

**OLANZAPİNİN REPRODÜKTİF TOKSİSİTESİNİN ERKEK
SIÇANLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Cankız Mina ARDIÇ

Eskişehir 2019

**OLANZAPİNİN REPRODÜKTİF TOKSİSİTESİNİN ERKEK SIÇANLARDA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Cankız Mina ARDIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem ATLI EKLIOĞLU

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Cankız Mina ARDIÇ'ın "Olanzapinin Reprodüktif Toksisitesinin Erkek Sıçanlarda Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 11/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Toksikoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans Yeterlik Tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Özlem ATLI EKLİOĞLU

Üye : Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ

Üye : Doç. Dr. Bülent ERGÜN

4

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Müdür

ÖZET

OLANZAPİNİN REPRODÜKTİF TOKSİSİTESİNİN ERKEK SIÇANLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

Cankız Mina ARDIÇ

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2019

Danışman: Doç. Dr. Özlem ATLI EKLIOĞLU

Özellikle şizofreni tedavisinde kullanılan bir atipik antipsikotik olan olanzapinin (OLZ) erkeklerde çeşitli reproduktif advers etkilere neden olduğu bilinmekle birlikte OLZ'e ait olası reproduktif toksisitesinin ve altında yatan mekanizmaların değerlendirildiği detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında erkek sıçanlara 2,5, 5 ve 10 mg/kg tekrarlayan dozlarda OLZ 28 gün süreyle oral olarak uygulanarak ajanın reproduktif toksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, sperm konsantrasyonu, motilitesi, morfolojisi ve DNA hasarı belirlenmiş ve testis dokusu histolojik olarak incelenmiştir. Ayrıca üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan hormonlar olan serum folikül stimüle edici hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH) ve testosteron seviyeleri ile reproduktif patolojilerde rol oynayan ve testis dokusunda oksidatif stresin biyogöstergeleri olan glutatyon (GSH), katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) seviyeleri belirlenmiştir. Sonuçlara göre, 5 ve 10 mg/kg OLZ uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre ve en düşük doz OLZ uygulanan gruba göre normal sperm morfolojisinin azaldığı ve doz bağımlı olarak testis dokusunda histopatolojik değişimler meydana geldiği tespit edilmiştir. OLZ uygulanan gruplarda serum LH, FSH ve testosteron seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca en yüksek doz OLZ uygulanan grupta testiküler dokuda GSH seviyeleri azalırken, SOD seviyelerinin artması OLZ ile indüklenen oksidatif stresin göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, OLZ uygulaması ile sıçanlarda oluşan anormal sperm morfolojisini, hormon seviyesindeki değişiklikleri, testiküler yapıdaki dejeneratif bulguları, OLZ ile indüklenen reproduktif toksik etkilerle ilişkilendirmek mümkündür.

Anahtar Sözcükler: Olanzapin, Sperm parametreleri, Reprodüktif hormonlar, Oksidatif stres.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF REPRODUCTIVE TOXICITY OF OLANZAPINE IN MALE RATS

Cankız Mina ARDIÇ

Department of Pharmaceutical Toxicology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem ATLI EKLIÖĞLU

Although it is reported that olanzapine (OLZ), which is an atypical antipsychotic drug, causes sexual dysfunction in men, it is noteworthy that there is not any study evaluating the toxic effects of OLZ on male reproductive system. In the scope of this thesis, it was aimed to evaluate the reproductive toxic effects of OLZ by oral administration of 2,5, 5 or 10 mg/kg of it to male rats for 28 days. In accordance with this purpose, sperm concentration, motility and morphology and DNA damage were determined and histopathological examination of testis tissue was carried out in rats. Also, the levels of serum follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and testosterone, which play roles in the regulation of reproductive functions, and the levels of glutathione (GSH), catalase (KAT), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) which play roles in reproductive pathologies as oxidative stress biomarkers, were determined. According to the results, normal sperm morphology were decreased in 5 ve 10 mg/kg OLZ-administered groups and pathological findings were evident in the testicular structure of the OLZ-administered group when compared with control group. It was determined that serum LH, FSH and testosterone levels were decreased in the OLZ-administered group. In addition, decreases of GSH levels in testis tissue and increases of SOD levels in the 10 mg/kg OLZ-administered groups were determined and evaluated as the markers of the oxidative stress induced by OLZ in the testis. In conclusion, it was determined that reproductive toxic effects were induced in rats by OLZ administration and this pathology was accompanied by the alterations of the hormone levels and testicular oxidative stress.

Keywords: Olanzapine, Sperm parameters, Reproductive hormones, Oxidative stress.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren proje danışmanım Doç. Dr. Özlem ATLI EKLİOĞLU'na ve her konuda destek vererek projemin şekillenmesinde emeği olan değerli hocalarım Doç. Dr. Bülent ERGÜN, Doç. Dr. Sinem ILGIN ve Araş. Gör. Merve BAYSAL'a,

Yüksek lisans tezimi hazırlarken pratik ve teorik çalışmalardaki yardımları yanı sıra üniversite ve yüksek lisans eğitimim boyunca ihtiyacım olduğu her zaman yanımda olan yol arkadaşım Gözde GÖRMÜŞ'e, özverilerini ve desteklerini her zaman hissettiren proje arkadaşlarım Büşra KORKUT, Burak KARADUMAN, Beril İNCİ ve Berkant KURBAN'a,

Çalışmalarım sırasında gösterdiği sabır, saygı ve verdiği destek için Cansu ERKOYUN'a, hayatımın her aşamasında yanımda olup, her konuda beni destekledikleri ve bana yürekten inandıkları için canım aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

11/01/2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Cankız Mina ARDIÇ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARINA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Şizofreni ve Etiyolojisi	3
2.2. Şizofreni Tedavisi	4
2.2.1. Antipsikotik ilaçlar.....	5
2.2.1.1. <i>Tipik antipsikotik ilaçlar</i>	6
2.2.1.2. <i>Atipik antipsikotik ilaçlar</i>	7
2.3. Olanzapin ile İlgili Genel Bilgiler	9
2.3.1. Olanzapinin farmakodinamik özellikleri.....	9
2.3.2. Olanzapinin farmakokinetik özellikleri	9
2.3.3. Olanzapinin endikasyonları ve kullanım dozları	10
2.3.4. Olanzapinin advers etkileri	11
2.3.5. Olanzapinin doz aşımı	12
2.3.6. Olanzapinin diğer ilaçlarla etkileşimi	12
2.4. Erkek Reprodüktif Sistemi	13
2.4.1. Spermatogenez ve hormonal düzenlenmesi.....	14
2.5. Reprodüktif Toksisite	15
2.5.1. Reprodüktif toksisitenin biyogöstergeleri	15
2.5.1.1. <i>Organ ağırlıkları</i>	15
2.5.1.2. <i>Sperm parametreleri</i>	16
2.5.1.3. <i>Hormonlar</i>	17

	<u>Sayfa</u>
2.5.1.4. <i>Oksidatif stres</i>	17
2.5.1.5. <i>Histopatoloji</i>	18
2.6. Antipsikotik İlaçlar ile İndüklenen Reprodüktif Toksik Etkiler	19
3. GEREÇLER	20
3.1. Kullanılan Hayvanlar	20
3.2. Kullanılan Maddeler	20
3.3. Kullanılan Cihazlar	22
4. YÖNTEM	23
4.1. Deney Hayvanlarına Test Maddesinin Uygulanması	23
4.2. Deney Hayvanlarından Numune Toplanması	23
4.3. Sperm Konsantrasyonunun ve Motilitesinin Değerlendirilmesi ..	24
4.4. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi	24
4.5. Sperm DNA Hasarının Belirlenmesi	25
4.6. İstatiksel Analiz	25
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
5.1. Bağlı Organ Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	26
5.2. Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi	27
5.3. Testis Dokusunun Histopatolojik Olarak İncelenmesi	30
5.4. Serum Hormon Seviyelerinin Değerlendirilmesi	33
5.5. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	35
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
KAYNAKÇA	40
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 5.1. Gruplara ait bağıl testis ve epididimis ağırlıkları	26
Tablo 5.2. Gruplara ait sperm parametreleri	27
Tablo 5.3. Gruplara ait serum hormon seviyeleri	34
Tablo 5.4. Gruplara ait SOD, KAT, GSH ve MDA seviyeleri	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 5.1. Gruplara ait sperm Comet testi fotoğrafları	29
Şekil 5.2. Gruplara ait % kuyruk moment	30
Şekil 5.3. Semifer tübüllerin ve Leydig hücrelerinin kontrol ve OLZ uygulanmış gruplardaki düşük oranda büyütülmesi	32
Şekil 5.4. Leydig hücrelerinin kontrol ve OLZ uygulanmış gruplardaki yüksek oranda büyütülmesi	32
Şekil 5.5. Semifer tübüllerin ve interstisyel hücrelerin kontrol ve OLZ uygulanmış gruplardaki yüksek oranda büyütülmesi	33

KISALTMALAR DİZİNİ

5-HT	: 5-hidroksitriptamin
CYP	: Sitokrom P450
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FDA	: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GABA	: Gama Aminobutirik Asit
GnRH	: Gonadotropin Salıverici Sormon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
HHG	: Hipotalamik-Hipofiz-Gonadal
K	: Kontrol grubu
KAT	: Katalaz
L	: Leydig hücresi
LH	: Luteinleştirici Hormon
MDA	: Malondialdehit
OLZ	: Olanzapin
p	: Probability (anlamlılık ifadesi)
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponu)
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Rotation per minute (dakikadaki devir sayısı)
S	: Spermatzoa
SCGE	: Single Cell Gel Electrophoresis (Tek Hücre Jel Elektroforez Sistemi)

SOD	: Süperoksit Dismutaz
ST	: Seminifer tübül
TBE	: Tris-borat
UDP	: Üridin difosfat
UI	: International unit (uluslararası birim)
v	: vakuolleşme

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çevresel kirleticiler, mesleki maruziyetler ve terapötik ilaçların neden olduğu reproduktif advers etkiler, erkek fertilitesi açısından büyük önem taşımaktadır (Creasy ve Chapin, 2018). Dünya çapında yaklaşık 186 milyon insanın infertiliteden muzdarip olduğu ve infertilite vakalarının yaklaşık %50'sini erkek infertilite vakalarının oluşturduğu belirlenmiştir (Vander Borgh ve Wyns, 2018). Erkek reproduktif sisteminin, farmakolojik ilaç toksisitesi için bir hedef olabileceği ve tekrarlanan dozlarda antipsikotik ilaçların, hipotalamik-hipofiz-gonadal (HHG) aks hormonlarının modifikasyonu veya hormonal olmayan mekanizmalarla, doğrudan ve dolaylı olarak cinsel işlevin, spermatogenez süreçlerinin veya epididimal olgunlaşmanın bozulmasını indükleyebileceği bilinmektedir (Semet ve diğ., 2017; Sousa ve diğ., 2017).

Antipsikotik ilaçlar, dünya çapında 21 milyondan fazla insanı etkileyen (WHO, Fact Sheets, 2018) kronik ve şiddetli bir ruhsal bozukluk olan şizofreni ve ilişkili bozuklukların tedavisinde, ayrıca bipolar bozukluğu olan hastalarda mani tedavisinde kullanılmaktadır (Drobnis ve Nangia, 2017). Genellikle “tipik” olarak adlandırılan bu ilaçların ilk nesli, daha belirgin yan etkilere sahipken, “atipik” olarak adlandırılan ikinci nesil, daha kabul edilebilir yan etki profilleri ile ilişkili bulunmuştur. Sedasyon, ortostatik hipotansiyon, antikolinergik etkiler (konstipasyon, ağız kuruluğu, bulanık görme, üriner retensiyon vb), ekstrapiramidal semptomlar (psödoparkinsonizm, akatizi, akut distoni, tardif diskinezi vb), agranülositoz, kardiyak aritmiler, kilo alımı gibi metabolik etkiler, hiperprolaktinemi, seksüel disfonksiyon antipsikotik ilaç kullanımıyla ortaya çıktığı bilinen advers etkilerdir (Drobnis ve Nangia, 2017; Muench ve Hamer, 2010).

Atipik bir antipsikotik olan Olanzapin (ZYPREXA®), oral formülasyon olarak, erişkinlerde şizofreninin akut ve idame tedavisinde, ayrıca bipolar I bozukluk ile ilişkili manik veya karışık atakların akut tedavisi (monoterapi ve lityum veya valproat ile birlikte) ve bipolar I bozukluğun (monoterapi) idame tedavisinde endikedir (FDA, ZYPREXA® Product Label, 2009). Bir tiyenobenzodiazepin türevi olan Olanzapin (OLZ), dopaminerjik D₁-D₅, serotonerjik (5HT_{2,3,6}), muskarinik (alt tipler 1-5), adrenerjik (α_{1-2}) ve histaminerjik (H₁) bağlanma bölgelerinde afinite göstermektedir (Duggan ve diğ., 2005; De Siqueira Bringel ve diğ., 2011).

Yapılan araştırmalar, OLZ kullanımının; amenore, meme ağrısı, menstrüasyon bozuklukları, impotens, artan prolaktin seviyeleriyle beraber galaktore ve cinsel işlev

bozukluğuna yol açabileceğini göstermiştir (Semet ve diğ., 2017; FDA, ZYPREXA® Product Label, 2009). Artmış prolaktin seviyelerinin, gonadotropin salıverici hormon (GnRH), folikül stimüle edici hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH) ve testosteronun inhibisyonu nedeniyle hipogonadizmi indükleyebileceği ve spermatogenezde gecikmeye, sperm motilitesinin ve semen kalitesinin azalmasına ve testiste morfolojik değişikliklere neden olabileceği belirtilmiştir (De Siqueira Bringel ve diğ, 2011; Hanssens ve diğ, 2008). Konarzewska ve diğ. (2009), risperidon ve olanzapin ile tedavi edilen şizofreni hastalarının yüksek düzeylerde serum prolaktin düzeylerine sahip olduğunu göstermiştir. Her iki ajan da reproduktif hormon bozuklukları ve cinsel işlev bozukluğu ile ilişkili bulunmuştur. Fakat OLZ'e ait olası reproduktif toksisitenin ve altında yatan mekanizmaların değerlendirildiği detaylı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu noktadan hareketle tez kapsamında, OLZ'in tekrarlayan dozlarda sıçanlara uygulanması ile sperm sayısı, motilitesi, morfolojisi ve deoksiribonükleik asit (DNA) hatalarının belirlenmesi ve testiküler yapının histolojik olarak değerlendirilmesi yoluyla, OLZ'in erkek reproduktif sistemi üzerine olası toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Ayrıca olası patolojide reproduktif fonksiyonların regölasyonunda rol oynayan hormonlar olarak serumda testosteron, serum FSH ve LH seviyelerinin belirlenmesi ve reproduktif patolojilerde rol oynayan oksidatif durumun göstergeleri olarak testis dokusunda glutatyon (GSH), katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) seviyelerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Şizofreni ve Etiyolojisi

Şizofreni, sanrılar, halüsinasyonlar, düşünce bozukluğu, düzensiz davranışlar gibi pozitif semptomlar; sosyal çekilme, ilgisizlik gibi negatif semptomlar; zayıf yürütücü işlev ve hafıza gibi bilişsel semptomlar ile karakterize, genellikle kronik seyir izleyen mental bir hastalıktır (Meyer ve MacCabe, 2016).

Çeşitli kültürlerde görülebilen bir hastalık olmakla birlikte endüstrileşmiş ülkelerde, düşük sosyoekonomik tabakada, nüfusun daha fazla olduğu bölgelerde, strese bağlı faktörlerle beraber daha fazla görülmektedir (Ertan, 2008). Popülasyonun %1'inin yaşamları boyunca şizofreniye sahip olacağı belirtilse de araştırmalar küresel ortalama yaşam boyu prevalansın %0,72 olduğunu göstermektedir (Meyer ve MacCabe, 2016).

Şizofreni, başlangıç yaşı, aile öyküsü, klinik görünüm, gidiş ve tedavi yanıtları açısından cinsiyet farklılıkları göstermektedir. Görülme sıklığı her iki cinsiyette eşit olmakla birlikte, başlangıç yaşının erkeklerde (10-25 yaş) kadınlara (25-35 yaş) göre daha erken olduğu bilinmektedir (Belli ve diğ. 2007; Ertan, 2008). Şizofreni genel toplumdaki yaşam boyu düşük yaygınlığına rağmen, Türkiye'de yaşam-yılına uyarlanmış yeti kaybına yol açan hastalıklar arasında 9. sırada yer almaktadır (Sağlık Bakanlığı, 2006). Ayrıca şizofreni hastaları arasında intihar ile ölüm oranının da %15 düzeyinde olduğu bilinmektedir (Ertan, 2008).

Şizofreninin ortaya çıkmasında çeşitli risk faktörleri bulunmasına rağmen etiyolojik süreçler tam olarak bilinmemektedir. Genetik etkenler, beyin yapısal değişiklikleri, nörokimyasal değişiklikler, nörofizyolojik değişiklikler ve endokrin etkenlerin bu süreçte rol oynadığı düşünülmektedir. Şizofreni etiyolojisinde genetik %81'lik kalıtılabilirlik oranı ile büyük bir role sahipken, çevre etkisinin %11 civarında olduğu ifade edilmektedir (Yavuz, 2008).

Manyetik rezonans görüntüleme çalışmalarında, şizofreni hastalarında prefrontal ve temporal kortekslerde, kortikal gri madde azalması; serebral beyaz cevher yolu değişimleri, amigdala, hipokampus ve entorhinal korteks ile talamus gibi limbik sistem yapılarında hacim azalması ve bazal gangliyon çekirdeklerinde artmış hacim olduğuna dair veriler bulunmuştur (Yavuz, 2008; Meyer ve MacCabe, 2016; Fatani ve diğ., 2017).

