



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LEVETİRASETAMA MARUZ KALAN GEBE
SIÇANLARIN YENİDOĞANLARINDA
TERATOJENİTE VE GONAD TOKSİSİTESİ**

Cansu KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON-2018

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynak listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici davranışımın olmadığını beyan ederim.

.../.../2018

Cansu KAYA

İthaf

Yüksek lisans tezimi tüm hayatım boyunca beni destekleyen ve maddi manevi hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan aileme ve tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen sevdiklerime ithaf ediyorum



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin ve tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle, ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim danışmanım anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Engin YENİLMEZ hocama, geniş bilgi, deneyim ve imkânlarından faydalandığım çok değerli hocalarım Prof. Dr. Ersan ODACI, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi. Gökçen KERİMOĞLU hocalarıma, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından değerli hocam Prof. Dr. Ersan KALAY'a, Farmakoloji Anabilim Dalından değerli hocam Doç. Dr. Mine KADIOĞLU DUMAN'a, çalışmamın bütün aşamalarında benden desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Birgül GÜR, Ferhat UZUN ve İrem ÇAVUŞOĞLU'na, tez deneyimin gerçekleşmesinde büyük katkıları olan değerli arkadaşlarım Uzm. Dr. Ahmet Uğur AKMAN, Arş. Gör. Dr. Senem ARI, Uzm. Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE, Arş. Gör. Dr. Tuğba ZENGİN, Arş. Gör. Dr. Oğuzhan KESKİN, Arş. Gör. Ali KULABER, Canan GÜNEY ve tüm bölüm arkadaşlarıma, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından Dr. Akın BODUR ile Dr. İmran İNCE AKÇA'ya ve son olarak tez çalışmamı TYL-2017-5738 no'lu proje olarak destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Cansu KAYA

Trabzon, 2018

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	xii
2. SUMMARY	xiii
3. GİRİŞ ve AMAÇ	1
4. GENEL BİLGİLER	2
4.1. Testis Embriyolojisi	2
4.2. Testis Anatomisi	3
4.3. Testis Histolojisi	4
4.3.1. Skrotum	4
4.3.2. İnterstisyel Doku	5
4.3.3. Seminifer Tübüller	5
4.3.4. Seminifer Epitel	6
4.3.4.1. Sertoli Hücreleri	6
4.3.4.2. Spermatogenez	6
4.3.5. Spermatozoon Yapısı	7
4.4. Epididimis	8
4.5. Embriyo Testis Gelişimi	8
4.6. Embriyotoksisite	9
4.7. Fetotoksisite	9
4.8. Teratojenite	10
4.9. Levetirasetam	10
4.10. Apoptoz	11
4.11. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	12

5. MATERİYAL ve METOD	14
5.1. Deneyel Çalışma Aşaması	14
5.1.1. Deney Hayvanlarının Temini, Bakımı ve Barınması	14
5.1.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulama	15
5.2. Histolojik İşlemler	17
5.2.1. Doku Numunelerinin Elde Edilmesi	17
5.2.2. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması	18
5.2.3. Kesitlerin Alınması	19
5.2.4. Hematoksilen – Eozin (H&E) Boyama Yöntemi	20
5.2.5. Histolojik Ölçümler	20
5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler	21
5.3.1. TUNEL Boyama	21
5.4. Biyokimyasal İncelemeler	22
5.4.1. Doku 4-Hidroksinonenal Ölçümü	22
5.5. İstatistiksel Yöntemler	22
6. BULGULAR	23
6.1. Teratojenik Bulgular	23
6.1.1 Morfolojik bulgular	23
6.1.2 Kafa Kesitlerinin Mikroskopisi	26
6.1.3 Uzun Kesitlerinin Mikroskopisi	28
6.2. Histopatolojik Bulgular	29
6.2.1 Testis Mikroskopisi	29
6.2.2. TUNEL Sonuçları	35
6.3. Morfometrik Bulgular	36
6.4. Biyokimyasal Değerlendirmeler	37
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	38
8. KAYNAKLAR	43
9. ETİK KURUL ONAYI	48
10. ÖZGEÇMİŞ	49

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Serbest radikal kaynakları ve antioksidan moleküller	12
Tablo 2. Deney grupları ve uygulamaları	16
Tablo 3. Testis bağ dokusu alanı	36
Tablo 4. Testis dokusunda biyokimyasal değerlerin aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri	37



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Skrotum, testis ve epididimis	3
Şekil 2. Levetirasetamın kimyasal yapısı	11



RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Gestasyonun 21. gününe ait testis histolojisi	9
Resim 2. Sıçanların bakımı ve barınması	15
Resim 3. Gebe sıçanlara gavaj yoluyla madde verilmesi	17
Resim 4. Postnatal 0. gün sıçan yavrularından testisin çıkarılması	18
Resim 5. Kontrol grubuna ait yeni doğan sıçanın vücut morfolojisi	23
Resim 6. LEV-A grubuna ait yeni doğan sıçanın vücut morfolojisi	23
Resim 7. LEV-B grubuna ait yeni doğan sıçanın vücut morfolojisi	24
Resim 8. LEV-C grubuna ait yeni doğan sıçanın vücut morfolojisi	24
Resim 9. LEV-D grubuna ait yeni doğan sıçanın vücut morfolojisi ...	25
Resim 10. Kontrol grubu ve LEV-D grubu yenidoğan sıçanlara ait kafa histolojisi	26
Resim 11. Kontrol grubu ile LEV-D grubuna ait göz ve göz kapağı kesiti	27
Resim 12. LEV-D grubu ön sağ ve arka sağ uzuva ait kesit	28
Resim 13. Kontrol grubuna ait testis dokusu	29
Resim 14. Sham grubuna ait testis dokusu	30
Resim 15. LEV-A grubuna ait sıçan testis dokusu	31
Resim 16. LEV-B grubuna ait sıçan testis dokusu	32
Resim 17. LEV-C grubuna ait sıçan testis dokusu	33
Resim 18. LEV-D grubuna ait sıçan testis dokusu	34
Resim 19. LEV-D grubuna ait sıçan yavrularının testis dokusu	35

