

**LEVETİRASETAMIN ERKEK SIÇANLARDA
REPRODUKTİF TOKSİSİTESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Merve Baysal

Yüksek Lisans Tezi

**LEVETİRASETAMIN ERKEK
SIÇANLARDA REPRODUKTİF
TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Merve Baysal

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Eskişehir, Temmuz 2016

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Özlem ATLI

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1505S412).

Jüri ve Enstitü Onayı

Merve Baysal'ın "Levetirasetamın Erkek Sıçanlarda Reprodüktif Toksisitesinin Değerlendirilmesi" başlıklı, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 21.07.2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Yrd. Doç. Dr. Özlem ATLI Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Başar SIRMAGÜL Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	
Üye	Doç. Dr. Bülent ERGUN Anadolu Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
02.08.2016 tarih ve ...31..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Dilek AK

ÖNSÖZ

İnfertilite günümüzde önemli bir halk sağlığı problemi olarak kabul edilmektedir. Çevresel kirleticiler, ilaçlar, kozmetik ürünler, kimyasal tarım maddeleri ve patojenlerin infertiliteye neden olduğu bilinmektedir. Özellikle tekrarlayan dozlarda kullanılan ilaçlar direkt olarak gonadları ya da indirekt olarak hipofiz gonadotropinlerini etkileyerek infertiliteye neden olabilmektedir. İkinci kuşak antiepileptik bir ilaç olan levetirasetam, nörolojik bir hastalık olan epilepsi tedavisinde sıklıkla ve uzun süreli olarak kullanılmaktadır. Bu noktadan hareketle bu tez çalışması kapsamında levetirasetamın tekrarlayan dozlarda sıçanlara uygulanması sonrasında erkek reproduktif sistemi üzerine olası toksik etkileri değerlendirilmiştir.

Tez çalışmam boyunca her daim maddi manevi yanımda olan, değerli fikir ve yardımlarını esirgemeyen sevgili danışmanım Yrd. Doç. Dr. Özlem ATLI'ya, bir danışman kadar üzerimde emeği olan sevgili hocam Doç. Dr. Sinem ILGIN'a, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı sevgili hocam Doç. Dr. Bülent ERGUN'a desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Burak KARADUMAN, Büşra KORKUT, Gözde GÖRMÜŞ ve Cankız Mina ARDIÇ'a; öğrenci işçileri sevgili İlker RAHAT ve Yakup SEVEN'e yardımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi'nde görevli tüm personele yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar imkanlarından rahatlıkla yararlanmamı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili Doç. Dr. Erol ŞENER'e ve Yrd. Doç. Dr. Arın Gül DAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç boyunca ve araştırma görevlisi olduğumuz günden beri hep yanımda olan, desteğini esirgemeyen, canım arkadaşım Elif KAYA TİLKİ'ye; sevgili arkadaşlarım Sakine ATİLA KARACA, Selin ENGÜR ve Güçlü ÖZARDA'ya ve burada ismini saymadığım tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayattaki en değerlilerim canım ailem; anneme, babama, ablalarıma, abime, neşe kaynaklarım biricik yeğenlerime ve enişteme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

LEVETİRASETAMIN ERKEK SIÇANLARDA REPRODUKTİF TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

İlaçlar ile indüklenen infertilite dahil reproduktif toksik etkiler günümüzde önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle ilaçların kadın ve erkek reproduktif sistem üzerine toksik etkilerinin belirlenmesi ve bu etkilerin fertilitate yansımalarının değerlendirilmesi önemli araştırma alanlarından biri olarak kabul görmektedir. Levetirasetam (LEV) da epilepsi tedavisinde her yaş grubunda güvenilir etki profili nedeni ile sıklıkla tercih edilen bir ilaçtır. Reprodüktif yaşlarda sıklıkla kullanılan bu ilacın erkek reproduktif sistem üzerine toksik etkilerinin değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmadığı dikkat çekmektedir. Bu noktadan hareketle bu tez çalışması kapsamında LEV'in erkek reproduktif sistem üzerine olası toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda levetirasetam 50, 150 ve 300 mg/kg dozlarda oral olarak 70 gün süre ile 12 haftalık erkek siçanlara uygulanmıştır. Süre sonunda gruplara ait vücut, testis ve epididimis ağırlıkları, bilgisayar destekli sperm analiz sistemi ile sperm konsantrasyonu, motilitesi, morfolojisi ve Comet yöntemi ile sperm DNA hasarı belirlenmiş, testis dokuları histopatolojik olarak incelenmiştir. Olası reproduktif toksisitede hormonal durumun etkisinin belirlenmesi amacı ile plazma testosteron, folikül stimule edici hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH) seviyeleri ELISA yöntemi ile, oksidatif stresin etkisinin belirlenmesi amacı ile testis dokusundaki glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve malondialdehit (MDA) seviyeleri ise kolorimetrik yöntemler ile tespit edilmiştir. Sonuçlara göre LEV uygulanan gruplarda sperm konsantrasyonu, motilitesi ve normal sperm morfolojisinin doza bağımlı olarak azaldığı belirlenmiştir. 150 ve 300 mg/kg LEV uygulanan gruplarda sperm DNA hatalarının arttığı dikkat çekmiştir. Özellikle 300 mg/kg levetirasetam uygulanan grupta testiküler hasar bulguları izlenmiştir. Plazma FSH, LH ve testosteron seviyeleri 300 mg/kg LEV uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Testis dokusunda SOD, GSH ve KAT seviyeleri levetirasetam uygulanan gruplarda anlamlı olarak azalmış ve MDA seviyeleri ise 150 ve 300 mg/kg LEV uygulanan gruplarda anlamlı olarak artmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda LEV uygulaması ile sperm kalitesinin azaldığı belirlenmiş ve hormonal seviyedeki değişimlerin ve testis dokusunda var olan oksidatif stresin reproduktif toksik etkiye katkı sağlayabileceği ileri sürülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Levetirasetam, reproduktif toksisite, oksidatif stres, Comet yöntemi

EVALUTION OF REPRODUCTIVE TOXICITY OF LEVETIRACETAM IN MALE RATS

ABSTRACT

Today, drug-induced reproductive toxic effects including infertility has emerged as a major health problem. For this reason, determining the toxic effects of drugs on male and female reproductive system and evaluating the reflection of these effects on infertility are accepted as important research fields. Levetiracetam (LEV) is a drug commonly used in epilepsy treatment because of its safe profile in all age groups. It is remarkable that there are no studies evaluating the toxic effects of this drug, which is commonly used during reproductive ages, on male reproductive system. From this point of view, our aim was to evaluate the possible toxic effects of LEV on male reproductive system in this study. For this purpose, LEV was administered to 12 weeks old male rats orally in 50, 150 and 300 mg/kg for 70 consecutive days. At the end of this period, alterations of body and organ weights were calculated, sperm concentration, motility and morphology were investigated by a computer assisted sperm analysis system, sperm DNA damage was determined by Comet assay and histopathological examination of testis tissue was carried out. Plasma testosterone, follicle stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH) levels were measured by ELISAs to determine the effects of hormonal status and Glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) levels in testes tissue were measured by colorimetric assays to determine the role of oxidative status on the potential toxicity. According to the results, sperm parameters were shown to be decreased with LEV treatment in a dose-dependent manner. LEV induced significant DNA damage in 150 and 300 mg/kg LEV-administered groups. Histopathology of the testis showed that LEV especially resulted in testicular injury in 300 mg/kg LEV-administered group. Plasma testosterone, FSH, and LH levels were significantly decreased in 300 mg/kg LEV-administered group when compared with controls. SOD, CAT ve GSH levels were significantly decreased in all experimental groups while MDA levels were significantly increased in 150 and 300 mg/kg LEV-administered groups when compared with controls. According to these results, it was determined that LEV administration decreased sperm quality and it was alleged that hormonal alteration and oxidative stress in testis tissue are the potential contributors of reproductive toxic effects.

Keywords: Levetiracetam, reproductive toxicity, oxidative stress, Comet assay

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Epilepsi ve Antiepileptik İlaçlar	2
Levetirasetam	3
<i>Genel bilgi</i>	3
<i>Levetirasetamın etki mekanizması</i>	3
<i>Levetirasetamın farmakokinetik özellikleri</i>	3
<i>Levetirasetamın endikasyonları ve kullanım dozları</i>	4
<i>Levetirasetamın advers etkileri</i>	4
<i>Levetirasetam doz aşımı</i>	4
Erkek Üreme Sistemi	6
<i>Testisler</i>	6
<i>Epididimis</i>	7
<i>Vas deferens (Ductus deferens)</i>	7
<i>Ejekülasyon kanalları</i>	7
<i>Üretra</i>	7
<i>Seminal vezikül</i>	7
<i>Prostat bezi</i>	8
<i>Bulboüretral bezler</i>	8
<i>Skrotum</i>	8
<i>Penis</i>	8
<i>Semen</i>	8

<i>Spermatogenez süreci</i>	8
<i>Spermatogenez sürecini etkileyen hormonlar</i>	9
<i>Spermin yapısı</i>	10
Reproduktif Toksisite	11
Reproduktif Toksisitenin Biyogöstergeleri	12
<i>Oksidatif stress ve DNA hasarı</i>	14
Epilepsi, Antiepileptik İlaçlar ve Reprodüktif Toksisite İlişkisi	15
<i>Antiepileptik ilaçlar ile yapılmış reprodüktif toksisite çalışmaları</i>	15
GEREÇLER	18
Kullanılan hayvanlar	18
Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Madde ve Kitler	18
Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Aletler	19
YÖNTEMLER	20
Deney Hayvanlarına Test Maddesinin Uygulanması	20
Deney Hayvanlarından Numune Toplanması	20
Sperm Konsantrasyonunun ve Motilitesinin Değerlendirilmesi	20
Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi	21
Spermde Tek Hücre Jel Elektroföresi (SCGE/Comet) Yöntemi	21
Biyokimyasal Analiz	21
Histopatolojik İnceleme	22
<i>Doku örneklerinin tespiti</i>	22
<i>Doku takip işlemleri</i>	22
İstatistiksel Analiz	22
BULGULAR ve TARTIŞMA	23
Bulgular	23
<i>Vücut ağırlıklarının değişimi ve bağıl organ ağırlıkları</i>	23
<i>Sperm parametreleri</i>	23
<i>Sperm konsantrasyonu ve motilitesi</i>	23
<i>Sperm morfolojisi</i>	24
<i>Spermde tek hücre jel elektroföresi (SCGE/Comet) yöntemi bulguları</i>	26
<i>Biyokimyasal analiz bulguları</i>	27
<i>Plazma hormon seviyeleri</i>	27
<i>FSH seviyeleri</i>	27

LH seviyeleri	27
Testosteron seviyeleri	27
<i>Testis dokusunda oksidatif stres parametreleri</i>	28
Testis dokusunda süperoksit dismutaz aktivitesi	28
Testis dokusunda katalaz seviyeleri	28
Testis dokusunda glutatyon seviyeleri	28
Testis dokusunda malondialdehit seviyeleri	28
<i>Histopatolojik inceleme bulguları</i>	29
Tartışma	32
SONUÇ ve ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1	Literatürdeki Levetirasetam Aşırı Doz Vakalarının Özeti
	5
Çizelge 2	Erkek Üreme Sistemi Yapı ve Fonksiyonları
	6
Çizelge 3	<i>İn vivo</i> Erkek Reprodüktif Sistem Toksisitesi Çalışmalarında İncelenmesi Gereken Parametreler
	14
Çizelge 4	Grupların Ağırlık Değişimleri, Testis ve Epididimis Ağırlıkları
	23
Çizelge 5	Grupların Sperm Konsantrasyonları ve Sperm Motiliteleri
	23
Çizelge 6	Grupların Sperm Morfoloji Değerlendirmesi Bulguları
	24
Çizelge 7	Grupların Plazma FSH, LH ve Testosteron Seviyeleri
	28
Çizelge 8	Testis Dokusunda SOD Aktivitesi, KAT, GSH ve MDA Seviyeleri
	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1	Spermatogenez Süreci 9
Şekil 2	Spermatogenez Sürecinin Hormonal Kontrolü 10
Şekil 3	Sperm Yapısı 11
Şekil 4	Erkek Üreme Sistemi Toksisitesi İçin Olası Hedef Bölgeleri 12
Şekil 5	Bazı Antiepileptik İlaçların Hipotalamus-Hipofiz-Gonad Ekseni Üzerine Etkileri 17
Şekil 6	Sperm Morfolojisi 25
Şekil 7	SCGE/Comet Yöntemi Sonucunda Sperm DNA'sında Tespit Edilen Hasarın Florosans Mikroskopik Görüntüsü 26
Şekil 8	SCGE/Comet Analizi Sonuçları Grafiği 27
Şekil 9	Kontrol ve Deney Gruplarındaki Sıçanlarda Seminifer Tübüller 30
Şekil 10	Kontrol ve Deney Grup Sıçanlarında Germinal Epitelin Detaylı Yapısı 31

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

·OH	: Hidroksil radikali
1/2 O ₂	: Singlet oksijen
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
O ₂ ⁻	: Süperoksit
α ₂ δ-1	: alfa-2-delta-1 reseptör alt ünitesi
ABP	: Androjen bağlayıcı protein
AEİ	: Antiepileptik ilaçlar
DHEAS	: Dihidroepiandrosteron sülfat
DHT	: Dihidrottestosteron
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
FB	: Fenobarbital
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FNT	: Fenitoin
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
GABA	: Gamma-aminobütirik asit
GBP	: Gabapentin
GnRH	: Gonadotropin salıverici hormon
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
KAT	: Katalaz
KBZ	: Karbamazepin
LEV	: Levetirasetam
LH	: Luteinleştirici hormon
LTJ	: Lamotrijin
MDA	: Malondialdehit
NMDA	: N-metil-D-aspartat
OECD	: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
OKS	: Okskarbazepin
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
PRM	: Primidon
RNS	: Reaktif nitrojen türleri

ROS	: Reaktif oksijen türleri
SCA®	: Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Sistemi
SCGE	: Tek hücreli jel elektroforezi
SHGB	: Seks hormonu bağlayıcı globulin
SOD	: Süperoksit dismutaz
SV2	: Sinaptik vezikül protein 2
TPM	: Topiramet
TUNEL	: Terminal deoksinnükleotid transferaz nick-end abelinq testi
US EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
VGB	: Vigabatrinq
VPA	: Valproik asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ZNS	: Zonisamid

GİRİŞ ve AMAÇ

Epilepsi dünyada yaklaşık 50 milyon insanı etkileyen yaygın bir nörolojik hastalıktır (http-1). Epilepsi hastalarında gerek hastalık, gerek ise tedavide kullanılan ilaçlar ile reproduktif sistem ile ilişkili hastalıklar gözlenmektedir. Bazı antiepileptik ilaçların erkeklerde reproduktif fonksiyonların regülasyonunda rol oynayan hormon seviyelerinde değişmelere ve semen kalitesinde azalmalara neden olduğu gösterilmiştir (Verrotti ve ark., 2011; Svalheim ve ark., 2015). Bu noktada reproduktif gelişme ve olgunlaşma süreci ile reproduktif yaşlarda sıklıkla kullanılan antiepileptik ilaçlar ile kronik tedavide teratojenik ve reproduktif toksik etkilerin belirlenmesi oldukça önemlidir (Kozłowski ve ark., 2015).

Son yıllarda çevresel kirleticiler, endüstriyel kimyasallar, ilaçlar gibi kimyasallara artan maruziyetler sonucunda reproduktif toksik etkilerde artış gözlenmiştir (Hoyer, 2001) ve bu reproduktif toksik etkiler arasında infertilite ilgi odağı haline gelmiştir (Liu ve ark., 2012). Epidemiyolojik çalışmalara göre infertilite vakalarının yarısına erkek kaynaklı faktörlerin sebep olduğu tespit edilmiştir. İlaçlar da semen kalitesini azaltarak erkeklerde infertiliteye neden olabilecek etkenler arasında sayılmaktadır (Liu ve ark., 2012; McPhee, 2000).

Levetirasetam (LEV), çocukluk, ergenlik, genç yetişkinlik ve yetişkinlik dönemi dahil olmak üzere erkeklerde epilepsi hastalığının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Lyseng-Williamson, 2011a; Kwong ve ark., 2012). Bir çok epilepsi sendromuna karşı ilk tercih edilen ya da kombine ilaç tedavi protokollerinde yer alan LEV'in erkek reproduktif sistem toksisitesi hakkında yeterli veri bulunmamakta ve ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (http-2; Svalheim ve ark., 2015).

Bu sebeple, bu tez çalışması kapsamında yeni nesil antiepileptik ilaçlardan biri olan LEV'in erkek reproduktif sistemi üzerine olası toksik etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, tekrarlayan farmakolojik dozlarda sıçanlara LEV uygulaması ile reproduktif toksisitenin değerlendirilmesinde kullanılan sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi, sperm DNA hasarı belirlenmiş ve testis dokusu histopatolojik olarak incelenmiştir. Ayrıca olası toksisitede hormonal durumun değerlendirilmesi amacı ile testosteron, folikül stimüle edici hormon (FSH) ve lutinleştirici hormon (LH) seviyeleri, oksidatif stresin rolünün aydınlatılması amacı ile testis dokusunda glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve malondialdehit (MDA) seviyeleri tespit edilmiştir.

KAYNAK BİLGİSİ

Epilepsi ve Antiepileptik İlaçlar

Epilepsi; santral sinir sisteminin kortikal veya subkortikal bölgelerinde yer alan nöron gruplarının ani, anormal ve hipersenkron deşarjları sonucu ortaya çıkan ve genellikle tekrarlayıcı nitelikte olan klinik tablodur (Genç ve ark., 2013). Dünya genelinde yaklaşık 50 milyon epilepsi hastasının olması, epilepsiyi en yaygın nörolojik hastalıklardan biri yapmaktadır. Epilepsi hastalarının (devam eden nöbetleri olan veya tedaviye ihtiyaç duyan) genel nüfusa oranının 1000 kişide 4-10 kişi olduğu tahmin edilmektedir. Ancak düşük ve orta gelirli ülkelerdeki bazı çalışmalar bu oranın 1000 kişide 7-14 kişi olduğunu göstermektedir. Epilepsi hastalarının yaklaşık %80'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşadığı ifade edilmektedir (http-1).

Epilepsinin en yaygın tipi idiyopatik yani nedeni bilinmeyen epilepsidir. Nedeni bilinen epilepsi, sekonder veya semptomatik epilepsi olarak adlandırılmaktadır. Epilepsiye neden olabilecek bazı durumlar arasında prenatal ya da perinatal dönemlerdeki hasarlar (doğum sırasında oksijensiz kalma veya travma, düşük doğum ağırlığı), konjenital ya da genetik nedenli beyin malformasyonları, şiddetli kafa travması, beyine giden oksijen miktarını kısıtlayan inme, menenjit, ensefalit, nörosistisierkoz gibi enfeksiyonlar, bazı genetik sendromlar ve beyin tümörü sayılmaktadır (http-1).

Epilepsi tedavisi, uzun yıllar ve hatta hastaların birçoğunda yaşam boyu sürecek bir tedavidir. Antiepileptik ilaçlar (AEİ) epilepsinin semptomatik tedavisi için kullanılmaktadır. AEİ'nin epilepsiyi oluşturan temel mekanizmaları engelleyemediği, sadece kullanıldıkları süre içinde nöbetleri azaltabildikleri veya ortadan kaldırabildikleri bilinmektedir (Vanlı Yavuz ve Baykan, 2010). Tedavide kullanılacak ilaçların seçimi, büyük ölçüde etkinlik, güvenilirlik ve hekimin tecrübelerine göre yapılmaktadır (Faught ve ark., 2015). Epilepsi tedavisine, hastaların yaklaşık %70'i yanıt vermektedir (http-1).

Modern epilepsi tedavisi bugün de kullanımı olan potasyum bromür ile başlamıştır. Fenobarbitalin sentezlenmesine (1911) kadar tek ajan olarak kullanılmıştır. Son yirmi yıldır gerek yaygın epilepsi türleri için gerek ise daha nadir sendromlar için en az 14 ilaç lisans almıştır (Brodie ve Sills, 2011).