Dopamin hipotezi, şizofreninin nörobiyolojik teorilerinde merkezi bir rol oynamıştır. Dopamin salımını uyaran amfetamin gibi ilaçların, psikoza indükleyebileceği ve tüm antipsikotik ilaçların, terapötik dozla ilişkili biçimde D₂ dopamin reseptörlerine

antagonizm uyguladığının bilinmesi bu teoriyi desteklemektedir (Meyer ve MacCabe, 2016; Fatani ve diğ., 2017). Çeşitli görüntüleme teknikleri, akut psikozda presinaptik dopamin sentezi ve salınımının arttığını göstermektedir (Meyer ve MacCabe, 2016).

Halüsinasyon ve varsanı gibi pozitif belirtiler de dahil olmak üzere çeşitli duygusal davranışlarda mezolimbik dopamin yolağının rol oynadığı kabul edilmektedir. Yürütücü işlevler, biliş ve duygulanımı düzenlediği kabul edilen mezokortikal dopamin yolağının, şizofrenide bilişsel işlevin bozulması ve negatif semptomlarla ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Summakoğlu ve Ertuğrul, 2018). Substantia nigradan başlayan ve kaudat çekirdeğinde biten nigrostriatal yolaktaki düşük dopamin düzeylerinin, ekstrapiramidal sistemi etkilediği ve motor semptomlara neden olduğu bilinmektedir. Tuberoinfundibular dopaminin bir redüksiyonu veya blokajı, galaktore, amenore ve libido azalması ile sonuçlanan yüksek prolaktin seviyelerine neden olmaktadır (Fatani ve diğ., 2017).

Şizofrenide serotonerjik ve dopaminerjik sistemlerin etkileşimi de serotonin çeşitli beyin bölgelerinde farklı etkiler üreterek dopamin nöronları üzerinde düzenleyici bir etkiye sahip olmasıyla açıklanmaktadır. 5-HT₁ reseptörlerinin şizofrenide bilişsel değişikliklerden sorumlu olduğu ve intihar ile ilişkili olduğu; 5-HT₂ reseptörünün, bozulan hafızanın bilişsel sürecinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bunların yanı sıra bir eksitator nörotransmitter olan glutamatın ve gama aminobutirik asit (GABA) reseptörlerinin de şizofreni için patofizyolojik açıdan son yıllarda önem kazandığı bilinmektedir (Summakoğlu ve Ertuğrul, 2018).

2.2. Şizofreni Tedavisi

Şizofreni tedavisinde temel hedef, semptomları azaltmak ya da ortadan kaldırmak, hastanın yaşam kalitesini ve topluma uyumunu olabildiğince artırmak ve hastalığın yıkıcı etkilerini mümkün olduğunca azaltmaktır. (Summakoğlu ve Ertuğrul, 2018).

Çeşitli antipsikotik ilaçların, psikotik semptomların hafifletilmesinde ve hastalığın yinelenme olasılığının azaltılmasında etkili olduğu bilinmektedir. Bilişsel davranışçı terapi veya destekleyici psikoterapi gibi psikolojik tedaviler de semptomların azaltılmasına yardımcı olurken, işlev artışını ve stresi azaltmayı, istihdamı desteklemeyi veya sosyal becerileri geliştirmeyi amaçlamaktadırlar. Varsanılar, sanrılar ve çok tuhaf davranışları olan, hastalık süresi daha kısa, akut başlangıçlı şizofreni hastalarında elektrokonvulsif terapinin de etkili olduğu rapor edilmiştir (Lehman ve diğ., 2010).

2.2.1. Antipsikotik ilaçlar

Antipsikotik ilaçlar, psikotik belirtilerin şiddetini azaltmakta, şizofreni ve diğer psikotik bozukluklarda nüksü önlemektedir. Bunun yanı sıra mani, depresyon ve deliryum gibi bazı diğer durumlarda da kullanılmaktadırlar (Vallianatou, 2016).

Antipsikotik ilaç dönemi, klorpromazinin keşfi ile başlamıştır. Psikiyatristler hastalığın pozitif semptomlarını kontrol etmede ve psikotik relapsı önlemede antipsikotik ajanların etkinliğini tartışmışlardır. Birleşik Devletler’de 1980’lerden önce geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuş klorpromazin ve haleporidol gibi geleneksel veya “tipik” antipsikotikler, klinik olarak etkin dozlarda kullanıldığında ekstrapiramidal yan etkileri (parkinsonizm, distoni, akatizi, tardif diskinezi) tetiklemiştir (Seeman, 2002). Ayrıca, bu antipsikotiklerin primer negatif semptomlar üzerinde çok az etkisi vardır veya hiç etkisi bulunamamıştır. Hastaların %30’unun tedaviye kısmi yanıt vermesi veya yanıt vermemesi ve uygun tedaviye rağmen, bir akut ataktan sonra hastaların %20-30’unda hastalığın nüksetmesi nedeniyle sınırlı bir etkinliğe sahip olduğu düşünülmüştür (Blin, 1999). Raporlar yeni antipsikotik ilaçlara duyulan ihtiyacı ortaya koymuş ve birçok yeni ajan geliştirilmesiyle beraber sınıflandırma ihtiyacı ortaya çıkmıştır (Blin, 1999).

Özellikle, en eski atipik antipsikotik ajan olan klozapinin (1960 yılında patenti alınmış), klorpromazin tedavisine dirençli şizofreni hastalarında üstün etkinliği anlaşılmıştır (Pompili ve diğ., 2016; Blin, 1999). Bazı kontrollü çalışmalar, tipik antipsikotik ile tedaviye yeterince yanıt vermeyen hastaların, başka bir antipsikotik tedaviye geçişinin yararlı olabileceğini göstermiştir. Bu da sonraki yıllarda, klozapinin özelliklerinden türetilen "atipik psikotikler" kavramına yol açmıştır (Blin, 1999).

Antipsikotik ilaçlar, kemirgenlerde katalepsiye ve insanlarda ekstrapiramidal yan etkilere neden oldukları için aynı zamanda nöroleptikler olarak da adlandırılmaktadırlar. Psikotik semptomları azaltma yeteneklerinin, mezolimbik çekirdeklerde, özellikle nukleus accumbens, stria terminalis ve genişletilmiş amigdalada dopamin D₂ reseptörlerinin bloke edilmesiyle oluştuğu gösterilmiştir. Bu ajanlarla terminal bölgelerdeki D₂ reseptörlerinin bloke edilmesi, başlangıçta sırasıyla substantia nigra ve ventral tegmentumdaki dopaminerjik nöronların aktivitesinde kompensatuar artışlara neden olur, bunu dopamin nöronlarının aktivitesinde kademeli bir azalma ve nihayetinde bu bölgelerde dopamin nöron iletiminin tamamen inaktivasyonu izler. Depolarizasyon bloğu olarak adlandırılan bu durumun, bazı psikotik hastalarda antipsikotik etkinin yavaş başlaması için neden olduğu ileri sürülmüştür (Meltzer, 2002; Doğangün ve diğ., 2010).

Tek başına dopamin kuramı klasik antipsikotiklerin etki mekanizmasını açıklamakta yetersiz olabilmektedir. Bu bileşiklerin serotonerjik, histaminerjik, adrenerjik, muskarinik, GABAerjik, glutamaterjik reseptörler gibi diğer nörotransmitter reseptörlerine de değişik derecelerde affiniteleri olduğu bilinmektedir (Gülseren ve Erol, 2000; Vallianatou, 2016).

Antipsikotikler, kan-beyin bariyerini hızla geçebilir ve beyin, karaciğer ve diğer dokularda birikebilmektedirler. Proteinlere yüksek oranda bağlanırlar ve vücuda dağılım oranı göreceli olarak yüksektir. Bütün antipsikotikler karaciğerde sitokrom P₄₅₀ enzim sistemi tarafından metabolize edilmektedir. (Doğangün ve diğ., 2010).

2.2.1.1. Tipik antipsikotik ilaçlar

Birinci kuşak antipsikotik ilaçlar, tipik olarak dorsal striatumda D₂ reseptörünün blokajının direkt veya indirekt sonucu olarak akut distonik reaksiyonlara, subakut parkinsonizme, akatiziye ve kronik kullanım sonrası tardif diskinezi veya distoni gibi ekstrapiramidal yan etkilere neden oldukları için genellikle tipik antipsikotik ilaçlar olarak adlandırılmaktadırlar (Meltzer, 2002). Bu ilaçların tedavi edici dozları ile D₂ reseptörlerine bağlanma afiniteleri arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Temel etki mekanizması dopaminerjik D₂ reseptörlerine yüksek afinite ve antagonizma göstermeleridir (Anıl Yağcıoğlu, 2007).

Büyük ölçüde hepatik mikrozomal enzimler aracılığıyla oksidatif yolla metabolize edilmektedirler. Genel olarak ileri derecede lipofiliktirler ve merkezi sinir sistemine geçmeleri bu özellikleri ile bağlantılıdır. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanmaktadır. Çoğunun atılım yarı ömrü 10-30 saat civarındadır. Yağ, akciğer, beyin gibi dokularda fazla miktarlarda depolanmaktadır (Gülseren ve Erol, 2000).

Tipik antipsikotikler karakteristik bir yan etki profiline sahiptir. Spinal yollardaki motor disfonksiyonun lokalizasyonunu ifade eden ekstrapiramidal yan etkilere neden olmaktadır. Genellikle tedavinin ilk birkaç günü içinde ve hastaların % 10-20'sinde şiddetli kas spazmları ile ortaya çıkan akut distoni; yüz ifadesi eksikliği, artmış kas tonusu ve titreme ile hastaların yaklaşık üçte birinde ortaya çıkan parkinson benzeri semptomlar; fiziksel ve psikolojik huzursuzluk ile karakterize ve hastaların üçte bir oranında mevcut olan akatizi; bir yıldan uzun süre antipsikotik kullanan hastaların % 10-20'sinde gelişen, bacaklarda ve gövdede yavaş, kıvrak hareketlerin yanı sıra ağız, dil ve yüz hareketleriyle karakterize bir hareket bozukluğu olan tardif diskinezi tipik antipsikotik kullanımıyla

meydana gelen ekstrapiramidal yan etkilerdir (Stevens ve Rodin, 2011; Holloway ve Peirce, 1998).

Bulanık görme, ağız kuruluğu, postural hipotansiyon, konstipasyon, üriner retensiyon, seksüel disfonksiyon gibi advers etkiler, daha çok yaşlılarda görülen, klorpromazin ve tioridazinin belirgin şekilde neden olduğu otonom yan etkilerdendir (http-1).

Ayrıca antipsikotiklerle artmış prolaktin düzeyleri kadınlarda galaktore veya erkeklerde jinekomastiye neden olabilmektedir. Tipik ve atipik antipsikotikler, nadiren, QT aralığının uzamasına neden olabilir (Stevens ve Rodin, 2011). Nöroleptik malign sendrom da, antipsikotik tedavinin nadir fakat potansiyel olarak ölümcül bir yan etkisidir. Nöroleptik malign sendrom, ateş, kas sertliği, otonomik disfonksiyon ve değişen mental durum ile karakterizedir (Holloway ve Peirce, 1998).

2.2.1.2. Atipik antipsikotik ilaçlar

Avrupa'da 1970'lerde şizofreni için geliştirilen ve piyasaya sürülen klozapinin klinik uygulamaya girmesiyle birlikte "atipik nöroleptik" kavramı ortaya çıkmıştır (Anıl Kostakoğlu ve diğ., 2001). Atipik terimi, kesin bir tanım yapılamamasıyla beraber, hayvan modellerinde antipsikotik etkilere neden olan ancak katalepsiye tetiklemeyen ilaçları tanımlamaktadır. Tipik antipsikotiklere göre daha etkili (özellikle depresif, negatif veya bilişsel belirtilere karşı) veya daha iyi tolere edilebilen (hastada akut veya subakut kullanımdan sonra ekstrapiramidal yan etki insidansını indüklemeyen dozlarda, psikotik semptomlar üzerindeki etkili) veya farklı bir farmakolojik profile sahip olan (serotonin 5HT₂ reseptör blokajı yapan) ilaçlar için kullanılmaktadır (Geddes ve diğ., 2000; Blin, 1999; Meltzer, 2002).

Atipik antipsikotiklerin farmakolojik temeline yönelik çeşitli varsayımlar bulunmaktadır. 1) Dopamin ve serotonin (5-hidroksi triptamin/5-HT) sistemlerinin her ikisi ile de etkileşim olması ve yüksek 5HT_{2A}/D₂ reseptör antagonizması oranına sahip olması, 2) Dopamin D₂ reseptörleri ile mezolimbik seçicilik veya daha zayıf blokaj ile farklı bir etkileşim biçimi sergilemesi bu iki varsayım arasındadır (Anıl Yağcıoğlu- 2007; Gülseren ve Erol, 2000).

Atipik antipsikotik bileşiklerin bazı ortak özellikleri şöyle açıklanabilir (Gülseren ve Erol, 2000; Öncü ve diğ., 1998; Vallianatou, 2012):

- 1) Mezolimbik nöronlar üzerine etkileri, nigrostriatal nöronlar üzerine olan etkilerinden daha fazladır.
- 2) 5-HT₂ reseptörlerine affiniteleri D₂ reseptörlerine olan affinitelerinden daha fazladır.
- 3) Prolaktin düzeylerinde daha az artış yaparlar.
- 4) Tedaviye dirençli vakalarda etkinlikleri daha yüksektir.
- 5) Hayvan deneylerinde düşük oranda katalepsi oluştururlar.
- 6) İnsanlarda ekstrapiramidal yan etki oluşturma potansiyelleri düşüktür.
- 7) Tardif diskinezi oluşturmazlar.

Risperidon, olanzapin, klozapin sertindol, ketiapin, ziprasidon, aripiprazol, amisülpirid, paliperidon, asenapin, lurasidon, remoksipirid, sertindol, seroquel, melperon gibi ilaçlar atipik olarak sınıflandırılan yaygın olarak kullanılan antipsikotik ilaçlardır (Meltzer, 2002).

Atipik antipsikotiklerin yan etki profilleri büyük ölçüde değişmektedir. İyi tolere edilmeye meyillidirler, fakat birçoğunun sedasyona ve kilo alımına neden olduğu bilinmektedir. Kilo alımı, klozapin ve olanzapin ile tedavide yaygın görülmekte; aripiprazol ve ziprasidon ile minimal düzeyde görülmektedir. Aripiprazol istisnadır ve insomniaya, huzursuzluğa ve kilo kaybına neden olabilmektedir. Özellikle risperidon ve ketiapin ilk reçete edildiklerinde ve doz artışı yapıldığında postüral hipotansiyona da neden olabilmektedirler. Ekstrapiramidal yan etkiler nadir de olsa ortaya çıkabilmektedir. Risperidon ve yüksek dozlarda olanzapin ve ziprasidon prolaktin seviyelerini yükseltmektedir. Olanzapin ve risperidon, demanslı yaşlılarda artmış inme riski ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Stevens ve Rodin, 2011).

Antipsikotik ilaç alan hastalarda cinsel işlev bozukluğu, ilaç tedavisine yol açabilecek seksüel yan etkiler bildirilmiştir. Antipsikotiklerin kullanımı libido, uyarılma ve orgazm dahil olmak üzere tüm cinsel işlevlerini etkileyebilmektedir (Muench ve Hamer, 2010; Üçok ve Gaebel, 2008).

Yapılan çalışmalarda, klozapin ve sertindol ile tedavi edilen gruplarda artmış salivasyon, artmış sıcaklık ve rinit gibi otonomik yan etkiler gözlenirken; ketiapinin kuru ağız insidansını arttırdığı gözlenmiştir. Olanzapin, tipik antipsikotik ilaçlardan daha az otonomik etki ile ilişkili bulunmuştur. Nadir durumlarda, klozapin potansiyel ölümcül enfeksiyonlara yol açabilen nötropeni ve agranülositoza neden olabilmektedir. Tüm antipsikotikler, ventriküler repolarizasyonun uzamasına (uzamış QT intervali) katkıda

bulunabilir, bu da torsades de pointes ve ani kardiyak ölümle sonuçlanabilmektedir (Muench ve Hamer, 2010; Üçok ve Gaebel, 2008).

2.3. Olanzapin ile İlgili Genel Bilgiler

Olanzapin, şizofreni ve akut manik nöbetlerin tedavisinde ve bipolar bozuklukların nüks etmesini önlemede etkili olan, yapısal olarak klozapine benzeyen bir tienobenzodiazepin türevidir. Psikozun psikopatolojik semptomlarını azaltmak için haloperidol kadar etkili ve güvenilirdir ve semptomların azaltılması ve advers etki profili açısından diğer klasik antipsikotiklere göre bazı terapötik avantajlara sahip olduğu gösterilmiştir. Ekstrapiramidal etkilere ve prolaktin seviyelerinde sürekli artışa neden olma eğilimi düşüktür. Bununla birlikte, olanzapin ile tedavi (klozapin gibi), diğer tipik ve atipik antipsikotiklere göre daha yüksek kilo alma riski ve daha yaygın olarak metabolik sendrom ile ilişkili bulunmuştur (Mauri ve diğ., 2014).