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

4-HNE	: 4-hidroksinonenal
ABP	: Androjen bağlayıcı proteinin
AI	: Apoptotik indeks
CAT	: Katalaz
DAB	: 3, 3–diaminobenzidine
FSH	: Follikül stimüle edici hormon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H&E	: Hematoksilen-Eozin
LEV	: Levetirasetam
LH	: Luteinleştirici hormon
LTG	: Lamotrijin
MDA	: Malondialdehid
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay

Simgeler

µm	: Mikrometre
°C	: Santigrad derece

ÖZET

Levetirasetama Maruz Kalan Gebe Sıçanların Yenidoğanlarında Teratojenite ve Gonad Toksisitesi

Bu çalışma levetirasetam uygulanan gebe sıçanların yavrularında oluşabilecek malformasyon ve gonad toksisitesini araştırmak amacıyla yapıldı.

Levetirasetam (LEV) [(-)-(S)- α -etil-2-okso-1-pirolidin asetamid], yeni nesil antikonvülzan ilaçtır. Hayvan deneylerinde LEV'in doğrudan plasentadan geçerek fetüse ulaştığı bildirilmiştir; ancak teratojenik ve toksik etkisi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Çalışmada ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 18 adet yetişkin düzenli siklus gösteren *Sprague Dawley* türü dişi sıçan çiftleşmeye bırakıldı. Gebelik tayini yapıldı. Gebe olan sağlıklı 18 adet dişi sıçan 6 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı. SHAM grubuna tüm gebelik boyunca 1ml gavaj yolu ile su verildi. LEV-A grubu (gebeliğin 1. trimesteri; 0.-7.gün), LEV-B grubu (gebeliğin 2. trimesteri; 8.-14. gün), LEV-C grubu (gebeliğin 3. trimesteri; 15.-21. gün) ve LEV-D grubuna (tüm gebelik süresince) gavaj yolu ile LEV (100 mg/kg) uygulandı. Tüm gruplardan elde edilen dişi ve erkek yavrular anatomik malformasyonlar (teratojenite) açısından değerlendirilip kaydedildi. Servikal dislokasyon yöntemi ile dekapite edilen yavruardan testis örnekleri çıkarıldı. Çıkarılan sol testisler histolojik incelemeler için, sağ testisler ise biyokimyasal incelemeler için kullanıldı.

LEV-D grubuna ait yavru sıçanlarda damak deformitesi ile göz malformasyonu görüldü. LEV-C ve LEV-D grubuna ait testislerde bağ dokusu alanında diğer gruplara nazaran, artış tespit edildi. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, gebeliğin 3. trimesteri ve tüm gebelik boyunca uygulanan LEV'in testis üzerine toksik etkisi olabileceğini ve çok ciddi olmayan teratojenik etkileri olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Testis, levetirasetam, trimester, teratojenite, toksisite

SUMMARY

Teratogenicity and Gonad Toxicity on Infants of Pregnant Rats Exposed Levetiracetam

This study was carried out to investigate malformation and gonad toxicity of pregnant rats' pups exposed with levetiracetam.

Levetiracetam (LEV) [(-)-(S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidine acetamide] is a new generation anticonvulsant drug. Animal experiments reported that LEV reached the fetus directly through the placenta; however, there is limited information about its teratogenic and toxic effects.

In the study, *Sprague Dawley* type female rats weighing between 200 and 250 g, which had 18 adult regular cycles, were left to mate. 18 healthy female pregnant rats were divided into 6 groups. No action was taken on the Control group. The SHAM group was given 1 ml water by gavage throughout the entire pregnancy. LEV (100 mg / kg) was administered by gavage to LEV-A group (1st trimester, 0-7th day), LEV-B group (2nd trimester, 8th-14th day), LEV-C group (3rd trimester, 15th-21st day) and LEV-D group (during the entire pregnancy). Female and male offspring from all groups were evaluated and recorded for anatomical malformations. Testicular specimens were removed from newborn rats that decapitated by cervical dislocation method. Left testes were used for histological examinations and right testes were used for biochemical examinations.

Palate deformities and eye malformation were seen in pups of LEV-D group. In the testis of the LEV-C and LEV-D groups, an increase was observed in the area of connective tissue compared to the other groups. The data revealed that LEV exposure to pregnant rats in the third trimester and throughout the pregnancy may cause testicular toxicity and possible mild teratogenic effects in offspring.

Key words: Testis, levetiracetam, trimester, teratogenicity, toxicity

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Gebelik, mümkün olduğunca sağlıklı şekilde geçirilmesi gereken bir dönemdir. Ancak sadece sağlıklı kadınlar tarafından yaşanan bir süreç değildir. Gebelikte en sık karşılaşılan nörolojik hastalıklardan biri epilepsidir. Gebelikte anti epileptik ilaç kullanan kadınların oranı % 0,3-0,4 'tür ve bu oran giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalarda ülkelere göre farklılık görülmekle birlikte gebelerin büyük bir kısmının (%80-90'nın) en az bir reçeteli ya da reçetesiz satılan ilaç kullandıkları bilinmektedir (1-3).

