arasında yapılan değerlendirmede anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$). Testosteron seviyelerinin nivolumab grubunda kontrol ve hesperidin grubuna kıyasla önemli düzeyde azaldığı belirlendi ($p<0,01$). Bunun yanında nivolumab ile birlikte

hesperidin uygulamasının nivolumab kaynaklı azalan testosteron seviyelerini artırdığı belirlendi. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi ($p > 0,05$).



Şekil 4.2.1. Serum testesteron düzeyi

Veriler ortalama \pm SD olarak sunulmuştur, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

4.3. Gen Ekspresyon Bulguları

RT-PCR çalışmaları sonucunda belirlenen PI3K, AKT, MTOR ve PD-1 gen ifadelerindeki kat değişimleri Tablo 4.3.1’de verilmiştir.

Tablo 4.3.1. Gen ekspresyon bulguları

Gen	Kontrol		Nivolumab		Hesperidin		Nivo+ Hsp	
	Kat Değişimi (Fc)	<i>p</i>	Kat Değişimi (Fc)	<i>p</i>	Kat Değişimi (Fc)	<i>p</i>	Kat Değişimi (Fc)	<i>p</i>
PD-1	1.00	-	- 3.53*	0.0001	- 1.03	0.61	-3.75*	0.000
PI3K	1.00	-	- 3.04*	0.019	- 1.01	0.54	+ 2.17*	0.07
AKT	1.00	-	- 2.49*	0.002	+ 1.74*	0.002	+1.78*	0.002
MTOR	1.00	-	- 2.46*	0.002	+ 1.22	0.58	+1.02	0.66

*Kontrol Grubuna Göre ; $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Fc: Fold changes; Stimülasyon (+) ve supresyon (-)

Kontrol grubuna kıyasla nivolumab grubunda PI3K, AKT, MTOR mRNA ifadelerinin sırasıyla 3,04, 2,49, 2,46 kat azaldığı belirlendi. PD-1 mRNA ifadesinin ise kontrole kıyasla nivolumab grubunda 3,53 kat azaldığı saptandı ($p < 0.05$). Kontrol grubuna kıyasla hesperidin grubunda PI3K, AKT, MTOR ve PD-1 mRNA ifadelerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p > 0.05$). Öte yandan nivolumab ile birlikte hesperidin uygulanmasının kontrole kıyasla PI3K, AKT, MTOR mRNA ifadelerini sırasıyla 2,17, 1,78, 1,02 kat artırdığı tespit edildi.

4.4. Histopatolojik Bulgular

Grup 1; Kontrol grubu: Testis dokularının histopatolojik incelenmesinde normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4.1).

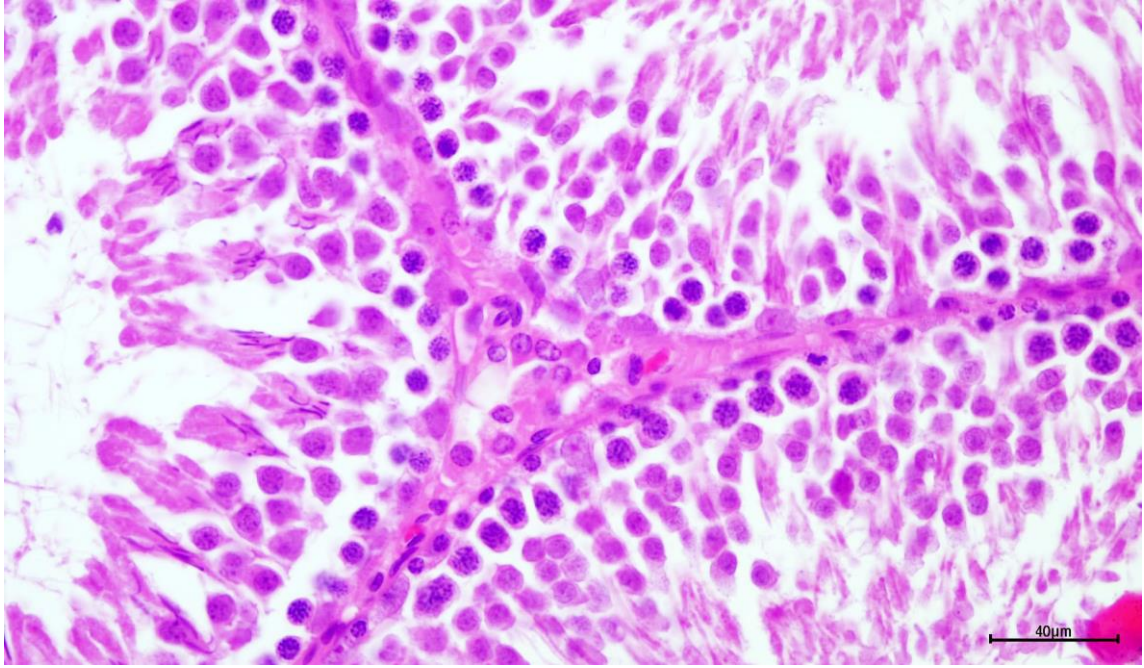
Grup 2; Nivolumab (NİVO) grubu: Testis dokularının histopatolojik incelenmesinde, testis dokularında spermatositlerde dejenerasyon ve nekroz, buna bağlı olarak seminifer tubullerin duvarında incelme, tubulus lümenlerinde çok az sayıda spermatozon, intertubuler aralıklarda ödem, interstisyel damarlarda hiperemi gözlemlendi (Şekil 4.4.2).

Grup 3; Hesperidin (HP) grubu: Testis dokularının histopatolojik incelenmesinde, normal histolojik yapıda olduğu görüldüğü belirlendi (Şekil 4.4.3).

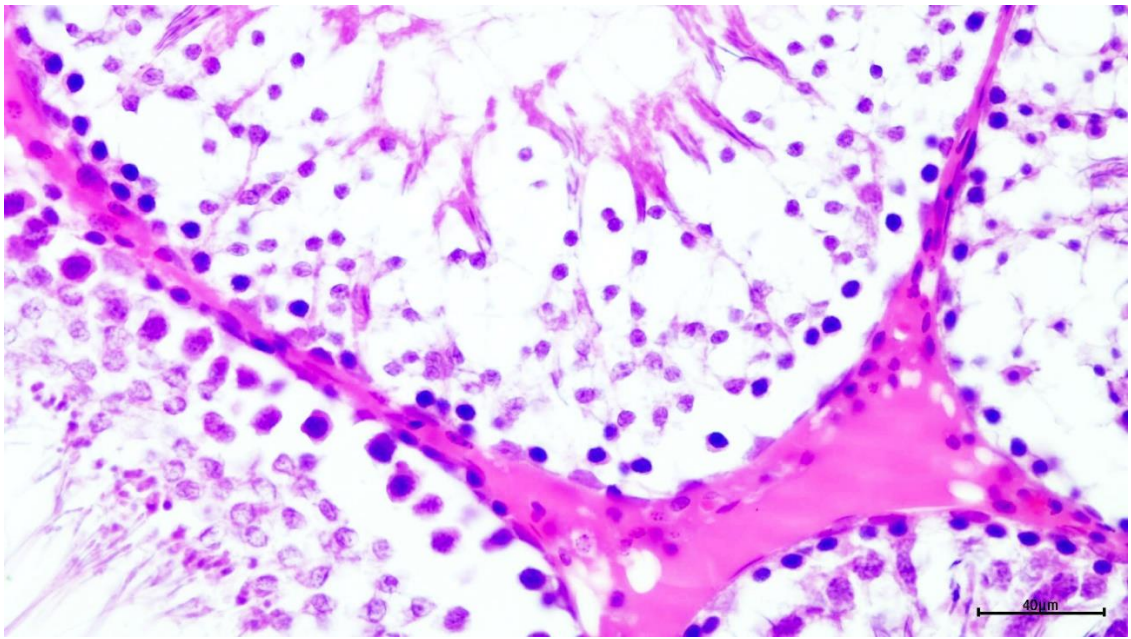
Grup 4; Nivolumab + Hesperidin grubu: Testis dokularının histopatolojik incelenmesinde, tubulus duvarında spermatositlerde hafif düzeyde dejenerasyon, çok sayıda mitoz ve rejenerasyon çabası, interstisyel aralıklarda damarlarda hiperemi görüldü (Şekil 4.4.4). Grup 2 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0,05$) tespit edildi. Histopatolojik bulgular Tablo 4.4.1’de özetlendi.

Tablo 4.4.1: Testis dokularında gözlenen histopatolojik bulguların skorlanması

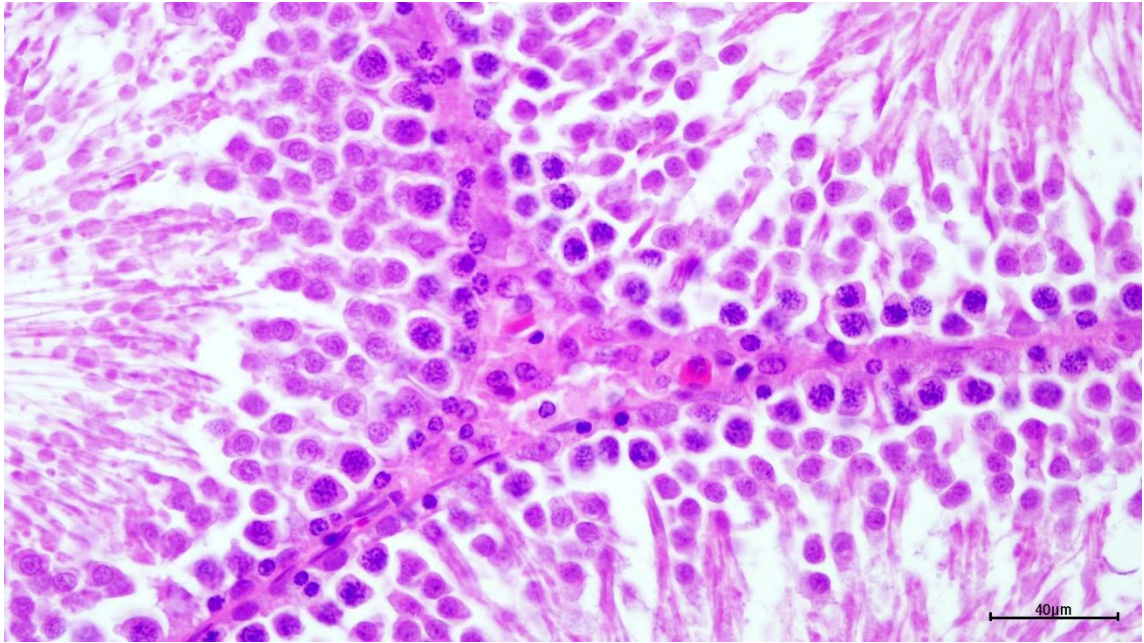
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Spermatositlerde dejenerasyon	-	+++	-	+
Spermatositlerde nekroz	-	+++	-	-
Tubulus duvarında incelme	-	+++	-	-
Damarlarda hiperemi	-	+++	-	++