2.3.1. Olanzapinin farmakodinamik özellikleri

Olanzapin, 5-HT_{2A} reseptörlerine D₂ reseptörlerine kıyasla daha yüksek afinite göstermektedir (yüksek 5-HT_{2A}/D₂ oranı). Olanzapin, diğer atipiklerle karşılaştırıldığında, serotoninerjik 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ ve 5-HT₆ reseptörlerine yüksek afinite, dopaminerjik D₁, D₂, D₃, D₄, D₅ ve muskarinik M₁-M₅ reseptörlerine orta afinite, adrenerjik α_1 ve α_2 reseptörlerine düşük afinite ve histamin H₁ reseptörlerine yüksek afinite göstermektedir. Olanzapin, atipikler içinde bilinen en güçlü histamin H₁ antagonistidir (Mauri ve diğ, 2014; Duggan ve diğ, 2005; De Siqueira Bringel ve diğ, 2011).

2.3.2. Olanzapinin farmakokinetik özellikleri

Oral yolla alınan olanzapinin yaklaşık %85'i absorbe olmaktadır, ancak hepatik metabolizmanın ilk geçiş etkisi ile yaklaşık %40'ı inaktive olduğu için oral biyoyararlanım yaklaşık %60 oranındadır. Olanzapinin, sağlıklı kişilerde yarılanma ömrü ortalama 33 (21-54 saat) saattir. Plazma pik konsantrasyonuna 6 saat içinde ulaşmaktadır. İlaç yaklaşık %93 plazma proteinlerine, çoğunlukla albümin (%90) ve alfa 1-asit glkoproteinine (%77), bağlanmaktadır. Dağıtım hacmi 16.4 ± 5.1 L 'dir. Ortalama plazma klirensi 26 L/s (12-47 L/s) 'dir. Sigara içenler ve erkekler, kadınlar ve sigara içmeyenlere

göre daha fazla olanzapin klirensi göstermektedir. Farmakokinetik bir çalışmada tek yüklü [¹⁴C]-OLZ'nin uygulanmasından sonra, radyoaktivitenin %30'u dışkıyla, %57'si de idrarla olmak üzere yaklaşık %87'si atılmıştır. Radyokarbonun yaklaşık yarısı üç gün içinde atılmıştır ve dozun %70'ten fazlası yedi gün içinde atılmıştır (Mauri ve diğ., 2014).

Olanzapin 10-N- ve 4'-N-glukuronide, 4'-N-desmetilolanzapin (CYP1A2 ile) ve olanzapin-N-oksite (flavin mono-oksjenaz 3 ile) metabolize olmaktadır. Olanzapinin majör metaboliti 10-N-glukuronittir. CYP2D6 vasıtasıyla 2hidroksimetilolanzapine metabolizasyonu küçük bir yoldur (Mauri ve diğ., 2014).

Olanzapin, CYP izoenzimlerini inhibe etmemektedir. Diazepam, alkol (etanol), imipramin, rasemik karışım -R ve -S varfarin, aminofilin, biperiden, lityum veya fluoksetin ile olanzapin arasında klinik açıdan anlamlı metabolik etkileşimler bulunmamıştır. CYP1A2'nin bir inhibitörü olan fluvoksamin, OLZ'in plazma konsantrasyonlarını artırırken; CYP1A2 indükleyicileri (sigara dahil), UDP-glukuroniltransferaz ve CYP3A4'ün (karbamazepin) indükleyicileri olanzapinin metabolizasyonunu artırarak plazma konsantrasyonunu düşürmektedir (Mauri ve diğ., 2014).

2.3.3. Olanzapinin endikasyonları ve kullanım dozları

1996 yılında şizofreni tedavisinde kullanımı için FDA'den onay alınan olanzapin, akut mani tedavisinde kullanımı ile ilgili kontrollü çalışmaların ardından 2000 yılı Mart ayında bipolar manik atakta kullanım için de onay almıştır (Akdemir ve Türkçapar, 2001)

Yapılan çalışmalarda, günlük OLZ dozu ile plazma OLZ konsantrasyonları arasındaki ilişki araştırılmış ve bu dozun, günlük oral doz ile doğrusal olarak arttığını gösterilmiştir ($0.12 < r < 0.68$). Üstelik bazı yazarlar, reçete edilen günlük doz ile major N-desmetilolanzapin metabolitinin plazma konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermiştir (Mauri ve diğ., 2014).

Bu çalışmalar, ortalama plazma OLZ konsantrasyonlarının, reçete edilen günlük doz ve tedavinin süresi gibi faktörlere bağlı olarak geniş çapta değiştiğini göstermiştir. Kadınların düşük OLZ klirensi göz önüne alındığında, ortalama plazma OLZ düzeyleri önemli derecede yüksektir ve bu, beşinci tedavi haftasından sonra belirginleşmektedir. Yaygın olarak kullanılan günlük OLZ dozlarında (5-30 mg/gün), ortalama plazma konsantrasyonları 10 ile 54 ng/mL arasında değişebilmektedir (Mauri ve diğ., 2014).

Ayrıca intramüsküler formu, şizofreni veya bipolar mani ile ilişkili ajitasyonlu hastalarda kullanılmak üzere hızlı etkili bir formüldür. Bu OLZ formülasyonu, şizofreni veya bipolar mani ile ilişkili akut ajitasyonlu hastaların tedavisinde daha hızlı bir etki başlangıcına sahiptir. 2,5 ile 10 mg arası enjeksiyonun değişen dozlarında, yanıt doza bağımlıdır. İlaç uygun bir güvenlik profiline sahiptir. Ayrıca olanzapin ve pamoik asitten oluşan bir kristalin tuzu olan depo intramüsküler formülasyonu da bulunmaktadır (Mauri ve diğ., 2014).

2.3.4. Olanzapinin advers etkileri

Olanzapin, yapısal ve işlevsel olarak diğer atipik antipsikotiklere benzemesine rağmen, daha olumlu bir yan etki profili vardır (Chue ve Singer, 2003). Birçok derlemede, en yaygın yan etkilerin uyku hali ve kilo artışı olduğu, bunların yanı sıra rijidite, ödem, ağız kuruluğu ve priapizm gibi cinsel işlev bozukluklarının da birçok hasta için bir sorun olabileceği vurgulanmıştır. Olanzapinin özellikle kadınlarda, yaşlılarda, kardiyak iletim bozukluğu olanlarda, beraberinde başka ilaçların alımıyla sıklıkla QT intervali uzamasına neden olduğu ileri sürülmüştür. Subklinik vakalarda artan kan basıncıyla ilişkili bulunmuştur. Olanzapinin serum prolaktin seviyesini artırdığı ve galaktoreye neden olduğu bilinmektedir (Aronson, 2016).

Akut distoni, akatizi, tardif diskinezi, tardif distoni gibi ekstrapiramidal yan etkiler, nöroleptik malign sendrom ve parkinsonizm olanzapin kullanımıyla meydana gelebilen yan etkilerdendir. Olanzapin tedavisinde nöbet geçirme insidansı %0,9 olarak belirlenmiştir. Anksiyete, olanzapin kullanan hastaların %36'sında görülen yaygın bir advers etkidir. Olanzapinin indüklediği obsesif kompulsif bozukluk vakaları bildirilmiş ve obsesif kompulsif bozukluğu olan hastaların semptomlarını kötüleştirmiştir. Birkaç hafta olanzapin kullanımından sonra ilacın geri çekilmesiyle paranoya, ajitasyon ve kekeleme gibi advers etkilerin oluştuğu bildirilmiştir (Aronson, 2016). Şizofreni, psikotik depresyon, şizoafektif bozukluk gibi değişik tanı gruplarından hastalarda olanzapin kullanımıyla birlikte mani ortaya çıkışını bildiren yayınlar bulunmaktadır. Bipolar bozuklukta kullanımı esnasında psikomotor aktivite artışı bildiren yayınlar da vardır (Akdemir ve Türkçapar, 2001).

Olanzapinle ilişkili hiperglisemi görülme frekansı 1/100-1/1000 olarak belirlenmiştir ve bu etkinin olanzapin indüklü kilo artışına bağlı bir mekanizmadan kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Olanzapin kullanımıyla önemli kilo artışı meydana

gelmektedir. Özellikle yüksek bir başlangıç dozu kullanan ve tedaviden önce zayıf olan hastaların yaklaşık %40'ında kilo artışı gözlenmiştir (Aronson, 2016).

Periferik ödem, olanzapinin nadir görülen bir yan etkisidir ve bazı araştırmalara göre doza bağımlı olduğu öne sürülmektedir. Olanzapin'in satış öncesi çalışmasında, şizofreni ve bipolar bozukluk tanısı ile 2,5 mg/g ve üzeri dozda olanzapin monoterapi sırasında ortaya çıkan yan etkilerin araştırılmış ve bu ilacı kullananların %3'ünde periferik ödem saptanırken, plasebo alanlarda ise bu oran %1 olarak bulunmuştur (Sarısöy ve Yazıcı, 2011).

2.3.5. Olanzapinin doz aşımı

Olanzapin plazma konsantrasyonunun normal hedef aralığı 9-23 ng/mL'dir. Olanzapin doz aşımının ölüm vakalarında kardiyak disritmi, non-konvulzif epilepsi, dirençli koreoatetozun eşlik ettiği vakalar bildirilmiştir. Akut aşırı doz olanzapin alımından sonra santral sinir sistemi depresyonu ve miyozis vakaları ayrıca diyabetes insipitus vakalarının meydana geldiği bilinmektedir (Aronson, 2016).

Doz aşımındaki belirtiler, genellikle olanzapin'in bilinen farmakolojik eylemlerinin bir yansımasıdır ve sedasyon, midriyaz, bulanık görme, solunum depresyonu, hipotansiyon ve ekstrapiramidal ve antikolinergik etkileri kapsamaktadır (Chue ve Singer, 2003).

800 mg'a kadar olanzapinin aşırı dozlarıyla tedavi, 991 ng/mL'ye kadar olan serum konsantrasyonları ile ilişkilendirilmiştir ve merkezi sinir sistemi depresyonu, taşikardi, hiperpireksi, lökositoz, artmış kreatin fosfokinaz seviyeleri ve opioid intoksikasyonu benzeri paradoksal miyozis veya α_2 -agonist intoksikasyonu gibi semptomları içermektedir (Chue ve Singer, 2003).

2.3.7. Olanzapinin diğer ilaçlarla etkileşimi

Olanzapin CYP izoenzimlerini inhibe etmemektedir ve aminofilin, biperiden, diazepam, etanol, fluoksetin, imipramin, lityum ve varfarin ile klinik olarak anlamlı metabolik etkileşimi bulunmamaktadır. Karbamazepinle beraber kullanıldığında monoterapiye oranla %36 daha düşük olanzapin plazma seviyeleri elde edilmiştir. Olanzapinin CYP2D6 inhibitörleriyle kullanımında, monoterapiye oranla plazma konsantrasyonunun yaklaşık %40 arttığı belirlenmiştir. Sigara içenlerde, CYP1A2

indüksiyonu nedeniyle olanzapın plazma konsantrasyonu içmeyenlere oranla daha düşüktür (Aronson, 2016).

2.4. Erkek Reprodüktif Sistemi

Erkek reprodüktif sisteminin asıl fonksiyonu, sperm yapımı ve spermin dışıya aktarılmasıdır. Bu fonksiyonları sağlayan başlıca organlar; skrotum içindeki testis, epididimis, vas deferens, seminal vezikül, ejakülatör kanal, yardımcı cinsiyet bezleri ve penisten oluşmaktadır (Lowe ve Anderson, 2015).

Testisler, erkek reprodüktif hücresi olan spermilerin üretildiği ve aynı zamanda testosteron adı verilen erkeklik hormonunun salgılandığı bir çift organdır. Testislerde bulunan seminifer tübül denilen küçük ve oldukça kıvrımlı sperm kanalcıklarında, hipofiz bezinin salgıladığı FSH hormonunun verdiği emirle sperm hücreleri üretilmektedir. Testisler yine hipofiz bezinden salgılanan ve LH adı verilen hormonun etkisiyle testosteron hormonu üretmektedirler (Kandeel, 2007).

Sperm kanallarının bir kısmı ve çok sayıda damar yapısı içeren skrotum, sperm hücrelerini ısı değişikliklerinden koruyarak sperm işlevlerini korumaktadır. Testisin orta-arka bölümünde bulunan yardımcı kanal epididimis, spermeleri olgunlaşmaya ve dışarı verilene kadar depolamakta, spermin testisten ejakülatör kanala ve penise iletilmesini sağlamakta, hasarlı spermatozoaları uzaklaştırmakta ve spermilerin olgunlaşmasına yardımcı olmaktadır. Vas deferens olarak adlandırılan sperm kanalı, epididimisten sonraki kısımda sperm iletimi ile görevlidir (Kandeel, 2007; Basu, 2011).

Seminal veziküller, spermin beslenmesini sağlayacak ve vajendeki asit ortamı nötralize edecek sıvıyı salgılamaktadır. İdrar kesesinin aşağısında bulunan prostat bezi, semenin üçte birini oluşturan bazik yapıda bir sıvı salgılamaktadır. Bulboüretal bezler, üretradaki idrarı nötralize edip ve üretrayı kayganlaştırmaktadırlar. Spermiler ile birlikte bu yardımcı bezlerden gelen sıvıların birleşmesiyle semen adı verilen salgı oluşmaktadır (Heffner ve Schust, 2010; Basu, 2011).

Epididimislerin genişlemiş devamı olan duktus deferens, sperm iletiminde görev almaktadır. Seminal vezikül ve prostat bezlerinden gelen salgıların sperm ile birleştiği ejakülatör kanalı, oluşan semeni ejakülasyon anında üretraya ulaştırmakta ve sperm üretra yoluyla dış genital bölge olan penisten vücut dışına taşınmaktadır (Heffner ve Schust, 2010).

2.4.1. Spermatogenez ve hormonal düzenlenmesi

Sperm yapımı, ön hipofiz gonadotropik hormonların etkisi sonucu seminifer tübüllerde gerçekleşmekte ve cinsel olgunlaşma ile başlamaktadır. Spermatogenezde; germ hücreleri olan spermatogoniaların mitoz çoğalmasıyla oluşan proliferasyon fazında spermatosit I'ler, redüksiyon fazında mayoz bölünme ile spermatosit II'ler, daha sonra ikincil bir bölünme ile spermatidler oluşmaktadır. Bu işlemler sonucunda her bir spermatidin kromozom sayısı yarıya ($n=23$) inmekte ve bunların ileri derecede farklılaşmaya uğramasıyla spermier meydana gelmektedir (Hall, 2013).

Olgun spermin yapısı; baş, orta parça ve kuyruk olarak üç kısımdan oluşmaktadır. Baş kısmında çekirdek ve enzim içeren akrozom, orta parçada bol miktarda spiral şekilli mitokondri, az miktarda vezikül ve sitoplazma bulunmaktadır. Kuyruk kısmı ise hareketi sağlayan kamçı yapısında bir uzantıdır (Aydın, 2006).

Son 30 yılda yapılan birçok çalışma, spermatogenezin endokrin regülasyonuna odaklanmıştır (O'Donnell ve diğ. 2017). Kantitatif olarak normal spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi gonadotropinler LH ve FSH hormonlarının kontrolü altında gerçekleşmektedir. Hipotalamus, LH ve FSH hipofiz hormonlarının üretimini ve salımını düzenleyen gonadotropin salgılatıcı hormonunu (GnRH) sentezlemekte ve salgılamaktadır. LH, androjen biyosentezini uyarmak için Leydig hücrelerini hedeflemekte ve ortaya çıkan androjenler (testosteron ve onun androjen metabolitleri), spermatogenezini uyarmak ve desteklemek için seminifer epitelyumdaki reseptörler üzerinde etki etmektedir. Böylece seminifer tübüllerde germ hücrelerinin olgunlaşması stimüle edilmektedir (Corenblum ve Boyd, 2017). FSH, spermatogenezini desteklemek için Sertoli hücrelerindeki reseptörleri doğrudan hedeflemektedir. Spermatogenez için hem androjenler hem de FSH'ın gerekli olduğu bilinse de, spermatogenez, büyüme faktörlerinin, sinyalleme moleküllerinin ve diğer içsel mekanizmaların işbirliğine dayanmaktadır (O'Donnell ve diğ. 2017).

Testosteron inhibisyonu, GnRH (gonadotropin salıverici hormon) ve gonadotropinlerin salgılanmasıyla gerçekleşmektedir. Kanda testosteron hormon konsantrasyonu yükseldiği zaman, hipofizden LH salınması durdurulmaktadır. Sertoli hücrelerinde sentezlenen inhibin B ve follistatin, hipofiz bezinden salgılanan FSH'ı baskılamakta, aktivin ise stimüle etmektedir (Woldemeskel, 2017).

2.5. Reprodüktif Toksisite

Reprodüktif toksisite, herhangi bir ajanın yetişkin erkeklerde ve kadınlarda cinsel işlev/fertilite üzerindeki olumsuz etkilerini ifade etmektedir. Daha geniş anlamda reprodüktif fonksiyonunun işlevini yitirmesi (infertilite); büyüme geriliği, malformasyonlar ve ölüm gibi embriyodaki yan etkilerin indüklenmesi (teratojenisite); ve yavruda olumsuz postnatal etkilerin indüksiyonu içermektedir (Kumar ve diğ. 2018; Woldemeskel, 2017).

İnsanlarda reprodüktif organlar, çevresel kirleticiler, ilaçlar (küçük moleküller ve biyolojik maddeler), kozmetikler, zirai kimyasallar ve virüsler, bakteriler ve parazitler gibi patojenler de dahil olmak üzere çeşitli çevresel maddelerden toksik olarak zarar görmektedir. Bu ajanların erkek ve dişi reprodüktif sistemler üzerindeki olumsuz etkileri, dünya çapında infertilitenin artmasının başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir (Woldemeskel, 2017).