İlaçlar teratojenik etkilerini değişik mekanizmalarla gösterebilirler. Embriyonal periyodun 18-60 gün sonrasında organogenez görülür ve teratojenik hassasiyet maksimum düzeye ulaşır. Fetal faz aşamasında teratojene maruz kalma fetal büyümeyi, organın büyüklüğünü ve işlevini etkiler (4). Bu dönemde dokular hızlı farklılaşma yeteneğinde olduğundan düzeltilemeyecek yapısal hasar oluşabilmektedir. Bunların başlıcaları fetal DNA yapısının bozulması, fetal gelişim için önemli besinsel faktörlerin alınmasının engellenmesi ve enerji üretiminin bozulması; uteroplental akımın azalması, doku ozmolaritesinin değişmesi ve farklılaşmayla ilgili spesifik olayların işlevini yitirmesidir (5).

Antiepileptik ilaçların merkezi sinir sistemi ile ürogenital sistem defekti gibi major anomaliler ve kraniofasial ve dijital anomaliler, yarık damak gibi minor anomalileri geliştirme riski olduğu bilinmektedir. Klasik antiepileptik ilaçlarla yapılan çalışmalar bu ilaçların teratojenite açısından belli bir riske sahip olduklarını göstermiştir. Bu nedenle gebelerde epilepsi tedavisinde, anne ve fetus için daha güvenli olduğu düşünülen yeni nesil antiepileptik ilaçlara yönelme görülmektedir. Gebelikte sıklıkla kullanılan valproik asit ve karbamazepin gibi antiepileptik ilaçların teratojenitesi bilinmesine rağmen LEV gibi yeni kuşak antiepileptik ilaçların teratojenitesi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (6-8).

Hayvan deneylerinde LEV'in doğrudan plasentadan geçerek fetüse ulaştığı bildirilmiştir; ancak bu ilacın teratojenik etkisine dair bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte gonad toksisitesi hakkında herhangi bir bilgiye ulaşılamamıştır (9-12).

4. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi testisler, genital boşaltım kanalları, aksesuar cinsiyet bezleri ve penisten oluşmaktadır. Veziküla seminalisler, prostat ve bulboüretal bezler aksesuar cinsiyet bezleri olarak adlandırılmaktadır. Testislerin spermin üretimi (spermatogenez) ve androjenlerin üretimi (steroidogenez) olmak üzere iki temel görevi vardır. Sperm, olgunlaşmasını tamamlamak ve depolanmak amacı ile boşaltım kanalları aracılığıyla epididimise hareket eder. Seksüel uyarı sırasında duktus deferens ile epididimisten ayrılarak penil üretra aracılığı ile dışarı atılır (13, 14).

4.1. Testis Embriyolojisi

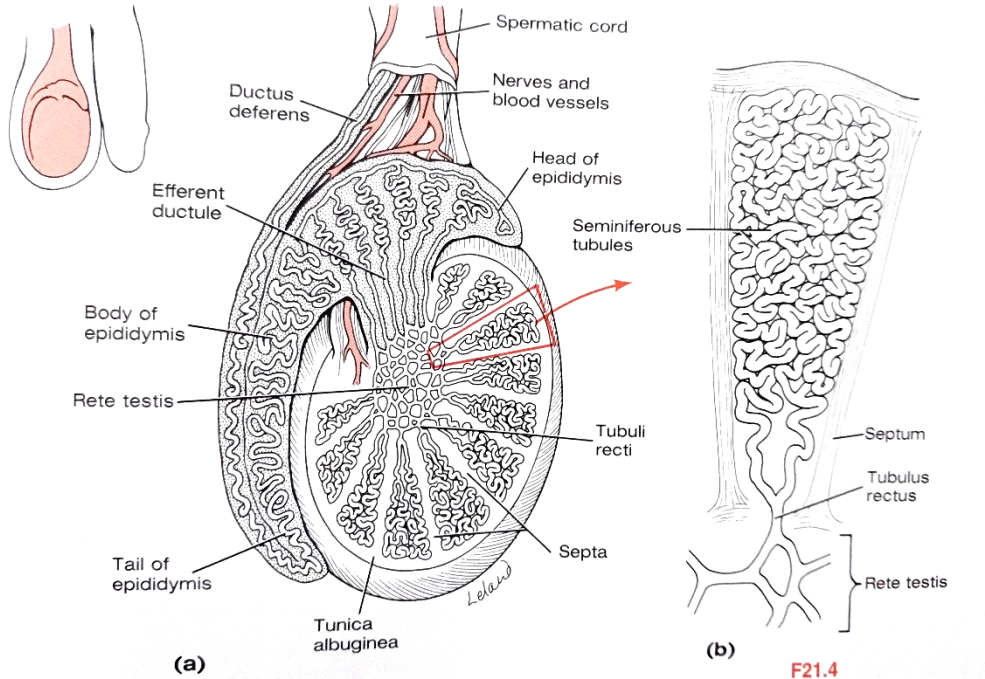
Testisler, intermediate mezoderminden köken alır. Intermediate mezoderm ilk olarak primer epiteliyal cinsiyet kordonlarını oluşturur. Vitellus kesesi arka duvarından göç eden primordial germ hücreleri intermediate mezodermin vücut boşluğuna doğru olan kabartısı (genital kabartı-sırt) içine gelir. Primer epiteliyal cinsiyet kordonları ilerleyen safhalarda Y kromozomu üzerindeki SRY geninin etkisiyle, testis ve medullar kordonları oluşturmak üzere çoğalmaya devam eder. Gonadal cinsiyet, Y kromozomunun kısa kolunda yer alan SRY geninin varlığı ile tayin edilir. SRY geninin ekspresyonu cinsiyetin belirlenmesinden sorumludur. SRY geni otozomal 9, 11, 17 ve 19 numaralı kromozomlarda ve X kromozomunda bazı genlerin aktivasyonunu kontrol etmektedir. SRY geni tarafından kodlanan testis belirleyici faktör erkek gonadal organların oluşumunu başlatan genlerin ekspresyonunu sağlarlar. SRY geni etkisiyle primitif kordonlar çoğalarak medullanın derinine inerler ve burada medullar kordonları oluştururlar. Kordonlar minik hücre sıraları halinde ağ oluşturarak bezin hilusuna doğru rete testisi meydana getirirler. İlerleyen evrelerde yoğun fibröz bağ dokusu olan tunika albuginea testis kordonlarını yüzey epitelinde ayırır. Dördüncü aydan itibaren testis kordonları at nalı şeklini alır. Bu şeklin iki ucu rete testisi oluşturur. Testis kordonlarının farklılaşmaya başlamasıyla birlikte gonadal sırt mezenşiminden köken alan intersitisyel Leydig hücreleri testis kordonlarının arasında bulunur, bu kordonların farklılaşmasıyla gelişmeye başlarlar. 8. haftada Leydig hücreleri, testosteron ve androstenodion gibi androjenik hormonları salgılayarak dış genitaler ve mezonefrik kanalların erkeksi karaktere farklılaşmasını sağlar. Kordonlar puberteden sonra uzar ve çapları genişler, içlerinde lümen oluşarak seminifer tübülleri oluştururlar. Kanalize olan seminifer tübülleri