Antiepileptik ilaçlar Avrupa'da piyasaya girdikleri yıllara göre 3 kuşak halinde sınıflandırılmaktadır. İlk kuşak ilaçlar bromür, fenobarbital (FB), fenitoin (FNT), pirimidon (PRM), sultiam, karbamazepin (KBZ) ve valproat (VPA)'tır. 1990'larla beraber kullanılmaya başlanan vigabatrin (VGB), okskarbazepin (OKS), lamotrijin (LTJ), gabapentin (GBP), felbamat, topiramat (TPM), tiagabin, levetirasetam (LEV), pregabalin, zonisamid (ZNS), stiripentol ve rufinamid ise ikinci kuşak antiepileptikleri oluşturmaktadır. Oldukça yeni ajanlar olan eslikarbazepin asetat, lakozamid ve retigabin ise üçüncü kuşak antiepileptik ilaçlardır (Reimers ve Brodtkorb, 2012; Patsalos, 2013; Bialer, 2012; Johannessen Landmark ve Patsalos, 2010).

Levetirasetam

Genel bilgi

LEV ((S)- α -etil-2-okso-1-pirolidin asetamid), yeni nesil antiepileptik ilaçlardan biridir (Patsalos, 2000; Deshpande ve Delorenzo, 2014). 1999 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı alan LEV, parsiyel ve jeneralize epilepside sıkça reçete edilen ilaçlardandır (Deshpande ve Delorenzo, 2014).

Levetirasetamın etki mekanizması

Yapılan *in vivo* çalışmalarda LEV'in sıçan beyinde doyurulabilir, reversibl ve stereospesifik olarak bağlanma bölgelerinin olduğu ve bu bölgelere diğer AEİ'nin ya da nöroaktif maddelerin afinite göstermedikleri tespit edilmiştir. Epilepsi odyojenik fare modelinde LEV analoglarının nöbet önleme ve beyindeki bu bölgelere bağlanma afiniteleri arasında güçlü bir korelasyon tespit edilmesi, bu bölgenin nöbet önlemedeki rolünü ortaya koymuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu bağlanma bölgesinin sinaptik vezikül proteini 2 (SV2) olduğu tespit edilmiştir (Lynch ve ark., 2004).

SV2, tüm sinaptik veziküllerde bulunan SV2A, SV2B ve SV2C olmak üzere üç izoformu olan bir integral membran proteindir. SV2A santral sinir sisteminde oldukça yaygın bulunmasının yanında endokrin hücrelerde de bulunan, SV2'nin en yaygın formudur (Lynch ve ark., 2004; Deshpande ve Delorenzo, 2014). Lynch ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada LEV'in SV2A'ya afinitesinin olduğu belirlenmiştir.

SV2 proteinleri Ca^{+2} ve ATP gibi vezikül içeriklerinin taşınmasında görev yapmaktadır. SV2A'nın sinaptik veziküllerde Ca^{+2} regülasyonunda yer alan sinaptotagmin proteini ile etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir. SV2A susturulmuş farelerde nöbet gelişmesi SV2A ligandlarının nöbetleri önlemede etkili olacağını göstermektedir (Deshpande ve Delorenzo, 2014).

Ayrıca LEV selektif olarak N-tipi kalsiyum kanallarının inhibisyonu ile nöronlardan kalsiyum salıverilmesini, GABA ve glisin akımlarının inhibisyonunu ve nöronlar arası aşırı, eş zamanlı aktiviteyi önleyerek de antiepileptik etki göstermektedir. Diğer AEİ'den farklı olarak, LEV GABAerjik etkinliğin potansiyalizasyonuna, L-, P- ve T-tipi kalsiyum veya sodyum kanal blokasyonuna neden olmamaktadır (Lyseng-Williamson, 2011b; Lukyanetz ve ark., 2002).

Levetirasetamın farmakokinetik özellikleri

LEV oral olarak alındıktan sonra hızla absorbe edilmektedir. Biyoyararlanımı %95'ten fazladır. Gıdalar ile birlikte alındığında absorpsiyon miktarı değişmemekte sadece absorpsiyon hızı azalmaktadır. Bu nedenle hastalarda LEV aç ya da tok karnına kullanılabilir. Plazma proteinlerine %10'dan az bağlanmaktadır. Kan beyin bariyerini kolayca geçmekte ve beyin dokusuna dağılım göstermektedir. LEV'in az bir kısmı metabolize olmaktadır. Majör atılımı (%93) böbreklerden idrar yoluyla gerçekleşmektedir. İdrarla atılan kısmın %66'sını LEV

%27'sini ise inaktif metabolitler (%24 L057, %3 diğer minör metabolitler) oluşturmaktadır. Ana metabolit olan L057'nin metabolizması non-hepatiktir.

Plazma eliminasyon yarı ömrü sağlıklı gönüllülerde ve yetişkin hastalarda 6-8 saat, çocuk hastalarda 5-7 saat ve sağlıklı yaşlı gönüllülerde 10-11 saattir. İlaç etkileşimi potansiyeli düşüktür. Diğer AEİ (FNT, FB, PRM, KBZ, VPA, LTJ, GBP, felbamat), digoksin, varfarin ve oral kontraseptif ilaçlarla etkileşimi bulunmamaktadır. (Patsalos, 2000; Patsalos, 2004; Gambardella ve ark., 2008; Lyseng-Williamson, 2011a; Lyseng-Williamson, 2011b).

Levetirasetamın endikasyonları ve kullanım dozları

LEV, parsiyel başlangıçlı nöbetlerde tek başına ya da diğer antiepileptik ilaçlarla kombine olarak ve juvenil myoklonik epilepside görülen myoklonik nöbetlerde, idiyopatik jeneralize epilepside görülen primer jeneralize tonik-klonik nöbetlerde kullanılmaktadır (Lyseng-Williamson, 2011a).

4 yaş ve üstü çocuklar ile yetişkinlerde parsiyel başlangıçlı nöbetlerin, yetişkinlerde primer jeneralize tonik-klonik ve myoklonik nöbetlerin, 12 yaş ve üstü adolesanlarda juvenil myoklonik epilepsinin, 6 yaş ve üstü çocuklarda idiyopatik jeneralize epilepside yardımcı ilaç olarak kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır. Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından ise ≥ 1 ay hastalarda jeneralize olan veya jeneralize olmayan parsiyel başlangıçlı nöbetlerin, ≥ 12 yaş hastalarda juvenil myoklonik epilepsinin ve idiyopatik jeneralize epilepsinin tedavisi için onaylanmıştır (Verrotti ve ark., 2015).

Sekonder jeneralizasyon olan veya olmayan parsiyel başlangıçlı nöbetlerde kullanım dozu günde iki kez 500 mg şeklindedir. Maksimum günlük doz 3000 mg'dır. Kombine tedavilerde ve tek başına kullanımlarında aynı dozlar tercih edilmektedir (Wright ve ark., 2013; Harden, 2001).

Hastaların böbrek fonksiyonlarına göre doz ayarlaması yapılmaktadır (Patsalos, 2004).

Levetirasetamın advers etkileri

LEV tedavisinde en sık görülen santral sinir sistemi advers etkileri agresif davranışlar, kronik halsizlik, gerginlik, ajitasyon, duygu durum bozuklukları, depresyon, baş dönmesi, anksiyete, hafıza kaybı, konfüzyon, artmış refleks, parestezi, saldırganlık, bilişsel gerilemedir. Ayrıca LEV tedavisi akut başlangıçlı psikoza ve intihar eğiliminde artışa da neden olabilmektedir. Diğer yaygın advers etkiler aşırı duyarlılık reaksiyonları, nazofarenjit gibi üst solunum yolu enfeksiyonları, kas ağrısı, rinit ve anoreksidir. Ayrıca LEV trombositopeni, lökopeni ve anemi hematolojik advers etkilere de neden olabilmektedir (Wright ve ark., 2013; Gambardella ve ark., 2008; Harden, 2001; Alzahrani ve ark., 2015; Verotti ve ark., 2015).

Levetirasetam doz aşımı

Larkin ve ark. (2013) 'ın yaptığı bir çalışmada aşırı doz LEV kullanımı ile ilişkili vakalar sunulmuştur. Çalışma sonuçları **Çizelge 1**'de özetlenmiştir.

Çizelge 1. Literatürdeki Levetirasetam Aşırı Doz Vakalarının Özeti (Larkin ve ark., 2013)

Yaş	Cinsiyet	Alınan LEV miktarı	LEV kan düzeyi	Alınan diğer ilaçlar	Eşlik eden sağlık problemleri	Klinik sekeller
-	-	6000 mg	-	-	-	Uyuklama
2	K	Tavsiye edilen dozun 10 katı	-	Yok	Serebral palsi Nöbet bozukluğu	Yok
5	K	Tavsiye edilen dozun 4 katı	-	Yok	Nöbet bozukluğu	Hafif kaşıntı
-	-	Reçete edilen dozun % 179'u; 71.4 mg/kg	-	-	-	Yok
41	E	63 000 mg; 446 mg/kg	-	-	-	Bulanık görme Hafif derecede ataksi
38	K	30 000 mg	400 µg/mL (6 saat sonra) 72 µg/mL (18 saat sonra) 60 µg/mL (20.5 saat sonra)	Yok	Yok	Koma Solunum Depresyonu Entübasyon Azalmış derin tendon refleksleri Azalmış kas tonusu
49	E	22 500 mg; 358 mg/kg	-	Yok	Yok	Yok

K: Kadın; E: Erkek; LEV: Levetirasetam; - : Veriye ulaşılamamıştır

Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi başlıca testisler, epididimis, vas deferens, ejakülasyon kanalları ve üretradan oluşmaktadır. Testisler içlerinde sperm bulunan seminifer tübüllerden oluşan spermatogenez sürecinin gerçekleştiği, steroid üretiminin olduğu kısımlardır. Epididimis, spermelerin olgunlaştığı ve depolandığı kısımdır. Vas deferens, epididimis ile üretra arasındaki kanaldır. Spermelerin taşınmasında ve ejakülasyona kadar spermelerin depo edilmesinde görevlidir. Testislerden vücut dışına açılan bölüm üretradır. Hem idrar hem de ejakulat atılımının gerçekleştiği yerdir. Yardımcı cinsiyet bezleri olarak bilinen prostat, seminal vezikül ve bulboüretal bezler spermin yaşadığı ve ejakülasyonla spermle birlikte atılan seminal sıvının üretildiği yerlerdir (Hall, 2011). Erkek üreme sisteminin yapısı ve fonksiyonları **Çizelge 2**'de özetlenmiştir.

Çizelge 2. Erkek Üreme Sistemi Yapı ve Fonksiyonları (Creasy, 2001; Hole, 1993)

Yapı	Fonksiyonu
Testis	Spermatogonyumlardan sperm üretilmesi Leydig hücrelerinden testosteron üretilmesi
Epididimis	Fertilizasyonu sağlayan yüzey antijenlerinin olgunlaşması Ejakülasyona kadar spermin depo edilmesi Seminifer tübül sıvısının resorpsiyonu Steroidler, karnitin, inositol gibi moleküllerin salgılanması
Vas deferens	Sperm hücrelerinin ejakülasyon kanalına taşınması
Seminal vezikül Prostat	Spermilerin canlılıklarını devam ettirmeleri ve kopulasyon plağı oluşumu için gerekli besin öğelerini, protein ve enzimleri içeren seminal sıvının üretilmesi
Bulboüretal bez	Penis sonunu kayganlaştıran sıvının salgılanması
Kopulasyon bez	Kopulasyon plağının üretilmesi
Preputial bez	Feromonların ve β -glukuronidazların üretilmesi
Skrotum	Testisleri çevreleyen ve koruyan yapı
Penis	İdrar ve semenin vücut dışına atılması
Hipofiz	Folikül stimüle edici hormon, luteinleştirici hormon ve prolaktin salgılanması
Hipotalamus ve Santral Sinir Sistemi	Gonadotropin salıverici hormon ve dopamin salgılanması Seksüel davranış ve performansının düzenlenmesi

Testisler

Testisler yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde oval yapıda spermatik kord yapısı ile skrotum keselerinde asılı halde bulunurlar. Testisler *tunica albuginea* adı verilen sert, beyaz, fibröz kapsülle çevrilidir. Bu oluşumun devamında kalınlaşan bağ dokusu *mediastinum testis* adını alır. Bu yapıdan oluşan *septa* adı verilen kalın bağ doku bağlantıları testisi yaklaşık 250 lobüle ayırır. Bu lobüller içerisinde kıvrılmış seminifer tübüller bulunur. Seminifer tübüller testisin iç kısımda birleşerek *rete testis* ağını oluştururlar. Bu ağdan çıkan *efferent ductules* kanalları epididimisin üst kısmına bağlanır. Seminifer tübüller özelleşmiş çok katlı bir epitel tabaka içerir. Burada bulunan spermatogonik hücrelerden sperm hücreleri üretilmektedir. Sertoli hücreleri de seminifer tübüllerde bulunan spermatogenez

sürecinde yardımcı hücrelerdir. Leydig hücreleri seminifer tübüllerin arasında bulunan bir diğer özelleşmiş hücrelerdir. Bu hücreler erkek seks hormonlarının üretimi ve salıverilmesinden sorumludur (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

Epididimis

Epididimis testis ile vas deferens arasında bulunan yaklaşık 6 metre uzunluğunda, sıkıca sarılmış ipliksi bir yapıdır. Baş (*caput*), gövde (*corpus*) ve kuyruk (*cauda*) kısımlarından oluşur. Spermilerin testisten taşınmasında rol alan epididimis, aynı zamanda spermleri depo eder. 1-3 hafta süren bu süreçte spermler olgunlaşmaya devam eder. Spermier ya epididimisten geçerek ejakülasyonla vücuttan atılır ya da parçalanarak zamanla geri emilir (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

Vas deferens (Ductus deferens)

Epididimisin devamında gelen daha az kıvrımlı ve çapı daha geniş olan kanaldır. Testislerden mesanenin arka kısmına uzanan vas deferens, seminal vezikül ve ejakülasyon kanalı ile birleştiği *ampulla* kısmı ile sonlanır. Spermilerin taşınması ve depo edilmesinde görev alır (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

Ejakülasyon kanalları

Yaklaşık 2 cm uzunluğunda seminal vezikül kanalı ile *ampullanın* birleşerek oluşturduğu kanallardır. Ejakülasyon boyunca ejakülasyon kanallarının kassal daralmaları, seminal kese salgılarını ve spermi karıştırır ve üretra içine doğru onları iter (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

Üretra

Hem üreme sistemi hem de boşaltım sisteminin son kısmını oluşturan üretra, semen ve idrarın taşınmasını sağlar. Kontrol mekanizması bu iki sıvının aynı anda geçmesini engeller (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

Seminal vezikül

Mesanenin arka yüzeyinde vas deferens ile bağlantılı yaklaşık 5 cm uzunluğunda kıvrımlı bir yapıdır. Yapının iç yüzeyinde bulunan salgı dokuları zayıf bazik bir sıvı salgılar. Viskoz, sarı renkli kremi bu sıvı semenin yaklaşık %60'ını oluşturur. Sıvının alkali olması üretra sonundaki ve vajinadaki asit ortamının nötralize edilmesini sağlar. Ayrıca sıvının içerdiği fruktoz spermilerin enerji ihtiyacını karşılarken, prostaglandinler kadın üreme organlarında kasların kasılmasını uyarak spermilerin yumurtaya ulaşmasına yardımcı olur (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

Prostat bezi

Mesaneinin altında, üretranın başında yer alan bir bezdir. Bağ ve düz kas dokusundan oluşan bezin kanalları üretraya açılır. İnce, süte benzer zayıf asidik bir sıvı salgılar. Bu sıvı sperm için gerekli besin maddelerinin yanı sıra hyaluronidaz, prostat spesifik antijen gibi bileşenleri içerir. Prostat salgısı spermilerin aktivasyonu, canlılığı ve motilitesi açısından önemlidir (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

Bulboüretal bezler

Cowper bezleri olarak da bilinen bulboüretal bezler, prostat bezinin altına ve penis tabanının yanına yerleşmiş küre biçiminde iki küçük bezdir. Cinsel uyarıyla salgıladıkları mukus benzeri alkali sıvı cinsel birleşme için penisin sonunu kayganlaştırır. Ayrıca ejakülasyon sırasında spermeleri sürtünme hasarından korur (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

Skrotum

Skrotum keseleri penisin arkasında abdominal bölgenin aşağısında testisleri saran subkütanoz yapıdır. Sahip oldukları kas dokuları sayesinde kasılıp gevşeyerek testislerin konumunu ayarlayıp sıcaklık değişimlerinden etkilenmelerini önler (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

Penis

Üretra ile semen ve idrarın vücut dışına aktarılmasını sağlayan silindirik bir organdır. Cinsel birleşme sırasında genişleyen ve sertleşen bir yapıya sahiptir. Erektile dokunun dorsal kısımda yer alan iki parçadan oluşan *corpora cavernosa* ve bu yapının önünde yer alan *corpus spongiosum* olmak üzere üç kısmı vardır. Üretra, *corpus spongiosum* uzunluğu boyunca genişler. *Corpus spongiosum* uçta çok sayıda sinir uçlarını ve üretral açıklığı içeren *glans penis* şeklini almak için genişler. Derinin gevşek kılıfı olan *prepiüs*, glansın kılıfına doğru genişler (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

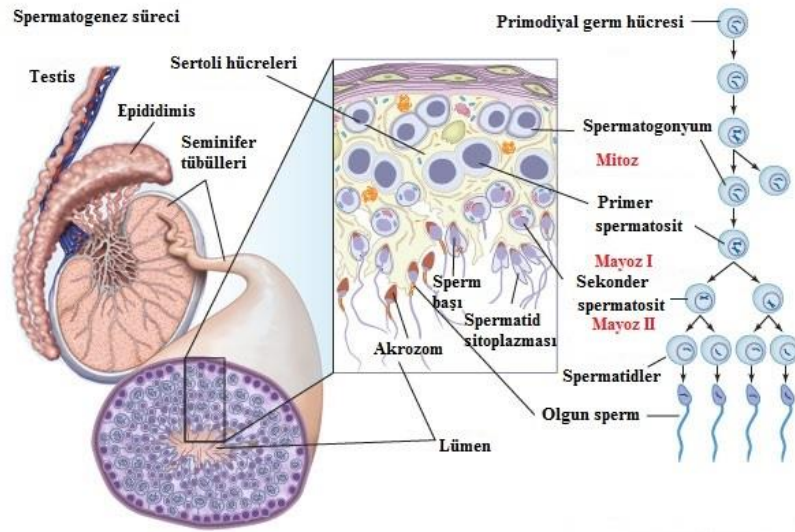
Semen

Semen sperm ve seminifer tübüllerin, seminal vezikül, prostat ve bulboüretal bezlerin salgılarından oluşan seminal sıvının karışımından oluşur. Ejakülasyonla açığa çıkan semen genel olarak 2.5-5 ml hacminde olup, mililitrede 50-150 milyon sperm içerir. Zayıf alkali (pH yaklaşık 7.5) yapıdaki bu sıvı spermin canlılığı ve hareketi için önemli olan çeşitli bileşenleri içerir (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

Spermatogenez süreci

Embriyonun gelişimi sırasında primordiyal germ hücreleri testise göçerek seminifer tübüllerinde spermatogonyumlara (olgunlaşmamış germ hücreleri) dönüşür. Bu hücreler ergenlik döneminin başlamasıyla mitoz bölünmeye uğrayarak çeşitli

basamaklardan geçip olgun spermli oluşturur. Primodiyal germ hücrelerinden olgun sperm hücrelerinin oluştuğu bu sürece spermatogenez süreci denir. İnsanda bu süreç yaklaşık 74 günde gerçekleşmektedir. Spermatogenezin ilk sürecinde spermatogonyumlar seminifer tübülünden sertoli hücrelerine göç ederler. Burada farklılaşarak primer spermatositleri oluştururlar. Her spermatosit mayoz bölünmeye uğrayarak sekonder spermatositleri oluşturur. Birkaç gün sonra bu hücrelerin de bölünmesiyle meydana gelen spermatidler farklılaşarak spermatozoalar (sperm) haline dönüşürler (Hall, 2011; Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013). **Şekil 1**'de spermatogenez süreci özetlenmektedir.