İnfertilite; çiftlerin korunmasız cinsel ilişkiye rağmen, bir yılın sonunda gebelik sağlayamaması olarak tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, infertilite reprodüktif çağıdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Ülkemizde de yaklaşık olarak 1,5-2 milyon kişinin infertilite sorunu ile karşı karşıya olduğu belirtilmektedir (Amanak ve diğ. 2014). Erkek kaynaklı infertiliter de, tüm infertilite problemlerinin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır (Brezina ve diğ. 2012).

2.5.1. Reprodüktif toksisitenin biyogöstergeleri

Biyogösterge, maruziyetin veya cevabın ölçülebilen biyolojik indeksi olarak tanımlanmaktadır. Anatomik, endokrin, hücresel ve moleküler biyogöstergelerin tanımlanması ve doğrulanması, toksisite ve hastalığın tanı ve tedavisinin yanı sıra temel toksikolojik, epidemiyolojik ve diğer araştırmaların başarısında klinik açıdan oldukça önemlidir (Rockett ve Kim, 2005).

2.5.1.1. Organ ağırlıkları

Organ ağırlığı değişiklikleri, organlarda kimyasal olarak oluşan değişikliklerin hassas bir göstergesi olarak uzun süredir kabul edilmektedir. Toksikolojik deneylerde, kontrol grupları ve tedavi edilen hayvan grupları arasındaki organ ağırlıklarının karşılaştırılması, geleneksel olarak test maddesinin toksik etkilerini ve riski

değerlendirmek için kullanılmaktadır. Reprodüktif toksikoloji açısından erkek sıçan doğurganlık çalışmalarında, testis, epididimis, prostat ve seminal veziküllerin tartıldığını belirtilmektedir (Michael ve diğ. 2007; Woldemeskel, 2017).

Hızla bölünen testis hücrelerinde, fizyolojisinde veya hormonlardaki bozukluk veya değişimlere bağlı toksisiteye karşı duyarlılıkları nedeniyle testis ağırlıklarının ölçülmesi, toksisite çalışmaları açısından yararlı bulunmaktadır. Bunun yanı sıra testiküler ağırlıklar, enzim indüksiyonunun tanımlanmasına yardımcı olmakta; histopatolojik değişikliklerle iyi korele olmakta ve morfolojik bir korelasyonun yokluğunda bile No-Observed Effect-Level (gözlenebilir etki oluşturmaz düzey) oluşturulmasında yararlı olduğu bilinmektedir. Epididimal ağırlık da reprodüktif toksisite açısından ortak bir hedef organ olarak kabul edilmekte ve ağırlık değişiklikleri sıklıkla histopatolojik bulgularla iyi korelasyon göstermektedir (Michael ve diğ. 2007; Woldemeskel, 2017).

2.5.1.2.Sperm parametreleri

Sperm analizleri, erkek reprodüktif toksisitesini, özellikle spermatogenezi ve sperm olgunlaşmasını değerlendirmek için uygun bir biyogöstergeçir (Brezina ve diğ. 2012). Hem hayvanlarda hem de insanda, fertilité, sperm sayısına ve üretilen spermin kalitesine bağlıdır. Sperm üretimini ölçmek için spermatid sayısı; sperm başı (penetrasyonu etkiler) ve sperm flagellumu (motiliteyi etkiler) ile ilişkili anormallikleri tanımlamak için sperm morfolojisi; spermatogenezdeki değişiklikleri tespit etmek veya mekanik bilgi sağlamak için histopatoloji, değerlendirilmesi gereken sperm parametrelerindendir (Faqi ve diğ, 2017).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, 2010) semen analizi kılavuzuna göre;

Semen hacmi: Semen hacminin alt referans sınırı 1,5 mL'dir (5. yüzdelerde, %95 güven aralığı).

Sperm konsantrasyonu: Makler sayım kamerası ile sayım yapıldığında 10 tane orta boy karedeki toplam sperm sayısı milyon/mL olarak kaydedilir. Normal bir semende alt referans değeri 15×10^6 /mL'dir.

Total sperm sayısı: Tüm ejakülattaki toplam sperm sayısıdır. Sperm konsantrasyonunun total hacim ile çarpımından elde edilmektedir. Referans değeri ejakülat başına 39×10^6 spermatozodur.

Sperm hareketi (motilite): İlk 30 dakikada, oda ısısında veya 37°C derecede hareketlilik değerlendirmektedir. Spermiler progresif hareketli, nonprogresif hareketli ve hareketsiz

şeklinde sınıflandırmaktadır. Progresif hareket eden sperm hücresi doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde hızdan bağımsız olarak ilerleyici bir şekilde hareket etmektedir. Nonprogresif hareket eden sperm hücresi ilerleyici hareket etmeyip küçük dairesel veya yerinde hareket etmektedir. Sperm hücresinde hiç hareket gözlenmiyorsa hareketsiz olarak sınıflandırılmaktadır. Sperm progresif motilite referans değeri %32 civarındadır. **Sperm canlılığı:** Sperm hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanmakta ve progresif hareketli sperm oranı < %40 olduğu durumlarda sperm canlılık testleri özellikle önem kazanmaktadır.

Sperm morfolojisi: En az 200 sperm incelenerek baş, orta kısım-boyun, kuyruk değerlendirilerek normal morfolojideki spermilerin yüzdesi hesaplanmaktadır. Katı “Tygerberg” yöntemini kullanarak %4 referans olarak kabul edilmektedir.

2.5.1.3. *Hormonlar*

Hormonların ölçümü, verileri istatistiksel olarak geçerli kılmak için yeterli sayıda hayvan veya numuneye sahip iyi tasarlanmış bir çalışmaya dahil edildiğinde güçlü ve bilgilendirici bir araç olarak kabul edilmektedir. En sık ölçülen hormonlar testosteron, LH, FSH ve inhibin B'dir (Creasy ve Chapin, 2018; Testicular Toxicity, 2018).

Endokrin hormon bozucuların, Leydig hücrelerini etkileyerek testosteron seviyelerinin azalmasına ve böylece hipospadias veya kriptorşidizme neden olabileceği, ayrıca Sertoli hücrelerine etki etmesi sonucunda, germ hücrelerinin gelişimini bozarak hipo-spermatogeneze veya germ hücresi kanserine yol açabileceği belirtilmiştir (Toor ve Sikka, 2017).

2.5.1.4. *Oksidatif stres*

Oksidatif stres, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stresin, toksisitenin olası bir mekanizması olarak toksikolojik araştırmalarda büyük önem taşıdığı bilinmektedir (Mercan, 2004).

Çeşitli endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlerin, hücrelerin prooksidant/antioksidan dengesini bozduğu ve süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil iyonu ($OH^\cdot$) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek oksidatif stres oluşturduğu bilinmektedir. ROS, eşleştirilmemiş elektronlar nedeniyle yüksek oranda reaktif olan, oksijen bazlı küçük moleküllerdir (Papa ve Skulachev, 1997). Oksidatif hasarın

kontrolünde önemli bir rol oynayan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutathion peroksidazı (GPx) içeren enzimler ve bununla birlikte enzimatik olmayan antioksidan vitaminler (A, C, E, Q), flavonlar, kinonlar, likopenler, b-karoten ve ürik asit gibi diyet takviyeleri antioksidan savunmayı oluşturmaktadır (Ranjekar ve diğ., 2003; Huang ve Liu, 2017). Sitosolik, mitokondriyal ve ekstraselüler formlarda bulunan SOD, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit'e çevirmektedir. Katalaz (KAT), tek formda bulunur ve hidrojen peroksidi hidrojene ve suya dönüştüren oldukça verimli, hücre içi bir enzimdir. Hidrojen peroksit, ferrik veya kuprik iyonlar ve hidroksil iyonları oluşturmak için Fe^{++} veya Cu^{++} gibi ağır metallerle reaksiyona girebilir veya su ve redüklenmiş glutatyon verecek şekilde glutatyon/glutatyon peroksidaz (GPx) yolu ile detoksifiye edilebilir. Glutamat bazlı bu sistem oksidatif strese karşı önemli bir savunmadır (Turner ve Lysiak, 2008). Malondialdehit (MDA), hücrelerde çoklu doymamış yağ asit peroksidasyonun son ürünlerindendir. Serbest radikaller, bir organizmada lipid peroksidasyon zincirini başlatmaktadır ve serbest radikallerde artış, MDA'nın aşırı üretilmesine neden olmaktadır. MDA seviyesi, oksidatif stresin ve antioksidan durumun bir biyogöstergesi olarak kullanılmaktadır (Gaweł ve diğ., 2004).

ROS'un, patolojik koşullara karşı savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir, ancak aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri dokulara zarar verebilmektedir (Sidorkiewicz ve diğ., 2017). Kusurlu sperm fonksiyonuna bağlı infertilitede ROS'un rolü bildirilmiştir ve aşırı ROS oluşumunun plazma membranında peroksidatif hasara neden olduğu ve bunun da sperm fonksiyonunun bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir (Kumar ve diğ., 2018). Bu sebeple reproduktif toksisiteyi değerlendirirken oksidatif stresi belirlemek önem taşımaktadır.

2.5.1.5. Histopatoloji

FDA, cinsel olarak olgunlaşmış hayvanların reproduktif organlarının histopatolojik değerlendirmesinin, hayvanlarda testiküler hasarı değerlendirmek için uygun şekilde hassas bir biyogösterge olduğunu düşünmektedir. Toksikoloji çalışmaları, testislerin, seminal vezikül, epididimis ve prostatın histopatolojisinin, uygun fiksasyon ve testis boyama ile incelenmesini içermelidir. Tekrarlanan doz toksisite çalışmalarında gonadal dokularda ters bulgular gözlenirse, klinik olmayan erkek infertilite çalışmalarında reproduktif dokuların histopatolojik değerlendirmesi, insan risk değerlendirmesi için ek kanıt sağlayabilmektedir (CDER, 2018; Woldemeskel, 2017).

2.6. Antipsikotik İlaçlar ile İndüklenen Reprodüktif Toksik Etkiler

Antipsikotik ilaç alan hastaların yaklaşık yüzde 43'ünde cinsel işlev bozukluğu bildirilmiştir (Muench ve Hamer, 2010). Hem birinci hem de ikinci jenerasyon antipsikotik kullanımının kadın ve erkeklerde libido, uyarılma ve orgazm dahil olmak üzere tüm seksüel fonksiyon aşamalarını etkileyebildiği belirlenmiştir (Wirshing ve diğ, 2002). Birinci jenerasyon antipsikotiklerin, özellikle erkeklerde priapizmde olduğu gibi spontan, ağrılı veya retrograd ejakülasyonun eşlik ettiği erektil ve ejakülatör disfonksiyona neden olduğu belirtilmiştir (Muench ve Hamer, 2010).

Şizofreni hastalarında seksüel disfonksiyon prevalansı, antipsikotik ilaçların serum prolaktin düzeylerine etkisi ile ilişkili görünmektedir (Dossenbach ve diğ, 2005). Dopaminin, prolaktin salınımını düzenleyen majör hipotalamik inhibitör faktör olması nedeniyle, antipsikotiklerin dopaminerjik iletiyi inhibe etmelerinin prolaktin düzeyini artırdığı bilinmektedir. Antipsikotiklerin neden olduğu D₂ reseptör blokajı sonucu ortaya çıkan prolaktin düzeyindeki artış hem kadın hem de erkekte hipogonadizm ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek prolaktin düzeyi, hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormon (GNRH) salınımını ve aynı zamanda LH salınımı üzerine östrojen düzeyinin pozitif geribildirim (feedback) etkisini baskılamaktadır. Bu durumun da LH ve FSH düzeylerini düşürürerek reprodüktif sağlık ve cinsel işlev üzerinde derin etkilere neden olduğu gösterilmiştir (Karakuş ve diğ, 2009; Bains ve Shah, 2012).

Birinci jenerasyon antipsikotiklerin ve ikinci nesil antipsikotiklerden özellikle risperidon ve yüksek dozda olanzapin ve ziprasidon kullanımı ile hiperprolaktinemi ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Hiperprolaktinemi asemptomatik olabildiği gibi; jinekomasti, galaktore, oligo veya amenore, seksüel disfonksiyon, düşük sperm sayısı, akne, hirsutizm, infertilite ve kemik mineral yoğunluğu kaybına neden olabilmektedir. (Muench ve Hamer, 2010; Bains ve Shah, 2012).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Hayvanlar

Deneylerde yaklaşık 300-340 g ağırlığında yetişkin erkek Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar, çalışma ortamına uyum sağlamaları için deney başlangıcından bir hafta önce laboratuvara alınarak 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık döngüsünde, %65 ortam nemi ve $24\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında, ad libitum beslenme ile ve serbest su erişimi sağlayabilecek şekilde bakımı sağlanmıştır. Tez çalışması süresince gerçekleştirilen tüm deneyler, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Komisyonu'ndan onay alındıktan sonra yapılmıştır (Dosya Kayıt No. 2013-9).

3.2. Kullanılan Maddeler

Agaroz (Normal)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Agaroz (Düşük erime dereceli)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Alkol	: Sigma-Aldrich, Almanya
Boraks çözeltisi	: Sigma-Aldrich, Almanya
Borik asit	: Riedel de Haen, Almanya
Dikalsiyum fosfat	: Carlo Erba, Amerika Birleşik Devletleri
Ditiyotritol	: Ambresco, Amerika Birleşik Devletleri
DMEM/Ham's F-12	: Wisent Inc, Amerika Birleşik Devletleri
EDTA disodyum dihidrat	: Merck, Almanya
FSH Kiti	: Sun-Red, Çin Halk Cumhuriyeti
Glutaraldehit	: Merck, Almanya
GSH Kiti	: BioVision, Amerika Birleşik Devletleri
KAT Kiti	: BioVision, Amerika Birleşik Devletleri
LH Elisa Kiti	: Sun-Red, Çin Halk Cumhuriyeti
Lamel yapıştırıcısı	: Eukitt, İspanya
Lityum 3,5-diiodosalisilat	: Fluka, Amerika Birleşik Devletleri
LMP Agaroz	: Invitrogen, İngiltere

LR White	: London Resin Campany, İngiltere
MDA Kiti	: BioVision, Amerika Birleşik Devletleri
Monosodyum Fosfat	: Carlo Erba, Amerika Birleşik Devletleri
Olanzapin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Paraformaldehit	: Sigma-Aldrich, Almanya
PBS	: MP Biomedicals, Fransa
SOD Kiti	: Sun-Red, Çin Halk Cumhuriyeti
Sodyum klorür	: Merck, Almanya
Sperm Blue dark staining	: Microptic SL, İspanya
Sperm Blue fixative solution	: Microptic SL, İspanya
Syber green	: Sigma-Aldrich, Almanya
Testosteron Kiti	: Sun-Red, Çin Halk Cumhuriyeti
Toluidin mavisi	: Sigma-Aldrich, Almanya
Triton X-100	: Merck, Almanya
Trizma baz	: Sigma-Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri
Trizma hidroklorit	: Sigma-Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri
Üretan	: Sigma-Aldrich, Almanya

3.3. Kullanılan Cihazlar

Basler A312fc dijital kamera	: Microptic SL, İspanya
Comet analiz programı	: BS 200 ProP, BAB Görüntüleme Sistemi, Türkiye
Elektroforez tank	: Cleaver, İngiltere
Floresan mikroskobu	: Leica DM6000 B, Almanya
Güç kaynağı	: Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri
Hassas terazi	: Ohaus, Amerika Birleşik Devletleri
Homojenizatör	: Sartorius, Almanya
Isıticılı manyetik karıştırıcı	: Lab Companion, Amerika Birleşik Devletleri
İnkübatör	: Lab Companion, Amerika Birleşik Devletleri
Nikon Eclipse 50i	: IMP, Güney Afrika
Otomatik Sperm Yazılımı	: SCA, İspanya
Soğutmalı santrifüj	: Eppendorf, Amerika Birleşik Devletleri
Stereomikroskop	: Leica Em Trim, Almanya
Ultramikrotom	: Leica Em Uc6, Almanya
Ultrasonik banyo	: Bandelin, Almanya
Vorteks	: Heildolph, Almanya

4. YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanlarına Test Maddesinin Uygulanması

Sıçanlar her grupta 8 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Deney hayvanlarına uygulanan OLZ dozları, literatür araştırmaları sonucunda antipsikotik aktivite gösterdiği 2,5, 5 ve 10 mg/kg olarak belirlenmiştir (De Siqueira Bringel ve diğ., 2011; Beasley ve diğ., 1996; Terry ve diğ., 2008). Yaygın olarak kullanılan günlük OLZ dozları 5-30 mg/gün olmakla birlikte (Mauri ve diğ., 2014), şizofreni tedavisinde oral OLZ, genellikle başlangıçta 5 ile 10 mg ile başlayan, birkaç gün içinde 10 mg/gün hedef dozu ile uygulanmaktadır (FDA, ZYPREXA® Product Label, 2009). Seçilen dozlar, insan dozlarını hayvan dozlarına uyarlayan kılavuzlara uygun düzenlenmiştir (FDA Guidance for Industry, 2005). OLZ, distile su içinde çözülerek 1 mL/100 g'lık bir hacimde deney hayvanlarına uygulanmıştır. Uygulama süresi, tekrarlanan doz oral toksisite çalışmalarına dayanarak, test maddesinin potansiyel reproduktif sistem hasarının saptanabileceği 28 gün olarak belirlenmiştir (ECETOC Monograph No. 31, 2002).