rete testis t b  lleri ile birleşerek duktuli eferenteslere açılırlar. Eferent duktuslar, rete testis ile daha sonra mezonefrik kanalları birbirine bağlayarak epididimis ve duktus deferens oluştururlar (14-16).

Testislerin inmesi transabdominal g   evresi ve inguinokrotal iniş evresi olmak üzere iki ana evrede incelenir (17). İnsanlarda ilk evre gestasyonun 10. ile 15. haftaları arasında cinsel organların gelişiminin başlamasıyla testisler abdomen içinde b  breklerin alt kutbundan inguinal kanal girişine doğru yer değiştirirler. Daha sonra 28. haftanın sonuna kadar süren bir duraklama olur. İnguinokrotal g   başlayana kadar testisler internal halka seviyesinde kalmaya devam ederler. İnguinokrotal evrede testisler inguinal kanaldan geçerek skrotuma yerleşirler. İniş 35. hafta sonunda tamamlanmaktadır (18).

4.2. Testis Anatomisi

Erkeklerde temel üreme organı olan testisler, funiculus spermaticusa asılı şekilde skrotumda bulunan ve skrotal septum ile ayrılmış bir çift ovoid organdır. Erişkin testisin ortalama hacmi yaklaşık 25 mL olup, boyutları 3,5-5 cm genişlikte, 2,5-3 cm uzunluğunda ve derinliği 3 cm (anteroposterior çap)     mektedir (19)(şekil 1).



şekil 1. Skrotum, testis ve epididimis

Her testis bağ doku kapsülü olan tunika albuginea ile çevrelenmiştir. Tunika albuginea içe doğru genişleyerek testisi içerden kompartmanlara ayırmaktadır. Her bir kompartman gelişmenin çeşitli aşamalarında bulunan spermatositleri içeren kıvrımlı seminifer tübüllere sahiptir. Spermatogenezis aşamaları yine seminifer tübüllerin içerisinde görülmektedir. Testisin her kompartmanındaki seminifer tübül, tubulus rectus adı verilen kısa düz bir tüpü oluşturur. Boşaltım kanalları, tubuli rekti ve rete testisi içerir. Tübüler ağ şeklinde bulunan Rete testis duktuli eferentes adı verilen 12 kısa tübüle bağlanır ve epididimise ulaşır. Buradan da penil üretraya duktus deferens ve duktus ejakulatorius ile bağlanmaktadır. Duktus epididimis, deferens duktus ve prostattaki ejakulatuvar kanallar ile penil üretraya bağlanır (20).

4.3. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi, boşaltım kanalları ve yardımcı üreme bezlerinden oluşur. Testisler, devamlı bölünen ve spermlere dönüşen kök hücre ihtiva eder. Spermler olgunlaşmasını tamamlamak ve depolanmak amacı ile boşaltım kanalları aracılığıyla epididimise doğru hareket eder. Seksüel dürtü durumunda duktus deferens aracılığı ile epididimisten ayrılan sperm penil üretra aracılığı ile dışarı atılır (14).

Her bir testiste ince bağ dokusu olan septumlar, mediastinumdan ışınal olarak testisten içeriye doğru uzanarak testisi yaklaşık 250 adet testiküler lobüle ayırır. Testiküler lobüller, içerisinde 1-4 adet sarmal yapılı seminifer tübül ve Leydig hücrelerinin bulunduğu stroma yapısındaki interstisyel bağ dokusundan oluşur. Her testiste 600-1200 seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül spermatogenik germ hücreleri, çoğalma göstermeyen destek (Sertoli) hücrelerinin bulunduğu çok katlı germinal epitelden oluşmaktadır. Seminifer tübüller, tübülü rekti ve rete testise açılır; rete testisle birleşerek altı ile sekiz adet duktuli efferentese bağlanır. Bu kanallar aracılığı ile spermatozoonlar ve testis sıvısı epididimise aktarılır. Bezin % 20-30 kadarını içerisinde hormon üreten Leydig hücrelerinin de yer aldığı damarlardan zengin intersitisyel bağ dokusu oluşturur (13, 14, 21).

4.3.1. Skrotum

Skrotum, içerisinde testis bulunduran, vücut boşluğu dışında yer alan torba şeklindeki yapıdır. Her testis anterior abdominal duvarın tabakaları ve skrotum içerisine uzanan muskulofasiyal kesenin ucunda askılanmıştır. Testisler spermatik kordonlar

aracılığı ile abdominal duvara ve skrotal ligamentler ile ise skrotuma bağlanmışlardır. Skrotum içerisinde sıcaklık, vücut içi sıcaklığından 3-4°C daha düşüktür. Sıcaklığın düşük olması testis fonksiyonu ve sperm üretimi için önemlidir. Dahası, testisi besleyen damarların düzenlenmesinde de sıcaklık faktörü önemli bir yer arz etmektedir. Skrotumdan çıkan testiküler arterler panpiniform ağı adı verilen bir damar ağı oluşturur; bu damarlar testise geri dönen kanın sıcaklığını normal kan sıcaklığının altında tutmaktadır. Karşı akım sıcaklık değişim mekanizması ile arterlerden gelen kan testise ulaşmadan önce venöz kan aracılığı ile soğutularak sıcaklığın korunmasına yardımcı olmaktadır (13, 14).