Şekil 1. Spermatogenez Süreci (http-3)

Spermatogenez sürecini etkileyen hormonlar

Erkek üreme sistemi fonksiyonları hipotalamus, ön hipofiz ve testislerden salıverilen hormonlar aracılığıyla düzenlenmektedir. Bu hormonlar sperm hücrelerinin üretimi, erkek cinsiyet karakterlerinin oluşması ve sürdürülmesi sürecini yönetmektedir.

Ergenlik döneminin başlamasıyla hipotalamustan gonadotropin salıverici hormon (GnRH) sekresyonu artmaktadır. Bu hormon ön hipofizi uyarak luteinleştirici hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormonun (FSH) salıverilmesini arttırmaktadır.

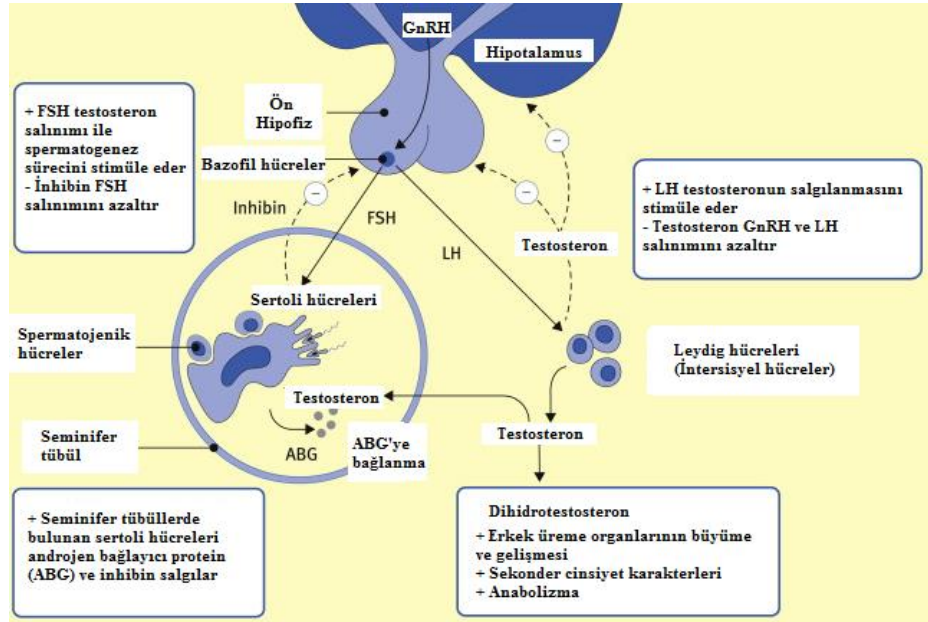
LH, seminifer tübüllerin arasında bulunan Leydig hücrelerinden testosteron salıverilmesini stimule etmektedir. Negatif geri bildirim mekanizması sonucu testosteron ön hipofizden LH, hipotalamustan GnRH salıverilmesini baskılamaktadır.

FSH dolaylı olarak spermatogenez sürecini stimule etmektedir. FSH ve testosteron sinerjistik etkiyle Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine androjen bağlayıcı protein (ABP) salıverilmesine aracılık etmektedir. ABP testosterona bağlanarak testosteron konsantrasyonunun yüksek tutulmasını sağlamaktadır. Testosteron ise

spermatogenez sürecinin son aşamalarını tetiklemektedir. Sertoli hücrelerinden salıverilen inhibin hormonu FSH'nin salıverilmesini azaltmaktadır. Spermatogenez süreci yavaşladığında daha az inhibin salıverilmekte, bu da FSH sekresyonunu ve dolayısıyla spermatogenez arttırmaktadır.

Prostat bezi ve seminal vezikül hücreleri gibi bazı hedef hücreler testosteronu bir diğer androjen olan dihidrotestosterona (DHT) dönüştürmektedir. Testosteron ve DHT, hedef hücrelerdeki aynı androjen reseptörlerine bağlanmaktadır. Bu hormon-reseptör komplekslerinin bazı genleri aktifleştirirken bazılarını pasif hale getirmeleri erkek üreme organlarında büyüme ve gelişme; ikincil seks karakterlerinin oluşması; anabolizmanın uyarılması gibi bazı etkileri tetiklemektedir (Hole, 1993; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).

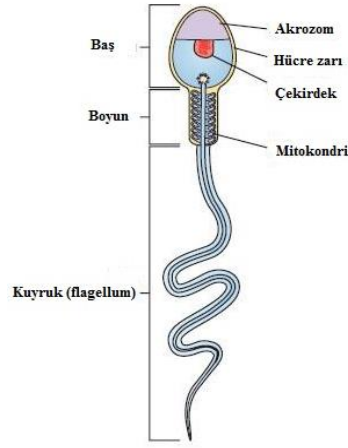
Şekil 2'de spermatogenez sürecinde rol oynayan hormonların etkileri ve negatif kontrol mekanizmaları özetlenmiştir.



Şekil 2. Spermatogenez Sürecinin Hormonal Kontrolü (Ramalingam ve ark., 2014)

Spermin yapısı

Bir spermatozoa baş, boyun ve kuyruk kısmından oluşmaktadır. Baş kısmında çekirdek, ince bir sitoplazma ve hücre zarı bulunur. Başın ön kısmında temel olarak golgi aygıtından oluşan akrozom adı verilen kalın bir başlık bulunur. Çeşitli enzimler içeren akrozom, spermin ovuma girmesinde ve ovumu fertilize etmesinde rol almaktadır. Boyun kısmı bol miktarda mitokondri içermektedir. Kuyruk öne ve arkaya hareketleri ile spermin motilitesini sağlamaktadır. Hareket için enerji mitokondrilere sentezlenen adenosin trifosfattan sağlanmaktadır (Hole, 1993; Patton ve Thibodeau, 2013; Jenkins ve Tortora, 2013; Shier ve ark., 2013).



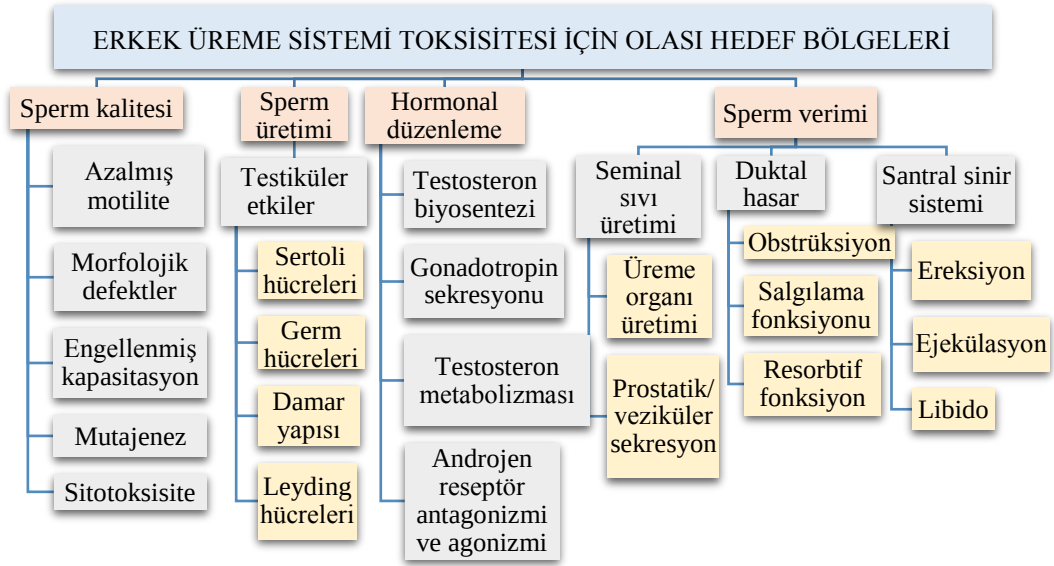
Şekil 3. Sperm yapısı (http-4)

Reproduktif Toksisite

Reproduktif toksisite, ekzojen kaynaklı ajanlara maruziyet sonucunda reproduktif sistem üzerinde olumsuz etkilerin meydana gelmesidir. Reproduktif toksisite organ toksisitesi, teratojenite, davranışsal teratojenite ve gelişimsel toksisiteyi kapsamaktadır (Kimmel ve ark., 1995). Reproduktif sistemin yapı ve fonksiyonlarını çeşitli hastalıklar, ilaçlar dahil kimyasal ajanlar ve genetik kaynaklı etkenler olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Kimmel ve ark., 1995; http-5; Pandiyan ve Darussalam, 2007).

İnfertilite, 6-12 ay korunmasız ve düzenli ilişki sonucunda gebelik oluşmaması durumu olarak tanımlanmaktadır. Evli çiftlerin yaklaşık %15-20'sini etkileyen önemli bir halk sağlığı problemidir. Vakaların üçte biri erkek kaynaklı, üçte biri kadın kaynaklı ve geriye kalan üçte birlik kısmı ise hem erkek hem kadın kaynaklı nedenlere bağlıdır. Erkeklerde infertilite nedenleri oldukça çeşitlidir. Erkek reproduktif sistemini etkileyerek infertiliteye neden olabilecek bazı faktörler arasında yaş (özellikle 40 yaş üstü erkekler), sigara kullanımı, aşırı alkol tüketimi, çevresel toksik ajanlar (kurşun, pestisitler vb.), çeşitli hastalıklar (kabakulak, hormon bozuklukları, hipertirodizm, hipotirodizm, seksüel disfonksiyon, impotens, anatomik defektler vb.) ve radyoterapi sayılabilmektedir (http-5). İlaçlar da pretestiküler (fenitoin, androjenler vb.) ya da testiküler aşamadaki (simetidin, vinkristin, prokarbazin vb.) toksik etkileri nedeniyle infertiliteye neden olabilmektedir (McPhee, 2000).

Şekil 4'te toksik ajanlar için erkek reproduktif sisteminin hedef bölgeleri özetlenmiştir.



Şekil 4. Erkek Üreme Sistemi Toksisitesi İçin Olası Hedef Bölgeleri (Wanda ve ark., 2010).

Reproduktif Toksisitenin Biyogöstergeleri

Reproduktif çalışmalarda sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi gibi sperm parametrelerinin değerlendirilmesi FDA, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (US EPA) ve Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) gibi düzenleyici kurumlar tarafından önerilmektedir (Coder ve ark., 2010). Bu parametrelere ek FSH, LH ve testosteron seviyeleri (Hoyer, 2001), reproduktif sistem organlarının ağırlıkları ve histopatolojisi diğer değerlendirilen biyogöstergeler arasındadır (Kimmel ve ark., 1995; http-6).

Testis ve epididimis ağırlığı reproduktif toksisite çalışmalarında göz önünde bulundurulmuş biyogöstergelerdir. Ancak ağırlık kaybı, ödem ya da efferent kanalların tıkanması gibi durumlarda fark edilmeyebilir (Kimmel ve ark., 1995). Mutlak veya bağıl erkek üreme organ ağırlıklarında anlamlı değişimler reproduktif fonksiyon üzerindeki advers etkileri yansıtabilir. Ancak bu değişimler diğer toksisite göstergeleri ile paralel seyretmeyebilir. Bu nedenle yorum yapılırken organ ağırlıkları anlamlı değişim göstermese de diğer toksisite göstergelerindeki anlamlı değişiklikler göz ardı edilmemelidir (http-6).

Histopatolojik incelemeler toksisitenin belirlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu amaçla genellikle testis, epididimis, seminal vezikül, prostat ve hipofiz dokuları incelenir. Histopatolojik incelemeler hasarın nispeten duyarlı göstergesi olması, çeşitli protokollerin toksisite hakkında bilgi sağlaması, kısa süreli uygulama ile ilgili alanlar (hedef organlar dâhil) hakkında bilgi sağlanması ve iyileşme potansiyelini göstermesi açısından yarar sağlayabilir (http-6). Testis histopatolojisi rutin olarak uygulanır ancak spermatogenez ve sperm olgunlaşması üzerine toksik etki potansiyelini tam olarak yansıtmaz (Kimmel ve ark., 1995).

Semen parametrelerinin en önemlileri sperm sayısı, sperm motilitesi ve sperm morfolojisidir. Sperm sayısı, tüm ejakülattaki toplam sperm sayısını ifade etmekte ve sperm konsantrasyonunun total hacim ile çarpımından elde edilmektedir. Bir ejakülattaki toplam sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu, gebeliğe kadar geçen süre ve gebelik oranlarıyla ilişkili olup, gebe kalmanın belirleyici faktörleridir (Kadıoğlu, 2011). Sperm motilitesi ilk 30 dakikada, oda ısısında veya 37°C derecede hareketliliğinin değerlendirilmesidir (Kadıoğlu, 2011). Spermin hareketliliği fertilizasyon yeteneğinin ve üreme potansiyelini göstermektedir (Maree ve van der Horst, 2013; Toth ve ark., 1989). Sperm morfolojisi sperm baş, boyun ve kuyruk kısımlarının değerlendirilmesi ile incelenmektedir. Bu yapıların anomali göstermesi spermin fertilizasyon kapasitesini etkilemektedir. Spermin morfolojik incelemesinin spermatogenezin kalitesinin ve fertilitenin duyarlı bir göstergesi olduğu ortaya konulmuştur (Erdemir ve ark., 2011). Sperm sayısı ve sperm motilitesindeki azalma, anormal sperm morfolojisi gibi sonuçlar erkek reproduktif toksisitesinin göstergelerindendir (Hoyer, 2001). Sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi gibi sperm parametreleri insan ile diğer türler arasında farklılık gösterir. Var olan bilgiler normal sperm üretimi ve infertilite açısından insanların daha küçük değişimlerden bile etkilendiğini gösterir. Örneğin sıçanlarda sperm üretimi %90 ya da daha fazla oranda azaldığında infertilite meydana gelir. Tavşanlarda ise tam üretkenlik 0.1×10^6 sperm depolandığında sağlanabilir. İnsanda ise ortalama 20×10^6 /ml altındaki sperm konsantrasyonlarında fertilitenin azaldığı bilinir. Dahası morfolojik açıdan sperm anomali insanda rodentlere göre çok daha fazladır. Dolayısıyla rodentlerde fertilite açısından sorun oluşturmayan bir durumun, insanı da tehdit etmeyen bir durum olduğu düşünülmemelidir (Kimmel ve ark., 1995).

Erkek üreme sistemi endokrin dengenin bozulmasından olumsuz yönde etkilenebilir. Yetişkinlerde FSH ve LH hormonlarının konsantrasyonlarında ya da aktivitelerinde görülen değişimler spermatogenez azaltabilir ya da tamamen engelleyebilir, epididimis gibi sekonder cinsiyet organlarının ve prostat gibi yardımcı cinsiyet bezlerinin fonksiyonlarını etkileyebilir ve cinsel davranış bozukluklarına neden olabilir. Erkek üreme sisteminin gelişimi ve farklılaşması, özellikle androjenlerin (testosteron ve dihidrotestosteron) üretimi ya da aktivitesindeki değişimlere dolayısıyla buna neden olabilecek maddelere karşı duyarlıdır. Toksisite çalışmalarında reproduktif hormonlar olarak genelde FSH, LH ve testosteron seviyeleri incelenir (http-6).

Çizelge 3'te reproduktif toksisite çalışmalarında belirlenen biyogöstergeler sunulmuştur.

Çizelge 3. *İn vivo* Erkek Reprodüktif Sistem Toksisitesi Çalışmalarında İncelenmesi Gereken Parametreler (Kimmel ve ark., 1995; <http://>6)

Organ ağırlıkları	Testis, epididimis, seminal vezikül, prostat, hipofiz
Görsel inceleme ve histopatoloji	Testis, epididimis, seminal vezikül, prostat, hipofiz
Sperm parametreleri	Sperm sayısı ve kalitesi (morfoloji, motilite)
Hormon seviyeleri	FSH, LH, testosteron, östrojen, prolaktin

Oksidatif Stres ve DNA hasarı

Oksidatif stres, reaktif oksijen/nitrojen türlerinin (ROS/RNS) oluşumu ile organizmanın bu oluşuma karşı kendini koruma kapasitesi arasındaki dengenin ROS/RNS'nin artması yönünde bozulması olarak tanımlanmaktadır (Pisoschi ve Pop, 2015). Oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin lipidler, proteinler, DNA gibi biyomoleküllerle etkileşerek hasara neden olması nedeniyle istenmeyen bir durumdur. Ancak fizyolojik adaptasyon ve hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesindeki rolü nedeniyle ise istenen bir durumdur. Bu nedenle oksidatif stresin, antioksidan mekanizmalar ile ROS arasındaki dengenin ortamda ROS artması yönünde bozulması olarak tanımlanması daha doğru bir yaklaşımdır (Yoshikawa ve Naito, 2002). Reaktif ürünler endojen mekanizmalar ile kontrol edilemediğinde hasara yol açarak nörodejeneratif ve kardiyovasküler patolojilere, yaşlanma ve kansere neden olabilmektedir (Pisoschi ve Pop, 2015).

Oksidatif stres kimyasal maddeler, UV ışınları, enfeksiyon ajanları gibi çevresel faktörler tarafından indüklenebileceği gibi mitokondride elektron taşıma zinciri, bazı enzim aktiviteleri (NADPH oksidaz, Nitrik oksidaz sentaz (NOS) gibi) ve enfeksiyonlu hücrelerde solunum patlamaları gibi endojen olaylar tarafından da indüklenebilmektedir (Thanan ve ark., 2014).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), singlet oksijen ($1/2 O_2$) ve hidroksil ($\cdot OH$) radikali ROS arasında sayılmaktadır. Serbest radikaller hücresel solunum, fagositoz, aşırı fiziksel aktivite ve sigara, alkol, ultraviyole (UV) ışınları, ozon, pestisit gibi kimyasal/kirleticilere maruziyet vb. durumlar sonucunda meydana gelmektedir (Pisoschi ve Pop, 2015).

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon (GSH) endojen antioksidanlardır. SOD'lar, süperoksit anyonunu hidrojen peroksite çevirmektedir. Memelilerde bakır-çinko içeren ve sitozolde bulunan SOD1, mangan içeren ve mitokondriyal matrikste bulunan SOD2, ekstraselüler SOD3 olmak üzere üç tip SOD bulunmaktadır. KAT, H_2O_2 'i suya ve singlet oksijene dönüştürmektedir. Özellikle karaciğer ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. (Pisoschi ve Pop, 2015). Glutatyon dokularda birbiriyle dengede bulunan, indirgenmiş glutatyon ve okside glutatyon (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur. İntraselüler GSH, selenyum içeren glutatyon peroksidaz enzimi ile GSSG dönüştürülür. Bu enzim aynı zamanda hidrojen peroksidini (H_2O_2) ve diğer peroksidlerin indirgenmesini de katalizler (Konukoğlu ve Akçay, 1995).

Malondialdehit (MDA), yüksek elektrofilik özelliği ile DNA ve proteinlere kolaylıkla etkileşime girmesi nedeniyle oldukça toksik bir lipid peroksidasyon ürünüdür. MDA en yaygın kullanılan oksidatif stres biyogöstergelerinden biridir (Thanan ve ark., 2014).

Aynı zamanda ROS'lar spermin kapasitasyonu, hiperaktivasyonu ve spermoosit füzyonu gibi fertilizasyon süreçlerinde önemli rol oynayan; aşırı üretimi ise lipid peroksidasyonu, motilite kaybı ve DNA hasarı yoluyla erkek üreme sisteminde birçok patolojik süreci başlatabilen radikallerdir (Buonocore ve ark., 2010; Karatağ ve Kendirci, 2013). Oksidatif stres hücre ölümü ve hormonal dengenin bozulmasına neden olarak gonadal gelişim ve spermatogenez sürecine etki etmektedir. Buna bağlı olarak testis ağırlığında ve sperm kalitesinde azalmaya yol açabilmektedir (Attia ve Bakheet, 2013).

Spermatogenez sürecindeki hızlı hücresel bölünme ve metabolik aktivite, bazı hasar türlerine karşı yatkınlığın temelini oluşturmaktadır. Genetik materyalin ve hücrelerin çoğalması sırasında özellikle DNA hasara karşı savunmasızdır (Demott ve Borgert, 2000). Bu nedenle oksidatif stres göstergelerinin incelenmesi ve DNA hasarının tespit edilmesi olası toksisitenin belirlenmesi açısından önemlidir (Sundaram ve Witorsch, 1995). Sperm DNA kırıkları (fragmentasyonunda), obstrüktif azospermisi ve ejakülasyon sorunu olan erkeklerde artmaktadır. DNA hasarının standart semen parametrelerinden bağımsız olarak meydana gelebildiği bilinmektedir. *In vitro* fertilizasyon ve intra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu gibi teknikler uygulansa bile DNA kırıklarının varlığı fertilizasyon olasılığını azaltmaktadır (Attia ve Bakheet, 2013).