- Kontrol grubu (K): 28 gün süre ile oral olarak 1 mL/100 g hacimde distile su uygulanan kontrol grubu sıçanlar (8 adet)
- 2,5 mg/kg OLZ uygulanan grup (OLZ-2,5): 28 gün süre ile oral olarak 2,5 mg/kg dozda OLZ uygulanan sıçanlar (8 adet)
- 5 mg/kg OLZ uygulanan grup (OLZ-5): 28 gün süre ile oral olarak 5 mg/kg dozda OLZ uygulanan sıçanlar (8 adet)
- 10 mg/kg OLZ uygulanan grup (OLZ-10): 28 gün süre ile oral olarak 10 mg/kg dozda OLZ uygulanan sıçanlar (8 adet)

4.2. Deney Hayvanlarından Numune Toplanması

28 günlük uygulama süresini takip eden 24 saatlik sürede deney gruplarındaki sıçanların ağırlıkları ölçülmüş ve intraperitoneal olarak 1,5 g/kg ürethan anestezisi verilen sıçanlar, kalp sağ ventrikül yapısından yüksek miktarda kan toplanması ile öldürülmüştür (Takeuchi ve diğ., 2014).

Toplanan kan örnekleri 4°C'de 24 saat bekletildikten sonra 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serum kısımları, ilgili kitlerin üreticisi tarafından belirlenen deney prosedürüne göre serum FSH, LH ve testosteron seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Sıçan testis ve epididimis dokuları çıkarılmış ve fosfat tamponuyla (8 g/L NaCl, 0,2

g/L KCl, 0,2 g/L KH_2PO_4 , 1,14 g/L Na_2HPO_4 , pH 7,4) yıkanıp kan ve kirlilikten arındırılmıştır. Sol testis ve epididimis dokularının ağırlıkları ölçülerek, sıçanların bağıl testis/epididimis ağırlıklarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Sol testis dokuları, ilgili kitlerin üreticisi tarafından belirlenen deney prosedürüne göre testis SOD ve KAT aktiviteleri ile GSH ve MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Sağ testis dokuları küçük parçalara (2 mm³) dilimlenmiş ve %4 paraformaldehit çözeltisi (fosfat tampon içinde pH 7,2-7,3) içinde 4°C’de 24 saat süre ile fikse edilmiştir. Fiksasyon süresi sonrasında örnekler 0,1 M’lık sodyum-fosfat tamponu (pH: 7,4) ile yıkanmış ve örnekler dehidratasyon amacıyla alkol serilerinden geçirilmiştir. Resinin hücre içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacıyla örnekler 2:1 oranında hazırlanmış LR White/alkol karışımında 2 saat bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler 24 saat süre ile LR White çözeltisinde bekletilmiştir. Gömme işleminin ardından oluşturulan bloklardan ultramikrotom kullanılarak 700 nm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler %1’lik toluidin mavisi/boraks çözeltisi (pH: 8,4) ile boyanmış ve mikroskopta görüntülenmiştir (Anderson ve Dixon, 2002). Sağ epididimisin proksimal kauda kısımları sperm konsantrasyonu, motilitesi, morfolojisi ve DNA hasarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

4.3. Sperm Konsantrasyonunun ve Motilitesinin Değerlendirilmesi

Kauda kısımları önceden sıcaklığı 37°C’ye ayarlanmış DMEM/Ham’s F-12 besiyerini içeren saat camlarına alınmıştır. Kirliliklerinden arındırılan kaudaların 0,5 cm’lik parçası içerisinde 1 mL aynı besiyerini içeren yeni saat camlarına aktarılmıştır. Besiyeri içerisinde sperm bulutu oluşması sağlanmış ve bu buluttan 5’er µL alınarak Leja lamaların kuyucuklarına doldurulmuştur. Hazırlanan lamalar Sperm Class Analyzer (SCA[®]) sisteminde konsantrasyon ve motilite modülünde 4x ters faz objektifi ile her sıçan için en az 8 görüntü olacak şekilde saniyede 50 kare çekilerek analiz edilmiştir. Motilitenin değerlendirilmesinde her sıçan için en az 200 sperm kullanılmıştır (WHO, 2010).

4.4. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi

5 µL sperm bulutu lama (24 x 60 mm) alınmış ve temiz başka bir lam yardımıyla 45°lik açı olacak şekilde yayılmıştır. Lamalar oda sıcaklığında kuruduktan sonra, 15-20 dakika boyunca dikey olarak SpermBlue[®] fiksatif solüsyon içerisinde fikse edilmiştir.

Süre sonunda 15 dakika boyunca SpermBlue[®] ile boyanmıştır. Lamlar fazla fiksatif ve boyadan arındırılmak için 1 saniye distile su ile yıkanmıştır. Hazırlanan lamlar SCA[®] sistemine ait morfoloji modülünde 100x aydınlık alan objektifi ile mavi lens kullanılarak otomatik olarak analiz edilmiştir. Sıçanlara ait sperm morfolojilerinin değerlendirilmesinde her sıçan için en az 200 sperm kullanılmıştır. Sperm literatür verilerine göre belirlenen sperm anomalileri esas alınarak morfolojik olarak değerlendirilmiştir (Van der Horst ve diğ., 2011; WHO, 2010).

4.5. Sperm DNA Hasarının Belirlenmesi

Spermelerde DNA hasarı tek hücre jel elektroforezi (SCGE/Comet) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Buzlu lamlar fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz jel ile kaplanmıştır. Sperm bulutunun 8 µL'si 72 µL %1'lik düşük erime sıcaklığına sahip agaroz jel ile karıştırıldıktan sonra lama aktarılmış ve lamel ile kapatılmıştır. 5 dakika kuruma süresi sonrasında lamel çıkarılıp preparatlar 24 saat lizis tamponu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10; tampona %1 Triton X-100 ve 40 mM ditiotreitol) içerisinde bekletilmiştir. Süre sonunda lizis tamponuna 0,1 mg/mL proteinaz K ve 4 mM lityum 3,5-diiodosalisilat eklenmiş ve lamlar 24 saat 37°C'de lizis tamponunda bekletilmiştir. Süre sonunda tuz ve deterjanları uzaklaştırmak için lamlar 5'er dakika 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Lamlar yatay elektroforez ünitesine yerleştirildikten sonra 20 dakika TBE tamponunda (10 mM Tris, 0.08 M borik asit ve 0,5 M EDTA pH 8,2) bekletilmiştir. Süre sonunda 25 V'de 25 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminin ardından lamlar distile su ile yıkanmış ve açık havada kurutulmuştur. Kurutulan lamlar Syber green boyası ile boyanmıştır. Lamlar floresan mikroskopunda fotoğraflanmış ve görüntüler analiz edilmiştir. Analiz işlemi her lamdan 100 sperm kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Trivedi ve diğ., 2010). Kuyruk momenti; % kuyruk DNA x kuyruk uzunluğu şeklinde hesaplanmıştır (Björndahl, 2009).

4.6. İstatistiksel Analiz

Tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler, SigmaPlot v.10 programında çoklu karşılaştırma testleri olan Tukey ve Tek Yönlü Varyans Analizi ile gerçekleştirilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Bağıl Organ Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Organ ağırlığı değişiklikleri, organlarda oluşan toksik etkilerin hassas bir göstergesi olarak uzun süredir kabul edilmektedir. Reprodüktif toksikoloji açısından erkek sıçan doğurganlık çalışmalarında, testis, epididimis, prostat ve seminal veziküllerin tartıldığı belirtilmektedir (Michael ve diğ. 2007; Woldemeskel, 2017). Muamele edilen hayvanların organ ağırlığının kontrol grubuyla karşılaştırılması, gruplar arasındaki vücut ağırlığı farklılıkları nedeniyle genellikle karmaşıktır. Bu nedenle organ ağırlığının analizi için, organ ağırlığı/vücut ağırlığı oranı olan bağıl ağırlık daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Bailey ve diğ., 2004).

De Siqueira Bringel ve diğ. (2011)'nın yaptığı çalışmada, 45 gün intraperitoneal 10 mg/kg olanzapin verilen sıçanların, bağıl testis, epididimis ve prostat ağırlıklarının kontrol grubuna kıyasla azalmış olduğu gösterilmiştir.

Bizim çalışma sonuçlarımıza göre ise OLZ uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre, bağıl testis ağırlıkları ve bağıl epididimis ağırlıkları açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Tablo 5.1). OLZ uygulaması ile elde edilen reprodüktif toksisite bulgularına, bağıl organ ağırlıklarındaki değişmelerin eşlik etmediği ifade edilebilir. Bu duruma OLZ uygulaması ile oluşan ve histopatolojik incelemede de gözlenen ödem gibi sekonder değişikliklerin bağıl organ ağırlıklarının farklılaşmasına olanak vermemiş olabileceği düşünülebilir.

Tablo 5.1. Gruplara ait bağıl testis ve epididimis ağırlıkları, K: Kontrol grubu; OLZ-2,5: 2,5 mg/kg olanzapin uygulanan grup; OLZ-5: 5 mg/kg olanzapin uygulanan grup; OLZ-10: 10 mg/kg olanzapin uygulanan grup; Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir, (*) Kontrolde farklı ($p \leq 0,05$).

Deney grupları	Bağıl testis ağırlığı (g/100 g vücut ağırlığı)	Bağıl epididimis ağırlığı (g/100 g vücut ağırlığı)
K	0,49 $\pm 0,05$	0,20 $\pm 0,01$
OLZ-2,5	0,48 $\pm 0,03$	0,20 $\pm 0,01$
OLZ-5	0,45 $\pm 0,03$	0,19 $\pm 0,01$
OLZ-10	0,46 $\pm 0,03$	0,19 $\pm 0,01$

5.2. Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Semen kalitesinin ölçütleri, erkek infertilitesi açısından tartışılmakta ve genellikle infertilite, anormal semen analizi ile teşhis edilmektedir. Sperm analizinin birden fazla ölçüm parametresi olsa da sperm sayısının normalden az olması (oligospermi), saptanamayan sperm (azoospermi) gibi sperm sayısı anomalileri, sperm motilitesi ve sperm morfolojisindeki anomaliler en önemli parametreler olarak değerlendirilmektedir (Brezina ve diğ. 2012; Kulkarni ve diğ., 2015).

De Siqueira Bringel ve diğ. (2011)'nın yaptığı çalışmada, 45 gün intraperitoneal 1, 2,5, 5, 10 mg/kg olanzapin uygulanan sıçanların her testis için günlük sperm üretimi ve gram başına günlük sperm üretimi sonuçları, deney grupları arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Literatürlerde spermin morfolojik incelemesinin spermatogenez kalitesinin ve fertilitenin duyarlı bir göstergesi olduğu ortaya konulmuştur. Yine sperm morfolojik bozukluklarına sahip olgularda beraberinde DNA hasarları, kromatin hasarları ve benzeri patolojilerin olabileceği belirtilmiştir (Erdemir ve diğ., 2011).

Çalışmamızda gruplara ait sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi Tablo 5.2'de sunulmuştur. OLZ uygulanan gruplar ve kontrol grupları sperm konsantrasyonları ve sperm motilitesi açısından karşılaştırıldığında, OLZ uygulanan gruplarda kontrol grubundan farksız değerler elde edilmiştir. Sperm morfolojisi açısından OLZ grupları karşılaştırıldığında ise OLZ-5 ve OLZ-10 gruplarında; kontrol grubuna göre ve en düşük doz (2,5 mg/kg) OLZ uygulanan gruba göre normal sperm morfolojisinin azaldığı tespit edilmiştir.

Tablo 5.2. Gruplara ait sperm parametreleri, K: Kontrol grubu; OLZ-2,5: 2,5 mg/kg olanzapin uygulanan grup; OLZ-5: 5 mg/kg olanzapin uygulanan grup; OLZ-10: 10 mg/kg olanzapin uygulanan grup; Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir, (*) Kontrolde farklı ($p \leq 0,05$); (!) OLZ-2,5'den farklı ($p \leq 0,05$).

Deney grupları	Sperm konsantrasyonu (10^6 /ml)	Motilite (%)	Normal sperm morfolojisi (%)
K	1,67 $\pm 0,24$	87,46 $\pm 3,15$	84,00 $\pm 4,55$
OLZ-2,5	1,32 $\pm 0,12$	84,78 $\pm 6,43$	77,16 $\pm 7,40$
OLZ-5	1,40 $\pm 0,50$	84,97 $\pm 5,17$	64,86 $\pm 6,87$ (*, !)
OLZ-10	1,31 $\pm 0,32$	84,45 $\pm 2,61$	66,81 $\pm 5,00$ (*, !)

Sperm morfoloji anomalisinin indüksiyonunun, spermatogonia ve spermatositlerin genetik materyalindeki veya spermatogenez sürecindeki hasara bağlı oluşabileceği düşünülmektedir (Tasdemir ve diğ, 1997; Agarwal ve Said, 2003). Çalışma sonuçlarımıza göre gözlenen morfolojideki bozulmaları spermatogenez kalitesi ve fertilitenin duyarlı bir parametresi olarak değerlendirirsek OLZ'nin reproduktif toksisitesinin göstergesi olarak kabul etmemiz mümkündür.

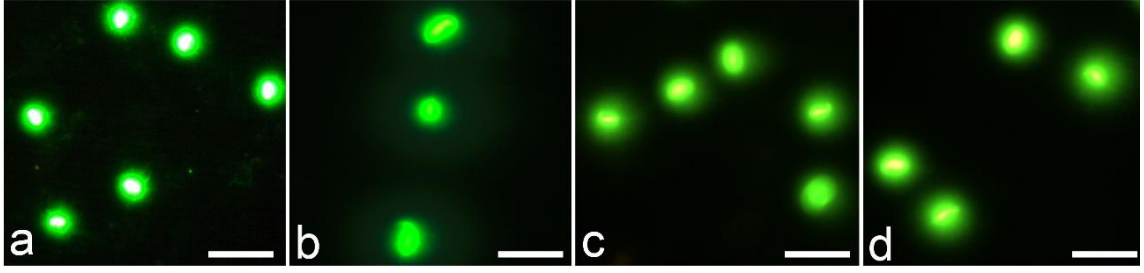
Sperm DNA hasarının, sperm kalitesinin bağımsız bir ölçüsü olduğu bilinmekte ve standart semen analizinden daha kesin tanı ve prognostik bilgi sağlayabilmektedir. Ayrıca, sperm çekirdeğinin oksidatif strese karşı korumadan yoksun ve oksidasyon aracılı DNA hasarına karşı hassas olduğu için; sperm DNA hasarının ölçülmesi, erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde yararlı bir araç olarak yer almaktadır (Simon ve Carrell, 2013).

Çeşitli çalışmalar infertiliteye sahip olduğu bilinen erkeklerde sperm DNA hasarının artmış olduğunu göstermiştir. DNA hasarının kaynağı muhtemelen çok faktörlü olmakla birlikte, DNA hasarı olan sperm, standart semen analizi ile değerlendirilen parametrelerden bağımsız olarak erkek subfertilitesinin göstergesi olabilmektedir. Ayrıca, çalışmalar normal standart sperm parametrelerine sahip infertil erkeklerden elde edilen spermelerde DNA hasarı artışının olabileceğini ortaya koymuştur. Sperm DNA fragmentasyonunun %30'dan fazla olması reproduktif sonuçları olumsuz etkileyebilmektedir (Hall ve Burt, 2012; Agarwal ve Said, 2003).

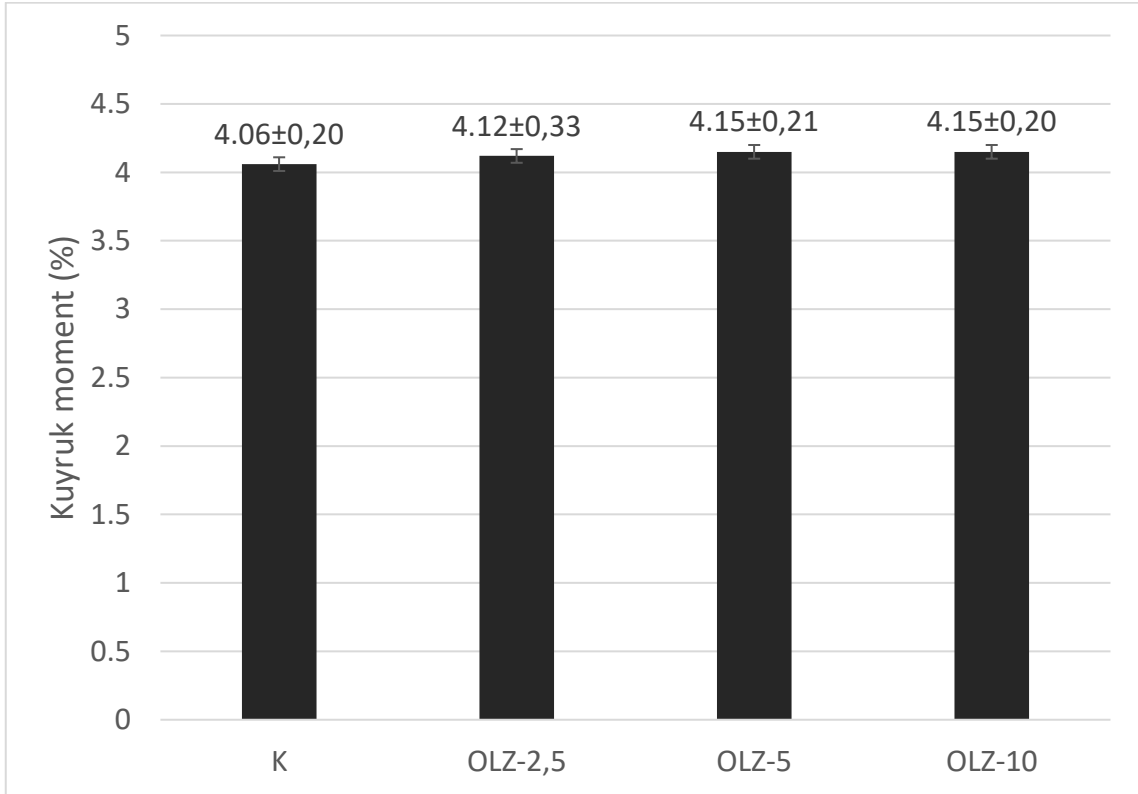
Comet testi, çok çeşitli hücre tiplerinde DNA iplikçik kırılmalarının ölçülmesiyle spermatozoadaki DNA hasarını araştırmak için yaygın kullanılan hassas bir yöntemdir (Chatterjee ve diğ., 2000; Agarwal ve Said, 2003). Comet testi, bir maddenin veya metabolitlerinin genotoksik potansiyelini, germ hücrelerinin genetik materyali ile etkileşime girebilecek şekilde algılama yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, germ hücre genotoksitesinin saptanması için comet testinin kullanılabileceği önerilmiştir. Sadece sperm fonksiyon testi, tüm güçlü germ hücresi toksik maddelerini tespit edemeyebilir. Bu nedenle, güvenilirliği artırmak için, mümkün olduğunca çok sayıda sperm özelliğini kapsayan çeşitli fonksiyonel testlerin sonuçlarını entegre etmek şarttır. DNA hasar analizi için kullanılan parametreler kuyruk uzunluğu, % kuyruk DNA'sı ve % kuyruk momentidir. % kuyruk momenti, hücredeki genel DNA hasarına entegre bir ölçüm vermektedir (Trivedi ve diğ., 2010).