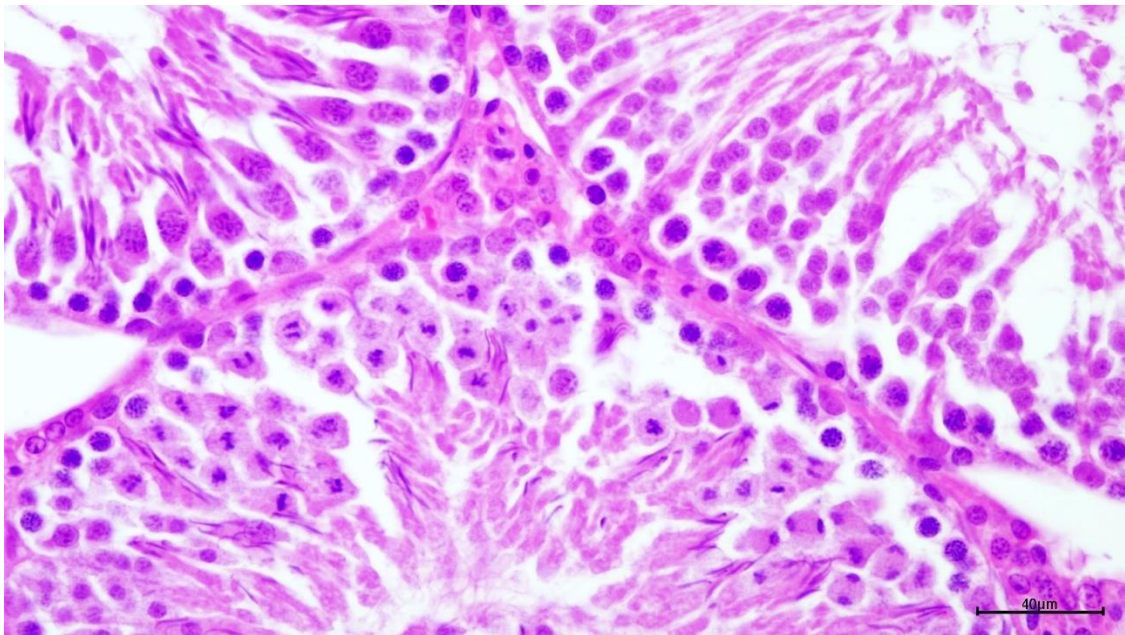
Şekil 4.4.1. Testis Dokusu, Normal histolojik görünüm, H&E, Bar:40µm.



Şekil 4.4.2. Testis Dokusu, spermatozoidlerde şiddetli düzeyde dejenerasyon ve nekroz, tubulus duvarında incelme, intertubuler aralıklarda ödem, damarlarda hiperemi, H&E, Bar:40µm.



Şekil 4.4.3. Testis Dokusu, Normal histolojik görünüm, H&E, Bar:40µm.



Şekil 4.4.4 Testis Dokusu, damarlarda hiperemi, spermatositlerde rejenerasyon çabaları ve mitoz, H&E, Bar:40µm.

4.5. Double İmmunofloresan Bulgular

Grup 1; Kontrol grubu: Testis dokularının immunofloresan incelemelerinde, negatif 8OhDG ve Kaspaz-3 ekspresyonu olarak değerlendirildi (Şekil 4.5.1).

Grup 2; Nivolumab (NİVO) grubu: Testis dokularının immunofloresan incelemelerinde, spermatoisitlerde şiddetli düzeyde stoplazmik 8OhDG ve Kaspaz-3 ekspresyonları tespit edildi (Şekil 4.5.1).

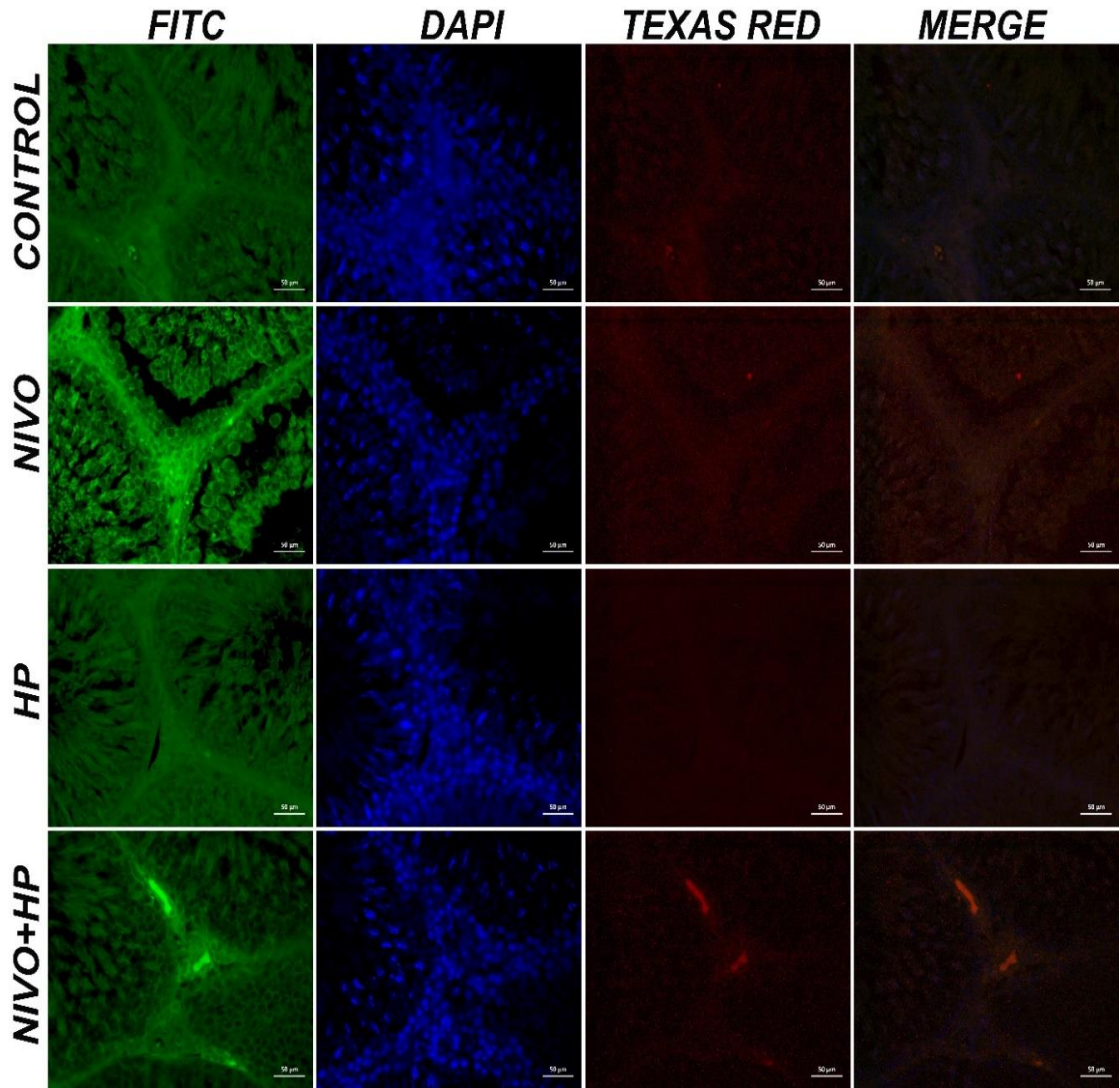
Grup 3; Hesperidin (HP) grubu: Testis dokularının immunofloresan incelemelerinde, 8OhDG ve Kaspaz-3 ekspresyonları negatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.5.1).

Grup 4; NİVO + HP grubu: Testis dokularının immunofloresan incelemelerinde, spermatoisitlerde hafif düzeyde stoplazmik 8OhDG ve Kaspaz-3 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 4.5.1). Grup 2 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$) tespit edildi. İmmunofloresan bulgular tablo 4.5.1’ de özetlendi.

Tablo 4.5.1. Testis dokularında gözlenen immunofloresan bulguların skorlanması

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
8 OHdG ekspresyonu	20.25±1.05 ^a	83.77±3.38 ^b	20.43±1.52 ^a	41.04±2.17 ^c
Kaspaz-3 ekspresyonu	19.85±1.39 ^a	81.51±4.07 ^b	20.25±1.17 ^a	19.94±1.41 ^c

a,b,c; aynı satırda bulunan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0.05$) ifade eder.



Şekil 4.5.1. Testis Dokusu, spermatozoidlerde 8 OHdG ekspresyonu (FITC), spermatozoidlerde Caspaz-3 ekspresyonu (Texas Red), Bar:50µm.

5. TARTIŞMA

Kanser, dünya çapında yüksek mortaliteyle seyreden küresel bir sağlık sorunudur. Kanser tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavi yaklaşımları kullanılmaktadır. Son zamanlarda immun sistem ve kanser arasındaki etkileşime dayalı immunoterapi yönteminin kanser tedavisinde kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (Debela ve ark., 2021). İmmünoterapi gelişmiş ve yenilikçi kanser tedavisi olarak karşımıza çıkmıştır. Spesifik kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılmasını engellemesi, sağlıklı hücrelere geleneksel tedavilere kıyasla daha az zarar vermesi ve daha uzun yaşam süreleri elde edilmesi noktasında kanser tarihinde önemli bir yere sahiptir. Bu üstünlüklerine rağmen toksisitelerine dair araştırmalar nispeten yakın geçmişte başlamış ve halen devam etmektedir (Esfahani ve ark., 2020)

İmmünoterapi, etki mekanizmasına bağlı olarak bağışıklıkla ilişkili bir toksisite profilini ortaya çıkarmaktadır. Bu toksisiteler tüm organları etkileyebilir. Nitekim bu organlardan biri de testislerdir. Çeşitli immunoterapi ilaçlarının gonadal disfonksiyona bağlı infertilite problemlerine neden olabileceği bildirilmiştir (Kennedy ve Salama, 2020). İmmünoterapi ilaçlarının erkek fertilesi üzerindeki toksik etkilerinin altında yatan mekanizma tam olarak aydınlatılmamış olsa da bu etkilerin oksidatif hasar kaynaklı olabileceğine dair bulgular mevcuttur (Liu ve ark., 2022). Birçok çalışmada oksidatif strese bağlı testiküler hasarda hesperidinin güçlü antioksidan aktivitesinin oksidatif hasarı azalttığı bildirilmiştir (Abd-Elhakim ve ark., 2020; Hozayen, 2016). Bu bağlamda nivolumabın olası testiküler toksisitesinde güçlü antioksidan aktiviteye sahip hesperidinin oksidatif hasarı azaltacağı ve testiküler hasarı iyileştirebileceği hipotezi kurulmuştur.