Epilepsi, Antiepileptik ilaçlar ve Reprodüktif Toksisite İlişkisi

Epilepsi ile seksüel bozukluklar arasındaki ilişki henüz aydınlatılamamış olsa da epilepsinin ve tedavisinde kullanılan antiepileptik ilaçların östrojen, testosteron ve dihidrotestosteron, prolaktin, FSH ve LH gibi hormon seviyelerini etkileyerek seksüel disfonksiyona neden olabileceği düşünülmektedir. Cerrahi müdahaleden sonra nöbet geçirmeyen erkek temporal lob epilepsi hastalarında hormon seviyelerinin normalleşmesi, temporal lobda meydana gelen fokal epileptik deşarjların hipotalamus-hipofiz eksenini etkileyerek hormon seviyelerinde değişikliklere neden olabileceği düşünülmektedir (Morris ve Vanderkolk, 2005).

Epilepsi hastalarında impotens, libidonun azalması ve infertilite görülme sıklığı normal popülasyondan daha fazladır. Bu problemler hem hastalığın kendisinden hem de kronik olarak kullanılan AEİ'den kaynaklanabilmektedir (Morris ve Vanderkolk, 2005; Calabrò ve ark., 2011; Verotti ve ark., 2011).

Antiepileptik ilaçlar ile yapılmış reproduktif toksisite çalışmaları

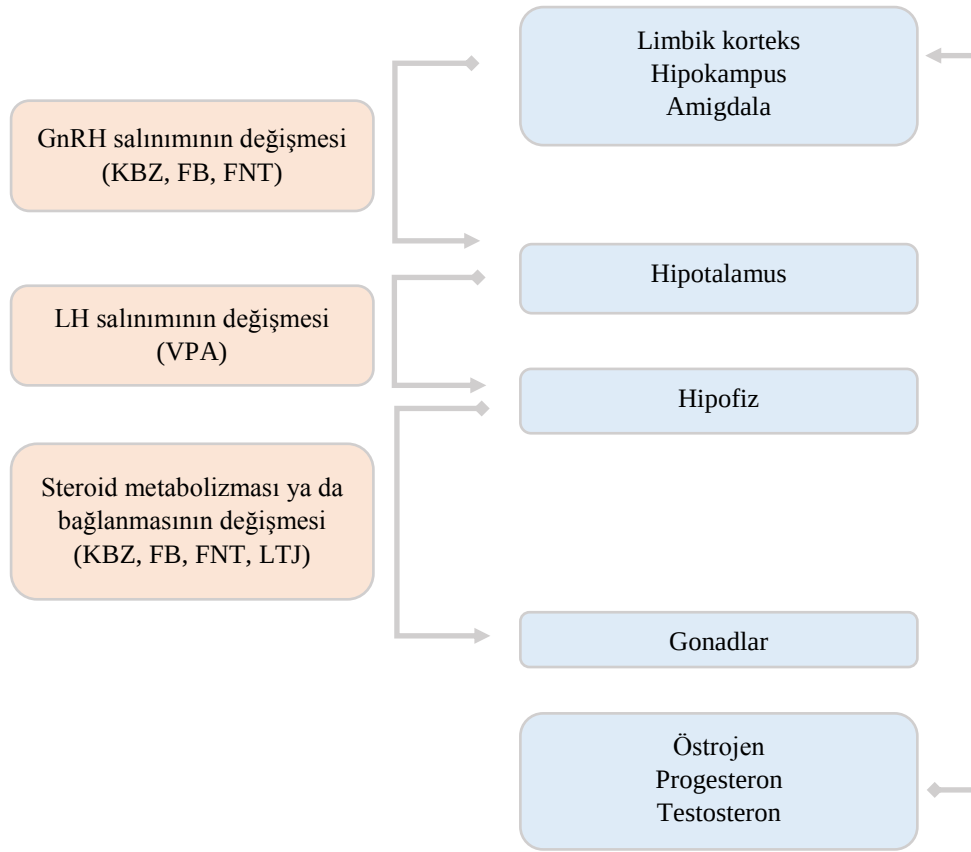
İkinci kuşak antiepileptik ilaçlardan olan TPM ve GBP'nin dişi sıçanlarda hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninin dengesini bozarak reproduktif disfonksiyona yol açtığı bildirilmiştir (Kumar ve Kuar, 2014). Yine ikinci kuşak antiepileptik ilaçlardan olan VGB, LTJ ve GBP'nin erkek sıçanlarda sperm sayısı ve motilitesinde; FSH, testosteron seviyelerinde; testis, epididimis gibi çeşitli erkek

üreme organı ağırlıklarında; fertilite oranlarında anlamlı azalmalara neden olarak erkek reproduktif sistem üzerine toksik etkileri gösterilmiştir (Daoud ve ark., 2004). Başka bir çalışmada ise TPM'nin benzer şekilde erkek sıçanlarda sperm sayısı ve motilitesinde; testosteron seviyesinde; testis, epididimis gibi çeşitli erkek reproduktif organ ağırlıklarında; fertilite oranlarında anlamlı azalmaya neden olarak erkek reproduktif sistem üzerine toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Otoom ve ark., 2004).

Andretta ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir çalışmada KBZ puberte başlangıcını geciktirmiş ve steriodogenez sürecini, sperm kalitesini olumsuz yönde etkilemiştir. KBZ, VPA, FNT, FB ve PRM ile yapılan randomize klinik denemeler bu ilaçların impotens veya azalmış libidoya neden olduğunu göstermiştir. FNT'nin erkeklerde seksüel disfonksiyonla ilişkili yüksek östradiol seviyesine neden olduğu rapor edilmiştir. FNT ve KBZ'nin dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) seviyesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Isojärvi, 2008). LTJ ile tedavi gören erkek epilepsi hastalarında seksüel fonksiyon skorlarının; seks hormon bağlayıcı globülin (SHBG), testosteron, testosteron/östradiol ve testosteron/LH seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Ergenlik dönemindeki erkek epilepsi hastalarında yapılan bir çalışmada VPA grubunda yüksek androstenedion seviyeleri tespit edilmiştir. KBZ, LTJ ve OKS gruplarında hormon seviyelerinde anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir (Isojärvi, 2008). Özellikle FB, FNT ve KBZ gibi karaciğer enzimlerini indükleyen AEİ'nin kullanılması SHBG seviyesini artırarak çeşitli hormon seviyelerinde değişimlere neden olabileceği gösterilmiştir. SHBG seviyesindeki artış testosteron biyoaktivitesinde azalmaya yol açabilir bu durum da erkeklerde impotens ya da infertiliteye neden olabilir (Verotti ve ark., 2011).

Şekil 5'te bazı antiepileptik ilaçların hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini üzerine etkileri sunulmuştur.

VPA ve LEV ile tedavi gören erkek epilepsi hastalarının hormon seviyeleri ve sperm parametrelerinin incelendiği bir çalışmada, VPA (n=32) grubunda FSH ve LH seviyelerinin azaldığı, LEV (n=20) grubunda ise seviyelerin değişmediği gözlenmiştir. Yine VPA (n=15) grubunda sperm morfolojisinde anomalilerin arttığı, LEV (n=10) grubunda ise sperm morfolojisinin değişmediği belirlenmiştir. Sperm motilitesi açısından ise her iki grupta da sperm motilitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Xiaotian ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada ise LEV ile erkek hastaların (n=8) serum testosteron seviyelerinde artış saptanmıştır (Harden ve ark., 2010).



Şekil 5. Bazı Antiepileptik İlaçların Hipotalamus-Hipofiz-Gonad Eksenine Etkileri (Verotti ve ark., 2011)

LEV ve VPA'nın dişi reproduktif sistem üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, *in vitro* domuz over folliküllerinde VPA'nın LH ile stimüle edilmiş testosteron seviyesinde artışa ve FSH ile stimüle edilmiş östradiol seviyesinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. LEV ise yüksek konsantrasyonda hücrelerde FSH ile indüklenmiş testosteronun östradiole dönüşümünü azaltmıştır. LEV ve VPA terapötik konsantrasyonlarda hücrelerde bazal testosteron seviyelerini arttırmıştır (Taubøll ve ark., 2006). Svalheim ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada ise LEV (n=26) kullanan kadın epilepsi hastalarının hormon seviyelerinde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

Önceki çalışmalar incelendiğinde, LEV ile erkek reproduktif toksisitesinin önemli son noktalar ile incelendiği klinik veya hayvan modeli bir çalışma verisine rastlanmamıştır. Bu sebeple bu tez çalışmasında, erkek sıçanlara LEV uygulaması ile vücut, testis ve epididimis ağırlıklarının, sperm sayısının, motilitesinin, morfolojisinin, DNA hasarının, serum FSH, LH ve testosteron seviyelerinin belirlenmesi ve testis dokusunun histopatolojik incelenmesi ile reproduktif toksisitenin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca MDA, SOD, KAT ve GSH gibi oksidatif stresin biyogöstergelerin testis dokusunda seviyelerinin tespit edilmesi ile olası patolojideki oksidatif stresin rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇLER

Kullanılan hayvanlar

Deneylerde yaklaşık 180-200 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, $24\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki iyi havalandırılan odalarda barındırılmış, standart hayvan yemi ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlanmıştır. Tez çalışması süresince gerçekleştirilen tüm deneyler, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Komisyonu'ndan onay alındıktan sonra yapılmıştır (Dosya Kayıt No. 2015-15).

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Madde ve Kitler

Borik asit	Riedel de Haën, Almanya
CAT Kiti	BioVision, Amerika Birleşik Devletleri
Ditiyotritol (DTT)	Amresco, Amerika Birleşik Devletleri
DMEM/Ham's F-12	Capricorn Scientific, Almanya
Düşük erime dereceli agaroz (LMA)	Invitrogen, İspanya
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich, Almanya
FSH Elisa kit (Sıçan için)	Cusabio, Çin Halk Cumhuriyeti
GSH Kiti	Cayman, Amerika Birleşik Devletleri
Kepra® tablet	UCB Pharma, Belçika
Lamel yapıştırıcısı	Eukitt, İspanya
LH Elisa kit (Sıçan için)	Cusabio, Çin Halk Cumhuriyeti
Lityum 3,5-diiodosalisilat (LIS)	Sigma-Aldrich, Almanya
MDA Kiti	BioVision, Amerika Birleşik Devletleri
Normal agaroz	Sigma-Aldrich, Almanya
PBS Dulbecco (10x)	Biochrom, Almanya
Proteinaz K	Sigma-Aldrich, Almanya
Sıvı azot	AÜ BİBAM'dan temin edilmiştir
SOD Kiti	BioVision, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Sperm boyama kiti (Sperm Blue)	Microptic, İspanya
Sybr green	Sigma-Aldrich, Almanya

Testosteron Elisa kit (Sıçan için)	Cusabio, Çin Halk Cumhuriyeti
Triton X	Merck, Almanya
Trizma baz	Sigma-Aldrich, Almanya
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Aletler	
Ultramikrotom	Leica EM UC7, Almanya
Floresan mikroskobu	Leica DM6000 B, Almanya
Comet analiz programı	BS 200 ProP, BAB Görüntüleme Sistemi, Türkiye
Elektroforez tankı	Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri
ELISA okuyucu	Biotek, Amerika Birleşik Devletleri
Güç kaynağı	Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri
Hassas terazi	Ohaus, Amerika Birleşik Devletleri
Homojenizatör	Heildolph, Almanya
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Lab Companion, Amerika Birleşik Devletleri
İnkübatör	Lab Companion, Amerika Birleşik Devletleri
Kan tüpleri	Greiner bio-one, Almanya
Lam	Isolab, Almanya
Lamel	Isolab, Almanya
Otomatik Sperm Analizörü	
ve Yazılımı	SCA® Microptic, İspanya
pH metre	WTW Inolab, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Amerika Birleşik Devletleri
Standart 4 odacıklı sayım slaytı	Leja B. V., Hollanda
Ultrasonik banyo	BANDELIN, Almanya
Vorteks karıştırıcı	Heildolph, Almanya

YÖNTEMLER

Deney Hayvanlarına Test Maddesinin Uygulanması

Spermatogenez süreci üzerindeki toksik etkinin belirlenmesi için yaklaşık 180-200 g ağırlığında 12 haftalık erkek Wistar sıçanlar kullanılmış ve her grupta 10 sıçan olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Uygulama süresi (http-7) ve uygulanacak olan LEV dozları (Kitano ve ark., 2005; Margineanu ve ark., 2008; Svalheim ve ark., 2008) literatür taraması sonucu belirlenmiştir.

- Kontrol grubu (K); 70 gün oral olarak 1 ml/100 g hacimde distile su uygulanan sıçanlar
- 50 mg/kg LEV uygulanan grup (LEV-50); 70 gün oral olarak 50 mg/kg dozda, 1 ml/100 g hacimde distile su içinde LEV uygulanan sıçanlar
- 150 mg/kg LEV uygulanan grup (LEV-150); 70 gün oral olarak 150 mg/kg dozda, 1 ml/100 g hacimde distile su içinde LEV uygulanan sıçanlar
- 300 mg/kg LEV uygulanan grup (LEV-300); 70 gün oral olarak 300 mg/kg dozda, 1 ml/100 g hacimde distile su içinde LEV uygulanan sıçanlar

Deney Hayvanlarından Numune Toplanması

Son LEV dozunu takip eden 24 saat sonunda sıçanların ağırlıkları kaydedilmiş ve intraperitoneal 1.5 g/kg ürean anestezisi (Takeuchi ve ark., 2014) altında kalp sağ ventrikül yapısından yüksek miktarda kan alınması ile sıçanlar öldürülmüştür.

Sıçanlara ait kan örnekleri 2-8°C'de bir gece bekletildikten sonra 1000 x g'de 15 dk santrifüj edilerek plazma örnekleri hazırlanmıştır. FSH, LH ve testosteron gibi spermatogenez sürecinde rol oynayan hormonların seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere 200 µl'lik porsiyonlar halinde -20°C'de saklanmıştır.

Kan alınmasını takiben sıçanların sağ testis ve sağ epididimis dokuları çıkarılmıştır. Sol testis ve sol epididimis dokuları fosfat tampon solüsyonu (PBS) (NaCl: 8 g/L, KCl: 0.2 g/L, KH₂PO₄: 0.2 g/L and Na₂HPO₄: 1.14 g/L; pH: 7.4) ile kan ve diğer kirliliklerden arındırıldıktan sonra tartılıp ağırlıkları kaydedilmiştir. Sol testis dokuları eşit parçalara ayrılıp oksidatif stresin belirlenmesinde önemli olan GSH, MDA, SOD ve KAT parametrelerinin incelenmesinde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Sağ testis dokuları PBS ile temizlendikten sonra histopatolojik inceleme için fikse edilmiştir. Sağ epididimisin kauda dokuları sperm parametrelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Sperm Konsantrasyonunun ve Motilitesinin Değerlendirilmesi

Sıçanlar öldürüldükten hemen sonra sağ epididimis dokularının kauda kısımları 37°C'deki DMEM/Ham's F-12 içeren petrilere alınmıştır. Kauda, kan damarları ve yağ dokularından arındırılması için aynı besiyerini (1 ml) içeren petriye alınmıştır. Arındırılmış 0.5 cm'lik kauda parçası yine aynı besiyerini (1 ml) içeren yeni bir petride 1 dakika bekletilerek spermatozoa bulutu oluşturulmuştur.

Petride besiyeri içerisinde oluşturulan spermatozoa bulutundan 5 µl alınarak Leja slaytlarının (Leja B.V., Hollanda) hücrelerine doldurulmuştur. Hazırlanan Leja slaytlarının 4 x ters faz objektifi, sarı lens kullanılarak ve faz 2 ayarı ile Sperm Class Analyzer (SCA[®], Microptic, İspanya) sistemi yazılımındaki motilite/konsantrasyon

modülünde (versiyon 5.4.0.1) saniyede 25 kare çekilerek her sıçan için en az 8 görüntü edilmiştir. Bu görüntülerden yine her sıçan için en az 200 motil spermatozoa sayılmıştır (http-8; Maree ve van der Horst, 2013).

Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Taze sperm örneklerinden 5 µl alınarak lam üzerine konulmuştur. Başka bir lam yardımıyla 45°lik açı ile konulan örnek lam üzerine çekilmiştir. Hazırlanan lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamlar Sperm Blue® boyama kiti (Microptic, İspanya) ile morfolojik inceleme için hazırlanmıştır. Lamlar yeterli yükseklikte fiksasyon sıvısı ve boyama sıvısı içeren boyama kaplarında 15'er dakika bekletilmiştir. Distile su ile yıkama işlemi ardından lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kuruduktan sonra yapıştırıcı yardımıyla üzerleri lamel (24 x 60 mm) ile kapatılarak morfolojik inceleme için hazır hale getirilmiştir. Morfolojik inceleme Sperm Class Analyzer (SCA®) sistemi yazılımındaki (versiyon 5.4.0.1) morfoloji modülünde 60 x aydınlık alan objektifi, mavi lens kullanılarak ve aydınlık alan ayarı yapılarak incelenmiştir. Her sıçan için 200 sperm incelenmiştir. Morfolojik incelemede, literatürdeki kriterlere göre, baş ve kuyruk anomallileri belirlenmiştir (Mori ve ark., 1991; Filler, 1993; Narayana ve ark., 2002; Gromadzka-Ostrowska ve ark., 2012; Martinez ve ark., 2014).

Spermde Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE/Comet) Yöntemi

Buzlu lamlar PBS ile hazırlanmış %1'lik normal erime sıcaklığına (NMA) sahip agaroz jel ile kaplanmıştır. Sıçanların epididimiden alınan sperm örneklerinden 8 µl alıp 72 µl %1'lik düşük erime sıcaklığına sahip agaroz jel (LMA) ile karıştırdıktan sonra karışım lama aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. 5 dakika sonra 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 dithiotreitol eklenir) içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra tekrar lizis tamponuna ilave olarak 0,1 mg/ml proteinaz K ve 4 mM Lis (Lityum 3,5-diiodosalisilat) eklenerek 24 saat 37°C'de örnekler bekletilmiştir. Bu işlemin sonunda tuz ve deterjanları uzaklaştırmak için lamlar 5'er dakika 3 kez distile suda 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. Daha sonra 25 V'de 25 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminden sonra lamlar distile su ile yıkanmış ve açık havada kurutulmuştur. Sonra Sybr green boyası ile boyanmıştır. Örnekler Leica DM6000 B (Leica, Almanya) floresan mikroskopunda fotoğraflanmış ve analiz işlemi için BS 200 ProP, BAB Görüntüleme Sistemi (BAB Görüntüleme Sistemi, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Her preparattan 100 hücre sayılmıştır (Trivedi ve ark., 2010).

Biyokimyasal Analiz

Sıçan plazmasında FSH (Cusabio®, Çin Halk Cumhuriyeti), LH (Cusabio®, Çin Halk Cumhuriyeti) ve testosteron (Cusabio®, Çin Halk Cumhuriyeti) hormon seviyeleri satın alınan ELISA kit prosedürlerine uygun olarak belirlenmiştir.

Sıçan testis dokusunda GSH (Cayman®, Amerika Birleşik Devletleri), MDA (BioVision®, Amerika Birleşik Devletleri), CAT (BioVision®, Amerika Birleşik Devletleri) ve SOD (BioVision®, Amerika Birleşik Devletleri) seviyeleri satın alınan Assay kit prosedürlerine uygun olarak belirlenmiştir.

Histopatolojik İnceleme

Doku örneklerinin tespiti

Dokulardan diseksiyonla alınan örnekler hayvandan çıkarıldıktan hemen sonra otolize uğramamaları için %4'lük paraformaldehit (fosfat tampon içinde pH 7.2-7.3) içeren tespit solüsyonuna alınmıştır.