Çalışma gruplarına ait sperm Comet testi fotoğrafları Şekil 5.1'de gösterilmiştir. Ayrıca gruplara ait % kuyruk momenti değerleri de Şekil 5.2'de sunulmuştur. Spermilere uygulanan Comet testi sonuçlarına göre gruplar arasında % kuyruk momenti parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir.

Sperm DNA hasarı, kromatinlerin ayrılması ve paketlenmesindeki anomaliler, oksidatif stres, hormonal eksiklik veya anormal hücre apoptozundan kaynaklanabilmektedir (Zini ve Libman, 2006; Trivedi ve diğ., 2010; Agarwal ve Said, 2003). Sperm DNA bütünlüğü ve normal sperm morfolojisi arasındaki ilişkiye dair yayınlanan çelişkili veriler bulunmaktadır (Belloc ve diğ., 2014). OLZ ile genotoksitesinin değerlendirildiği bir çalışmada kullanılan kardeş kromatit değişimi ve mikroçekirdek testlerinde genotoksik potansiyelinin olmadığı sonucuna varılmıştır (Togar ve diğ., 2011). Sperm parametreleri ve DNA hasarı ilişkisi araştırılan bazı çalışmalarda, sperm DNA hasarı ile anormal morfoloji arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir (Belloc ve diğ., 2014; Oliveira ve diğ., 2010). Başka bir çalışmada, infertil gruptaki tüm örneklerde, normal morfolojideki spermatozoidlerin DNA fragmentasyonuna sahip olduğu gözlemlenmiştir (Avendaño ve diğ., 2009). Yine çalışmamızda elde ettiğimiz sperm morfolojisindeki % anormalliğin anlamlı düzeyde artışı, anlamlı artan DNA hasarı ile sonuçlanmamıştır.



Şekil 5.1. Gruplara ait sperm Comet testi fotoğrafları (Büyütme ölçeği: 20 μ m). a: Kontrol grubuna ait Comet testi fotoğrafı; b: 2,5 mg/kg OLZ grubuna ait Comet testi fotoğrafı, c: 5 mg/kg OLZ grubuna ait Comet testi fotoğrafı; d: 10 mg/kg OLZ grubuna ait Comet testi fotoğrafı.



Şekil 5.2. Gruplara ait % kuyruk moment. K: Kontrol grubu; OLZ-2,5: 2,5 mg/kg olanzapin uygulanan grup; OLZ-5: 5 mg/kg olanzapin uygulanan grup; OLZ-10: 10 mg/kg olanzapin uygulanan grup

5.3. Testis Dokusunun Histopatolojik Olarak İncelenmesi

Düzenleyici toksisite çalışmalarında, histopatolojik değerlendirme genel olarak toksikanların erkek reproduktif fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkilerini tespit etmek için en hassas biyogöstergelerden biri olarak kabul edilmektedir (Creasy, 2003).

Çalışmamızda kontrol grubuna ait testis doku kesitlerinin histolojik analizleri,

seminifer tübül yapılarının normal olduğunu göstermiştir. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinin normal histolojik görünüme sahip olduğu ve düzenini koruduğu gözlenmiştir. Tübül içerisindeki spermatogenik serilerin ve Sertoli hücrelerinin organizasyonun normal olduğu tespit edilmiştir. Seminifer tübüllerde lümen içerisinde spermiler izlenmiştir (şekil 5.2-A, şekil 5.3-A ve şekil 5.4-A).

OLZ-2,5 grubuna ait testis dokusu kesitlerinin histolojik analizleri, kontrol grubuna benzer şekilde seminifer tübül yapılarının normal olduğunu göstermiştir. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinin normal histolojik görünüme sahip olduğu ve düzenini koruduğu gözlenmiştir. Tübül içerisindeki spermatogenik serilerde ve Sertoli hücrelerinde normal bir görünüm tespit edilmiştir (şekil 5.2-B, şekil 5.3-B ve şekil 5.4-B).

OLZ-5 grubuna ait testis dokusu kesitlerinin histolojik analizlerinde, seminifer tübül yapılarında gözlemlenebilir bir patolojiye rastlanmamıştır. Ancak spermatogenik hücrelerde şişme meydana geldiği, Leydig hücrelerinde vakuolleşme ve hafif intraselüler vakuolleşme geliştiği tespit edilmiştir (şekil 5.2-C, şekil 5.3-C ve şekil 5.4-C).

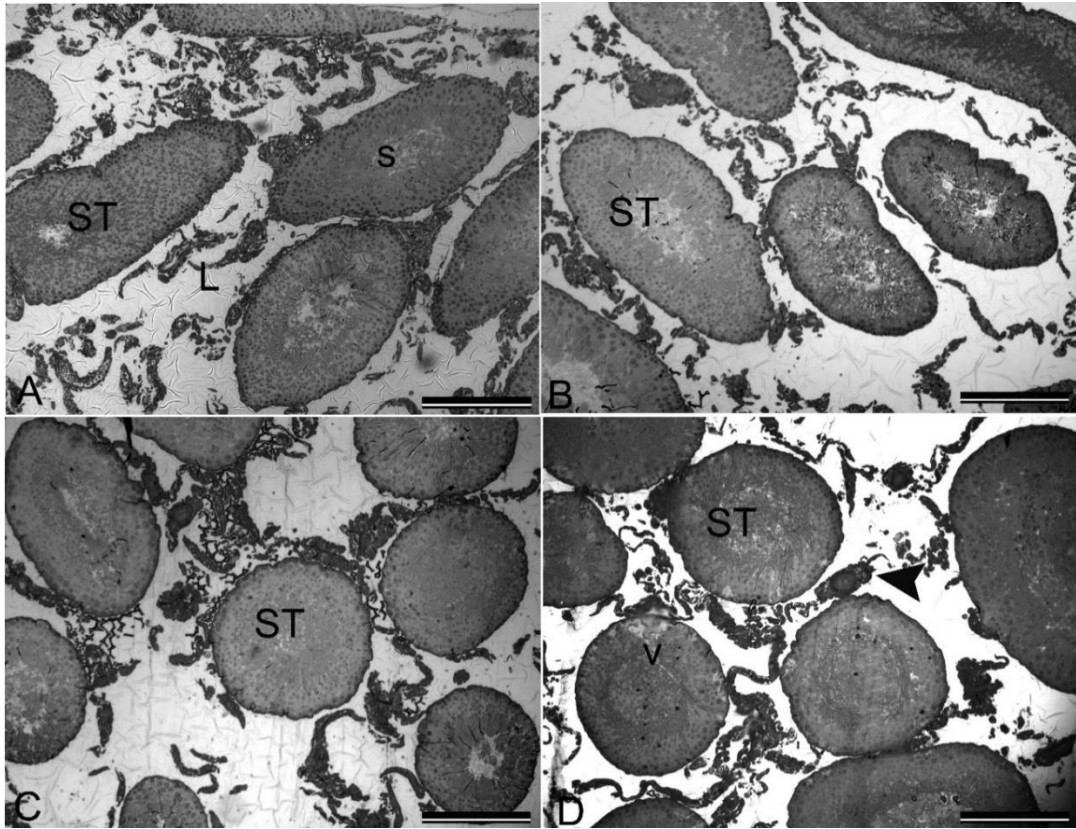
OLZ-10 grubuna ait testis dokusu kesitlerinin histolojik analizlerinde, seminifer tübüllerdeki vakuolleşmeler belirginleşmiştir. Leydig hücrelerindeki şişme ve lipofuksin granüllerindeki artış dikkat çekmiştir. İnterselüler vakuolleşmede artış, sperm sayısında azalma ve bazal membranın kalınlaştığı tespit edilmiştir (şekil 5.2-D, şekil 5.3-D ve şekil 5.4-D). Sertoli hücre hasarının en sık görülen morfolojik tepkilerinden biri, vakuolleşmedir. Bazı durumlarda, vakuoller büyük ve ayrıktır, bazı durumlarda ise bazal Sertoli hücre sitoplazmasının mikrovakuolleşmesi görülmektedir. Vakuolleşme ve/veya şişmeyi takiben, genellikle germ hücre dejenerasyonu, disorganizasyonu veya eksofoliyasyon görülmektedir. Germ hücresi değişikliklerinin, farklı toksik maddelerle değişebildiği ve muhtemelen Sertoli hücresi içindeki fonksiyonel bozukluğun doğasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (Vidal ve Whitney, 2014; Creasy, 2001).

Çalışmamızda OLZ ile indüklenen morfolojik bozulmalar bu noktada histopatolojik bulgular ile desteklenmektedir. Histopatolojik bulgulara göre de OLZ ile gerçekleşen vakuolleşme, şişme ve bunun gibi patolojiler OLZ ile ind klenebilecek germ hücre hasarı dolayısıyla reproduktif toksisitenin bir göstergesidir.

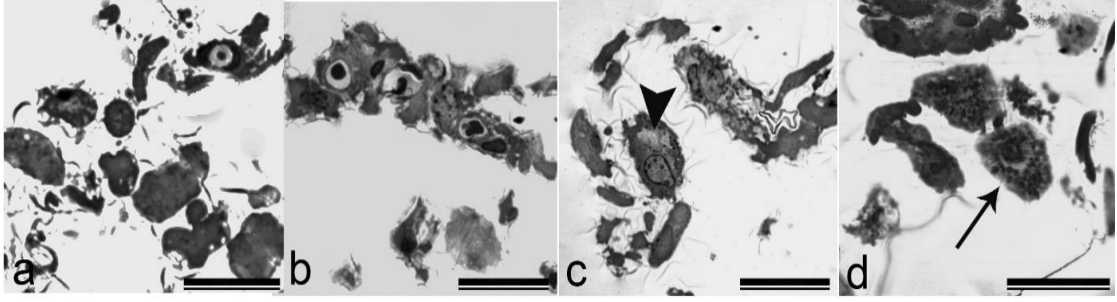
Çalışmamıza benzer olarak OLZ uygulanan sıçanlara ait testisin histopatolojik analizinde, 5 ve 10 mg/kg olanzapin ile tedavi edilen hayvanlarda testiküler parankimada; germ hücre deskuamasyonlu seminifer tübüller, çok çekirdekli dev hücreler ve sertoli

hücrelerinde intrasitoplazmik vakuolleşme; ayrıca, seminifer epitel ve tübüler lümenlerde nekrotik ve apoptotik germ hücreleri gözlenmiştir. Bu durumun ise OLZ ile tedavi edilen hayvanların seminifer tübüllerinde gözlenen testiküler dejenerasyonun, plazma testosteron düzeylerinde azalma ile ilişkili olabileceği; testosterondaki azalmanın, olanzapin kullanımı ve muhtemelen yüksek prolaktin seviyeleri ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (De Siqueira Bringel ve diğ., 2011).

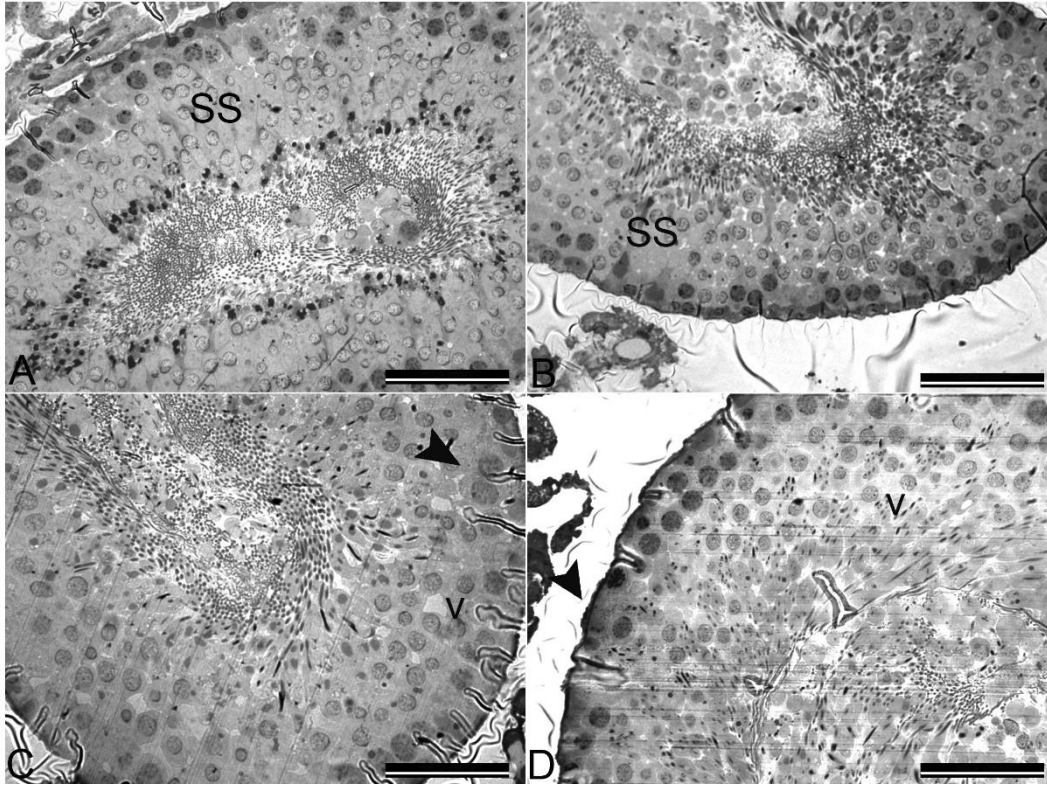
OLZ ile indüklenen histopatolojik değişimler OLZ nin doz bağımlı olarak testis dokusundaki toksisitesini göstermektedir. Bu değişimlerin sperm kalitesinde düşüşe yol açtığı da sperm morfolojik değerlendirmemiz ile ortaya konulmuştur.



Şekil 5.3. *Seminifer tübüllerin ve Leydig hücrelerinin kontrol ve OLZ uygulanmış gruplardaki düşük oranda büyütülmesi (Büyütme Ölçeği: 200 μ m), A: Kontrol grubu: Seminifer tübüllerin (ST), spermatozoa (S) ve Leydig hücrelerinin (L) normal histolojisi. B: OLZ-2,5 ve C: OLZ-5: Seminifer tübüllerde (ST) gözlemlenebilir patoloji yoktur. D: OLZ-10: Seminifer tübüllerde (ST) büyük vakuoller (v) ve Leydig hücrelerinin şişmesi (►).*



Şekil 5.4. Leydig hücrelerinin kontrol ve OLZ uygulanmış gruptaki yüksek oranda büyütülmesi (Büyütme Ölçeği: 20 μ m), a) Kontrol grubu: Leydig hücrelerinin normal görünümü b) OLZ-2,5: Leydig hücrelerinde gözlemlenebilir patoloji yoktur. c) OLZ-5: Leydig hücrelerinde vakuolleşme (►). d) OLZ-10: Leydig hücrelerinde şişme ve lipofuksin granüllerinde artış (►).



Şekil 5.5. Semifer tübüllerin ve interstisyel hücrelerin kontrol ve OLZ uygulanmış gruptaki yüksek oranda büyütülmesi (Büyütme Ölçeği: 50 μ m), A: Kontrol grubu: Spermatogenik serilerdeki (SS) hücreleri içeren seminifer tübüllerin normal görünümü. B: OLZ-2,5: Spermatogenik serilerde (SS) gözlemlenebilir patoloji yoktur. C: OLZ-5: Spermatogenik hücrelerin şişmesi (►) ve hafif interstiyel vakuolleşme (v). D: OLZ-10: İnterselüler vakuolleşmede (v) artış, sperm sayısında azalma ve bazal membranın kalınlaşması (►).

5.4. Serum Hormon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında incelenen gruplara ait serum hormon seviyeleri Tablo 5.3'te sunulmuştur. Buna göre OLZ uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla serum FSH seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı tespit edilmiştir. OLZ-10 grubunda OLZ-2,5 grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış serum FSH değerleri elde edilmiştir.

Serum LH seviyeleri açısından gruplar karşılaştırıldığında; OLZ uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre LH seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca testosteron seviyeleri değerlendirildiğinde de OLZ uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalan testosteron seviyeleri tespit edilmiştir.