Oksidatif stres, hücrelerde ve dokularda ROS'un birikimi ile karakterize bir durumdur. ROS'lar hücrel aerobik metabolizmanın doğal bir yan ürünü olup mitokondri tarafından üretilir. Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahiptirler ve bu

elektronunu başka bir moleküle vererek ya da onu başka bir molekülden uzaklaştırarak diğer moleküllerle reaksiyona girebilen nispeten kararlı moleküllerdir (Juan ve ark., 2021). ROS kirlilik, duman, ilaçlar, ksenobiyotikler veya iyonlaştırıcı radyasyon gibi eksojen kaynaklar tarafından indüklenebilir ve genel olarak DNA veya RNA, membran fosfolipitleri ve proteinleri hedef alarak hücresel bileşenleri oksitleyip yapısını bozarlar. ROS fizyolojik seviyeleri normal işleyişe özgüdür ve hücre homeostazı, reseptör aktivasyonu ve gen ekspresyonu gibi fonksiyonlarla ilişkili süreçleri düzenler. Öte yandan aşırı üretildiklerinde veya hücresel savunma onları metabolize edemediğinde oksidatif hasarı meydana getirirler (Kerksick Zuhl, 2015).

Testisler spermatogenez nedeniyle yüksek oranda mitokondriyal oksijen tüketirler. Bu yüzden oksidatif strese oldukça açıktırlar. Oksidatif strese karşı hassas olan bu dokuyu karakterize eden düşük oksijen gerilimi testislerin kendisini serbest radikallerin yol açtığı hasardan koruduğu mekanizmalardan biridir. Düşük oksijen gerilimine rağmen bu doku, yüksek düzeyde doymamış yağ asitlerinin bolluğu ve potansiyel ROS'ları üreten sistemlerin varlığı nedeniyle oksidatif strese karşı savunmasızdır (John Aitken & Roman, 2008). Testislerin normal fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirmesinde antioksidan savunma sistemlerinin rolü büyüktür. Oksidatif hasar testis torsiyonundan diyabet ve ksenobiyotik maruziyetine kadar geniş bir yelpazedeki birçok patolojik durumun en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir (Dutta ve ark., 2021).

Kemoterapotik ilaçların birçoğunun hücre düzeyinde hasarlara neden olduğu ve hücrenin antioksidan ve oksidan mekanizmalarını bozduğu bilinmektedir. Bunun yanında yeni nesil immünoterapi ilaçların da bazı hastalarda oksidatif hasar ve spesifik olmayan inflamasyon gibi ciddi yan etkilere neden olabileceği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2022). Yeni nesil immünoterapi ilaçlarından biri olan nivolumabın oksidatif hasarı indükleyebileceğine dair yeterli literatür verisi yoktur. Bu açıdan çalışmamız nivolumabın sıçan testis dokusunda neden olabileceği oksidatif hasarı ortaya koyan ilk çalışmadır. Bu tez çalışmasında nivolumab uygulanan grupta diğer gruplarla kıyaslandığında total antioksidan seviyelerinin anlamlı düzeyde azaldığı ve total oksidan seviyelerinin anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Buradan hareketle nivolumabın sıçan testis dokusunda ROS üretimini artırarak oksidatif strese neden olduğunu belirledik. Sonuçlarımıza göre nivolumab yüksek ROS üretimi ile hücre içi sinyal olaylarını tetikler ve bu durum oksidatif stresin, bağışıklık tepkileri ile yakından ilişkili olduğunu

gösterir. Piscitani ve ark. tarafından sunulan bir vaka raporunda nivolumab tedavisi alan iki hastada nivolumab kaynaklı nefrotoksisite geliştiği bildirilmiştir. Nefrotoksisitenin nedeni açık olmasa da oksidatif stresle ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Piscitani ve ark., 2020).

Nivolumab diğer immünoterapi ilaçlarında olduğu gibi kanser tedavisi için umut verici olsa da uzun vadede etkinlik ve güvenilirlik açısından birçok zorlukla karşı karşıyadır. Bu nedenle nivolumabın etkinliğini sağlarken güvenilirliğini de artırmaya yönelik ROS kaynaklı oksidatif stresi hedeflemek oldukça önemlidir (Aboeella ve ark., 2021). Bu bağlamda mevcut tez çalışmasında antioksidan aktivitesi nedeniyle hesperidin uygulanmıştır. Hesperidinin hücre içi antioksidan aktivitede rol alan birçok enzimi indükleyerek etkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (Parhiz ve ark., 2015 İleritürk ve ark. yaptıkları bir çalışmada, hesperidinin paklitaksel kaynaklı testis toksisitesinde azalan antioksidan enzim aktivitelerini düzenlenerek oksidatif stresin şiddeti azalttığı gösterilmiştir (İleritürk ve ark., 2023). Hesperidinin sıçanlarda sisplatinin neden olduğu testiküler hasardan koruduğu bildirilmiştir (Kaya ve ark., 2015). Yine başka bir çalışmada hesperidinin, oksidan/antioksidan dengenin düzenlenmesi yoluyla sıçanlarda benzoapiren kaynaklı testis toksisitesini hafiflettiği bildirilmiştir. Nitekim bu tez çalışmasında da hesperidin uygulamasının antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği belirlenmiştir. Nivolumab uygulamasına bağlı olarak azalan total antioksidan seviyelerinin ve artan total oksidan seviyelerinin hesperidin uygulamasıyla kontrol grubu değerlerine yaklaştığı saptanmıştır. Böylece hesperidinin nivolumabın neden olduğu oksidatif hasarı azalttığını belirledik.

Testislere sağlanan antioksidan korumaya rağmen çok çeşitli endojen ve eksojen faktör bu savunmayı bozar ve oksidatif strese neden olarak testiküler hasar meydana getirir (Aitken ve Roman, 2008). Birçok kemoterapötik ilacın spermatogenezde kusurlara neden olduğu bilinmektedir, ancak immün kontrol noktası inhibitörleriyle kanser tedavisinin spermatogenez üzerindeki etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir. Nivolumabın infertilite üzerindeki etkisini araştıran klinik öncesi hayvan veya insan verileri oldukça sınırlıdır ve bu nedenle nivolumabın spermatogenez üzerindeki etkisi belirsizdir (Oktay ve ark., 2018).

İmmun kontrol noktası inhibitörleri ve erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi destekleyen bir vaka raporunda önceden normozoospermik bir erkeğin metastatik melanom için nivolumab tedavisi aldıktan sonra azospermik hale geldiği ve serum testosteron seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (Rabinowitz ve ark., 2021). Mevcut tez çalışmasında da tek başına nivolumab uygulamasının serum testosteron düzeyini anlamlı şekilde azalttığı saptandı. Nivolumabın testosteron seviyeleri üzerindeki etkilerini değerlendiren bir çalışma yapılmamıştır. Testosteron seviyelerindeki bu azalma oksidatif strese bağlı mitokondriyal fonksiyonun bozulması ile ilişkilendirilebilir. Nitekim Rovira-Llopis ve ark. oksidatif stres ve buna bağlı mitokondriyal disfonksiyonun spermatogenezi etkileyerek testosteron düzeylerinde azalmaya sebep olabileceğini bildirmişlerdir (Rovira-Llopis ve ark., 2017). Bunun yanında daha önceki çalışmalarda sıçanlarda testis gelişimi sırasında PD-1 reseptörünün spermatogenezin düzenlenmesinde rol oynadığı ve infertilite problemleri için potansiyel bir aday olduğu bildirilmiştir (Onisto ve ark., 2000; Wang ve ark., 2017) Buradan hareketle azalan testosteron seviyeleri oksidatif hasarla beraber nivolumabın PD-1 reseptör blokajına bağlı olabilir.

Öte yandan bu tez çalışmasında nivolumabın neden olduğu düşük testosteron seviyelerinin hesperidin uygulamasıyla beraber kontrol seviyesine yaklaştığı belirlendi. Hesperidin antioksidan/oksidan dengesinin koruyarak mitokondriyal disfonksiyonun önüne geçtiğini sonucuna ulaştık. Testislerdeki oksidatif strese karşı hesperidin göreceli potansiyelini belirlemek için birçok çalışma mevcuttur. Laila ve ark. yaptığı bir çalışmada sildenafil sitratın sıçan testis dokusunda total antioksidan kapasitede azalmalarla beraber düşük testosteron seviyelerine neden olduğu ve hesperidin uygulamasının bu etkileri azalttığı gözlenmiştir (Laila ve ark., 2023). Yine başka bir çalışmada erkek sıçanlarda siklofosamid kaynaklı testis hasarında hesperidin uygulamasının azalan testosteron seviyelerinin hesperidin etkisiyle arttığı bildirilmiştir (Khamis ve ark., 2023). Bu bağlamda elde ettiğimiz sonuçlar literatürle benzerlik göstermektedir.

Oksidatif stres çeşitli sinyal yollarını tetikleyerek gen ekspresyon değişimlerine neden olabilir. PI3K/AKT/mTOR yolu hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli olan hücre içi bir sinyal yoludur (Shiau ve ark., 2022). Oksidatif stresle birlikte PI3K/AKT/mTOR yolağı apoptoz, yaşlanma gibi çeşitli hücre stres yanıtlarının karşılıklı modülasyonundan sorumludur. Oksidatif stres PI3K/AKT/mTOR aktivitesini düzenleyebileceği gibi PI3K/AKT/mTOR aktivitesi de oksidatif stresi düzenleyebilir.