Doku takip işlemleri

1 mm³'lük parçalara bölünen dokular tespit solüsyonu (%4'lük paraformaldehit) içerisinde 24 saat boyunca ve +4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Materyal 0.1 M'lık sodyum-fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkayıp dokulardan suyun uzaklaştırılması amacıyla alkol serilerinden geçirilmiştir. Resinin hücre içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacıyla dokular (2:1) LR White/alkol karışımında 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 1 gece LR White içerisinde bekletilmiştir. Gömme işleminin ardından oluşturulan bloklardan Leica EM UC7 (Leica microsystems, Almanya) ultramikrotom kullanılarak 700 nm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler %1'lik toluidin mavisi/boraks (pH:8.4) ile boyanıp, Leica DM6000 B'de (Leica microsystems, Almanya) görüntülenmiştir (Bancroft ve Gamble, 2002).

İstatistiksel Analiz

Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler, SigmaPlot v.10 programında (Systat software inc., Amerika Birleşik Devletleri) çoklu karşılaştırma testleri olan Tek faktörlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve ardından çoklu karşılaştırma testi olarak (post-hoc) Tukey testi ile gerçekleştirilmiştir. Comet yöntemi sonuçları ise One-way ANOVA ve post-hoc Dunnet T3 testi ile karşılaştırılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bulgular

Vücut ağırlıklarının değişimi ve bağıl organ ağırlıkları

70 günün sonunda vücut ağırlıklarının değişimi % ağırlık artışı olarak, organ ağırlıkları ise bağıl testis ve epididimis ağırlıkları şeklinde gösterilmiştir. Bağıl organ ağırlıkları g organ/100 g vücut ağırlığı şeklinde ifade edilmiştir.

Çizelge 4. Grupların Ağırlık Değişimleri, Testis ve Epididimis Ağırlıkları

Deney grupları	% Ağırlık artışı	Bağıl testis ağırlıkları (g/100 g vücut ağırlığı)	Bağıl epididimis ağırlıkları (g/100 g vücut ağırlığı)
K	71.35 ± 23.44	0.55 ± 0.10	0.26 ± 0.04
LEV-50	48.24 ± 16.15 ^(a)	0.52 ± 0.06	0.27 ± 0.04
LEV-150	47.18 ± 16.09 ^(a)	0.52 ± 0.09	0.27 ± 0.05
LEV-300	34.63 ± 12.41 ^(aaa)	0.51 ± 0.07	0.26 ± 0.03

K: Kontrol grubu; LEV-50: 50 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-150: 150 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-300: 300 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ^(a) Kontrolde farklı (p ≤ 0.05); ^(aaa) Kontrolde farklı (p ≤ 0.001).

Tüm deney gruplarındaki vücut ağırlığı artışı kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır. Deney gruplarına ait bağıl testis ve epididimis ağırlıklarında anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir (**Çizelge 4**).

Sperm parametreleri

Sperm konsantrasyonu ve motilitesi

Çizelge 5'de görüldüğü gibi tüm deney gruplarındaki sperm konsantrasyonları kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır. LEV-50, LEV-150 ve LEV-300 için sperm konsantrasyonları (10⁶/ml) sırasıyla 0.83 ± 0.50; 0.82 ± 0.38 ve 0.81 ± 0.37 iken kontrol grubunun sperm konsantrasyonu (10⁶/ml) 2.68 ± 0.88 olarak belirlenmiştir.

Sperm motilitesi incelendiğinde, LEV-300 grubunda sperm motilitesinin kontrole göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir.

Çizelge 5. Grupların Sperm Konsantrasyonları ve Sperm Motiliteleri

Deney grupları	Sperm konsantrasyonları (10 ⁶ /ml)	Motilite (%)
K	2.68 ± 0.88	84.54 ± 9.08
LEV-50	0.84 ± 0.22 ^(a)	78.83 ± 8.16
LEV-150	0.82 ± 0.38 ^(a)	80.49 ± 3.89
LEV-300	0.81 ± 0.37 ^(a)	69.78 ± 13.02 ^(a)

K: Kontrol grubu; LEV-50: 50 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-150: 150 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-300: 300 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ^(a) Kontrolde farklı (p ≤ 0.05).

Sperm morfolojisi

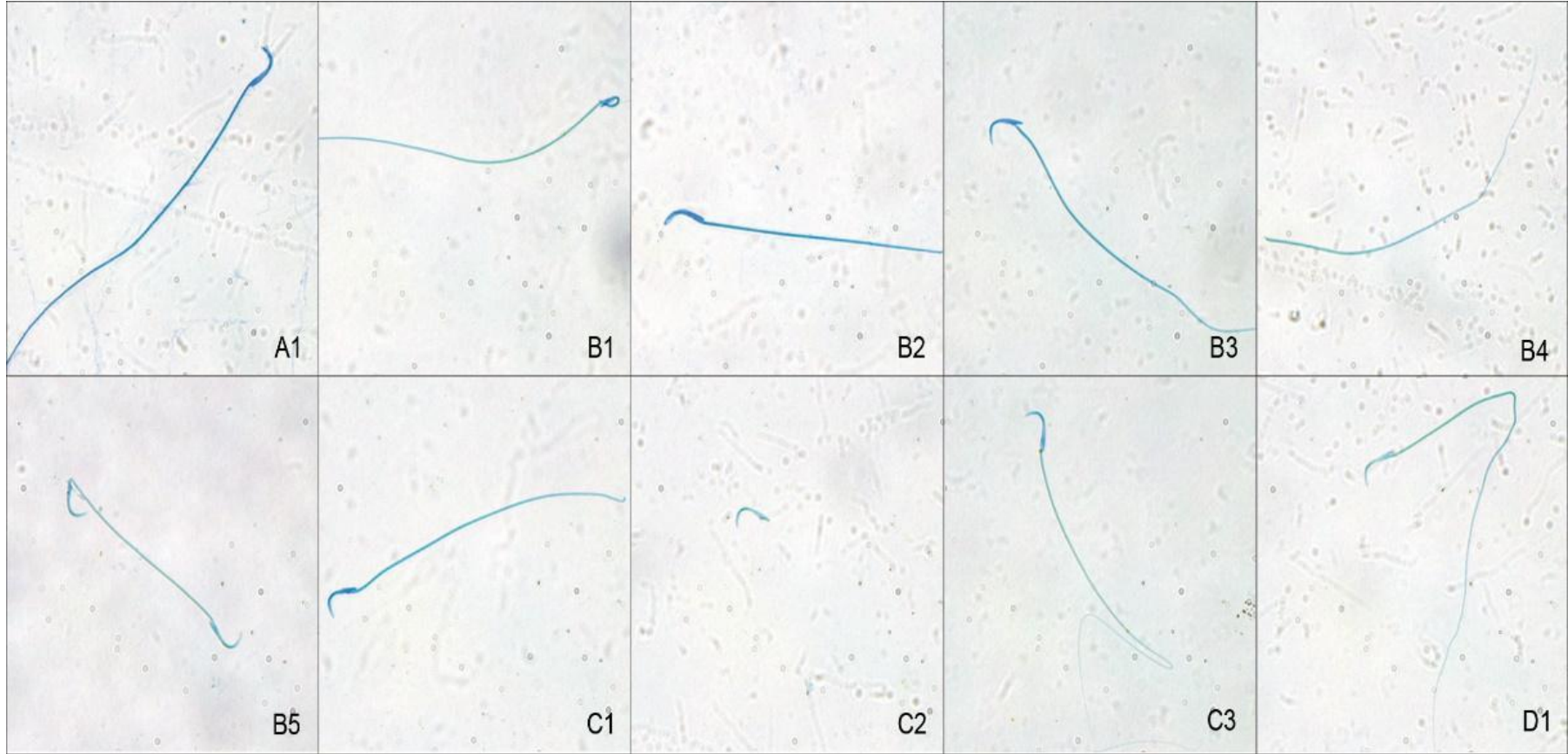
Anormal sperm yüzdesi, LEV-150 ve LEV-300 gruplarında kontrole göre anlamlı olarak artmıştır. Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında LEV-300 grubundaki anormal sperm yüzdesi, LEV-50 grubundaki anormal sperm yüzdesinden de anlamlı olarak fazla bulunmuştur.

Tüm deney gruplarında baş anomalisi yüzdesi değerlendirildiğinde, LEV-300 grubundaki % baş anomalisi kontrole göre anlamlı olarak artmıştır. Kuyruk anomalisi yüzdeleri kıyaslandığında ise LEV-150 ve LEV-300 gruplarında kuyruk anomalileri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında LEV-300 grubundaki % kuyruk anomalisi, LEV-50 grubundaki % kuyruk anomalisine göre de anlamlı olarak artmıştır. Tüm deney gruplarında çoklu anomali görülen sperm yüzdesi artış göstermiş; LEV-150 ve LEV-300 gruplarında da kontrole göre anlamlı artışlar saptanmıştır (**Çizelge 6**).

Çizelge 6. Grupların Sperm Morfoloji Değerlendirmesi Bulguları

Deney grupları	Anormal sperm (%)	Baş anomalisi (%)	Kuyruk anomalisi (%)	Çoklu anomali (%)
K	24.85 ± 4.88	8.75 ± 3.22	12.4 ± 3.74	3.7 ± 1.58
LEV-50	38.7 ± 2.98	13.55 ± 3.24	18.3 ± 2.09	6.5 ± 2.04
LEV-150	46.3 ± 7.02 (^a)	13.3 ± 3.14	25.85 ± 3.34 (^a)	7.15 ± 2.75 (^a)
LEV-300	59.25 ± 7.21 (^{aaa,b})	15.05 ± 3.59 (^a)	35.5 ± 4.47 (^{aaa,b})	8.7 ± 3.72 (^a)

K: Kontrol grubu; LEV-50: 50 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-150: 150 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-300: 300 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (^a) Kontrolde farklı ($p \leq 0.05$); (^{aaa}) Kontrolde farklı ($p \leq 0.001$); (^b) LEV-50'den farklı ($p \leq 0.05$).

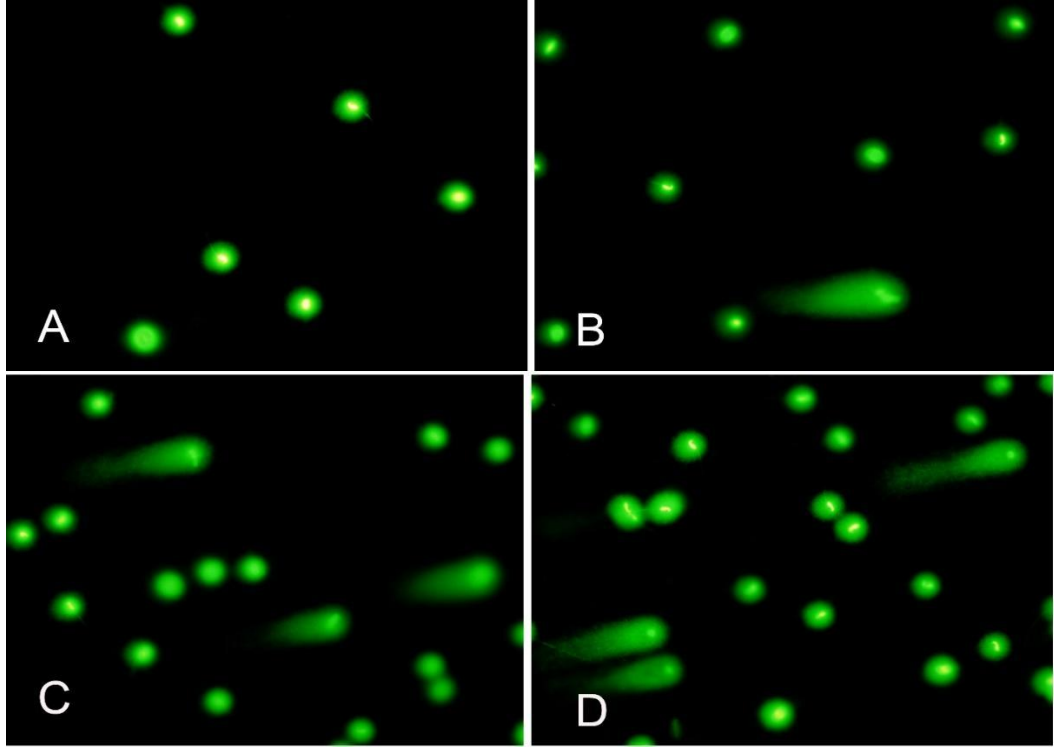


A1: Normal; B: Baş anomalileri; B1: Amorf; B2: Muz şeklinde baş anomalisi; B3: Bükülmüş boyun; B4: Başsız sperm; B5: İki başlı sperm; C: Kuyruk anomalileri; C1: Kırılmış kuyruk; C2: Ayrık; C3: Bükülmüş kuyruk; D: Çoklu anomali; D1: Muz şeklinde baş anomalisi + Bükülmüş kuyruk

Şekil 6. Sperm Morfolojisi

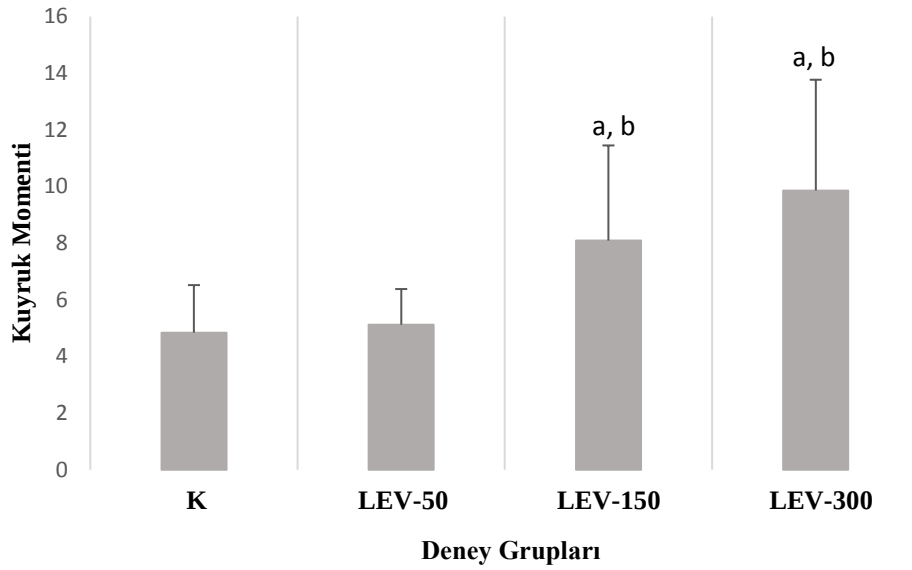
Spermde tek hücre jel elektroforez (SCGE/Comet) yöntemi bulguları

LEV-150 ve LEV-300'de doz artışına bağlı olarak kontrole göre sperm hücrelerinde DNA hasarının indüklendiği görülmüştür. LEV-50 dozunda ise kontrole göre DNA hasarında bir farklılık saptanmamıştır (**Şekil 7 ve 8**).



A: Kontrol grubu; B: LEV-50: 50 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; C: LEV-150: 150 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; D: LEV-300: 300 mg/kg levetirasetam uygulanan grup. (40x)

Şekil 7. SCGE/Comet Yöntemi Sonucunda Sperm DNA'sında Tespit Edilen Hasarın Floresans Mikroskopik Görüntüsü



K: Kontrol grubu; LEV-50: 50 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-150: 150 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-300: 300 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; (a) Kontrol grubuna göre; (b) LEV-50'den farklı ($p < 0.05$).

Şekil 8. SCGE/Comet Analizi Sonuçları Grafiği

Biyokimyasal analiz bulguları

Plazma hormon seviyeleri

FSH seviyeleri

Plazma FSH seviyeleri ölçümü sonucunda, LEV-300 grubunda plazma FSH seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır. Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında LEV-300 grubunun plazma FSH seviyesi, LEV-50 ve LEV-150 gruplarına göre de anlamlı olarak azalmıştır (**Çizelge 7**).

LH seviyeleri

Deney gruplarındaki plazma LH seviyeleri incelendiğinde LEV-300 grubunda LH seviyesi kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır. Gruplar arası kıyaslama yapıldığında LEV-300 grubunda azalan LH seviyesi, LEV-50 ve LEV-150 gruplarından da anlamlı olarak farklıdır (**Çizelge 7**).

Testosteron seviyeleri

Plazma testosteron seviyeleri incelendiğinde LEV-300 grubunda testosteron seviyesi kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (**Çizelge 7**).

Çizelge 7. Grupların Plazma FSH, LH ve Testosteron Seviyeleri

Deney grupları	FSH (IU/L)	LH (mg/dL)	Testosteron (IU/L)
K	12.63 ± 2.73	18.16 ± 3.73	4.87 ± 2.6
LEV-50	11.26 ± 1.76	16.14 ± 2.91	3.05 ± 1.85
LEV-150	10.44 ± 3.55	15.70 ± 3.05	3.44 ± 1.39
LEV-300	6.34 ± 1.77 (^{a,b,c})	11.13 ± 2.90 (^{a,b,c})	2.48 ± 1.26 (^a)

K: Kontrol grubu; LEV-50: 50 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-150: 150 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-300: 300 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (^a) Kontrolde farklı ($p \leq 0.05$); (^b) LEV-50'den farklı ($p \leq 0.05$); (^c) LEV-150'den farklı ($p \leq 0.05$).

Testis dokusunda oksidatif stres parametreleri

Testis dokusunda süperoksit dismutaz aktivitesi

Deney gruplarının testis dokusundaki SOD aktivitesi ölçümü sonucunda LEV-150 ve LEV-300 gruplarında SOD aktivitesinin kontrole göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Gruplar arası yapılan değerlendirmede ise LEV-300 grubundaki SOD aktivitesi LEV-50 ve LEV-150 gruplarından da anlamlı olarak az bulunmuştur (**Çizelge 8**).

Testis dokusunda katalaz seviyeleri

Tüm deney gruplarının testis dokusundaki KAT seviyeleri, kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır. Gruplar arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır (**Çizelge 8**).

Testis dokusunda glutatyon seviyeleri

Testis dokusunda GSH seviyeleri LEV gruplarının hepsinde anlamlı olarak azalmıştır. Gruplar arasında, LEV-300 grubunda kontrol grubuna kıyasla GSH seviyelerindeki azalma öne çıkmaktadır ($p < 0.01$). LEV-300 grubunda saptanan GSH seviyeleri LEV-50 grubundan da anlamlı olarak az bulunmuştur (**Çizelge 8**).

Testis dokusunda malondialdehit seviyeleri

Tüm deney gruplarının testis dokusundaki MDA seviyeleri incelendiğinde, LEV-150 ve LEV-300 gruplarında MDA seviyeleri kontrole göre anlamlı olarak artmıştır (**Çizelge 8**).