Tablo 5.3. Gruplara ait serum hormon seviyeleri, K: Kontrol grubu; OLZ-2,5: 2,5 mg/kg olanzapin uygulanan grup; OLZ-5: 5 mg/kg olanzapin uygulanan grup; OLZ-10: 10 mg/kg olanzapin uygulanan grup; Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir, (*) Kontrolde farklı ($p \leq 0,05$); (!) OLZ-2,5'den farklı ($p \leq 0,05$).

Deney grupları	FSH (IU/L)	LH (mIU/mL)	Testosteron (pg/ml)
K	25,55 $\pm 1,24$	15,86 $\pm 0,84$	619,58 $\pm 95,10$
OLZ-2,5	22,97 $\pm 1,32$ (*)	13,07 $\pm 1,60$ (*)	482,63 $\pm 107,86$ (*)
OLZ-5	20,57 $\pm 1,70$ (*)	13,32 $\pm 1,63$ (*)	449,18 $\pm 63,87$ (*)
OLZ-10	20,07 $\pm 1,73$ (*,!)	13,63 $\pm 1,52$ (*)	435,99 $\pm 88,63$ (*)

Testosteron seviyesinin önemli ölçüde azalması, testis androjen biyosentezinin merkezi olan Leydig hücrelerinde oluşan hasarın doğrudan bir sonucu olabilmektedir (El-Kashoury ve diğ., 2009). Leydig hücre atrofisi, testosteron üretiminin azalmasıyla ilişkili bulunmuştur ve bu nedenle kemirgenlerde, testosteronun inhibisyonu seminifer epitelindeki karakteristik morfolojik değişiklikler ile sıklıkla bağlantılı olarak görülmektedir (Vidal ve Whitney, 2014; Creasy, 2001). Spermatojenik siklusun 7 ve 8. evrelerinde tübüllerin, yüksek seviyelerde testosteron ve androjen bağlayıcı protein içerdiği bilinmektedir. Bu iki aşamada Sertoli hücre fonksiyonları ve germ hücre gelişimi, yeterli seviyelerde testosteronun varlığına bağlıdır ve testosteron seviyeleri azalırsa, bu

hücrelerin apoptoz seviyesinde bir artış gözlenecek ve bu da spermatogenezin etkinliğinde azalmaya neden olacaktır (Creasy, 2001). LH seviyelerinin değişmesiyle, seminifer epitelde tahrip ve germinal hücre kaybı meydana geldiği ve bunun sonucu olarak spermatid sayısının ve testislerde sperm üretiminin azaldığı ve ayrıca sperm anomalisinin arttığı belirlenmiştir (El-Kashoury ve diğ., 2009). Leydig ve sertoli hücrelerini içeren seminifer tübüllerdeki atrofi ve dejenerasyona FSH seviyelerindeki azalma eşlik edebilmektedir (El-Kashoury ve diğ., 2009). Gonadotropinlerin (FSH ve LH) seviyesinin azalmasının, sekonder hipogonadizme neden olabileceği ve testosterondaki azalmanın reproduktif performansı üzerinde, sosyal davranış değişikliklerinde ve ikincil cinsel özelliklerdeki değişikliklerde etkili olabileceği belirtilmiştir (Sousa ve diğ., 2017). Çalışmamızın sonuçlarına göre hem testosteronda hem de FSH ve LH seviyelerinde azalma gözlenmesi histopatolojik inceleme sonuçlarımızda gözlenen sertoli ve leydig hücrelerinde vakuolleşme ve deformasyonlar, sperm morfolojisinin bozulması gibi sonuçlar ile koreledir. Bu noktada OLZ ile FSH, LH ve testosteron seviyelerinde gözlemlenen azalmalarının germ hücre gelişimini, sperm kalitesi, reproduktif performansı ve fertilitiyi olumsuz etkileyeceği de bir gerçektir.

OLZ ile yapılan ve reproduktif hormon düzeylerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma verileri derlendiğinde; yapılan bir çalışmada 4 hafta oral olarak olanzapin (4 mg/kg/gün) ve risperidon (2mg/kg/day) ile tedavi edilen wistar-erkek sıçanlarda (n=15) testosterone ve LH seviyelerinin azaldığı fakat farkın anlamlı olmadığı, FSH seviyelerinin ise anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Yanik ve diğ., 2012). Başka bir çalışmada ise 45 gün boyunca 10 mg/kg olanzapin ile tedavi edilen sıçanlarda, kontrol grubuna kıyasla plazma testosteronunda yaklaşık %84'lük anlamlı bir azalma bulunmuştur (De Siqueira Bringel ve diğ., 2011). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ise şizofreni hastalarında 339 hastada yapılan rastlantısal, çift kör, randomize, çift kör, paralel grup karşılaştırmalı bir çalışmada 10–20 mg/gün OLZ ve 4–12 mg/gün risperidon ile tedavi edilen hastalarda hiperprolaktinemi ve cinsel işlev bozukluğunun geliştiği gözlenmiştir.

Olanzapin kullanımıyla artan prolaktin seviyelerinin neden olduğu hipogonadizm ile ilişkili galaktore, seksüel disfonksiyon, jinekomasti, iktidarsızlık ve azalmış kemik yoğunluğu bildirilmiştir (FDA, ZYPREXA® Product Label, 2009). Antipsikotiklerin birçoğu, santral sinir sisteminde dopamini (D₂) bloke ederek, yüksek prolaktin seviyelerine ve böylece hipotalamik-hipofizal-gonadal aksın baskılanmasına

neden olabilmekte, bu durum GnRH saliverilmesini azaltmakta ve buna sekonder olarak serum LH, FSH ve testosteron seviyelerinde azalmalar gözlenebilmektedir (Ding ve diğ., 2017; FDA, ZYPREXA® Product Label, 2009). Yine OLZ nin prolaktin seviyelerinde artışa sebep olarak spermatogenezde gecikmeye neden olabileceği, sperm motilitesi ve semen kalitesini düşürebildiği, ayrıca testiste morfolojik değişikliklere neden olabileceği belirtilmiştir (De Siqueira Bringel ve diğ., 2011; De Rosa ve diğ., 2003). Dolayısıyla çalışmamızda OLZ uygulanan gruplarda meydana gelen FSH, LH ve testosteron seviyelerindeki azalmaları bu ilaç ile indüklenen hiperprolaktineminin bir sonucu olarak yorumlamak mümkündür.

5.5. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

İnfertil erkeklerin %25'inin semeninde ROS'un yüksek oranı saptanmıştır. Normal sperm fonksiyonu için düşük seviyelerde reaktif oksijen türleri gereklidir ancak, spermatozoa defekti ve semende ROS'un arttığı ve bunun da sperm disfonksiyonu ile sonuçlandığı bilinmektedir (Zini ve Libman, 2006). Olgun spermde ROS; kapasitans, akrozom reaksiyonu, mitokondriyal kılıf stabilitesi ve sperm motilitesinde önemli bir rol oynamaktadır (Kumar ve diğ. 2018). Hücre zarının büyük miktarlarda doymamış yağ asitleri içermesi ve sitoplazmada ROS'u nötralize edebilen enzimlerin sadece düşük konsantrasyonda bulunması nedeniyle spermatozoanın, ROS'un zararlı etkilerine duyarlı olduğu bilinmektedir (Sidorkiewicz ve diğ., 2017). Lipit oksidasyonu ile, membran bütünlüğünün kaybı ve geçirgenliğinde bir artış, hücrel enzimlerin inaktivasyonu, yapısal DNA hasarı ve hücre apoptozu oluşabilmektedir. (Kumar ve diğ. 2018). Bunun sonucunda, azalmış sperm sayısı ve aktivitesi, motilite ve anormal morfoloji gözlenmektedir (Sidorkiewicz ve diğ., 2017)

Çalışmamızda gruplara ait testis dokusu SOD, KAT, GSH ve MDA değerleri Tablo 5.4'te sunulmuştur. Buna göre testiküler dokuda OLZ uygulanan gruplarda KAT ve MDA seviyelerinde kontrol grubundan farksız değerler elde edilmiştir. Testis GSH seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında, 10 mg/kg OLZ uygulanan grupta GSH seviyelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı belirlenmiştir. Testis SOD seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında ise OLZ-5 ve OLZ-10 gruplarında testis SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. Ayrıca SOD seviyelerinde OLZ-10 grubunda, en düşük doz yani OLZ-2,5 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir.

Tablo 5.4. Gruplara ait SOD, KAT, GSH ve MDA seviyeleri, K: Kontrol grubu; OLZ-2,5: 2,5 mg/kg olanzapin uygulanan grup; OLZ-5: 5 mg/kg olanzapin uygulanan grup; OLZ-10: 10 mg/kg olanzapin uygulanan grup; Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir, (*) Kontrolde farklı ($p \leq 0,05$); (!) OLZ-2,5'den farklı ($p \leq 0,05$).

Deney grupları	KAT (ng/ml)	GSH (ng/ml)	MDA (mcg/ml)	SOD (ng/ml)
K	123,64 $\pm 9,64$	432,45 $\pm 24,99$	8,72 $\pm 0,52$	29,96 $\pm 1,59$
OLA-2,5	107,67 $\pm 17,02$	388,01 $\pm 89,31$	8,51 $\pm 3,27$	33,43 $\pm 2,59$
OLA-5	116,82 $\pm 17,27$	373,50 $\pm 98,70$	8,02 $\pm 1,05$	35,15 $\pm 3,45$ (*)
OLA-10	112,69 $\pm 25,47$	334,31 $\pm 55,35$ (*)	9,03 $\pm 1,07$	37,04 $\pm 2,27$ (*,!)

Spermatozoa oksidatif hasarını indükleyen serbest radikaller, zayıf sperm fonksiyonu ve infertilitenin indüklenmesindeki rolüyle büyük dikkat çekmiştir. Sperm fonksiyonları ve hareketliliği üzerindeki zararlı etkilerin çoğu, bu çalışmalarda yüksek ROS seviyelerine ve reaktif azot türlerine bağlanmıştır (Parlaktas ve diğ., 2008). ROS seviyelerinde, semendeki pro-oksidanlara doğru gelişen bir değişim spermatozoa üzerinde oksidatif strese neden olabilmektedir. Aynı zamanda, semende antioksidan aktivitelerindeki (örneğin, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz ve redüktaz, GSH) azalmanın idiyopatik infertiliteyle ilişkili olabileceği bilinmektedir. Artan ROS üretim oranının, bu antioksidan enzimlerin etkisini inhibe etmesi veya alternatif olarak bu antioksidan enzimlerin doğal azaltılmış ekspresyonunun oksidatif strese neden olabilmesi mümkündür. Bu, lipid peroksidasyonunun artmasına, sperm motilitesinin, canlılığının ve fonksiyonun azalmasına neden olmakta ve sonuçta infertiliteye yol açabilmektedir (Sıkka, 1996).

Çalışmamızda GSH seviyelerinin azalması artan oksidatif stresin bir göstergesidir. ROS, hücre içi GSH konsantrasyonunu azaltarak antioksidan savunma mekanizmalarını etkileyebilmektedir (Abdel Moneim, 2014). Yapılan çalışmalarda oksidatif stres; lipid peroksidasyonu ve nitrik oksitte anlamlı bir artış ve GSH seviyelerinde anlamlı bir azalma ile ilişkilendirilmiştir (Abdel Moneim, 2014; Elghaffar ve diğ., 2016). Tremellen, GPx (glutatyon peroksidaz) aktivitesinin sürdürülmesi için vazgeçilmez olan GSH konsantrasyonundaki bir azalmanın, semendeki redoks homeostazının oksidatif hasara maruz kalması için koşullar yarattığını iddia etmektedir (Tremellen., 2008). Bu noktada

bu durum çalışmamızda özellikle en yüksek dozda saptanan histopatolojik değişimleri de destekler niteliktedir. Artan oksidatif strese akut cevap olarak GSH seviyelerinin azaldığı ve ROS ile savaşabilmek için antioksidan enzim seviyelerinin stimule olduğu bilinmektedir (Somani ve diğ., 1995). Çalışmamızda aynı zamanda doz bağımlı olarak SOD'un yükselmesinin de artan oksidatif strese akut cevap olarak, ROS ile ani şekilde savaşmak için stimule olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca yine SOD'un ROS'a cevap olarak yükselmiş olabileceğini destekler nitelikte süperoksit anyonunun, infertilite varlığında ya da sperm kalitesinde bozulmalarda belirgin olarak arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Hsieh ve diğ., 2002; Mazzilli ve diğ., 1994). Togar ve diğ., (2011) ise yaptıkları çalışmada OLZ nin yüksek dozları sebebi ile oksidatif stresin indüklendiğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasındaki bulgulara göre, yüksek doz OLZ uygulanan gruplardaki anormal sperm morfolojisini ve testiküler yapıdaki dejeneratif bulguları testiküler dokuda OLZ ile indüklenmiş oksidatif stresle ilişkilendirmek mümkündür.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Şizofreni, halüsinasyon, içe kapanma, hezeyan gibi belirtileri olan ve etiyolojisi tam olarak bilinmemekle beraber, bütün dünyada görülen kronik bir hastalıktır. Şizofreni başlangıcı, hastaların yaklaşık %80'inde reproduktif periyodun başlangıcında görülmektedir ve beynin spesifik alanlarında nöroendokrin değişikliklere neden olan şizofreninin, reproduktif fonksiyonları etkilediği bilinmektedir. Bununla birlikte, şizofreni tedavisinde kullanılan antipsikotik ilaçlar, doğrudan hormonal regülasyonu etkileyerek ya da dolaylı olarak cinsel işlevin, spermatogenez süreçlerinin veya epididimal olgunlaşmanın bozulmasını indükleyerek reproduktif toksik etkilere neden olabilmektedir. Bu bağlamda, diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, OLZ'in reproduktif toksik etkilerinin erkek sıçanlarda değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, OLZ'in normal sperm morfolojisini azalttığı, histopatolojik değişimler ile OLZ'in doz bağımlı testis dokusundaki toksisitesine sebep olduğu, bu durumun altında yatan mekanizmaların ise FSH ve LH seviyelerinde azalma ile karakterize HHG ekseninin bozulması ve oksidatif stresin olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma OLZ ile yapılmış reproduktif toksisitesini çok çeşitli biyogöstergeler ile değerlendiren bir çalışmadır. Bu çalışma sonuçlarından hareketle, OLZ'nin toksisiteye neden olan mekanizmalarının aydınlatıldığı ve erkek reproduktif sistemi üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği deneysel çalışmalar atırılarak, elde edilen veriler insanlarda yapılan çalışmaların sonuçlarıyla desteklenmelidir. İnsanlarda toksisite riskinin tanımlanması amacıyla hastalarda OLZ kullanımından önce ve tedavi döneminde sperm parametreleri ve reproduktif hormon seviyeleri takip edilerek olası reproduktif etkiler ve infertilite açısından değerlendirilmelidir.

KAYNAKÇA

- Abdel Moneim, A.E. (2014). Prevention of carbon tetrachloride (CCl₄)-induced toxicity in testes of rats treated with *Physalis peruviana* L. fruit. *Toxicology and Industrial Health*, 32(6), 1064–1073.
- Agarwal, A. Said, T.M. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, 9(4), 331–345.
- Akdemir, A. Türkçapar, H. (2001). Olanzapin Kullanımı İle Birlikte Görülen Hipomani: Olgu Sunumu, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 11:257-261.
- Amanak, K. Karaöz, B. Sevil, Ü. (2014). Modern Yaşamın İnfertilite Üzerine Etkisi, *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 13(4):345-350.
- Anderson, M.J. ve Dixon, A.F. (2002). Sperm competition: motility and the midpiece in primates. *Nature*, 416 (6880), 496.
- Anıl Kostakoğlu, E. Alptekin, K. Kıvrıkcık, B.B. Kabakçı, E. Tunca, Z. Göğüş, A. (2001). Şizofrenik Hastalarda Olanzapin ve Klorpromazinin Etki ve Güvenliğinin Karşılaştırılması, *Türk Psikiyatri Dergisi*, 12(1):3-16.
- Anıl Yağcıoğlu, E. (2007). Antipsikotik İlaçların Etki Mekanizmaları: Şizofreni Tedavisinde Atipiklik Bir Üstünlük Mü?, *Türk Psikiyatri Dergisi*, 18(4):364-374.
- Aronson, J.K. (2016). Olanzapine, *Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*, Sixteenth Edition, (s. 297-319), Amsterdam: Elsevier.
- Avendaño, C. Franchi, A. Taylor, S. Morshedi, M. Bocca, S. Oehninger, S. (2009). Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa, *Fertility and Sterility*. 91(4):1077-84.
- Aydın, S. (2006). İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Bains, S. Shah, A. (2012). Sexual Side Effects of Antipsychotic Drugs, *Advances in Pharmacoeconomics and Drug Safety*, 1:2.
- Basu, S.C. (2011), Male Reproductive Anatomy and Physiology, *Male Reproductive Dysfunction*, Jaypee Brothers Medical Publishers:New Delhi, 15-40.
- Beasley, C.M. Sanger, T. Satterlee, W. Tollefson, G. Tran, P. Hamilton, S. (1996). Olanzapine versus placebo: results of a double-blind, fixed-dose olanzapine trial. *Psychopharmacology*, 124(1-2), 159–167.