4.3.2. İnterstisyel Doku

Tubuli seminiferi contorti'lerin aralarını dolduran gevşek bağ dokusu yapısındaki interstisyel alan, içerisinde gruplar halinde interstisyel hücreler (Leydig hücreleri), fibroblastlar, damar çevresi mezenşim hücreleri ve az sayıda makrofajlar, bol kılcal damarlar, lenf damarları ve sinirleri barındırmaktadır.

İnterstisyel alanda, Leydig hücreleri hem spermatogenezin tamamlanması hem de vücuttaki erkek cinsel özelliğin geliştirilmesi ve sürdürülmesi için gereken steroid hormonlarını üretir (22).

Merkezinde tek nükleusu bulunan poligonal şekilli Leydig hücreleri, çok sayıda lipid damlacıkları ve granülsüz endoplazmik retikulum bulunduran eozinofilik hücrelerdir. Yapısında lipofuskin pigmenti, çubuk şekilli Reinke kristalleri ve tübüloveziküler kristaller bulunur (23).

4.3.3. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüllerin her biri yaklaşık 50 cm uzunluğunda ve 150 – 250 µm çapındadır. Seminifer tübüller, fibröz bir bağ dokusu kılıfı, bazal lamina ve kompleks germinal epitelden meydana gelmektedir. Peritübüler alanda, seminifer tübülleri en dıştan çevreleyen birkaç fibroblast katmanı bulunmaktadır. Yassılaştırmış düz kas özelliği gösteren miyoid hücreler ve kollajen fibriller iç kısımda bazal laminaya bitişik bulunan tabakayı oluşturmaktadır. Miyoid hücrelerin ritmik kasılmaları ile spermatozoonların ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden boşaltım kanalına atılması sağlanır (15, 24, 25).

4.3.4. Seminifer Epitel

Seminifer epitel çok katlı bir özelliğe sahiptir. İki ana hücre çeşidi ihtiva etmektedir. Bunlardan biri destek hücresi olan Sertoli hücresidir. Diğer ise spermatogenik seri hücreleridir. Bu hücreler spermatogenez ile spermatozoonları üretmekle görevlidir (24).

4.3.4.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, seminifer epitelin bazal laminasından seminifer tübülün lümenine ulaşan birçok yan uzantılara sahip uzun, prizmatik, çoğalmayan hücrelerdir. Germinal epitel, germ hücrelerinin farklı gelişim aşamalarını, yani spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatidleri içeren hücrelerden oluşur. Bunlar Sertoli hücrelerinin invaginasyonlarında bulunurlar. Sertoli hücrelerine atfedilen fonksiyonlar arasında seminifer epitel hücreleri için trofik fonksiyonlar, seminifer tübüllerin lümenine doğru olgun spermatidlerin taşınması, androjen bağlayıcı proteinin (ABP) salgılanması, spermatogenez için endokrin veya parakrin etkisi olan maddelerin üretimi ve kontrolü ile intertübüler endokrin Leydig hücrelerle etkileşim yer almaktadır (26).

4.3.4.2. Spermatogenez

Seminifer tübüllerde, spermatogonyumdan spermatozoon oluşma sürecine spermatogenez ya da spermatogenezis denir. Puberteye kadar inaktif olarak bulunan testisler, puberteye girmeden önce salınan pitüiter gonadotropinlerin seviyesinin artması ile aktif hale gelirler ve bu aktiflikleri hayat boyu devam eder. Spermatogenez sırasında, aralarında hücresel bağlantı bulunan farklı spermatogenik hücre tipleri seminifer epitelin döngüsü içerisinde tekrarlanır. İnsanlarda spermatogonyal kök hücreden olgun sperm oluşumu 65 gün sürer (27).

Spermatogenez 3 farklı faza ayırmak mümkündür.

1. Spermatogonyal faz: Spermatogonyumlar mitozla bölünerek primer spermatositlere farklılaşırlar ve spermatogonyum popülasyonunu oluştururlar.
2. Spermatosit fazı: Primer spermatositler mayoz bölünme geçirerek sekonder spermatositleri daha sonrada spermatid adı verilen haploid hücreleri oluştururlar.

3. Spermatid fazı: Spermiyogenez olarak da isimlendirilen bu fazda spermatidler olgun hücrelere dönüşür. Spermatid fazı kendi içerisinde 4 fazdan oluşmaktadır (14, 28).

Golgi fazında, bu faz spermatidlerin sitoplazmasında, çekirdeğe yakın bölgede çok sayıda belirgin bir Golgi kompleksi izlenir. Glikoprotein bakımından zengin proakrozomal granüller Golgi kompleksinde yoğunlaşırlar. Bu fazda akrozomal vezikül genişler ve içeriği artar. Granüller birleşir, nüklear zarfa komşu membran ile sınırlandırılmış akrozomal vezikülü yaparlar.

Kep fazında, akrozomal vezikül nükleusun ön yarısında yayılır. Akrozom vezikülü genişleyerek çekirdeğin 2/3 ünü kaplar. Bu yapıya akrozomal kep denir. Akrozomal kepin altındaki nüklear kılıf, porlarını kaybeder ve kalınlaşır.