Çizelge 8. Testis dokusunda SOD Aktivitesi, KAT, GSH ve MDA Seviyeleri

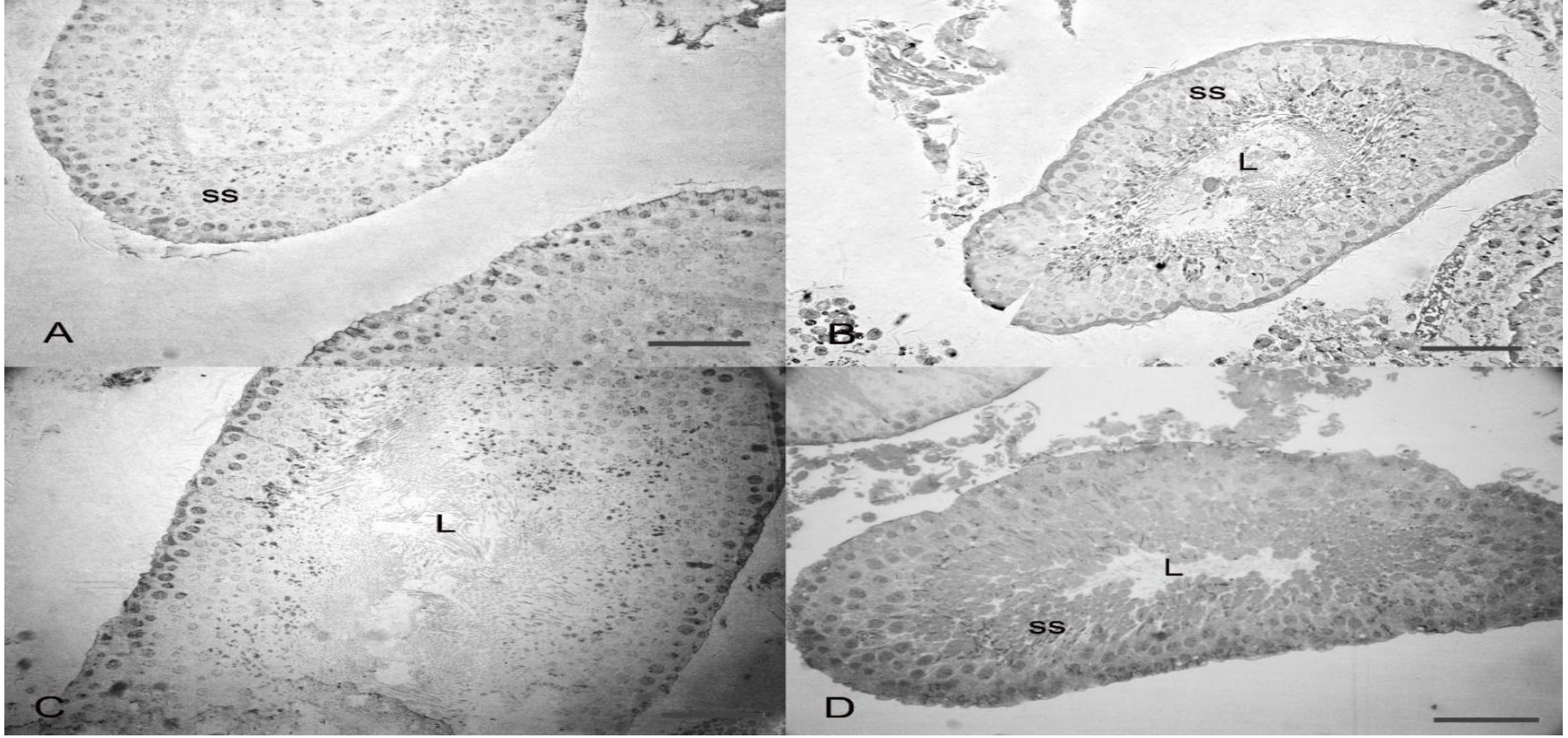
Deney grupları	SOD (%)	KAT (mU/ml)	GSH (μM)	MDA (nmol/g doku)
K	97.94 ± 1.13	60.47 ± 12.97	217.48 ± 15.95	0.56 ± 0.16
LEV-50	95.5 ± 2.15 (^a)	37.65 ± 12.13 (^a)	120.99 ± 7.92 (^a)	0.82 ± 0.43
LEV-150	92.16 ± 4.17 (^a)	35.94 ± 7.23 (^a)	101.07 ± 11.62 (^a)	0.94 ± 0.49 (^a)
LEV-300	86.82 ± 6.67 (^{a,b,c})	33.56 ± 4.91 (^a)	92.64 ± 10.09 (^{aaa,b})	1.09 ± 0.48 (^a)

K: Kontrol grubu; LEV-50: 50 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-150: 150 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; LEV-300: 300 mg/kg levetirasetam uygulanan grup; Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (^a) Kontrolde farklı ($p \leq 0.05$); (^{aaa}) Kontrolde farklı ($p \leq 0.001$); (^b) LEV-50'den farklı ($p \leq 0.05$); (^c) LEV-150'den farklı ($p \leq 0.05$).

Histopatolojik inceleme bulguları

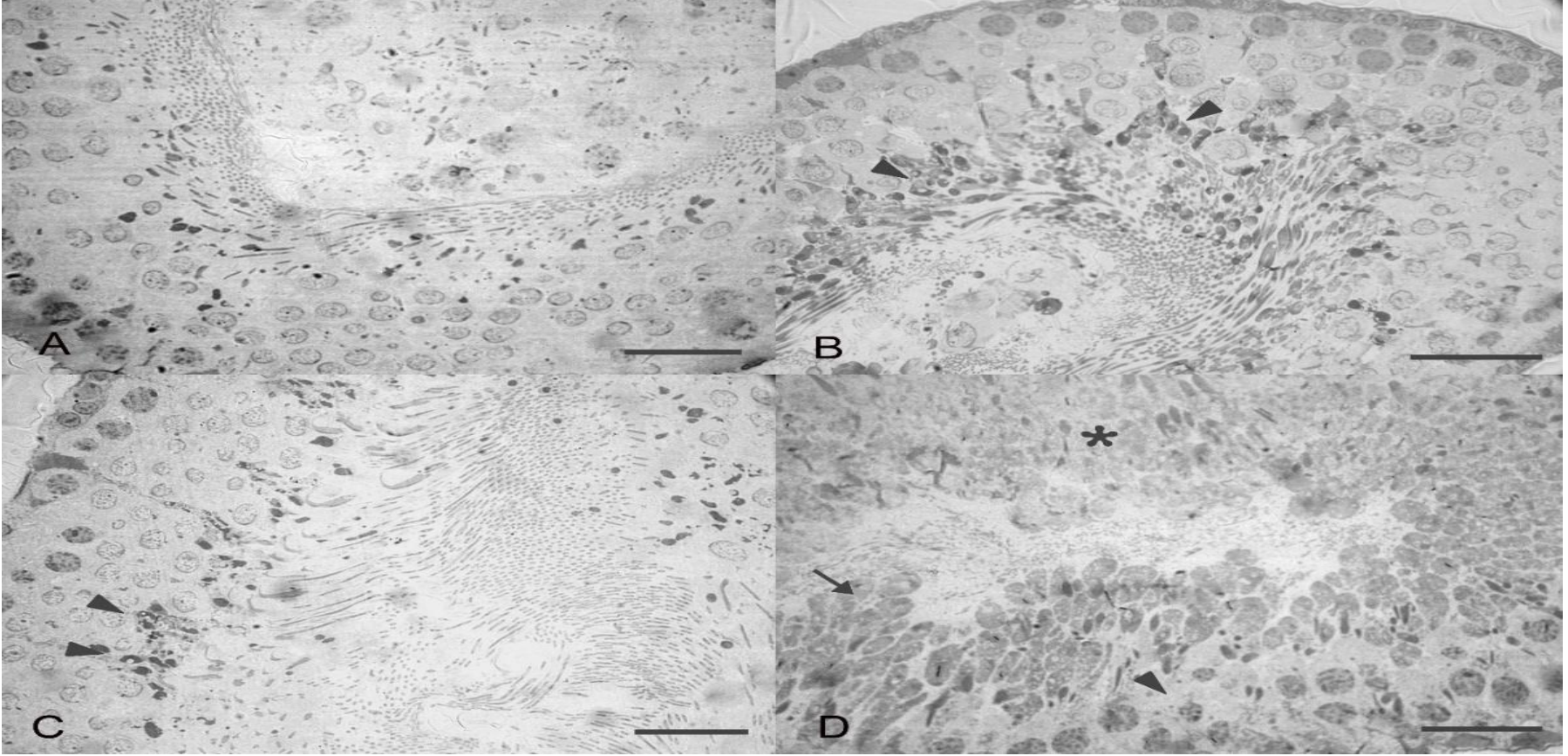
Kontrol sıçanlarında normal bir spermatogenez ve zarar görmemiş durumdaki germinal epitel görülmektedir. LEV-50 ve LEV-150 gruplarında seminifer epitel döngüsü basamakları korunmuştur. Spermatositler ve genç spermatidler normal görülmektedir. Ancak özellikle olgunlaşmanın son aşamasındaki spermatidlerde hafif vakuolizasyon ve dejenerasyon gözlenmiştir. LEV-300 grubunda tübüler dejenerasyon spermatojenik serilerde organizasyon bozuklukları ve tübüler lümendeki sperm sayısında azalmayı indüklemiştir. Bu gruptaki spermatojenik serilerde hücrel yapıda bozulmalar görülmektedir. Spermatidlerde şişme, vakuolizasyon ve nekroz gözlenmiştir.

Histopatolojik inceleme bulguları, LEV-50 ve LEV-150 gruplarında testiküler dokunun hafif düzeyde etkilendiğini ancak LEV-300 grubunda tübüler ve hücrel yapının hasara uğradığını göstermiştir. LEV'in özellikle spermatid yapısını ve sperm üretimini etkilediği gözlemlenmiştir. Olgunlaşmanın son aşamasındaki spermatidlerde, düşük dozlarda hafif patolojik lezyonlar görülmekle birlikte yüksek dozda nekrozunda dahil olduğu dramatik değişimler görülmüştür.



A: Kontrol sıçanlarında bütünlük halindeki spermatojenik seriler ve seminifer tubulin normal yapısı (ss); B ve C: Sırasıyla LEV-50 ve LEV-150 deney gruplarındaki sıçanlarda kısmen korunmuş yapıdaki spermatojenik seriler (ss) ve tübüler lümende (L) gözönüne alınabilir sayıda spermatozoa; D: LEV-300 grubundaki sıçanlarda tübüler dejenerasyon, spermatojenik serilerde (ss) organizasyon bozuklukları ve tübüler lümendeki (L) sperm sayısında önemli derecedeki azalma. (Büyütme ölçeği: 50 μ m)

Şekil 9. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Sıçanlarda Seminifer Tübüller



A: Kontrol sıçanlarında hasar görmemiş spermatojenik seriler; B ve C: Sırasıyla LEV-50 ve LEV-150 deney gruplarındaki sıçanlarda hafif vakuolizasyon ve olgunlaşmanın son aşamasındaki spermatidlerde dejenerasyon (►); D: LEV-300 deney grubundaki sıçanlarda spermatojenik serilerde (►) hücresel yapının kaybı, spermatidlerde şişme, vakuolizasyon (→) ve nekroz (*). (Büyütme ölçeği: 20 μ m)

Şekil 10. Kontrol ve Deney Grup Sıçanlarında Germinal Epitelin Detaylı Yapısı

Tartışma

Dünyadaki teknolojik ve endüstriyel gelişmelere bağlı olarak artan kimyasal maruziyeti insanlarda sağlık ile ilişkili problemlerin görülme sıklığını arttırmıştır. Bu kimyasallara maruziyetlerin sonucu olarak meydana gelen sağlık problemleri arasında reproduktif sistemde gerçekleşen hasarlar da günümüzde giderek önem kazanmıştır (Hoyer, 2001). Reproduktif toksik etkiler açısından ise özellikle infertilite son yıllarda ilgi odağı haline gelmiştir. Epidemiyolojik çalışmalara göre 1960-2002 yılları arasında fertilite oranı %45 oranında azalmış ve bu vakaların yarısında erkek kaynaklı faktörlerin rol oynadığı tespit edilmiştir. Kimyasal maddelere ve çevresel kirleticilere maruziyetin erkek kaynaklı infertilite vakaları için en önemli riski oluşturduğu ve bu maruziyetlerin semen kalitesini azalttığı saptanmıştır (Liu ve ark., 2012). Semen kalitesindeki azalmaların infertilite dışında embriyo ölümüne, düşük riskine, düşük ağırlıklı doğuma, konjenital anomalilere, nörogelişimsel bozukluklara ve diğer çocukluk dönemi hastalıklarına neden olabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenlerden dolayı günümüzde çevresel, mesleki toksikanlar ile terapötik ajanlara artmış maruziyetlerin reproduktif toksik etkilerinin incelenmesinin öneminin giderek arttığı vurgulanmıştır (Wisniewski ve ark., 2015).

Epilepsi, antiepileptik ilaçlar ve reproduktif fonksiyon arasında karmaşık bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Epilepsili erkeklerde %22-67 oranında reproduktif disfonksiyon meydana geldiği tespit edilmiştir (Montouris ve Morris, 2005; Calabrò ve ark., 2011). Çalışmalarda reproduktif disfonksiyon hem epilepsi hem de antiepileptik ilaç kullanımı ile ilişkilendirilmiştir (Isojärvi, 2008). Hem nöbet gelişimi hem de antiepileptik ilaçlar hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini etkileyerek hormon seviyelerini değiştirmekte ve reproduktif bozukluklara neden olabilmektedir (Montouris ve Morris, 2005; Calabrò ve ark., 2011).

Varolan bilgiler doğrultusunda tez çalışması kapsamında, çocukluk, ergenlik ve yetişkinlik dönemlerini kapsayan reproduktif gelişme ve olgunlaşma süreci ile reproduktif yaşlarda sıklıkla reçete edilen LEV'in insanlarda olası reproduktif toksisitenin öngörülmesi doğrultusunda erkek sıçanlarda reproduktif toksisitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bilindiği gibi reproduktif toksisitenin değerlendirilmesinde hayvan çalışmaları oldukça önem taşımaktadır. Reproduktif açıdan insana daha fazla benzeyen, reproduktif aşamaları iyi aydınlatılmış ve toksikolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan sıçanlar ile erkek reproduktif sistem toksisitesi değerlendirilebilmektedir (Working, 1988; Herbert ve ark., 1995). Çalışmamızın amacı doğrultusunda vücut ağırlığı, testis ağırlığı, epididimis ağırlığı, testis histolojisi, sperm sayısı, motilitesi, morfolojisi ve DNA'sı gibi reproduktif toksisitenin biyogöstergeleri (Working, 1988) sıçanlarda 70 günlük LEV maruziyetini takiben tespit edilmiştir. Ek olarak olası toksisitede hormonal regülasyonun ve oksidatif stresin rolü incelenmiştir.

Kimyasal maruziyeti ile ilişkili toksisite çalışmalarında vücut ve organ ağırlıkları toksisitenin belirlenmesinde kullanılan hassas biyogöstergelerdir (Kong ve ark., 2014). Ağırlık değişimleri, belli organ ve sistemlerin fonksiyonlarındaki bozulmaları yansıtmaktadır. Testiküler dokuda dejenerasyona bağlı olarak

testiküler ağırlıkta azalma meydana gelebilmektedir (Jayachandra ve AnnGie, 2013). Ancak çalışmamızda LEV uygulaması ile relatif testis ve epididimis ağırlıkları açısından anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Bu noktada testis ve epididimiste meydana gelen ödem ya da efferent kanalların tıkanması gibi etkenler sebebiyle relatif ağırlık değişimlerinin gözden kaçabileceği vurgulanmalıdır (Kimmel ve ark., 1995). Çalışmamızda ağırlık değişimleri ile ilgili diğer bir bulgu ise LEV uygulaması ile doz bağımlı olarak meydana gelen % ağırlık değişimlerindeki azalmadır. Antiepileptik ilaçların kilo kaybına neden olup olmadıkları uzun yıllardır araştırılmaktadır (Ben-Menachem, 2007; Antel ve Hebebrand, 2012). LEV tedavisi ile de ciddi kilo azalma vakaları rapor edilmiş ve LEV'in hastalarda doz bağımlı olarak yaşam kalitesini bozacak düzeyde kilo kaybına neden olabileceği vurgulanmıştır (Gelisse ve ark., 2008).

Erkek reproduktif sistem toksisitesinin değerlendirilmesinde temel biyogöstergeler olan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile semen kalitesi değerlendirilmektedir (Ong ve ark., 2002). Çalışma sonuçlarımıza göre, LEV uygulaması ile sıçanlarda doza bağlı olarak sperm konsantrasyonunda azalmalar tespit edilmiştir. Histopatolojik incelemelerde de bu bulguyu destekler nitelikte tübüler lümende azalan spermatid sayısı izlenmiştir. Fertilite ile yüksek korelasyon gösteren sperm motilitesi de (Toman ve ark., 2014) LEV-300 grubunda belirgin olmak üzere azalmıştır. Spermin hareketliliği spermin servikse ve fallop tüpüne ulaşması ve oosit ile bütünleşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle sperm motilitesindeki azalmalar kimyasallar ile indüklenen infertilitenin önemli bir etkeni olarak kabul edilmektedir (Jayachandra ve AnnGie, 2013). Semen kalitesinin belirlenmesinde diğer önemli parametre olan sperm morfolojisi spermatogenezin geç aşamalarına dek devam etmektedir (Ong ve ark., 2002). Dolayısıyla sperm morfolojisi, spermin testiste olgunlaşma sürecinin bir sonucudur ve testiküler fonksiyonların değerlendirilmesi için önemli bir parametre olarak kabul görmektedir (Jayachandra ve AnnGie, 2013). EPA, FDA, OECD, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH) gibi düzenleyici otoriteler erkek üreme toksisitesi çalışmalarında özellikle sperm baş anomalilerin göz önünde bulundurulmasını önermiştir (Trivedi ve ark., 2010). Ayrıca sperm boyun ve kuyruk anomalileri de infertilite etkeni olabilir (van der Horst ve Maree, 2009). Özellikle bükülmüş kuyruk ve kıvrılmış/sarmal kuyruk anomalileri gibi sperm kuyruk anomalileri infertilite ile ilişkilendirilmiştir (Svalheim ve ark., 2015). Çalışma sonuçlarımıza göre, LEV-150 ve LEV-300 gruplarında belirgin olmak üzere LEV tedavisi ile sperm morfolojisinde anomaliler tespit edilmiştir. İnfertilite açısından önemli biyogöstergeler olarak kabul edilen baş anomalileri LEV-300 grubunda, kuyruk anomalileri ise hem LEV-150 hem de LEV-300 grubunda izlenmiştir. Semen kalitesinin göstergeleri olarak kabul edilen sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi açısından LEV uygulanan gruplarda, özellikle yüksek doz LEV grubunda belirgin olmak üzere, sperm konsantrasyonunun, sperm motilitesinin ve normal sperm morfolojisinin azaldığı gözlenmiştir. Bu noktada LEV'in sperm parametreleri üzerine etkilerine dikkat çeken çalışmalar olmasa da diğer antiepileptik ilaçların sperm konsantrasyonunu,

motilitesini ve normal sperm morfolojisini azalttığı çalışmalarda gösterilmiştir (Daoud ve ark., 2004; Ootom ve ark., 2004; Andretta ve ark., 2014; Svalheim ve ark., 2015; Isojärvi, 2008). Dolayısıyla LEV farklı etki mekanizması sebebi ile diğer antiepileptiklere göre daha güvenilir kabul edilse de sperm parametreleri açısından diğer antiepileptik ilaçlar gibi sperm kalitesi üzerine olası advers etki potansiyelinin gözardı edilmemesi gerekmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda LEV tedavisinin erkeklerde semen kalitesini azaltarak fertilitiyi olumsuz yönde etkileyebileceği öne sürülebilir.