- Belli, H. Özçetin, A. Ertam, Ü. Alpay, E. Bahçebaşı, T. Kıran, K. Baykız, F. Bayık, Y. (2007). Şizofreni hastalarında bazı sosyodemografik özellikler ve tedavi ile ilişkili etkenler, *Anatolian Journal of Psychiatry*, 8:102-112.
- Belloc, S. Benkhalifa, M. Cohen-Bacrie, M. Dalleac, A. Chahine, H. Amar, E. Zini, A. (2014). Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31:527–532.
- Björndahl, L. (2009). Methods to assess the status of the sperm DNA: The Comet and TUNEL Assays, *Centre for Andrology and Sexual Medicine*, ESHRE.
- Blin, O. (1999). A Comparative Review of New Antipsychotics, *The Canadian Journal Psychiatry*, 44:235-244.
- Brezina, P.R. Yunus, F.N. Zhao, Y. (2012). Effects of Pharmaceutical Medications on Male Fertility. *Journal of Reproduction Infertility*, 13(1):3-11.
- Chatterjee, R. Haines, G.A. Perera, D.M.D. Goldstone, A., Morris I.D. (2000). Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia, *Human Reproduction*, 15(4), 762–766.
- Chue, P. Singer, P. (2003). A review of olanzapine-associated toxicity and fatality in overdose, *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 28(4):253-61.
- Corenblum, B. Boyd, J. (2017). Endocrinology and disorders of the reproductive system, *Endocrine Biomarkers*, 351-397.
- Creasy, D. (2001). Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity, *Toxicologic Pathology*, 29,(1),64-76.
- Creasy, D. (2003). Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis And Discussion Of The Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology, *Birth Defects Research Part B*, 68:408–415.
- Creasy, D.M. Chapin, R.E. (2018). Male Reproductive System, *Fundamentals of Toxicologic Pathology*, Academic Press, Elsevier, 459-516.
- De Rosa, M. Zarrilli, S. Di Sarno, A. Milano, N. Gaccione, M. Boggia, B. Lombardi, G. Colao, A. (2003). Hyperprolactinemia in Men: Clinical and Biochemical Features and Response to Treatment, *Endocrine*, 20(1-2), 75–82.
- De Siqueira Bringel, S. de Amorim Júnior, A.A. Amorim, M.J. Brito, L.T. Morais R.N. de Torres, S.M. Tenoiro, B.M. da Silva Junior, V.A. (2011). Endocrine and

- testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats, *Journal of Applied Toxicology*, 33(1), 24–31.
- Ding, J. Shang, X. Zhang, Z. Jing, H. Shao, J. Fei, Q. Rayburn, E.R. (2017). FDA-approved medications that impair human spermatogenesis, *Oncotarget*, 8, (6),10714-10725.
- Doğangün, B. Karaçetin, G. Kayaalp, M.L. (2010). Çocuk ve Ergenlerde Antipsikotik Kullanımı, *New Symposium Journal*, 48(2), 86-101.
- Dossenbach, M. Hodge, A. Anders, M. Molna'r B. Peciukaitiene, D. Krupka-Matuszczyk I. Tatu, M. Bondar, V. Pecenak, J. Gorjanc, T. McBride, M. (2005). Prevalence of sexual dysfunction in patients with schizophrenia: international variation and underestimation, *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 8, 195–201.
- Drobnis, E.Z. Nangia, A.K. (2017). Impacts of Medications on Male Fertility, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1034, Springer International Publishing, 1-332.
- Duggan, L. Fenton, M. Dardennes, R. El-Dosoky, A. Indran, S. (2005). Olanzapine for schizophrenia, *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Elghaffar, S.K.A. Fiedan, I.O. Ahmed, E.A. Omar, H. (2016). Acrylamide Induced Testicular Toxicity in Rats: Protective Effect of Garlic Oil. *Journal of Biomarkers*, 1:5.
- El-Kashoury, A.A. Salama, A.F. Selim, A.I. Mohamed, R.A. (2009). Animal Model Study of Reproductive Toxicity of the Chronic Exposure of Dicofol, *Life Science Journal*, 6(3).
- Erdemir, F. Fırat, F. Gençten, Y. (2011). Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi, *Türk Üroloji Seminerleri*; 2: 11-7.
- Ertan, T. (2008). Psikiyatrik Bozuklukların Epidemiyolojisi, *Türkiye’de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi*, 62:25-30.
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC), (2002), Guidance on Evaluation of Reproductive Toxicity Data, *ECETOC Monograph No. 31*, Brussels.
- Faqi, A.S. Hoberman, A. Lewis, E. Stump, D. (2017). Developmental and Reproductive Toxicology, *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*, (Second Edition), Academic Press, Elsevier, 215-245.

- Fatani, Z. Aldawod, R. Alhawaj, F.A. Alsadah, S. Slais, F.R. Alyaseen, E.N. Ghamri, A.S. Banjar, J. Qassaim, Y.A. (2017). Schizophrenia: Etiology, Pathophysiology and Management - A Review, *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 69 (6):2640-2646.
- Fell, M.J. Marshall, K.M. Williams, J. Neill, J.C. (2004). Effects of the Atypical Antipsychotic Olanzapine on Reproductive Function and Weight Gain in Female Rats. *Journal of Psychopharmacology*, 18(2), 149–155.
- Food and Drug Administration, (2005). *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Adult Healthy Volunteer*. Rockville, MD: Food and Drug Administration.
- Gaweł, S. Wardas, M. Niedworok, E. Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker, *Wiadomości lekarskie*; 57(9-10): 453-5.
- Geddes, J. Freemantle, N. Harrison, P. Bebbington, P. (2000). Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia: systematic overview and meta-regression analysis, *British Medical Journal*, 321:1371–6.
- Gülseren, L. Erol, A. (2000). Şizofrenide İlaç Sağaltımı, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 10:213-227.
- Hall, J. (2013). Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji, Nobel Tıp, 973-986.
- Hall, E. Burt, V.K. (2012). Male fertility: psychiatric considerations. *Fertility and Sterility*, 97(2), 434–439.
- Hanssens, L. L'Italien, G. Loze, J. Marcus, R.N. Pans, M. Kerselaers, W. (2008). The effect of antipsychotic medication on sexual function and serum prolactin levels in community-treated schizophrenic patients: results from the Schizophrenia Trial of Aripiprazole (STAR) study, *BMC Psychiatry*, 8:95.
- Heffner, L. Schust, D.J. (2010). Gross anatomy of the male reproductive tract, *The Reproductive System at a Glance*, 24-25, Oxford: Wiley-Blackwell.
- Holloway, F.A. Peirce, J.M. (1998). Antipsychotic drug side-effects, *Comprehensive Clinical Psychology*, Elsevier.
- Hsieh, Y.Y. Sun, Y.L. Chang, C.C. Lee, Y.S. Tsai, H.D. Lin, C.S. (2002). Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(3), 127–131.
- Huang, D. Liu, S. (2017). Oxidative Stress and Schizophrenia, *Journal of Psychiatry and Brain Science*, 2(2); 4.

- Kandeel, F.R. (2007). Anatomy of the male reproductive tract, *Male Reproductive Dysfunction: Pathophysiology and Treatment*, CRC Press, 9-19.
- Karakuş, G. Tamam, L. Zengin, M. (2009). Şizofreni hastalarında antipsikotik kullanımına bağlı hiperprolaktinemi ve kemik metabolizma bozuklukları, *Anadolu Psikiyatri Derg*; 10:336-342.
- Khan, F.Z. Sultana, S.P. Akhter, N. Md. Mosaddek, A.S. (2018). Effect of Olanzapine and Risperidone on Oxidative Stress in Schizophrenia Patients, *International Biological and Biomedical Journal*, 4(2), 89-97.
- Konarzewska, B. Wołczyński, S. Szulc, A. Galińska, B. Popławska, R. Waszkiewicz, N. (2009). Effect of risperidone and olanzapine on reproductive hormones, psychopathology and sexual functioning in male patients with schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, 34(1), 129–139.
- Kulkarni, S.N. Kulkarni, N.V. (2015). Study of semen parameters in male partners among infertile couples, *International Journal Of Reproduction, Contraception, Obstetrics And Gynecology*, 4(4):1016-1019.
- Kumar, S.B. Dada, R. Gupta, N.P. (2018). Environmental Toxicants–Induced Male Reproductive Toxicity: Role of Oxidative Stress, *Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health*, Elsevier, 305-322.
- Lehman, A.F. Lieberman, J.A. Dixon, L.B. McGlashan, T.H. Miller, A.L. Perkins, D.O. Kreyenbuhl, J. American Psychiatric Association; Steering Committee on Practice Guidelines, (2010), Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia, second edition.
- Lowe, J.S. Anderson P.G. (2015). Male Reproductive System, *Stevens & Lowe's Human Histology* (Fourth Edition), 319-336.
- Mauri, M.C. Paletta, S. Maffini, M. Colasanti, A. Dragogna, F. Di Pace, C. Altamura A.C. (2014). Clinical Pharmacology Of Atypical Antipsychotics: An Update, *EXCLI Journal*, 13:1163-1191.
- Mazzilli, F. Rossi, T. Marchesini, M. Ronconi, C. Dondero, F. (1994). Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertility and Sterility*, 62(4), 862–868.
- Meltzer, H.Y. (2002). Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs *Neuropsychopharmacology, 5th Generation of Progress*, 6(58), 819-831.

- Mercan, U. (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1-2):91-96.
- Meyer, N. MacCabe, J. (2016). Schizophrenia, *Medicine: Psychiatric Disorders*, 44(11):649-653.
- Michael, B. Yano, B. Perry, R. Morton, D. Roome, N. Johnson, J. Schafer, K. (2007). Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices, *Toxicologic Pathology*, 35:742–750.
- Muench, J. Hamer, A.M. (2010). Adverse Effects of Antipsychotic Medications, *American Family Physician*, 81(5):617-622.
- O'Donnell, L. Stanton, P. Kretser, D. (2017). “Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis”, www.endotext.org (Erişim tarihi: 10.01.2019).
- Oliveira, J.B. Massaro, F.C. Baruffi, R.L. Mauri, A.L. Petersen, C.G. Silva, L.F. Vagnini, L.D. Franco, J.G. Jr., (2010)., Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage, *Fertility and Sterility*; 94(5):1937-40.
- Öncü, F. Habib, A. Ceylan, M.E. Ceylan, N. Yazan, B. (1998). Atipik Nöroleptikler, *Düşünen Adam*, 11(4): 21-29.
- Papa, S. Skulachev, V.P. (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging, *Molecular and Cellular Biochemistry*; 174(1-2):305-19.
- Parlaktas, B.S. Ozyurt, B. Ozyurt, H. Tunc, A.T. Akbas, A. (2008). Levels of oxidative stress parameters and the protective effects of melatonin in psychosis model rat testis, *Asian Journal of Andrology*; 10 (2):259–265.
- Pompili, M. Baldessarini, R.J. Forte. A. Erbutto, D. Serafini, G. Fiorillo, A. Amore, M. Girardi, P. (2016). Do Atypical Antipsychotics Have Antis suicidal Effects? A Hypothesis-Generating Overview, *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1700.
- Ranjekar, P.K. Hinge, A. Hegde, M.V. Ghate, M. Kale, A. Sitasawad, S. Wagh, U.V. Debsikdar, V.B. Mahadik, S.P. (2003). Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Research*, 121(2), 109–122.
- Rockett, J.C. Kim, S.J. (2005). Biomarkers of reproductive toxicity, *Cancer Biomarkers*, 1(1):93-108.

- Sağlık Bakanlığı. (2006). Türkiye hastalık yükü çalışması 2004. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Hıfzısıhha Mektebi Müdürlüğü, Ankara.
- Sarısoy, G. Yazıcı, N. (2011). Olanzapin ve Mirtazapin'in Birlikte Kullanımıyla İlişkili Periferik Ödem: Olgu Sunumu, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 21(3):249-52.
- Seeman, P. (2002), Atypical Antipsychotics: Mechanism of Action, *Canadian Journal of Psychiatry*, 47:27–38 .
- Semet, M. Paci, M. Saïas-Magnan, J. Metzler-Guillemain, C. Boissier, R. Lejeune, H. Perrin, J. (2017). The impact of drugs on male fertility: a review, *Andrology*, 5, 640–663.
- Sikka, S.C. (1996). Oxidative Stress And Role Of Antioxidants in Normal And Abnormal Sperm Function, *Frontiers in Bioscience*, 1,78-86.
- Sidorkiewicz, I. Zareba, K. Wołczynski, S. Czerniecki, J. (2017). Endocrine-disrupting chemicals-Mechanisms of action on male reproductive system, *Toxicology and Industrial Health*, 33(7) 601–609.
- Simon, L. Carrell, D.T. (2013). Sperm DNA damage measured by comet assay, *Methods in Molecular Biology*, 927:137-46.
- Somani, S.M. Frank, S. Rybaks, L.P. (1995). Responses of Antioxidant System to Acute and Trained Exercise in Rat Heart Subcellular Fractions, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 51,(4),627-634.
- Sousa, M. Ferreira, C. Rabaca, A. Sa, R. (2017). Assessing Male Reproductive Toxicity during Drug Development, *Andrology*, 6: 185.
- Stevens, L. Rodin, I. (2011). Antipsychotic drugs, *Psychiatry* (Second Edition), Elsevier.
- Summakoğlu, D. Ertuğrul, B. (2018). Şizofreni Ve Tedavisi, *Lectio Scientific Journal of Health and Natural Sciences*, 2(1):43- 61.
- Takeuchi, K. Takayama, S. Hashimoto, E. Itayama, M. Amagase, K. Izuhara, C. (2014). Effect of rebamipide on gastric bleeding and ulcerogenic responses induced by aspirin plus clopidogrel under stimulation of acid secretion in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 29 (4), 37-46.
- Tasdemir, I. Tasdemir, M. Tavukcuoglu, S. Kahraman, S. Biberoglu, K. (1997). Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Human Reproduction*, 12(6), 1214–1217.
- Terry, Jr A.V. Warner, S.E. Vandenhuerk, L. Pillai, A. Mahadik, S.P. Zhang, G. Bartlett, M.G. (2008). Negative effects of chronic oral chlorpromazine and olanzapine

- treatment on the performance of tasks designed to assess spatial learning and working memory in rats *Neuroscience*, 156: 1005–1016.
- Togar, B. Turkez, H. Tatar, A. Kirkpınar, İ. Hacimuftuoglu, A. Geyikoglu, F. Keles, M.S. Dirican, E. (2011). The genotoxic potentials of some atypical antipsychotic drugs on human lymphocytes, *Toxicology and Industrial Health*, 28(4) 327–333.
- Tohen, M. Vieta, E. Calabrese, J. Ketter, T.A. Sachs, G. Bowden, C. Mitchell, P.B. Centorrino, F. Risser, R. Baker, R.W. Evans, A.R. Beymer, K. Dube, S. Tollefson, G.D. Breier, A. (2003). Efficacy of Olanzapine and Olanzapine-Fluoxetine Combination in the Treatment of Bipolar I Depression, *Archives Of General Psychiatry*, 60:1079-1088.
- Toor, J.S. Sikka, S.C. (2017). Developmental and Reproductive Disorders-Role of Endocrine Disruptors in Testicular Toxicity, *Reproductive and Developmental Toxicology*, Academic Press, Elsevier, 1111-112.
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14(3), 243–258.
- Trivedi, P.P. Kushwaha, S. Tripathi, D.N. Jena, G.B. (2010). Evaluation of male germ cell toxicity in rats: Correlation between sperm head morphology and sperm comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703(2), 115–121.
- Turner, T.T. Lysiak, J.J. (2008). Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction. *Journal of Andrology*, 29(5), 488–498.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (2018). *Testicular Toxicity: Evaluation During Drug Development Guidance for Industry*, FDA.
- U.S. Food and Drug Administration. (2009). (FDA, ZYPREXA® Product Label)
- Üçok, A. Gaebel, W. (2008). Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview, *World Psychiatry*, 7:58-62.
- Vallianatou, K. (2016). Antipsychotics, *Medicine*, 44(12), 748-752.
- Van der Horst, G. Maree, L. Kotze, S.H., O'Riain, M.J. (2011). Sperm structure and motility in the eusocial naked mole-rat, *Heterocephalus glaber*: a case of degenerative orthogenesis in the absence of sperm competition?. *BMC Evolutionary Biology*. 5(11), 351.

- Vander Borcht, M. Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology, *Clinical Biochemistry*, 1-9.
- Vidal, J.D. Whitney, K.M. (2014). Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity, *Spermatogenesis*, 4(2):e979099.
- WHO. Fact Sheets, 2018, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia> (Erişim tarihi: 12/12/2018).
- WHO. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. İsviçre: WHO Press, 13-63.
- Wirshing, D.A. Pierre, J.M. Marder, S.R. Saunders, C.S. Wirshing, W.C. (2002), Sexual side effects of novel antipsychotic medications, *Schizophrenia Research*, 56(1-2), 25–30.
- Woldemeskel, M. (2017), Toxicologic Pathology of the Reproductive System, *Reproductive and Developmental Toxicology*, 1209-1241.
- Yanik, T. Ak, M. Sezlev, D. Kursungoz, C. Kurt, B. Akay, O. Akarsu, S. (2012). Determination of Peripheral Gonadal Hormones after the Treatment of Atypical Antipsychotics, Olanzapine and Risperidone in Wistar Male Rats, *The Endocrine Society's 94th Annual Meeting and Expo*, June 23–26, Houston, TX.
- Yavuz, R. (2008). Şizofreni, *Türkiye’de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi*, 62:49-58.
- Zini, A. Libman, J. (2006). Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction, *Canadian Medical Association journal*; 175(5): 495–500.
- http-1:** <https://psychopharmacologyinstitute.com/antipsychotics/first-generation-antipsychotics/> (Erişim Tarihi: 09.05.2018)