Dolayısıyla oksidatif stres ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı arasında karmaşık bir etkileşim söz konusudur (Mao ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında nivolumabın hücre düzeyinde hasarlara neden olduğu ve hücrenin antioksidan ve oksidan mekanizmalarını bozduğunu ve bunu hücre içerisinde reaktif oksijen türlerini artırarak yaptığını belirledik. Son çalışmalar ROS'un yoğun üretiminin sadece oksidatif strese neden olmakla kalmayıp aynı zamanda PI3K/AKT/mTOR yolunu inhibe ederek hücrelerin apoptoza gitmesine neden olduğunu ortaya koymuştur (H. Zhang ve ark., 2023). Buradan hareketle mevcut tez çalışmasında artan ROS miktarının PI3K/AKT/mTOR gen ekspresyonlarının değişimine neden olup olmadığını değerlendirdik.

Kontrol grubuna kıyasla nivolumab grubunda PI3K, AKT, MTOR mRNA ekspresyonlarının azaldığını belirledik. Nitekim Chang ve ark. yaptığı bir çalışmada sisplatinin sıçan testis dokusunda oksidatif stres aracılı PI3K/AKT/mTOR yolunu inhibe ederek apoptoza neden olduğunu ve bir antioksidan olan proantosiyanidin ile sisplatin tarafından inhibe edilen PI3K/AKT/mTOR yolunu aktive ederek söz konusu hasarı azalttıklarını bildirmişlerdir (Chang ve ark., 2021). Hassanein ve ark. yaptığı bir çalışmada metotreksatin sıçan testis dokusunda neden olduğu oksidatif stresin PI3K/AKT/mTOR yolunu inhibe ederek apoptozu stimüle ettiği bildirilmiştir (Hassanein ve ark., 2023). Öte yandan nivolumab ile birlikte hesperidin uygulanmasının kontrole kıyasla azalan PI3K, AKT, MTOR mRNA ekspresyonlarını arttırdığını belirledik. Bu sonuçlar hesperidinin PI3K/AKT/mTOR yolunu aktive ederek nivolumab kaynaklı testis toksisitesine karşı koruyucu bir rol oynadığını göstermektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda, oksidatif hasar kaynaklı çeşitli organ toksisitelerinde (kalp, karaciğer, böbrek, beyin) bizim sonuçlarımıza benzer şekilde hesperidinin PI3K, AKT, MTOR gen ekspresyonlarını artırarak apoptoz üzerinde inhibitör etkilere katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Caglayan ve ark., 2021; Elavarasan ve ark., 2012; Kosari-Nasab ve ark., 2018; Tirkey ve ark., 2005).

Hesperidinin nivolumabın etkinliğini değiştirip değiştirmediğini belirlemek için PD-1 gen ekspresyon seviyelerini değerlendirdik. Nivolumab uygulaması yapılan sıçanların testis dokusunda PD-1 gen ekspresyon düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. Bunun yanında tedavi olarak uygulanan hesperidinin PD-1 ekspresyon düzeylerinde bir değişiklik yapmadığı saptandı. Sonuçlarımız hesperidinin oksidatif hasarı iyileştirdiğini ve bunun yanında hesperidinin nivolumabın etkinliği üzerinde bir değişikliğe neden olmadığını gösterdi. Bu bulgumuz literatüre kazandırılacak özgün bir sonuç niteliğinde

olup, literatürde çalışmamızın bu yönüne benzer bir çalışma bulunmaması nedeniyle elde edilen sonuçları doğrulayacak ya da reddedecek bir veriye ulaşamamıştır. Benzer şekilde, literatürde hesperidin ile PD-1 ekspresyon düzeyini ilişkilendiren bir çalışma da mevcut değildir.

Oksidatif stres dokularda histopatolojik değişikliklere neden olmaktadır (Dossena ve Marino, 2021). Benz ve ark. yaptığı bir çalışmada nivolumabın spermatogenez üzerindeki histolojik etkisini değerlendirmiş ve nivolumabın histopatolojik hasarla spermatogenezini bozduğunu bildirmişlerdir (Benz ve ark., 2018). Benzer şekilde Türkmen ve ark. yaptığı çalışmada nivolumab ile aynı etki mekanizmasına sahip pembrolizumabın sıçan testis dokusunda seminifer tübül yapılarında bozulma, interstisyel alanda ödem ve vasküler konjesyon gibi değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Türkmen ve ark., 2022).

İleritürk ve ark. yaptığı bir çalışmada paklitaksel kaynaklı testiküler hasarda spermatojenik germ hücrelerinde bozulma, interstisyel ödem ve Leyding hücre kaybı, seminifer tübüllerde atrofi ve büzülme gözleendiği ve bu hasarın hesperidin tarafından hafifletildiği bildirilmiştir (İleritürk ve ark., 2023). Bu tez çalışmasında da testis dokularının histopatolojik incelenmesinde, spermatositelerde dejenerasyon ve nekroz, buna bağlı olarak seminifer tubul duvarında incelme, tubulus lümenlerinde çok az sayıda spermatozon, intertubuler aralıklarda ödem ve interstisyel damarlarda hiperemi gözleendi. Söz konusu hasar artan ROS üretimiyle ilişkilendirilebilir ve nivolumab tedavisi alan erkeklerde nivolumabın infertilite problemlerine neden olabileceği söylenebilir. Dolayısıyla bu problemin hesperidin gibi bir antioksidan etkili bileşikle hafifletilme olasılığı erkek infertilitesi açısından oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasında hemotoksilen eozin boyamaya ek olarak immunflerosan olarak 8OHdG ve Kaspaz-3'ün ekspresyonları değerlendirildi. Kaspaz-3, hücredeki apoptotik ölüm yollarından biridir, artan ROS aktivitesi ile uyarılır ve hücrede apoptoza neden olur (Sengul ve ark., 2023). Trivedi ve ark. yaptığı çalışmada doksorobusinin sıçan testis dokusunda Kaspaz-3 ekspresyonlarını arttığını ve böylelikle testis hücrelerinin ölümünü indüklediğini göstermişlerdir (Trivedi ve ark., 2011). 8-OHdG'nin oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarının en önemli belirteçlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stresten kaynaklanan hidroksil radikalleri nükleik asidin

hidrojenlenmesine yol açarak 8-OHdG'ye neden olur (Stepniak ve Karbownik-Lewinska, 2016). Gelen ve ark. yaptığı bir çalışmada 5-florourasil kaynaklı nefrotoksisitede böbrek dokularında 8-OHdG ekspresyonunun arttığı, bu durumun oksidatif stres kaynaklı DNA hasarına neden olduğu ve 5-florourasil ile birlikte hesperidin uygulamasının 8-OHdG ekspresyonunu azaltarak oksidatif hasarı önlediğini bildirmişlerdir (Gelen ve ark., 2021). Sonuçlarımız bu bakımdan literatüre benzer bir profil sergiledi. Testis dokularının immunofloresan incelemelerinde, nivolumab grubunda spermatozoidlerde şiddetli düzeyde sitoplazmik 8OHdG ve Kaspaz 3 ekspresyonları tespit edildi. Öte yandan artan hesperidin bu şiddetli ekspresyonları hafiflettiği gözlemlendi. Buradan hareketle hesperidin nivolumab kaynaklı histopatolojik hasarı tersine çevirdiği söylenebilir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında bir immün kontrol noktası inhibitörü olan nivolumabın erkek sıçanların testis dokusunda oluşturduğu hasara karşı hesperidinin koruyucu etkilere sahip olduğu belirlendi.

Nivolumab uygulamasına bağlı olarak total antioksidan seviyeleri azalırken, total oksidan seviyeleri artış gözlemlendi. Hesperidin uygulamasıyla beraber total oksidan/antioksidan seviyelerinin kontrol grubu değerlerine yaklaştığı saptandı. Böylece hesperidinin nivolumabın neden olduğu oksidatif hasarı azalttığı sonucuna ulaşıldı. Nivolumaba maruz kalan sıçanların serum testosteron düzeyinin anlamlı şekilde azaldığı saptanırken nivolumabın neden olduğu düşük testosteron seviyelerinin hesperidin uygulamasıyla beraber kontrol seviyesine yaklaştığı belirlendi.

Nivolumab uygulanan sıçanların testis dokusunda PI3K, AKT, MTOR mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna kıyasla azaldığı görüldü ve diğer sonuçlara benzer şekilde nivolumab ile birlikte hesperidin uygulanmasının azalan PI3K, AKT, MTOR mRNA ekspresyonlarını arttırdığı tespit edildi. Bu sonuçlar hesperidinin PI3K/Akt/mTOR yolunu aktive ederek nivolumab kaynaklı testis toksisitesine karşı koruyucu bir rol oynadığını gösterdi.

Nivolumab uygulaması yapılan sıçanların testis dokusunda PD-1 gen ekspresyon düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. Bunun yanında tedavi olarak uygulanan hesperidinin PD-1 ekspresyon düzeylerinde bir değişiklik yapmadığı saptandı. Sonuçlarımız hesperidinin oksidatif hasarı iyileştirdiğini ve bunun yanında nivolumabın etkinliği üzerinde bir değişikliğe neden olmadığını gösterdi.