Erkek reproduktif fonksiyonlarının regülasyonunda FSH, LH ve testosteron gibi hormonlar rol oynamakta ve bu nedenle reproduktif toksisite çalışmalarında bu hormon seviyelerinin belirlenmesi önem taşımaktadır (http-6). Bilindiği gibi ön hipofizden hipotalamik gonadotropin salıverici hormon aracılıklı LH ve FSH salıverilmektedir. LH, Leydig hücrelerinden testosteron salımını stimule etmektedir. Leydig hücrelerinden salıverilen testosteron ise sekonder seksüel özelliklerin kazanılması ve spermatozoa üretimi için gereklidir. FSH, Sertoli hücrelerinde spermatozoa oluşumunu regüle etmektedir (Wisniewski ve ark., 2015). Bahsedilen bu hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini pek çok faktörden etkilenebilmektedir. İlaçlar dahil kimyasal maddeler hem erkeklerde hem de kadınlarda bu eksenin normal işleyişini bozarak fertilitiyi azaltmakta hatta infertiliteye neden olabilmektedir (Lin ve ark., 2014). Antiepileptik ilaçların da hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini etkileyerek reproduktif disfonksiyona neden olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Calabrò ve ark., 2011; Svalheim ve ark., 2009; Kumar ve Kuar, 2014; Daoud ve ark., 2004; Ootom ve ark., 2004; Andretta ve ark., 2014; Isojärvi, 2008). Çalışmamızda da LEV-300 grubunda belirgin olmak üzere LEV uygulaması ile gruplarda azalan plazma FSH, LH ve testosteron seviyeleri elde edilmiştir. Epilepsi hastaları ile yapılan çalışmalarda LEV tedavisi ile erkeklerde LH ve FSH seviyeleri açısından anlamlı bir fark elde edilmezken testosteron seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (Tauboll ve ark., 2009; Svalheim ve ark., 2009). Diğer bir çalışmada da benzer şekilde hastalarda testosteron seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Harden ve ark., 2010). Prepubertal çocuklarda ise epilepsinin LEV ile tedavisi hormon seviyelerinde anlamlı bir değişime neden olmamıştır (Rauchenzauner ve ark., 2010). Bu hormonal homeostazın bozulması sonucu spermatogenez süreci ve sperm olgunlaşmasında bozukluklar meydana gelebilmektedir. Plazmada LH seviyesinin azalması direkt olarak Leydig hücrelerinin testosteron üretimini azaltabilmektedir. Bilindiği gibi spermatogenez süreci dışında epididimiste de spermatozoanın transferi ve depolanması için androjenlere ihtiyaç duyulmaktadır. Testosteron seviyesinin azalması bu süreçleri de etkileyerek reproduktif disfonksiyona neden olabilmektedir (Wisniewski ve ark., 2015). Çalışmalara göre testosteron seviyesi spermatogenik hücre hasarı ve spermatogenez sürecindeki bozuklukların seviyesine dikkat çekmektedir. Testiküler hasarın şiddetini azalmış testosteron seviyeleri yansıtmaktadır (Lin ve ark., 2014). Spermatogenez sürecinde hücrelerde hasar oluşumu ve azalan seks hormon seviyeleri sperm üretiminde gerçekleşen bozuklukların altında yatan nedenler olarak tanımlanmaktadır (Jayachandra ve AnnGie, 2013). Dolayısıyla

gruplarımızda LEV uygulaması ile tespit edilen semen kalitesindeki azalmaları gruplarda elde edilen testosteron seviyelerindeki azalmalar ile ilişkilendirmek mümkündür. LEV'i diğer antiepileptik ilaçlardan ayıran etki mekanizmasının temelini SV2A'ya bağlanması oluşturmaktadır. SV2A proteini santral sinir sistemi dışında organizmadaki endokrin dokulara da dağılım göstermektedir. LEV'in endokrin etkilerine yine bu proteinin aracılık edebileceği başka çalışmalarda vurgulanmıştır (Svalheim ve ark., 2009; Harden ve ark., 2010)

Ayrıca, bu noktada antiepileptik ilaçların serotonerjik aşırımı modüle ederek de reproduktif ve seksüel bozukluklara yol açtığı vurgulanmalıdır (Calabrò ve ark., 2011). LEV'in de presinaptik P/Q-tip kalsiyum kanalları aracılığıyla dopamin/serotonin dengesinin bozulmasına yol açarak seksüel bozukluklara neden olabileceği belirtilmiştir (Calabrò ve Bramanti, 2013). Artmış serotonin seviyeleri hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninin geri bildirim mekanizmasını bozmaktadır (Csoka ve Shipko; 2006). Dolayısıyla, LEV'in aracılık ettiği FSH, LH ve testosteron seviyelerindeki değişimlere serotonerjik yolak üzerindeki etkinliğinin katkısı olabileceği akla getirilmelidir.

Oksidatif stresin semen kalitesinin azalmasının ve erkek infertilitesinin önemli bir etkeni olduğu düşünülmektedir (Giribabu ve ark., 2014; Fanaei ve ark., 2014). Semen kalitesi, reproduktif yapılardaki ROS ve antioksidan seviyeleri arasındaki denge ile kontrol edilmektedir. Ejekülasyonun ardından antioksidan savunma sisteminin aktivitesi azalırken, ROS üretimi sperm metabolizması süresince artmakta ve bu nedenle oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres intraselüler ATP seviyesinin azalmasına, mitokondriyal membranın bozulması ile sitozole apoptojenik faktörlerin salıverilmesine (pro-kaspazları sitokrom C, apoptosis-indükleyen faktörler), enzim disfonksiyonuna, protein fosforilasyonun bozulmasına, membran permeabilitesinin artmasına ve spermisidal ürünlerin oluşumuna neden olarak semen kalitesini azaltmaktadır (Fanaei ve ark., 2014). Özellikle sperm plazma membranının yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri içeriği onu oksidatif strese duyarlı hale getirmektedir (Ong ve ark., 2002; Giribabu ve ark., 2014). Ek olarak spermdeki antioksidan savunma mekanizmasının yetersizliği spermi oksidatif strese karşı savunmasız hale getirmektedir (Lewis ve ark., 2013). Çalışma sonuçlarımıza göre LEV-150 ve LEV-300 gruplarında belirgin olmak üzere LEV uygulaması ile gruplarda antioksidan sistemler olan SOD, KAT ve GSH seviyelerinin azaldığı ve oksidatif stresin göstergesi olan MDA seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda LEV uygulaması ile testiküler dokuda oksidatif stresin indüklendiği söylenebilir. Sonuçlarımızdan farklı olarak oksidatif stresin indüklendiği patolojilerde LEV uygulamasının antioksidan etkinliği gösterilmiştir (Marini ve ark., 2004; Oliveira ve ark., 2007; Ueda ve ark., 2009; Mazhar ve ark., 2014; Abdel-Wahab ve ark., 2015). LEV'in konvülzan etkinin çeşitli maddeler ile indüklendiği epilepsi modellerindeki antioksidan etkinliği SV2A proteini ile ilişkilendirilmiştir. LEV'in SV2A proteini aracılığıyla sinaptik aşırımı düzenlemesi ile epileptik odakları inhibe ettiği, dolayısıyla oksidatif stresin bu odakların inhibisyonu ile azaldığı vurgulanmıştır (Sargentini-Maier ve ark., 2008). Farklı olarak, Sarangi ve arkadaşlarının (2013) yaptığı diğer

bir çalışmada LEV uygulamasının ardından sıçan beyin dokusunda oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir. LEV ile indüklenen oksidatif stresi destekler nitelikte Varoğlu ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada ise epilepsi hastalarında LEV tedavisi ile antioksidan parametrelerde azalma ve oksidan parametrelerde artma tespit edilmiştir. Semen kalitesindeki azalmalar testis dokusundaki oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir (Giribabu ve ark., 2014; Attia ve Bakheet, 2014). Bu noktadan hareketle LEV uygulanan gruplarda gözlenen semen kalitesindeki azalmalar testiküler yapıdaki oksidatif stres ile ilişkilendirilebilir.

Sperm fonksiyonunu ve yapısal değişimlerini değerlendirmek için DNA'nın yapısal bütünlüğünü saptamak gerekmektedir (Ong ve ark., 2002). Sperm DNA bütünlüğü, spermin üreme kapasitesinin bir göstergesidir (Khan ve ark., 2015). Bu noktada ROS'un sperm DNA hasarına neden olarak erkeklerde infertilite oluşumuna sebep olabileceği vurgulanmalıdır (Ong ve ark., 2002). Sperm DNA onarım mekanizmalarının yetersizliği sperm DNA'sını oksidatif strese karşı daha da duyarlı hale getirmektedir (Lewis ve ark., 2013). Bu bulguları destekler nitelikte spermdeki oksidatif DNA hasarının erkek infertilitesi ile ilişkili olduğunu gösteren en önemli kanıt ise infertil hastalarda oksidatif DNA ürünü olan 8-hidroksideoksiguanozin seviyelerinin yüksekliğidir. İnsan sperminde DNA kırıklarının ve DNA fragmentasyonunun belirlenmesinde tek hücre jel elektroforezi (Comet) ve terminal deoksinükleotid transferaz nick-end abeling testi (TUNEL) sıklıkla kullanılmaktadır (Ong ve ark., 2002). Nötral comet yöntemi insan sperminde DNA hasarının belirlenmesinde diğer yöntemlere göre daha kolay, daha ucuz ve çift sarmal kırıklarının tespitinde daha hassas bir yöntem olarak kabul görmektedir (Chi ve ark., 2011). Comet yöntemi ile DNA hasarının kantitatif belirlenmesinde pek çok parametre kullanılmakla birlikte kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk momenti en çok kullanılan parametrelerdir. Kuyruk uzunluğunun genotoksik bir ajana maruz kalındığında ilk hasarın belirlenmesinde, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesinin ise DNA hasar yoğunluğunun belirlenmesinde kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Knopper, 2005; Møller ve ark., 2014). Ancak yapılan birçok çalışma ile kuyruk momentinin DNA hasarının belirlenmesinde daha iyi bir gösterge olduğu belirtilmiştir (Morris ve ark., 2002; Hauser ve ark., 2003; Olive ve Banáth, 2006; Rasool ve ark., 2012). Çalışmamızda LEV uygulanan gruplarda doz bağımlı olarak nötral comet yöntemi ile sperm DNA hasarının arttığı tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada LEV'in dişi sıçanlara gebeliğin 5 - 18. günleri arasında uygulanması ile hem dişi sıçanların ve hem de fetüslerin beyin ve karaciğer dokularında DNA hasarını arttırdığı comet yöntemi ile gösterilmiştir (El-Shorbagy ve Hamdi, 2016). Çalışmamızda, LEV uygulaması ile spermde DNA hasarının meydana geldiği ilk kez gösterilmiştir. LEV histon deasetilaz enzimini inhibe ederek DNA'da histon modifikasyonuna neden olmakta ve bu durum kromatin dekonduksiyonuna yol açmaktadır (Stettner ve ark., 2011; Shi ve ark., 2013). LEV ile sperm DNA'sunda tespit edilen hasar yine LEV ile indüklenen oksidatif stres ve DNA histon modifikasyonu ile ilişkilendirilebilir. Sperm baş morfolojisi de kimyasalların sperm DNA'sı için mutajenik potansiyelinin indirekt bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Yapılan bir çalışmada sperm baş anomalileri ile sperm DNA hasarının pozitif korelasyonu tespit edilmiş ve sperm baş morfolojisindeki bozuklukların spermin genetik materyalinin zedelenmesinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Trivedi ve ark., 2010). Çalışmamızda da yüksek doz LEV uygulanan gruplarda belirgin olmak üzere LEV uygulamasıyla artan sperm baş anomalileri, LEV ile indüklenen DNA hasarının bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Erkek reproduktif toksisitesinin değerlendirilmesinde histopatolojik incelemelerde toksisiteyi işaret eden en önemli patolojik bulgular vakuolleşme ve şişmeyi takiben spermatosit hasarı, hücrel dejenerasyon ve hücrel disorganizasyondur (Creasy, 2001). Çalışmamızda da elde edilen histopatolojik bulgularda düşük doz grubunda hafif seyreden vakuolleşme, artan dozlar ile belirginleşen hücrel şişme, spermatid hasarı, dejenerasyon ve nekroza kadar ilerleyen bir tablo izlenmiştir.

Çalışma sonuçlarımıza göre, sıçan modeli kullanılarak fizyolojik spermatogenez sürecini kapsayan dönemde LEV uygulamasını takiben değerlendirilen sperm sayısı, motilitesi, morfolojisi ve DNA'sında tespit edilen toksikolojik bulgulara eşlik eden reproduktif fonksiyonların regülasyonunda rol oynayan hormon seviyelerindeki değişimler ve oksidatif stres bulguları LEV ile indüklenen reproduktif toksisitenin göstergeleri olarak yorumlanmıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Epilepsi kronik ve nörodejeneratif bir hastalık olması yanında tedavi sürecinde kullanılan antiepileptik ilaçların toksisite problemleri sebebi ile de tedavide kullanılabilecek alternatif ilaçlar için araştırma/geliştirme süreçlerinin devam ettiği önemli bir sağlık problemidir. Son yıllarda ilaç kaynaklı reproduktif toksik etkiler belirgin düzeyde artmıştır. Antiepileptik ilaçların da hormonal regülasyonu bozarak ve ya testiküler dokuda oksidatif stresi indükleyerek reproduktif toksik etkilere sebep oldukları gösterilmiştir. LEV antiepileptik ilaçlar arasında hepatik olmayan biyotransformasyonu sebebi ile diğer ilaçlarla etkileşim açısından risk oluşturmaması ve diğer antiepileptiklerden farklı olduğu düşünülen etki mekanizması sonucu görece daha güvenilir advers etki profiline sahip olması gibi nedenler ile hem kombine hem de tekli tedavide her yaş grubunda kullanılmaktadır. Epilepsi tedavisinde yaygın bir kullanımı olan LEV'in erkek reproduktif sistem üzerine toksik etkilerini tanımlayacak herhangi bir çalışma bulunmadığı dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasında, LEV'in reproduktif sistem üzerine toksik etkilerinin erkek sıçanlarda tam bir spermatogenez sürecini kapsayacak şekilde uygulanmasıyla araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre LEV, reproduktif organ ağırlıklarını değiştirmemiş fakat vücut ağırlığını azaltmıştır. Sperm kalitesinin önemli göstergeleri olan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisini olumsuz etkiler ve sperm DNA hasarına neden olarak gruplarda sperm kalitesini azaltmıştır. Ayrıca, testis dokusunun histopatolojik incelemesi sonucunda gruplarda testisküler dejenerasyon gözlenmiştir. Çalışmada, LEV ile indüklenen reproduktif toksik etkiler FSH, LH ve testosteron seviyelerindeki azalmalar ve testis dokusunda tespit edilen oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda reproduktif toksisite göstergeleri açısından LEV'in diğer antiepileptik ilaçlar gibi reproduktif toksik etkilere sebep olabileceği belirtilmelidir. İlerleyen aşamalarda, olası toksisitenin mekanistik olarak aydınlatılması için LEV'in reproduktif toksisite hedeflerinin aydınlatılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra insanlarda toksisite riskinin tanımlanması için retrospektif çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bir gerçektir. Bir sonraki aşamada, reproduktif toksisite çalışmaları dünyaca kabul gören yönetmeliklere uygun olarak tasarlanarak LEV'in fertilizasyon kapasitesi üzerine etkilerini tanımlayacak çalışmalara ihtiyaç duyulduğu vurgulanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahab, B.A., Shaikh, I.A., Khateeb, M.M., Habeeb, S.M., Omega 3 polyunsaturated fatty acids enhance the protective effect of levetiracetam against seizures, cognitive impairment and hippocampal oxidative DNA damage in young kindled rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 135, 105-113 (2015).
- Alzahrana, T., Kaya, D., Alqahtanib, S.A., Makkeb, Y., Leskya, L., Koubeissib, M.Z., Levetiracetam-induced pancytopenia, *Epilepsy Behav. Case Rep.*, 4, 45-47 (2015).
- Andretta, R.R., Okada, F.K., Paccola, C.C., Stumpp, T., de Oliva S.U., Miraglia, S.M., Carbamazepine-exposure during gestation and lactation affects pubertal onset and spermatogenic parameters in male pubertal offspring, *Reprod. Toxicol.*, 44, 52-62 (2014).
- Antel J. and Hebebrand J., Weight-Reducing Side Effects of the Antiepileptic Agents Topiramate and Zonisamide, Appetite control, H-G. Joost (Eds.), Springer, Berlin, 433-437 (2012).
- Attia, S.M., Bakheet, S.A., Citalopram at the recommended human doses after long-term treatment is genotoxic for male germ cell, *Food Chem. Toxicol.*, 53, 281-285 (2013).
- Bancroft, J.D., Gamble, M., Theory and Practice of Histological Techniques, E.P. Churchill Livingstone, Edinburgh, 172-175, 2002.
- Ben-Menachem, E., Weight issues for people with epilepsy--a review, *Epilepsia*, 48 (9), 42-45 (2007).
- Bialer, M., Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs), *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 64 (10), 887-895 (2012).
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M.L., Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species, *Semin. Fetal Neonatal Med.*, 15 (4), 186-190 (2010).
- Calabrò, R.S., Bramanti, P., Levetiracetam-induced sexual disorders, *Seizure*, 22 (4), 329 (2013).
- Calabrò, R.S., Marino, S., Bramanti, P., Sexual and reproductive dysfunction associated with antiepileptic drug use in men with epilepsy, *Expert Rev. Neurother.*, 11 (6), 887-895 (2011).
- Chambers, C., Schaefer, C., Epilepsy and antiepileptic medications, *Drugs During Pregnancy and Lactation: Treatment Options and Risk Assessment*, C. Schaefer, (Eds.), P.W.J. Peters (Eds.), R.K. Miller (Eds.), Elsevier, London, 251-291 (2015).
- Chi, H., Chung, D., Choi, S., Kim, J., Kim, G., Lee, J., Lee, H., Kim, M., Roh, S., Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program, *Clin. Exp. Reprod. Med.*, 38 (1), 10-17 (2011).

- Chung, S., Sperling, M.R., Biton, V., Krauss, G., Hebert, D., Rudd, G.D., Doty, P., SP754 Study Group, Lacosamide as adjunctive therapy for partial-onset seizures: a randomized controlled trial, *Epilepsia*, 51 (6), 958-967 (2010).
- Coder, P.S., Slotter, E.D., Stump, D.G., Nemec, M.D., Bowman, C.J., Evaluation of a Male Reproductive Toxicant, *Comprehensive Toxicology* 2nd Edition, C. McQueen (Eds.), Elsevier Science, The Boulevard, Volume 11.03, 62-85 (2010).
- Creasy, D.M., Pathogenesis of male reproductive toxicity, *Toxicol. Pathol.*, 29 (1), 64-76 (2001).
- Csoka, A.B., Shipko, S., Persistent Sexual Side Effects after SSRI Discontinuation, *Psychother. Psychosom.*, 75, 187-188 (2006).
- Daoud, A.S., Bataineh, H., Ootom, S., Abdul-Zahra, E., The effect of Vigabatrin, Lamotrigine and Gabapentin on the fertility, weights, sex hormones and biochemical profiles of male rats, *Neuro. Endocrinol. Lett.*, 25 (3), 178-183 (2004).
- Demott, R.P., Borgert, C.J., Reproductive Toxicology, Principles of Toxicology Environmental and Industrial Applications 2nd Edition, P.L. Williams (Eds.), R.C. James (Eds.), S. M. Roberts (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, 209-236 (2000).
- Deshpande, L.S., Delorenzo, R.J., Mechanisms of levetiracetam in the control of status epilepticus and epilepsy, *Front. Neurol.*, doi: 10.3389/fneur.2014.00011, eCollection (2014).
- El-Shorbagy, H.M., Hamdi, H., Genotoxic and Mutagenic Studies of The Antiepileptic Drug Levetiracetam in Pregnant Rats and Their Fetuses, *Int. J. Pharm. Sci.*, 8 (2), 82-88 (2016).
- Erdemir, F., Fırat, F., Gençten, Y., Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi, *Türk Urol. Sem.*, 2, 11-17 (2011).
- Fanaei, H., Khayat, S., Halvaei, I., Ramezani, V., Azizi, Y., Kasaeian, A., Mardaneh, J., Parvizi, M.R., Akrami, M., Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples, *Iran J. Reprod. Med.*, 12 (2), 103-110 (2014).
- Faught, E., Helmers, S.L., Begley, C.E., Thurman, D.J., Dilley, C., Clark, C., Fritz, P., Newer antiepileptic drug use and other factors decreasing hospital encounters, *Epilepsy Behav.*, 45, 169-175 (2015).
- Filler, R., Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology, Male reproductive toxicology, R.E. Chapin and J.H. Heindel (Eds.), Academic Press, California, 334-343 (1993).
- Gambardella, A., Labate, A., Colosimo, E., Ambrosio, R., Quattrone, A., Monotherapy for partial epilepsy: focus on levetiracetam, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 4 (1), 33-38 (2008).

Gelisse, P., Juntas-Morales, R., Genton, P., Hillaire-Buys, D., Diaz, O., Coubes, P., Crespel, A., Dramatic weight loss with levetiracetam, *Epilepsia*, 49 (2), 308-315 (2008).

Genç, F., Kutlu, G., Biçer Gömceli, Y., İnan, L.E., Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Epilepsi Bölümü'nde Düzenli Takip Edilen Dirençli Epilepsi Hastalarının Demografik ve Klinik Bulguları, *Epilepsi*, 19 (2), 79-84 (2013).

Giribabu, N., Kumar, K.E., Rekha, S.S., Muniandy, S., Salleh, N., *Chlorophytum borivilianum* (Safed Musli) root extract prevents impairment in characteristics and elevation of oxidative stress in sperm of streptozotocin-induced adult male diabetic Wistar rats, *BMC Complement. Altern. Med.*, 14, 291-307 (2014).

Gromadzka-Ostrowska, J., Dziendzikowska, K., Lankoff, A., Dobrzyńska, M., Instanes, C., Brunborg, G., Gajowik, A., Radzikowska, J., Wojewódzka, M., Kruszewski, M., Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats, *Toxicol. Lett.*, 214 (3), 251-258 (2012).