Akrozom fazında, akrozomun yapımı tamamlanır. Akrozom granülleri içinde proteaz, asit fosfataz gibi çeşitli hidrolitik enzimler bulunur. Bu enzimler hücre içindeyken inaktiftir. Bu sırada spermatidin kondanase olan çekirdeği uzar ve yoğunlaşır. Sitoplazma posteriora itilir. Nükleusa tutunan distal sentriolden çıkan fibril demetleri uzayarak ortada iki, çevrede dokuz adet olmak üzere kuyruğun içine doğru uzanır ve flagellum şekillenir.

Matürasyon fazı, spermatidin yeniden modellenmesinin bu son fazında flagella etrafındaki sitoplazmanın büyük bölümü koparak hücreden ayrılır. Rezidüel cisimcik olarak adlandırılan sitoplazma artıkları, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Oluşan spermatozoonlar, Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasından çıkıp lümene geçerler (29).

4.3.5. Spermatozoon Yapısı

Olgun sperm, baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Spermin baş kısmını, yassılaştırmış çekirdek ile anteriorunun üçte ikilik kısmını saran, çeşitli enzimler içeren, akrozom oluşturmaktadır. Akrozomal kep hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz, proteaz, akrozin ve tripsin benzeri madde gibi hidrolitik enzimler içermektedir. Bu enzimler zona pellusidanın delinmesi sonrası fertilizasyonu kolaylaştırmanın yanı sıra ovuma başka spermilerin girişini de engellerler.

Spermin kuyruğu boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört kısımdan oluşur. Spermin boyun kısmı, baş ile kuyruk arasında bağlantı parçası olup yapısında çift sentriol ve kaba fibriller bulundurmaktadır. Orta parça, kalın fiberlerin ve

aksonemal kompleksin etrafında sarılmış çok sayıda mitokondrileri içermektedir. Mitokondriler kuyruk hareketi için gerekli enerjiyi sağlayarak spermin hareketini sağlarlar. Esas kısım, diğer kısımlara nazaran daha uzun olup, kalın fiberleri ve aksonemal kopleksi içerir. Esas kısmı en dıştan fibröz bir kılıf sarmaktadır. Olgun sperm kuyruğunun uç kısmı olan son parça, yalnızca aksonemal kompleks içermektedir (14, 30).

4.4. Epididimis

Epididimis, testisin süperior ve posterior yüzeyleri boyunca uzanan kıvrımlı tübüllerden oluşmuş, spermlere depo görevi gören, hilal şeklindeki organdır. Yapısında duktuli efferentes, duktus epididimis, ilişkili düz kaslar, bağ dokusu ve damarlar bulunmaktadır. Duktus epididimis yüksek düzeyde kıvrımlı tübüllerden oluşmaktadır. Bu organ, baş (caput epididymidis), gövde (corpus epididymidis) ve kuyruk (cauda epididymidis) kısımlarından oluşur. Baş kısmına duktuli efferentes, kuyruk kısmına ise duktus deferens bağlanır (31).

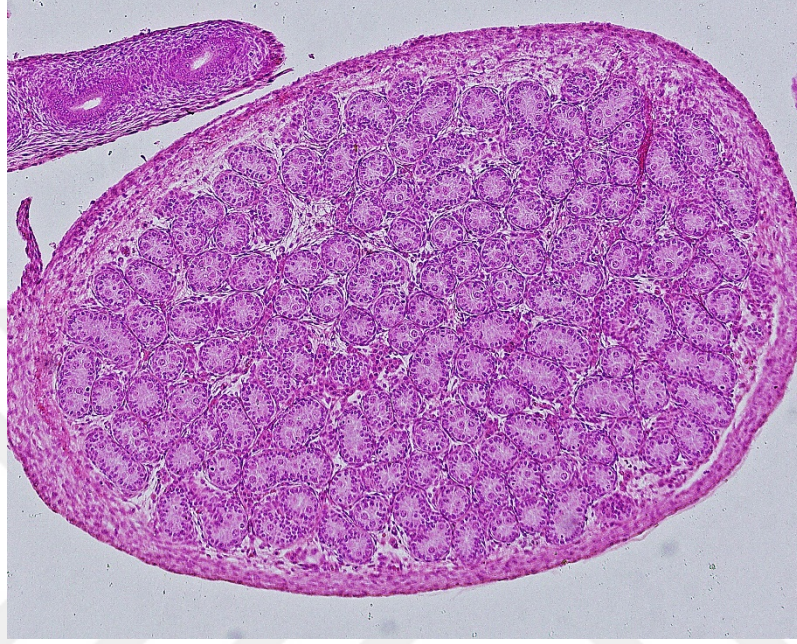
Testisten epididimise giren yeni üretilmiş spermler, epididimis boyunca geçişleri sırasında matür hale gelir; bu sayede motilite ve oositi fertilize etme yeteneği kazanır. Androjen bağımlı matürasyon sürecinde sperm başı, sıvı glikokonjugatlar ile modifiye edilir. Bu sürece dekapasitasyon denir. Bu süreç spermin dölleme yeteneğini dönüşümlü bir şekilde inhibe eder. Dekapasitasyon faktörleri fertilizasyondan hemen önce salınırlar (32).

Duktus epididimis yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşeli olup iki hücre tipi içermektedir. Esas hücreler lümene daha yakın olup lüminal yüzeylerinde stereosilyum bulundururlar. Bazal hücreler, bazal laminanın üzerinde bulunan kanal epiteline ait kök hücrelerdir (14).