Testis dokularının histopatolojik incelenmesinde nivolumab uygulanan testis dokularında spermatositlerde dejenerasyon ve nekroz buna bağlı olarak seminifer tubullerin duvarında incelme, tubulus lümenlerinde çok az sayıda spermatozon,

intertubuler aralıklarda ödem, interstisyel damarlarda hiperemi gözlemlendi. Nivolumab ve hesperidinin birlikte uygulandığı grupta söz konusu hasarların hafiflediği gözlemlendi. Testis dokularının immunofloresan incelemelerinde, nivolumab grubunda spermatozoidlerde şiddetli düzeyde sitoplazmik 8OhDG ve Kaspaz-3 ekspresyonları tespit edildi. Hesperidin uygulamasının bu şiddetli düzeydeki ekspresyonları hafiflettiği gözlemlendi. Bu bağlamda nivolumab ile oluşan histopatolojik hasarı hesperidin tarafından hafifletilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması hesperidin uygulamasının sıçanlarda nivolumab ile indüklenen testis hasarını azalttığını ve spermatogenezin devamlılığını sağladığını göstermektedir.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar bu alanda yapılan çalışmalara ve bundan sonra yapılacak olan daha ileri araştırmalara ışık tutacağı umudunu taşımaktayız. Ayrıca nivolumab alan hastalarda ilaca bağlı toksik etkiler daha kapsamlı şekilde incelenmeli ve bu etkileri hedefleyen tedavi yöntemleri araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, M. ve Ustoyev, Y. (2019). Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *In Seminars in Oncology Nursing*, 35(5), 150923. <https://doi.org/10.1016/J.SONCN.2019.08.002>
- Abd-Elhakim, Y. M., Ghoneim, M. H., Ebraheim, L. L. M., Imam, T. S. (2020). Taurine and hesperidin rescues carbon tetrachloride-triggered testicular and kidney damage in rats via modulating oxidative stress and inflammation. *Life Sciences*, 254, 117782. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.117782>
- Aboeella, N. S., Brandle, C., Kim, T., Ding, Z. C., Zhou, G. (2021). Oxidative Stress in Aggarwal, V., Tuli, H. S., Thakral, F., Singhal, P., Aggarwal, D., Srivastava, S., Pandey, A., Sak, K., Varol, M., Khan, M. A., Sethi, G. (2020). Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements. *Experimental Biology and Medicine*, 245(5), 486-497. <https://doi.org/10.1177/1535370220903671>
- Ahmadi, A., Shadboorestan, A., Nabavi, S. F., Setzer, W. N., Nabavi, S. M. (2015). The Role of Hesperidin in Cell Signal Transduction Pathway for the Prevention or Treatment of Cancer. *Current medicinal chemistry*, 22(30), 3462-3471.
- Aitken, R. J. ve Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1(1), 15. <https://doi.org/10.4161/OXIM.1.1.6843>
- Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K., Iyer, A. K. (2017). PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 561. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00561>
- Alturki, N. A. (2023). Review of the Immune Checkpoint Inhibitors in the Context of Cancer Treatment. *Journal of Clinical Medicine*, 12(13), 4301. <https://doi.org/10.3390/JCM12134301>
- Alturki, N. A. (2023). Review of the Immune Checkpoint Inhibitors in the Context of Cancer Treatment. *Journal of Clinical Medicine*, 12(13), 4301.
- Andtbacka, R. H. I., Kaufman, H. L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K. A., Spitler, L. E., Puzanov, I., Agarwala, S. S., Milhem, M., Cranmer, L., Curti, B., Lewis, K., Ross, M., Guthrie, T., Linette, G. P., Daniels, G. A., Harrington, K., ... Coffin, R. S. (2015). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(25), 2780–2788. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3377>

- Ardolino, M., Hsu, J., Oncotarget, D. R. (2015). Cytokine treatment in cancer immunotherapy. *Oncotarget*, 6(23), 19346. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5095>
- Barber, G. N. (2015). STING: infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 15(12), 760–770. <https://doi.org/10.1038/nri3921>
- Beatty, G. L., O'Hara, M. (2016). Chimeric antigen receptor-modified T cells for the treatment of solid tumors: Defining the challenges and next steps. *Pharmacology & Therapeutics*, 166, 30–39. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2016.06.010>
- Benz, K. S., Maruf, M., Duregon, E., Hooper, J., Matoso, A., Herati, A. S. (2018). Testicular histopathology after immunotherapy for metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology*, 36, 15.
- Boutros, C., Mateus, C., Lambotte, O. (2016). Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *European journal of cancer*, 54, 139-148.
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q. M., Hwu, W.-J., Topalian, S. L., Hwu, P., Drake, C. G., Camacho, L. H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H. C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T. M., Alaparthy, S., Grosso, J. F., ... Wigginton, J. M. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455–2465. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1200694>
- Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., Borquez-Ojeda, O., Qu, J., Wasielewska, T., He, Q., Bernal, Y., Rijo, I. V., Hedvat, C., Kobos, R., Curran, K., ... Sadelain, M. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine*, 5(177). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3005930>
- Brown, J. A., Dorfman, D. M., Ma, F. R., Sullivan, E. L., Munoz, O., Wood, C. R., ... & Freeman, G. J. (2003). Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *The Journal of Immunology*, 170(3), 1257-1266. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1257>
- Burton, G. J. ve Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287–299. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2010.10.016>
- Cancers, 13(5), 986. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13050986>
- Cao, R., Zhao, Y., Zhou, Z., Zhao, X. (2018). Enhancement of the water solubility and antioxidant activity of hesperidin by chitoooligosaccharide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(6), 2422–2427. <https://doi.org/10.1002/JSFA.8734>
- Carter, P. (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Reviews Cancer*, 1(2), 118-129. <https://doi.org/10.1038/35101072>
- Chang, X., Tian, M., Zhang, Q., Liu, F., Gao, J., Li, S., Liu, H., Hou, X., Li, L., Li, C., & Sun, Y. (2021). Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates cisplatin-induced testicular apoptosis via PI3K/Akt/mTOR and endoplasmic reticulum stress pathways in rats. *Journal of Food Biochemistry*, 45(8), e13825. <https://doi.org/10.1111/JFBC.13825>
- Cicala, C. M., Musacchio, L., Scambia, G., Lorusso, D. (2023). Dostarlimab: From preclinical investigation to drug approval and future directions. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 19(1), 2178220.

- Conlon, K. C., Miljkovic, M. D., Waldmann, T. A. (2019). Cytokines in the treatment of cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 39(1), 6-21. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0019>
- Corciova, A., Ciobanu, C., Poiata, A., Mircea, C., Nicolescu, A., Drobotu, M., Varganici, C. D., Pinteala, T., Marangoci, N. (2015). Antibacterial and antioxidant properties of hesperidin: β -cyclodextrin complexes obtained by different techniques. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 81(1), 71–84. <https://doi.org/10.1007/S10847-014-0434-2/FIGURES/12>
- Crescenti, A., Caimari, A., Alcaide-hidalgo, J. M., Mariné-casadó, R., Valls, R. M., Companys, J., Salamanca, P., Calderón-pérez, L., Pla-pagà, L., Pedret, A., Delpino-rius, A., Herrero, P., Samarra, I., Arola, L., Solà, R., Del Bas, J. M. (2022). Hesperidin Bioavailability Is Increased by the Presence of 2S-Diastereoisomer and Micronization A Randomized, Crossover and Double-Blind *Clinical Trial. Nutrients*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/NU14122481/S1>
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/CBIN.11137>
- Debela, D. T., Muzazu, S. G. Y., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE open medicine*, 9, 20503121211034366. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>
- Dermani, F. K., Samadi, P., Rahmani, G., Kohlan, A. K., Najafi, R. (2019). PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(2), 1313–1325. <https://doi.org/10.1002/JCP.27172>
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26175377>
- Dong, Y., Sun, Q., Zhang, X. (2017). PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget*, 8(2), 2171. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.13895>
- Dossena, S. ve Marino, A. (2021). Cellular Oxidative Stress. *Antioxidants*, 10(3), 1–6. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10030399>
- Duma, N. ve Lambertini, M. (2020). It Is Time to Talk About Fertility and Immunotherapy. *The Oncologist*, 25(4), 277–278. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2019-0837>
- Dutta, S., Sengupta, P., Slama, P., & Roychoudhury, S. (2021). Oxidative Stress, Testicular Inflammatory Pathways, and Male Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 10043, 22(18), 10043. <https://doi.org/10.3390/IJMS221810043>
- Ellis, S. R., Vierra, A. T., Millsop, J. W., Lacouture, M. E., Kiuru, M. (2020). Dermatologic toxicities to immune checkpoint inhibitor therapy: A review of histopathologic features. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 83(4), 1130. <https://doi.org/10.1016/J.JAAD.2020.04.105>
- Eno, M.S. Ve PAC, J. (2017). Immunotherapy Through the Years. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, 8(7), 747. <https://doi.org/10.6004/jadpro.2017.8.7.8>
- Escandon, J., Peacock, S., Trabolsi, A., Thomas, D. B., Layka, A., Lutzky, J. (2017). Interstitial nephritis in melanoma patients secondary to PD-1 checkpoint inhibitor. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/S40425-016-0205-2/FIGURES/2>

- Esfahani, K., Roudaia, L., Buhlaiga, N. A., Del Rincon, S. V., Papneja, N., Miller, W. H. (2020). A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Current Oncology*, 27(2), 87-97. <https://doi.org/10.3747/co.27.5223>
- Fadlinizal Abd Ghafar, M., Nagendra Prasad, K., Kin Weng, K., Ismail, A. (2010). Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *African Journal of Biotechnology*, 9(3), 326–330. <https://doi.org/10.4314/AJB.V9I3>
- Falzone, L., Salomone, S., Libra, M. (2018). Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 421926. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.01300/BIBTEX>
- Farhangnia, P. ve Akbarpour, M. (2022). Immunological Tolerance. *Encyclopedia of Infection and Immunity*, 1, 206–220.
- Filin, I. Y., Solovyeva, V. V., Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A. (2020). Current Trends in Cancer Immunotherapy. *Biomedicines*, 8(12), 621. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8120621>
- Fukuhara, H., Ino, Y., Todo, T. (2016). Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Science*, 107(10), 1373–1379. <https://doi.org/10.1111/CAS.13027>
- Galluzzi, L., Kroemer, G., Eggermont, A. (2014). Novel immune checkpoint blocker approved for the treatment of advanced melanoma. *Oncoimmunology*, 3(11), e967147-1-e967147-5. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.967147>
- Ganeshpurkar, A. ve Saluja, A. (2019). The pharmacological potential of hesperidin. 56(4), 287–300.
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. (2019b). The pharmacological potential of hesperidin. *IJBB* Vol.56(4) [August 2019], 56, 287–300. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/49535>
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., & Singla, A. K. (2001). Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15(8), 655–669. <https://doi.org/10.1002/PTR.1074>
- Garutti, M., Lambertini, M., Puglisi, F. (2021). Checkpoint inhibitors, fertility, pregnancy, and sexual life: a systematic review. *ESMO Open*, 6(5), 100276. <https://doi.org/10.1016/J.ESMOOP.2021.100276>
- Gelen, V., Şengül, E., Yıldırım, S., Senturk, E., Tekin, S., Kükürt, A. (2021). The protective effects of hesperidin and curcumin on 5-fluorouracil-induced nephrotoxicity in mice. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(34), 47046–47055.
- Gettinger, S. N., Horn, L., Gandhi, L., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Rizvi, N. A., Powderly, J. D., Heist, R. S., Carvajal, R. D., Jackman, D. M., Sequist, L. V., Smith, D. C., Leming, P., Carbone, D. P., Pinder-Schenck, M. C., Topalian, S. L., Hodi, F. S., Sosman, J. A., Sznol, M., ... Brahmer, J. R. (2015). Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(18), 2004. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3708>
- Gross, G., Waks, T., Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24), 10024–10028. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.24.10024>
- Grouthier, V., Lebrun-Vignes, B., Moey, M., Johnson, D. B., Moslehi, J. J., Salem, J., Bachelot, A. (2020). Immune Checkpoint Inhibitor-Associated Primary Adrenal