Hall, J.E., "Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 12thEd., Elsevier Limited, The Boulevard, 973-986 (2011).

Harden, C.L., Nikolov, B.G., Kandula, P., Labar, D.R., Pannullo, S., Effect of levetiracetam on testosterone levels in male patients, *Epilepsia*, 51 (11), 2348-2351 (2010).

Harden, C., Safety profile of levetiracetam, *Epilepsia*, 42 (4), 36-39 (2001).

Hauser, R., Singh, N.P., Chen, Z., Pothier L., Altshul, L., Lack of an association between environmental exposure to polychlorinated biphenyls and *p,p'* DDE and DNA damage in human sperm measured using the neutral comet assay, *Hum. Reprod.*, 18 (12), 2525-2533 (2003).

Herbert, D.C., Supakar, P.R., Roy, A.K., Male Reproduction, *Reproductive Toxicology* 2nd Edition, R. J. Witorsch, Raven Press, Ltd., New York, 3-23 (1995).

Hole, J.W., Human anatomy & physiology 6th Edition, Wm. C. Brown (Eds.), Inc., Dubuque, Iowa, 804-818, 1993.

Hoyer, P.B., Reproductive toxicology: current and future directions, *Biochem. Pharmacol.*, 62 (12), 1557-1564 (2001).

http-1 WHO Fact Sheets 2015 World Health Organization. Epilepsy: Key facts 2015 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> (07.06.2015).

http-2 Epilepsi Rehberi <http://www.noroloji.org.tr/TNDDData/Uploads/files/epilepsi.pdf> (12.11.2015).

http-3 Spermatogenesis <http://global.britannica.com/science/spermatogenesis> (05.11.2015).

http-4 Normal spermatozoa structure <http://www.medical-labs.net/normal-spermatozoa-structure-1736/> (05.11.2015).

http-5 Infertility Fact Sheet <http://www.hhs.gov/opa/pdfs/infertility-fact-sheet.pdf> (12.09.2015).

http-6 US EPA Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment EPA/630/R-96/009 dated October 1996 http://www2.epa.gov/sites/production/files/201411/documents/guidelines_repro_toxicity.pdf (27.05.2015).

http-7 OECD Guideline For Testing of Chemicals Two-Generation Reproduction Toxicity Study Guideline 416 dated January 2001 <http://www.oecdilibrary.org/docserver/download/9741601e.pdf?expires=1394537191&id=id&accname=guest&checksum=4BD261B2270C036B2009759CF5AE3A1C> (27.05.2015).

http-8 WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction 1999 http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf (27.05.2015).

Isojärvi, J., Disorders of reproduction in patients with epilepsy: antiepileptic drug related mechanisms, Seizure, 17 (2), 111-119 (2008).

Jayachandra, S., AnnGie N., Possible toxic effect of antihypertensive drug olmesartan on male reproductive system of rat, Int. J. Basic Clin. Pharmacol., 2 (1), 83-88 (2013).

Jenkins, G.W., Tortora, G.J., Anatomy and physiology: from science to life 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 926-940, 2013.

Johannessen Landmark, C., Patsalos, P.N., Drug interactions involving the new second- and third-generation antiepileptic drugs, Expert Rev. Neurother., 10 (1), 119-140 (2010).

Kadioğlu, A., WHO Laboratuvar El Kitabı: İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, 7-113, 2011.

Karatağ, T., Kendirci, M., Erkek infertilitesinde antioksidan tedavinin yeri, Androloji Bülteni, 55, 263-267 (2013).

Khan, S., Jan, M.H., Kumar, D., Telang, A.G., Firpronil induced spermatotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats, Pestic. Biochem. Physiol., 124, 8-14 (2015).

Kimmel, G.L., Clegg, E.D., Crisp, T.M., Reproductive Toxicity Testing: A Risk Assessment Perspective, Reproductive Toxicology 2nd Edition, R.J. Witorsch (Eds.), Raven Press, Ltd., New York, 75-99 (1995).

Kitano, Y., Komiyama, C., Makino, M., Takasuna, K., Satoh, H., Aoki, T., Kinoshita, M., Takazawa, A., Yamauchi, T., Sakurada, S., Anticonvulsant and neuroprotective effects of the novel nootropic agent nefiracetam on kainic acid-induced seizures in rats, Brain Res., 1057 (1-2), 168-176 (2005).

- Knopper, L.D., Use of The Comet Assay to Assess Genotoxicity In Mammalian, Avian, and Amphibian Species, Technical Report Series No. 429, Canadian Wildlife Service, 2005.
- Kong, L., Tang, M., Zhang, T., Wang, D., Hu, K., Lu, W., Wei, C., Liang, G., Pu, Y., Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats, *Int. J. Mol. Sci.*, 15 (11), 21253-21269 (2014).
- Konukoğlu, D., Akçay, T., Glutasyon Metabolizması ve Klinik Önemi, *T. Klin. Tıp Bilimleri*, 15, 214-218 (1995).
- Kozłowski, P., Czępińska-Ćwik, W., Kozłowska, M., Kozłowska, K., Levetiracetam-epilepsy treatment, pharmacokinetics, mechanism of action, interaction and toxicity, *Journal of Education, Health and Sport*, 5 (4), 143-150 (2015).
- Kumar, S., Kaur, G., Second generation anti-epileptic drugs adversely affect reproductive functions in young non-epileptic female rats, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 24 (10), 1709-1718 (2014).
- Kwong, K.L., Tsui, K.W., Wu, S.P., Yung, A., Yau, E., Eva, F., Ma, C.K., Cherk, S., Liu, K.T., Cheng, W.W., Yau, M.M., Utilization of antiepileptic drugs in Hong Kong children, *Pediatr. Neurol.*, 46 (5), 281-286 (2012).
- Larkin, T.M., Cohen-Oram, A.N., Catalano, G., Catalano, M.C., Overdose with levetiracetam: a case report and review of the literature, *J. Clin. Pharm. Ther.*, 38 (1), 68-70 (2013).
- Lin, J.F., Lin, Y.H., Liao, P.C., Lin, Y.C., Tsai, T.F., Chou, K.Y., Chen, H.E., Tsai, S.C., Hwang, T.I., Induction of testicular damage by daily methamphetamine administration in rats, *Chin. J. Physiol.*, 57 (1), 19-30 (2014).
- Liu, L., Bao, H., Liu, F., Zhang, J., Shen, H., Phthalates exposure of Chinese reproductive age couples and its effect on male semen quality, a primary study, BPA, *Environ. Int.*, 42, 78-83 (2012).
- Lukyanetz, E.A., Shkryl, V.M., Kostyuk, P.G., Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam, *Epilepsia*, 43 (1), 9-18 (2002).
- Lynch, B.A., Lambeng, N., Nocka, K., Kensel-Hammes, P., Bajjalieh, S.M., Matagne, A., Fuks, B., The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam, *PNAS*, 101 (26), 9861-9866 (2004).
- Lyseng-Williamson, K.A., Levetiracetam: A Review of its Use in Epilepsy, *Drugs*, 71 (4), 489-514 (2011a).
- Lyseng-Williamson, K.A., Spotlight on levetiracetam in epilepsy, *CNS Drugs*, 25 (10), 901-905 (2011b).
- Maree, L. ve van der Horst G., Quantification and identification of sperm subpopulations using computer-aided sperm analysis and species-specific cut-off values for swimming speed, *Biotech. Histochem.*, 88 (3-4), 181-193 (2013).

- Margineanu, D.G., Matagne, A., Kaminski, R.M., Klitgaard, H., Effects of chronic treatment with levetiracetam on hippocampal field responses after pilocarpine-induced status epilepticus in rats, *Brain. Res. Bull.*, 77, 282-285 (2008).
- Marini, H., Costa, C., Passaniti, M., Esposito, M., Campo, G.M., Ientile, R., Adamo, E.B., Marini, R., Calabresi, P., Altavilla, D., Minutoli, L., Pisani, F., Squadrito, F., Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity, *Life Sci.*, 74, 1253-1264 (2004).
- Martinez, C.S., Torres, J.G., Peçanha, F.M., Anselmo-Franci, J.A., Vassallo, D.V., Salaices, M., Alonso, M.J., Wiggers, G.A., 60-Day chronic exposure to low concentrations of HgCl₂ impairs sperm quality: Hormonal imbalance and oxidative stress as potential routes for reproductive dysfunction in rats, *PLoS One*, 9 (11):e111202 (2014).
- Mazhar, F., Malhia, S.M., Simjeea, S.U., Comparative studies on the effects of clinically used anticonvulsants on the oxidative stress biomarkers in PTZ-induced kindling model of epileptogenesis in mice, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (M. J. Curtis), 11th Annual Focused Issue on Methods in Safety Pharmacology, November-December, 70 (3), 313 (2014).
- McPhee, S.J., Disorders of the Male Reproductive Tract, Pathophysiology of Disease-An Introduction to Clinical Medicine 3rd Edition, S.J. McPhee (Eds.), W.R. Lingappa (Eds.), W.F. Ganong (Eds.), J.D. Lange (Eds.), The McGraw-Hill Companies, Inc., 556-576 (2000).
- Møller, P., Loft, S., Ersson, C., Koppen, G., Dusinska, M., Collins, A., On the search for an intelligible comet assay descriptor, *Front. Genet.*, 5 (217), 1-4 (2014).
- Montouris, G., Morris, G.L., Reproductive and sexual dysfunction in men with epilepsy, *Epilepsy Behav.*, 7 (2), 7-14 (2005).
- Mori, K., Kaido, M., Fujishiro, K., Inoue, N., Koide, O., Hori, H., Tanaka, I., Dose dependent effects of inhaled ethylene oxide on spermatogenesis in rats, *Br. J. Ind. Med.*, 48 (4), 270-274 (1991).
- Morris, G.L., Vanderkolk, C., Human sexuality, sex hormones, and epilepsy, *Epilepsy Behav.*, 7 (2), 22-28 (2005).
- Morris, I.D., Ilott, S., Dixon, L., Brison, D.R., The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development, *Hum. Reprod.*, 17 (4), 990-998 (2002).
- Narayana, K., D'Souza, U.J., Seetharama Rao, K.P., Ribavirin-induced sperm shape abnormalities in Wistar rat, *Mutat. Res.*, 513 (1-2), 193-196 (2002).
- Olive, P.L., Banáth, J.P., The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells, *Nat. Protoc.*, 1 (1), 23-29 (2006).
- Oliveira, A.A., Almeida, J.P., Freitas, R.M., Nascimento, V.S., Aguiar, L.M., Junior, H.V., Fonseca, F.N., Viana, G.S., Sousa, F.C., Fonteles, M.M., Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant

enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures, *Cell Mol. Neurobiol.*, 27 (3), 395-406 (2007).

Ong, C.N., Shen, H.M., Chia, S.E., Biomarkers for male reproductive health hazards: are they available?, *Toxicol. Lett.*, 134 (1-3), 17-30 (2002).

Otoom, S., Batieneh, H., Hassan, Z., Daoud, A., Effect of long term use topiramate on fertility and growth parameter in adult male rats, *Neuro. Endocrinol. Lett.*, 5, 351-355 (2004).

Pandiyan, N., Darussalam, B., Medical Drugs Impairing Fertility, Reproductive Health and the Environment, P. Nicolopoulou-Stamati, L. Hens (Eds.), C.V. Howard, Springer, Dordrecht, 187-205 (2007).

Patsalos, P.N., Clinical pharmacokinetics of levetiracetam, *Clin. Pharmacokinet.*, 43 (11), 707-724 (2004).

Patsalos, P.N., Drug interactions with the newer antiepileptic drugs (AEDs)--part 1: pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between AEDs, *Clin. Pharmacokinet.*, 52 (11), 927-966 (2013).

Patsalos, P.N., Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics, *Pharmacol. Ther.*, 85 (2), 77-85 (2000).

Patton, K.T., Thibodeau, G.A., Anatomy & physiology 8th Edition, Elsevier, Inc., St. Louis, 1044-1058, 2013.

Perucca, P., Gilliam, F.G., Adverse effects of antiepileptic drugs, *Lancet Neurol.*, 11, 792-802 (2012).

Pisoschi, A.M., Pop, A., The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *Eur. J. Med. Chem.*, 97, 55-74 (2015).

Ramalingam, M., Kini, S., Mahmood, T., Male fertility and infertility, *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.*, 24 (11), 326-332 (2014).

Rasool, E.A., Abdul-Rasheed, O.F., AL-Hashimi, A.F., Comparison Between Different DNA and Conventional sperm parameters in Infertile Men, *Al-kindy. Col. Med. J.*, 8 (2), 40-47 (2012).

Rauchenzauner, M., Bitsche, G., Svalheim, S., Tauboll, E., Haberlandt, E., Wildt, L., Rostasy, K., Luef, G., Effects of levetiracetam and valproic acid monotherapy on sex-steroid hormones in prepubertal children--results from a pilot study, *Epilepsy Res.*, 88 (2-3), 264-248 (2010).

Reimers, A., Brodtkorb, E., Second-generation antiepileptic drugs and pregnancy: a guide for clinicians, *Expert Rev. Neurother.*, 12 (6), 707-717 (2012).

Reimers, A., New antiepileptic drugs and women, *Seizure*, 23 (8), 585-591 (2014).

Sarangi, S.C., Kakkar, A.K., Kumar, R., Gupta, Y.K., Effect of lamotrigine, levetiracetam and topiramate on neurobehavioral parameters and oxidative stress in comparison with valproate in rats, *Journal of Pharmacological and Toxicological*

Methods (M.J. Curtis), 10th Annual Focused Issue on Methods in Safety Pharmacology, July-August, 68 (1), Pages e4 (2013).

Sargentini-Maier, M.L., Espié, P., Coquette, A., Stockis, A., Pharmacokinetics and metabolism of ¹⁴C-brivaracetam, a novel SV2A ligand, in healthy subjects, *Drug Metab. Dispos.*, 36 (1), 36-45 (2008).

Shi, J.Q., Wang, B.R., Tian, Y.Y., Xu, J., Gao, L., Zhao, S. L., Jiang, T., Xie, H.G., Zhang, Y.D., Antiepileptics topiramate and levetiracetam alleviate behavioral deficits and reduce neuropathology in APPswe/PS1dE9 transgenic mice, *CNS Neurosci. Ther.*, 19 (11), 871-881 (2013).

Shier, D., Butler, J., Lewis, R., Hole's human anatomy and physiology 13th Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 822-837, 2013.

Stettner, M., Dehmel, T., Mausberg, A.K., Kohne, A., Rose, C.R., Kieseier, B.C., Levetiracetam exhibits protective properties on rat Schwann cells in vitro, *J. Peripher. Nerv. Syst.*, 16 (3), 250-260 (2011).

Sundaram, K., Witorsch, R.J., Toxic Effects on the Testes, *Reproductive Toxicology* 2nd Edition, R.J. Witorsch (Eds.), Raven Press, Ltd., New York, 99-123, 1995.

Svalheim, S., Sveberg, L., Mochol, M., Taubøll, E., Interactions between antiepileptic drugs and hormones, *Seizure*, 28, 12-17 (2015).

Svalheim, S., Taubøll, E., Luef, G., Lossius, A., Rauchenzauner, M., Sandvand, F., Bertelsen, M., Mørkrid, L., Gjerstad, L., Differential effects of levetiracetam, carbamazepine, and lamotrigine on reproductive endocrine function in adults, *Epilepsy Behav.*, 16, 281-287 (2009).

Svalheim, S., Taubøll, E., Surdova, K., Ormel, L., Dahl, E., Aleksandersen, M., McNeilly, A., Gjerstad, L., Ropstad, E., Long-term levetiracetam treatment affects reproductive endocrine function in female Wistar rats, *Seizure*, 17 (2), 203-209 (2008).

Takeuchi, K., Takayama, S., Hashimoto, E., Itayama, M., Amagase, K., Izuhara, C., Effect of rebamipide on gastric bleeding and ulcerogenic responses induced by aspirin plus clopidogrel under stimulation of acid secretion in rats, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 29 (4), 37-46 (2014).

Taubøll, E., Gregoraszcuk, E.L., Tworzydło, A., Wójtowicz, A.K., Ropstad, E., Comparison of reproductive effects of levetiracetam and valproate studied in prepubertal porcine ovarian follicular cells, *Epilepsia*, 47 (9), 1580-1583 (2006).

Taubøll, E., Gregoraszcuk, E.L., Wojtowicz, A.K., Milewicz, T., Effects of levetiracetam and valproate on reproductive endocrine function studied in human ovarian follicular cells, *Epilepsia*, 50 (8), 1868-1874 (2009).

Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Kawanishi, S., Murata, M., Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (1), 193-217 (2014).

- Toman, R., Hluchy, S., Massanyi, R., Lukac, N., Adamkovicova, M., Cabaj, M., Hajkova, Z., Selenium and Cadmium Tissue Concentrations and the CASA Sperm Motility Analysis after Administration to Rats, *American J. Ani. Vet. Sci.*, 9 (4), 194-202 (2014).
- Toth, G.P., Stober, J.A., Read, E.J., Zenick, H., Smith, M.K., The automated analysis of rat sperm motility following subchronic epichlorohydrin administration: methodologic and statistical considerations, *J. Androl.*, 10 (5), 401-415 (1989).
- Trivedi, P.P., Kushwaha, S., Tripathi, D.N., Jena, G.B., Evaluation of male germ cell toxicity rats: Correlation between sperm head morphology and sperm comet assay, *Mutat. Res.*, 703, 115-121 (2010).
- Ueda, Y., Doi, T., Takaki, M., Nagatomo, K., Nakajima, A., Willmore, L.J., Levetiracetam enhances endogenous antioxidant in the hippocampus of rats: in vivo evaluation by brain microdialysis combined with ESR spectroscopy, *Brain Res.*, 1266, 1-7 (2009).
- van der Horst, G., Maree, L., SpermBlue: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis, *Biotech. Histochem.*, 84 (6), 299-308 (2009).
- Vanlı Yavuz, E., Baykan, B., Epilepsi Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, *Klinik Gelişim*, 23 (1), 39-43 (2010).
- Varoglu, A.O., Yildirim, A., Aygul, R., Gundogdu, O.L., Sahin, Y.N., Effects of valproate, carbamazepine, and levetiracetam on the antioxidant and oxidant systems in epileptic patients and their clinical importance, *Clin. Neuropharmacol.*, 33, 155-157 (2010).
- Verrotti, A., Loiacono, G., Laus, M., Coppola, G., Chiarelli, F., Tiboni, G.M., Hormonal and reproductive disturbances in epileptic male patients: emerging issues, *Reprod. Toxicol.*, 31 (4), 519-527 (2011).
- Verrotti, A., Prezioso, G., Di Sabatino, F., Franco, V., Chiarelli, F., Zaccara, G., The adverse event profile of levetiracetam: A meta-analysis on children and adults, *Seizure*, 31, 49-55 (2015).
- Wanda, M., Haschek, C.J., Waller, R.M.A., *Fundamentals of Toxicologic Pathology* 2nd Edition, Academic Press, London, 555-559, 2010.
- Wisniewski, P., Romano, R.M., Kizys, M.M., Oliveira, K.C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M.I., Dias-da-Silva, M.R., Romano, M.A., Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis, *Toxicology*, 329, 1-9 (2015).
- Working, P.K., *Male Reproductive Toxicology: Comparison of the Human to Animal Models*, *Environ. Health Perspect.*, 77, 37-44 (1988).
- Wright, C., Downing, J., Mungall, D., Khan, O., Williams, A., Fonkem, E., Garrett, D., Aceves, J., Kirmani, B., Clinical pharmacology and pharmacokinetics of levetiracetam, *Front. Neurol.*, doi: 10.3389/fneur.2013.00192 (2013).

Xiaotian, X., Hengzhong, Z., Yao, X., Zhipan, Z., Daoliang, X., Yumei, W., Effects of antiepileptic drugs on reproductive endocrine function, sexual function and sperm parameters in Chinese Han men with epilepsy, *J. Clin. Neurosci.*, 20 (11), 1492-1497 (2013).

Yoshikawa, T., Naito, Y., What Is Oxidative Stress?, *JMAJ*, 45 (7), 271-276 (2002).