4.5. Embriyo Testis Gelişimi

Embriyo testisi, dıştan kalın düz bir kapsül ile sarılıdır. Dış yüzey üç tabakadan meydana gelmektedir. Yüzeyde basit bir epitel tabakası olan tunika vaginalis, yoğun bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea ve en altta vasküler bağ dokusu olan tunika vasküloza bulunmaktadır. Tunika vaginalis ve tunika albuginea bipotansiyel gonaddan ilk olarak diferansiye olurken, tunika vasküloza 20 ile 30 haftalık gebelik döneminde aşamalı olarak gelişir. Parenkima dokusu, interstisyum ile seminifer tübüllerden oluşmaktadır (Resim 1). Her bir seminifer tübül, Sertoli hücreleri ile germ hücrelerinin

bulunduğu bazal membran, bu bazal membran üzerindeki miyoid hücreler ve peritübüler fibroblastik iç hücrelerinden oluşmaktadır. Seminifer tübüller, interlobüler septumlar ile yaklaşık 250 lobüle ayrılmaktadır. İnterstisyel alanda çok sayıda Leydig hücresi, içsi stroma hücreleri, damarlar, sinirler, mast hücreleri ve makrofajlar bulunmaktadır (33).



Resim 1. Gestasyonun 21. gününe ait testis histolojisi (H&E, X100)

4.6. Embriyotoksisite

Embriyotoksisite, embriyoda oluşabilecek tüm olumsuz etkiler olarak tanımlanabilir. Bu ters etkiler erken embriyo-blastula aşamasından organogenezis tamamlanana kadar görülebilir. Çeşitli kimyasallar annede gözle görülür toksisite oluşturmadan, doğrudan embriyo ve fetüsü etkileyebilir. Embriyonik ve fetal gelişim evresine göre toksik maddeler yavrularda çeşitli bilişsel, fizyolojik ve metabolik bozukluklara sebep olur. Ayrıca bu maddeler fetal ölüm, kusurlu oluşumlar, olgunlaşmanın gecikmesi veya düşük doğum ağırlığına sebep olabilirler (34).

4.7. Fetotoksisite

Fetotoksisite, fetüste görülen ters etkiler olarak tanımlanır. Organ oluşumunun tamamlanmasından sonra meydana gelir. Düşük doğum ağırlığı, ölü doğum sayısının

artışı, postnatal fizyolojik işlev bozuklukları ile beraber bilişsel bozukluklar fetotoksisitenin özgün örnekleri içerisinde yer almaktadır (34).

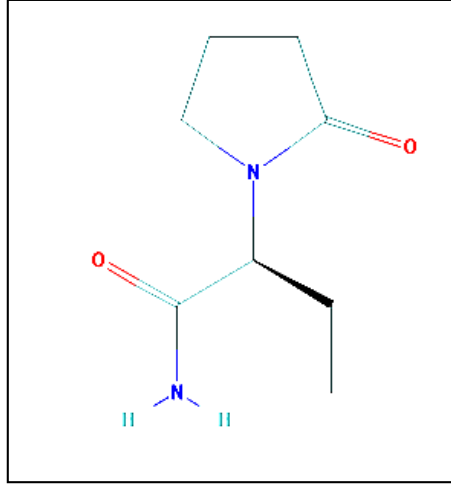
4.8. Teratojenite

Teratoloji, anormal gelişimin nedenlerini, mekanizmalarını ve kalıplarını inceleyen bilimdir. 1950'den önce insan konjenital malformasyonları ile ilgili bilgi yetersizliğinden dolayı meydana gelen malformasyonların çoğunun genetik tabanlı olduğu düşünülüyordu (35). Embriyonik ve fetal zarlar, anne karın duvarı ve uterusun embriyoyu dışarıdan gelebilecek zararlara karşı koruyan güçlü bariyer oldukları düşünülüyordu. İlk kez 1920 ile 1930'lu yıllarda, yağ oranı yüksek ve A vitamini bakımından zayıf besinler ile beslenen domuz yavrularında teratojenite çalışılmıştır. Çalışma neticesinde, yenidoğanlarda çeşitli şekil bozuklukları ve gözsüz doğum anomalileri dikkat çekmiştir (36). Teratojenite, büyüme geriliği, displazi (örn. iyot yetersizliği ile ilişkili guatr) veya asimetrik uzuv gibi fetal gelişim sırasındaki yapısal bozuklukları ifade eder (37).

Prenatal dönemde toksisite tipleri arasındaki ilişki oldukça karmaşık olup kimyasal maddenin yapısı, maruziyet zamanı ve maddenin dozuna bağlıdır. Embriyotoksik doz aralığında uygulanan maddenin, deney hayvanlarının bazılarında normal fetüs doğumuna, bazılarında embriyoletaliteye, bazılarında malformasyonlara, diğerlerinde ise geç gelişime neden olduğu bilinmektedir. Farklı dozlarda malformasyon oranı, doz arttırıldığında embriyoletalite sıklığı artar (34).

4.9. Levetirasetam

LEV, pediatrik epilepsili hastalarda hem adjuvan tedavi hem de monoterapi olarak kullanılan pirolidin türevi antiepileptik bir ilaçtır (Şekil 2). Fokal nöbet aktivitesinin sekonder yayılımını önleyerek eşzamanlı nöronal ateşlemeyi azalttığı düşünülmektedir. LEV, epilepsi tedavisinde 1999 yılında kullanım için onaylanmış olup, hem çocuklarda hem de erişkinlerde miyoklonik nöbetler için yardımcı tedavi olarak kullanılmıştır (38, 39).



Şekil 2. Levetirasetamın kimyasal yapısı

LEV, nöbet aktivitesini, eksitatör veya inhibe edici nöronal yollar içermeyen bir mekanizma ile inhibe eder. Ağız yoluyla biyoyararlanımı yaklaşık % 100'dür ve besin emilimini değiştirmez. Oral uygulamadan sonra absorpsiyon için en yüksek süre bir saattir ve kararlı durum, günde iki kez verilen uygulama ile iki gün içinde elde edilir. Klinik araştırmalarda en sık bildirilen advers etkiler uyuklama, baş dönmesi, enfeksiyon ve astenidir (40).