- Insufficiency. *The Oncologist*, 25(8), 696–701.
<https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2019-0555>
- Grover, S., Rahma, O. E., Hashemi, N., Lim, R. M. (2018). Gastrointestinal and Hepatic Toxicities of Checkpoint Inhibitors: Algorithms for Management. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 38, 13–19.
https://doi.org/10.1200/edbk_100013
- Guo, L., Zhang, H., Chen, B. (2017). Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) Inhibitor for Targeted Immunotherapy in Tumor. *Journal of Cancer*, 8(3), 410.
<https://doi.org/10.7150/JCA.17144>
- Hajimahmoodi, M., Moghaddam, G., Mousavi, S. M., Sadeghi, N., Oveisi, M. R., Jannat, B. (2014). Total Antioxidant Activity, and Hesperidin, Diosmin, Eriocitrin and Quercetin Contents of Various Lemon Juices. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(6), 951–956. <https://doi.org/10.4314/TJPR.V13I6.18>
- Hammerstrom, A. E., Cauley, D. H., Atkinson, B. J., Sharma, P. (2011). Cancer Immunotherapy: Sipuleucel-T and Beyond. *Pharmacotherapy. The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 31(8), 813–828.
<https://doi.org/10.1592/PHCO.31.8.813>
- Hasan Ali, O., Diem, S., Markert, E., Jochum, W., Kerl, K., French, L. E., Speiser, D. E., Früh, M., Flatz, L. (2016). Characterization of nivolumab-associated skin reactions in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 5(11). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1231292>
- Hassanein, E. H. M., Mohamed, W. R., Hussein, R. M., Arafa, E. S. A. (2023). Edaravone alleviates methotrexate-induced testicular injury in rats: Implications on inflammation, steroidogenesis, and Akt/p53 signaling. *International Immunopharmacology*, 117, 109969.
<https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2023.109969>
- Hosawi, S. (2023). Current Update on Role of Hesperidin in Inflammatory Lung Diseases: Chemistry, Pharmacology, and Drug Delivery Approaches. *Life*, 13(4), 937. <https://doi.org/10.3390/LIFE13040937>
- Hozayen, W. G. (2016). Hozayen, W. G. (2012). Effect of hesperidin and rutin on doxorubicin induced testicular toxicity in male rats. *Int J Food Nutr Sci*, 1(1), 31–42.
<https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05481.X>
<https://doi.org/10.1007/S11356-021-13969-5>
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00165-8>
<https://doi.org/10.1186/S13045-017-0552-6>
<https://doi.org/10.2174/092986732230151019103810>
- Huwait, E., & Mobashir, M. (2022). Potential and Therapeutic Roles of Diosmin in Human Diseases. *Biomedicines* 10(5), 1076.
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10051076>
- Ileriturk, M., Kandemir, O., Akaras, N., Simsek, H., Genc, A., Kandemir, F. M. (2023). Hesperidin has a protective effect on paclitaxel-induced testicular toxicity through regulating oxidative stress, apoptosis, inflammation and endoplasmic reticulum stress. *Reproductive Toxicology* 118.
<https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2023.108369>
- Iranshahi, M., Rezaee, R., Parhiz, H., Roohbakhsh, A., & Soltani, F. (2015). Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sciences*, 137, 125–132.
<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2015.07.014>

- Iranshahi, M., Rezaee, R., Parhiz, H., Roohbakhsh, A., & Soltani, F. (2015b). Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sciences*, 137, 125–132. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2015.07.014>
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO Journal*, 11(11), 3887–3895.
- Janakiram, M., Chinai, J. M., Fineberg, S., Fiser, A., Montagna, C., Medavarapu, R., Hyungjun, E., Ohaegbulam, J., ZhaO, R., Zhao, A., Almo, C.S., Sparano, J. Zang, X. (2015). Expression, clinical significance, and receptor identification of the newest B7 family member HHLA2 protein. *Clinical cancer research*, 21(10), 2359-2366.
- John Aitken, R. ve Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636, 153–171. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_9
- Juan, C. A., de la Lastra, J. M. P., Plou, F. J., Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642. <https://doi.org/10.3390/IJMS22094642>
- Jubel, J. M., Barbati, Z. R., Burger, C., Wirtz, D. C., & Schildberg, F. A. (2020). The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Frontiers in Immunology*, 11, 524474. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00487/BIBTEX>
- Kambhampati, S., Bauer, K. E., Bracci, P. M., Keenan, B. P., Behr, S. C., Gordan, J. D., Kelley, R. K. (2019). Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma and Child-Pugh class B cirrhosis: Safety and clinical outcomes in a retrospective case series. *Cancer*, 125(18), 3234–3241. <https://doi.org/10.1002/CNCR.32206>
- Kawaguchi, K., Kikuchi, S. I., Hasunuma, R., Maruyama, H., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y. (2004). A Citrus Flavonoid Hesperidin Suppresses Infection-Induced Endotoxin Shock in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(5), 679–683. <https://doi.org/10.1248/BPB.27.679>
- Kaya, K., Ciftci, O., Cetin, A., Doğan, H., Başak, N. (2015). Hesperidin protects testicular and spermatological damages induced by cisplatin in rats. *Andrologia*, 47(7), 793–800. <https://doi.org/10.1111/AND.12332>
- Kennedy, L. B. ve Salama, A. K. S. (2020). A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(2), 86–104. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21596>
- Kerksick, C. M. ve Zuhl, M. (2015). Mechanisms of Oxidative Damage and Their Impact on Contracting Muscle. *Antioxidants in Sport Nutrition*, 1–16. <https://doi.org/10.1201/b17442-1>
- Khamis, T., Hegazy, A. A., El-Fatah, S. S. A., Abdelfattah, E. R., Abdelfattah, M. M. M., Fericean, L. M., Arisha, A. H. (2023). Hesperidin Mitigates Cyclophosphamide-Induced Testicular Dysfunction via Altering the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis and Testicular Steroidogenesis, Inflammation, and Apoptosis in Male Rats. *Pharmaceuticals* 2023, Vol. 16, Page 301, 16(2), 301. <https://doi.org/10.3390/PH16020301>
- Kim, A. E., Nelson, A., Stimpert, K., Flyckt, R. L., Thirumavalavan, N., Baker, K. C., Weinmann, S. C., Hoimes, C. J. (2022). Minding the Bathwater: Fertility and

- Reproductive Toxicity in the Age of Immuno-Oncology. *JCO Oncology Practice*, 18(12), 815–822. <https://doi.org/10.1200/op.22.00469>
- Kopecký, J., Kubecek, O., Geryk, T., Podhola, M., Ziaran, M., Priester, P., Hanisova, M., Borilova, S. (2019). Hepatic Injury Induced by a Single Dose of Nivolumab - a Case Report and Literature Review. *Casopis Ceske a Slovenske Onkologicke Spolecnosti*, 32(2), 133–138. <https://doi.org/10.14735/AMKO2019133>
- Koyama, N., Iwase, O., Nakashima, E., Kishida, K., Kondo, T., Watanabe, Y., Takahashi, H., Umebayashi, Y., Ogawa, Y., Miura, H. (2018). High incidence and early onset of nivolumab-induced pneumonitis: Four case reports and literature review. *BMC Pulmonary Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12890-018-0592-X>
- Kubo, K., Kato, M., Mabe, K. (2017). Nivolumab-Associated Colitis Mimicking Ulcerative Colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 15(9), A35–A36. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.03.026>
- Laila, I. M. I., Kassem, S. H. A., Diab, M. S. E. D. M. (2023). Ameliorative effect of hesperidin against high dose sildenafil-induced liver and testicular oxidative stress and altered gene expression in male rats. *Laboratory Animal Research*, 39(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S42826-023-00173-4/TABLES/6>
- Lee, S. Ve Margolin, K. (2011). Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers*, 3(4), 3856–3893. <https://doi.org/10.3390/CANCERS3043856>
- Li, C. ve Schluesener, H. (2017). Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 613–631. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.906382>
- Li, R., Li, J., Hu, C.M., Zhang, L., Cai, L., Li, J. (2010). Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(2), 221–228. <https://doi.org/10.1211/JPP.60.2.0011>
- Li, S., Zhang, Z., Lai, W. F., Cui, L., Zhu, X. (2020). How to overcome the side effects of tumor immunotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110639. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110639>
- Li, Y. M., Li, X. M., Li, G. M., Du, W. C., Zhang, J., Li, W. X., Xu, J., Hu, M., Zhu, Z. (2008). In Vivo pharmacokinetics of hesperidin are affected by treatment with glucosidase-like BglA protein isolated from yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5550. <https://doi.org/10.1021/JF800105C>
- Li, Y., Kandhare, A. D., Mukherjee, A. A., Bodhankar, S. L. (2019). Acute and sub-chronic oral toxicity studies of hesperidin isolated from orange peel extract in Sprague Dawley rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 105, 77–85. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2019.04.001>
- Lin, M. J., Svensson-Arvelund, J., Lubitz, G. S., Marabelle, A., Melero, I., Brown, B. D., Brody, J. D. (2022). Cancer vaccines: the next immunotherapy frontier. *Nature Cancer*, 3(8), 911–926. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00418-6>
- Lipson, E. J. ve Drake, C. G. (2011). Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clinical cancer research*, 17(22), 6958–6962.
- Liu, R., Peng, L., Zhou, L., Huang, Z., Zhou, C., Huang, C. (2022). Oxidative Stress in Cancer Immunotherapy: Molecular Mechanisms and Potential Applications. *Antioxidants*, 11(5), 853. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11050853>
- Liu, Y. P., Zheng, C. C., Huang, Y. N., He, M. L., Xu, W. W., Li, B. (2021). Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm*, 2(3), 315–340. <https://doi.org/10.1002/MCO2.55>
- Lorzadeh, E., Ramezani-Jolfaie, N., Mohammadi, M., Khoshbakht, Y., Salehi-Abargouei, A. (2019). The effect of hesperidin supplementation on inflammatory

- markers in human adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Chemico-biological interactions*, 307, 8-15.
- Mahoney, K. M., Rennert, P. D., Freeman, G. J. (2015). Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14(8), 561–584. <https://doi.org/10.1038/NRD4591>
- Mao, S., Luo, X., Li, Y., He, C., Huang, F., Su, C. (2019). Role of PI3K/AKT/mTOR Pathway Associated Oxidative Stress and Cardiac Dysfunction in Takotsubo Syndrome. *Current Neurovascular Research*, 17(1), 35–43. <https://doi.org/10.2174/1567202617666191223144715>
- Marin-Acevedo, J. A., Soyano, A. E., Dholaria, B., Knutson, K. L., Lou, Y. (2018). Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors. *Journal of Hematology & Oncology* 11(1), 1–25.
- Michot, J., Bigenwald, C., Champiat, S., Collins, M., Carbonnel, F., Postel-Vinay, S., Berdelou, A., Varga, A., Bahleda, R., Hollebecque A., Massard, C., Fuerea, A., Ribrag, V., Gazzah, A., Armand, J.P., Amellal, N., Angevin, E., Noel, N., Mitsogiannis, I., Tzelves, L., Dellis, A., Issa, H., Papatsoris, A., Moussa, M. (2022). Prostate cancer immunotherapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 22(5), 577–590. <https://doi.org/10.1080/14712598.2022.2027904>
- Morrissey, S. M. ve Yan, J. (2020). Exosomal PD-L1: roles in tumor progression and immunotherapy. *Trends in cancer*, 6(7), 550-558.
- Naidoo, J., Page, D. B., Li, B. T., Connell, L. C., Schindler, K., Lacouture, M. E., Postow, M. A., Wolchok, J. D. (2015). Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(12), 2375–2391. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDV383>
- Nain, S., Mathur, G., Sharma, P. K. (2015). Cancer: An Overview. *Academic Journal of Cancer Research*, 8(1), 1–09. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajcr.2015.8.1.9336>
- Nakamura, H. ve Maeda, H. (2020). Cancer Chemotherapy. *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*, 401–427. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9164-4_15
- Ni, L. ve Dong, C. (2017). New checkpoints in cancer immunotherapy. *Immunological Reviews*, 276(1), 52–65. <https://doi.org/10.1111/IMR.12524>
- Nicholas, C., Lesinski, G. B. (2011). Immunomodulatory cytokines as therapeutic agents for melanoma. *Immunotherapy*, 3(5), 673–690. <https://doi.org/10.2217/IMT.11.45>
- Ohaegbulam, K. C., Assal, A., Lazar-Molnar, E., Yao, Y., Zang, X. (2015). Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends in Molecular Medicine*, 21(1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.10.009>
- Oktay, K., Harvey, B. E., Partridge, A. H., Quinn, G. P., Reinecke, J., Taylor, H. S., Hamish Wallace, W., Wang, E. T., Loren, A. W. (2018). Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(19), 1994–2001. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.1914>
- Onisto, M., Graziotto, R., Scannapieco, P., Marin, P., Merico, M., Slongo, M. L., Foresta, C. (2000). A novel gene (PD1) with a potential role on rat spermatogenesis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 23(9), 605–608. <https://doi.org/10.1007/BF03343783>
- Palaskas, N., Lopez-Mattei, J., Durand, J. B., Iliescu, C., Deswal, A. (2020). Immune Checkpoint Inhibitor Myocarditis: Pathophysiological Characteristics, Diagnosis,

- and Treatment. *Journal of the American Heart Association*, 9(2). <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013757>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 12(4), 252. <https://doi.org/10.1038/NRC3239>
- Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M. (2015). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytotherapy Research*, 29(3), 323–331. <https://doi.org/10.1002/PTR.5256>
- Pasquali, S., Chiarion-Sileni, V., Rossi, C. R., Mocellin, S. (2017). Immune checkpoint inhibitors and targeted therapies for metastatic melanoma: a network meta-analysis. *Cancer treatment reviews*, 54, 34–42..
- Peer, C. J., Heiss, B. L., Goldstein, D. A., Goodell, J. C., Figg, W. D., Ratain, M. J. (2022). Pharmacokinetic Simulation Analysis of Less Frequent Nivolumab and Pembrolizumab Dosing: Pharmacoeconomic Rationale for Dose Deescalation. *Journal of Clinical Pharmacology*, 62(4), 532. <https://doi.org/10.1002/JCPH.1984>
- Piscitani, L., Sirolli, V., Di Liberato, L., Morroni, M., Bonomini, M. (2020). Nephrotoxicity Associated with Novel Anticancer Agents (Aflibercept, Dasatinib, Nivolumab): Case Series and Nephrological Considerations. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 4878. <https://doi.org/10.3390/IJMS21144878>
- Postow, M. A. (2015). Managing immune checkpoint-blocking antibody side effects. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 35, 76–83. https://doi.org/10.14694/EDBOOK_AM.2015.35.76
- Poulet, F. M., Wolf, J. J., Herzyk, D. J., Degeorge, J. J. (2016). An Evaluation of the Impact of PD-1 Pathway Blockade on Reproductive Safety of Therapeutic PD-1 Inhibitors. *Developmental and Reproductive Toxicology*, 107(2), 108–119. <https://doi.org/10.1002/BDRB.21176>
- Propper, D. J. ve Balkwill, F. R. (2022). Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2022 19:4, 19(4), 237–253. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00588-9>
- Quandt, D., Fiedler, E., Boettcher, D., Marsch, W. C., Seliger, B. (2011). B7-H4 expression in human melanoma: Its association with patients' survival and antitumor immune response. *Clinical Cancer Research*, 17(10), 3100–3111. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2268>
- Rabinowitz, M. J., Kohn, T. P., Peña, V. N., Samarska, I. V., Matoso, A., Herati, A. S. (2021). Onset of azoospermia in man treated with ipilimumab/nivolumab for BRAF negative metastatic melanoma. *Urology Case Reports*, 34, 101488. <https://doi.org/10.1016/J.EUCR.2020.101488>
- Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., Mitchell, M. J. (2019). Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2018 18:3, 18(3), 175–196. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>
- Robbins, P. F., Morgan, R. A., Feldman, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Nahvi, A. V., Helman, L. J., Mackall, C. L., Kammula, U. S., Hughes, M. S., Restifo, N. P., Raffeld, M., Lee, C. C. R., Levy, C. L., Li, Y. F., El-Gamil, M., Schwarz, S. L., ... Rosenberg, S. A. (2011). Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of Clinical Oncology* :

- Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(7), 917–924. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.2537>
- Robert, C., Schachter, J., Long, G. V., Arance, A., Grob, J. J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M. S., McNeil, C., Lotem, M., Larkin, J., Lorigan, P., Neyns, B., Blank, C. U., Hamid, O., Mateus, C., Shapira-Frommer, R., Kosh, M., Zhou, H., ... Ribas, A. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 372(26), 2521–2532.
- Roddie, C., O'Reilly, M., Dias Alves Pinto, J., Vispute, K., Lowdell, M. (2019). Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges. *Cytotherapy*, 21(3), 327–340. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2018.11.009>
- Rombouts, M. D., Swart, E. L., Van Den Eertwegh, A. J. M., & Crul, M. (2020). Systematic review on infusion reactions to and infusion rate of monoclonal antibodies used in cancer treatment. *Anticancer Research*, 40(3), 1201–1218. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.14062>
- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348(6230), 62–68. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAA4967>
- Rotimi, S. O., Bankole, G. E., Adelani, I. B., Rotimi, O. A. (2016). Hesperidin prevents lipopolysaccharide-induced endotoxicity in rats. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38(5), 364–371. <https://doi.org/10.1080/08923973.2016.1214142>
- Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., de Marañon, A. M., Diaz-Morales, N., Jover, A., Garzon, S., ... Hernandez-Mijares, A. (2017). Low testosterone levels are related to oxidative stress, mitochondrial dysfunction and altered subclinical atherosclerotic markers in type 2 diabetic male patients. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, 155-162.
- Russell, S. J., Peng, K. W., Bell, J. C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology*, 30(7), 658–670. <https://doi.org/10.1038/NBT.2287>
- Salas, M. P., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M., Resnik, S. L. (2011). Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, 124(4), 1411-1415.
- Saresella, M., Rainone, V., M. Al-Daghri, N., Clerici, M., Trabattoni, D. (2012). The PD-1/PD-L1 Pathway in Human Pathology. *Current Molecular Medicine*, 12(3), 259-267. <https://doi.org/10.2174/156652412799218903>
- Savoia, P., Astrua, C., Fava, P. (2016). Ipilimumab (Anti-Ctla-4 Mab) in the treatment of metastatic melanoma: Effectiveness and toxicity management. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(5), 1092. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1129478>
- Sckisel, G. D., Bouchlaka, M. N., Monjazeb, A. M., Crittenden, M., Curti, B. D., Wilkins, D. E., Murphy, W. J. (2015). Out-of-sequence signal 3 paralyzes primary CD4+ T-cell-dependent immunity. *Immunity*, 43(2), 240-250.
- Scott, L. J. (2015). Nivolumab: A Review in Advanced Melanoma Topical Collection on *Immuno-Oncology. Drugs*, 75(12), 1413–1424. <https://doi.org/10.1007/S40265-015-0442-6/TABLES/4>
- Scotte, F., Ratta, R., Beuzeboc, P. (2019). Side effects of immunotherapy: A constant challenge for oncologists. *Current Opinion in Oncology*, 31(4), 280–285. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000541>
- Seki, T., Yasuda, A., Oki, M., Kitajima, N., Takagi, A., Nakajima, N., Miyajima, A., Fukagawa, M. (2017). Secondary Adrenal Insufficiency Following Nivolumab

- Therapy in a Patient with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Tokai J Exp Clin Med*, 42(3), 115–120.
- Sengul, E., Gelen, V., Yildirim, S., Cinar, İ., Aksu, E. H. (2023). Effects of naringin on oxidative stress, inflammation, some reproductive parameters, and apoptosis in acrylamide-induced testis toxicity in rat. *Environmental Toxicology*, 38(4), 798–808. <https://doi.org/10.1002/TOX.23728>
- Sethi, G., Shanmugam, M. K., Ramachandran, L., Kumar, A. P., Tergaonkar, V. (2012). Multifaceted link between cancer and inflammation. *Bioscience reports*, 32(1), 1–15.
- Sharma, P. ve Allison, J. P. (2015). Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell*, 161(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.03.030>
- Shiau, J. P., Chuang, Y. T., Cheng, Y. Bin, Tang, J. Y., Hou, M. F., Yen, C. Y., Chang, H. W. (2022). Impacts of Oxidative Stress and PI3K/AKT/mTOR on Metabolism and the Future Direction of Investigating Fucoïdan-Modulated Metabolism. *Antioxidants*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11050911>
- Shiner, E. K., Holbrook, B. C., Alexander-Miller, M. A. (2014). CD4+ T cell subset differentiation and avidity setpoint are dictated by the interplay of cytokine and antigen mediated signals. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0100175>
- Shiravand, Y., Khodadadi, F., Kashani, S. M. A., Hosseini-Fard, S. R., Hosseini, S., Sadeghirad, H., Ladwa, R., O'byrne, K., Kulasinghe, A. (2022). Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Current Oncology*, 29(5), 3044–3060. <https://doi.org/10.3390/CURRONCOL29050247>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. (2017). Colorectal Cancer Mortality Rates in Adults Aged 20 to 54 Years in the United States, 1970-2014. *JAMA*, 318(6), 572–574. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2017.7630>
- Simsek, M., Tekin, S. B., Bilici, M. (2019). Immunological Agents Used in Cancer Treatment. *The Eurasian Journal of Medicine*, 51(1), 90. <https://doi.org/10.5152/EURASIANJMED.2018.18194>
- Sloan, K. E., Eustace, B. K., Stewart, J. K., Zehetmeier, C., Torella, C., Simeone, M., Roy, J. E., Unger, C., Louis, D. N., Ilag, L. L., Jay, D. G. (2004). CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer*, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-4-73>
- Stanisic, D., Costa, A., Fávoro, W., Tasic, L., Seabra, A. (2018). Anticancer activities of hesperidin and hesperetin. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000515>
- Stepniak, J. ve Karbownik-Lewinska, M. (2016). 17β-estradiol prevents experimentally-induced oxidative damage to membrane lipids and nuclear DNA in porcine ovary. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 62(1), 17–21. <https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1101510>
- Stojdl, D. F., Lichty, B. D., TenOever, B. R., Paterson, J. M., Power, A. T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E. G., Durbin, R. K., Durbin, J. E., Hiscott, J., Bell, J. C. (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*, 4(4), 263–275. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00241-1)
- Stuby, J., Herren, T., Schwegler Naumburger, G., Papet, C., Rudiger, A. (2020). Immune checkpoint inhibitor therapy-associated encephalitis: a case series and review of the literature. *Swiss medical weekly* 150, w20377. <https://doi.org/10.4414/SMW.2020.20377>

- Su, Q., Zhu, E. C., Wu, J. B., Li, T., Hou, Y. L., Wang, D. Y., Gao, Z. H. (2019). Risk of pneumonitis and pneumonia associated with immune checkpoint inhibitors for solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Immunology*, <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00108/FULL>
- Taefehshokr, S., Parhizkar, A., Hayati, S., Mousapour, M., Mahmoudpour, A., Eleid, L., Rahmanpour, D., Fattahi, S., Shabani, H., Taefehshokr, N. (2022). Cancer immunotherapy: Challenges and limitations. *Pathology - Research and Practice*, 229, 153723. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2021.153723>
- Takumi, H., Nakamura, H., Simizu, T., Harada, R., Kometani, T., Nadamoto, T., Mukai, R., Murota, K., Kawai, Y., Terao, J. (2012). Bioavailability of orally administered water-dispersible hesperetin and its effect on peripheral vasodilatation in human subjects: implication of endothelial functions of plasma conjugated metabolites. *Food & Function*, 3(4), 389–398. <https://doi.org/10.1039/C2FO10224B>
- Tan, S., Zhang, H., Chai, Y., Song, H., Tong, Z., Wang, Q., Qi, J., Wong, G., Zhu, X., Liu, W. J., Gao, S., Wang, Z., Shi, Y., Yang, F., Gao, G. F., & Yan, J. (2017). ARTICLE An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab. <https://doi.org/10.1038/ncomms14369>
- Tanaka, R., Maruyama, H., Tomidokoro, Y., Yanagiha, K., Hirabayashi, T., Ishii, A., Okune, M., Inoue, S., Sekine, I., Tamaoka, A., Fujimoto, M. (2016). Nivolumab-induced chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy mimicking rapid-onset Guillain–Barré syndrome: a case report. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 46(9), 875–878. <https://doi.org/10.1093/JJCO/HYW090>
the Tumor Microenvironment and Its Relevance to Cancer Immunotherapy.
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., ... Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England Journal of Medicine*, 366(26), 2443–2454. <https://doi.org/10.1056/NEJM0A1200690>
- Trivedi, P. P., Tripathi, D. N., Jena, G. B. (2011). Hesperetin protects testicular toxicity of doxorubicin in rat: Role of NFκB, p38 and caspase-3. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 838–847. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.12.005>
- Tsimberidou, A. M., Levit, L. A., Schilsky, R. L., Averbuch, S. D., Chen, D., Kirkwood, J. M., McShane, L. M., Sharon, E., Mileham, K. F., Postow, M. A. (2018). Trial Reporting in Immuno-Oncology (TRIO): an American society of clinical oncology-society for immunotherapy of cancer statement. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/S40425-018-0426-7>
- Türkmen, N. B., Çiftçi, O., Taşlıdere, A., Aydın, M., Eke, B. C. (2022). The effect of aromatase inhibitors against possible testis toxicity in pembrolizumab treated rats. *Andrologia*, 54(10), e14557. <https://doi.org/10.1111/AND.14557>
- Vrinzen, C. E. J., Delfgou, L., Stadhouders, N., Hermens, R. P. M. G., Merkx, M. A. W., Bloemendal, H. J., Jeurissen, P. P. T. (2023). A Systematic Review and Multilevel Regression Analysis Reveals the Comorbidity Prevalence in Cancer. *Cancer Research*, 83(7), 1147–1157. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>
- Waldmann, T. A. (2018). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(12). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A028472>
- Wang, L. L., Li, Z. H., Hu, X. H., Muyayalo, K. P., Zhang, Y. H., Liao, A. H. (2017). The roles of the PD-1/PD-L1 pathway at immunologically privileged sites.

- American Journal of Reproductive Immunology*, 78(2), e12710. <https://doi.org/10.1111/AJI.12710>
- Weber, J. S., Yang, J. C., Atkins, M. B., Disis, M. L. (2015). Toxicities of immunotherapy for the practitioner. *Journal of Clinical Oncology*, 33(18), 2092–2099. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0379>
- Wilkinson, A. N. (2021). Cancer diagnosis in primary care: Six steps to reducing the diagnostic interval. *Canadian Family Physician*, 67(4), 265. <https://doi.org/10.46747/CFP.6704265>
- Wilmsen, P. K., Spada, D. S., Salvador, M. (2005). Antioxidant Activity of the Flavonoid Hesperidin in Chemical and Biological Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4757–4761. <https://doi.org/10.1021/JF0502000>
- Wu, J., Zhao, X., Sun, Q., Jiang, Y., Zhang, W., Luo, J., Li, Y. (2020). Synergic effect of PD-1 blockade and endostar on the PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy and angiogenesis in Lewis lung carcinoma mouse model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109746>
- Wu, M., Huang, Q., Xie, Y., Wu, X., Ma, H., Zhang, Y., Xia, Y. (2022). Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation. *Journal of Hematology & Oncology* 2022 15:1, 15(1), 1–58. <https://doi.org/10.1186/S13045-022-01242-2>
- Wu, Q., Jiang, L., Li, S. cheng, He, Q. jun, Yang, B., Cao, J. (2020). Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0366-x>
- Yamauchi, I., Sakane, Y., Fukuda, Y., Fujii, T., Taura, D., Hirata, M., Hirota, K., Ueda, Y., Kanai, Y., Yamashita, Y., Kondo, E., Sone, M., Yasoda, A., Inagaki, N. (2017). Clinical Features of Nivolumab-Induced Thyroiditis: A Case Series Study. *Thyroid*, 27(7), 894–901. <https://doi.org/10.1089/THY.2016.0562>.
- Yanai, S., Nakamura, S., Kawasaki, K., Toya, Y., Akasaka, R., Oizumi, T., Ishida, K., Sugai, T., Matsumoto, T. (2020). Immune checkpoint inhibitor-induced diarrhea: Clinicopathological study of 11 patients. *Digestive Endoscopy*, 32(4), 616–620. <https://doi.org/10.1111/DEN.13555>
- Yi, M., Zheng, X., Niu, M., Zhu, S., Ge, H., Wu, K. (2022). Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. *Molecular Cancer*, 21(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/S12943-021-01489-2>
- Yi, W., Yan, D., Wang, D., Li, Y. (2023). Smart drug delivery systems to overcome drug resistance in cancer immunotherapy. *Cancer Biology & Medicine*, 20(4), 248.

- Yumol, J. L. ve Ward, W. E. (2018). The polyphenolic compound hesperidin and bone protection. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*, 431–440. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00032-5>
- Zang, X., Sullivan, P. S., Soslow, R. A., Waitz, R., Reuter, V. E., Wilton, A., Allison, J. P. (2010). Tumor associated endothelial expression of B7-H3 predicts survival in ovarian carcinomas. *Modern pathology*, 23(8), 1104-1112.
- Zeng, M. F., Chen, L., Ye, H. Y., Gong, W., Zhou, L. N., Li, Y. M., Zhao, X. L. (2017). Primary hypothyroidism and isolated ACTH deficiency induced by nivolumab therapy Case report and review. *Medicine (United States)*, 96(44). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008426>
- Zhang, H., Sun, K., Gao, M., Xu, S. (2023). Zinc Inhibits Lead-Induced Oxidative Stress and Apoptosis of ST Cells Through ROS/PTEN/PI3K/AKT Axis. *Biological Trace Element Research*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/S12011-023-03721-0>.
- Zhang, X., Ran, Y., Wang, K., Zhu, Y., Li, J. (2016). Incidence and risk of hepatic toxicities with PD-1 inhibitors in cancer patients: A meta-analysis. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 3153–3161. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S115493>
- Zhang, Y. ve Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular and Molecular Immunology*, 17(8), 807. <https://doi.org/10.1038/S41423-020-0488-6>
- Zhang, Y. ve Zheng, J. (2020). Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1248, 201-226. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_9.
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J., Kroemer, G. (2015). Type I interferons in anticancer immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 15(7), 405–414. <https://doi.org/10.1038/NRI3845>
- Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., Paz-Ares, L. (2016). Current Challenges in Cancer Treatment. *Clinical Therapeutics*, 38(7), 1551-1566. <https://doi.org/10.1016/J.CLINTHERA>