4.10. Apoptoz

Hücreler bölünerek çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Apoptoz, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Apoptozis ve yeniden yapım (mitozis) dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde sürer. İskoçyalı araştırmacı Kerr ve arkadaşları tarafından ilk kez 1972 yılında kullanılan apoptozis terimi, kelime anlamı olarak yaprak dökümüne benzetilerek apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuştur.

Doku homeostazisi, apoptozis ile proliferasyon dengesinin sürdürülmesine bağlıdır. Bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir. Normal fizyolojik koşullar altında ortaya çıkan hücre ölümü dış ve iç sinyaller tarafından aktive edilir (41). Apoptoza uğrayan hücreler benzer morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Bu özelliklere örnek olarak, DNA fragmentasyonu, hücre hacminin azalması, mitokondriyal fonksiyon kaybı ve apoptotik vezikül oluşumu

verilebilir. Bunun yanında Bcl-2 proteinleri, antiapoptotik ve proapoptotik önemli düzenleyiciler olarak fonksiyon görmektedir. Bunlar en güçlü apoptotik ajan olan sitokrom c salınımını doğrudan etkileyerek apoptozu düzenlerler (42).

Apoptotik hücrelerin morfolojilerindeki değişiklikleri belirlemede çeşitli mikroskopi tekniklerinin (ışık mikroskobu, elektron mikroskobu) yanında, flow sitometri gibi multiparametrik analizlerden de yararlanılmaktadır. Yine bu hücrelerin belirlenmesinde en sık kullanılan tekniklerden biri de DNA fragmentasyonunu histokimyasal olarak gösteren TUNEL yöntemidir (43).

4.11. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Besin maddelerinin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen dış yörüngede kararsız elektron içeren reaktif moleküllere serbest radikaller denir (Tablo 1). Bu moleküller çok reaktiftirler. Oksijen moleküllerinden, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Reaktif oksijen metabolitleri, lipid, protein, aminoasitler ve DNA gibi çeşitli hücre bileşenlerine zarar verirler.

Aerobik solunum yapan organizmalarda serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Bu sistemler serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemediklerinde oksidatif stres denilen durum ortaya çıkar.

İlaçlar, UV ışınları, yağ oksidasyonu, radyasyon, stres, sigara, alkol gibi birçok yolla serbest radikal oluşumu gerçekleşebilir. Oluşan serbest radikaller çeşitli patolojik durumların oluşumuna katkıda bulunurlar (44).

Tablo 1. Serbest radikal kaynakları ve antioksidan moleküller

SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI	ANTIOKSİDAN MOLEKÜLLER
• Sigara kullanımı • Aşırı egzersiz • Yaşlanma • Kronik inflamasyon • Aşırı alkol • Aşırı demir yüklenmesi	• Enzimler (GSH-Px, CAT, SOD) • Selenyum • Proteinler (Albumin, serüloplazmin) • Askorbik asit (C vitamini) • Tokoferoller (E vitamini) • Glutasyon ve tiyoller • Koenzim Q, ubiquinon ve türevleri

Reaktif oksijen metabolitleri olarak bilinen moleküller özellikle protein, lipid ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verirler. Yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında gerçekleşen lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile bioaktif aldehytler oluşur. Malondialdehit ve hidroksialkenaller (4-OH-nonenal gibi...) bunların ba lıcalarıdır. Bunlar hücre düzeyinde metabolize edilebilir ve aynı zamanda diğer hücrelere diffüze olup hasar oluşturabilirler (44).



5. MATERYAL ve METOD

5.1. Deneysel Çalışma Aşaması

Çalışmanın yürütülmesi için 13.07.2016 tarihinde Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 5 no'lu kararı ile onay alındı. Etik Kurul onayının ardından KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (BAP) başvuruda bulunuldu ve BAP Koordinasyon Birimi'nin ID:53488718-418 proje kodlu izni ile çalışmaya başlandı.

5.1.1. Deney Hayvanlarının Temini, Bakımı ve Barınması

Çalışmada 18 adet, 12 haftalık, 200-250 g ağırlığında, iki düzenli siklus gösteren *Sprague Dawley* türü dişi gebe sıçanlar kullanıldı. Sıçanların temini, bakımı ve barınması KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Bu sayede hayvanların çevreye uyum problemi ve çevre stresi gibi olumsuz durumlardan etkilenmesi engellendi. Sıçanlar 21 gün boyunca KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezinde sıçan takip odalarında takip edildi. Deney süresince ortamın sıcaklığı $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, nem oranı ortalama $\%50 \pm 5$, ışık ayarı sirkadiyen ritme uygun olan 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Çalışma boyunca hayvanlar, standart Tip III sıçan kafeslerinde barındırıldı (Resim 2). Sıçanların tüketeceği yem ve su, kolaylıkla ulaşabilecekleri şekilde kafesin üst kısmına yerleştirildi. Sıçanların beslenmesinde standart yem ve çeşme suyu verildi.



Resim 2. Sıçanların bakımı ve barınması

5.1.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulama

Araştırma için düzenli siklus gösteren 18 adet yetişkin *Sprague Dawley* türü dişi sıçan ile erkek sıçanlar çiftleşmeye bırakıldı. Her grup için 1 erkek ile 3 dişi sıçan çiftleşmeye bırakılıp ertesi gün vajinal smear ile gebelik tayini yapıldı ve smear örneğinde sperm görüldüğü ilk gün, gebeliğin başlangıcı (0. gün) kabul edildi. Çalışmaya her grup için vaginal smear örneği pozitif olan 3 sıçanla devam edildi. Gebe olan sağlıklı 18 adet dişi sıçan aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi 6 gruba ayrıldı (Tablo 2).

1. Grup (Kontrol grubu): Bu gruba herhangi bir işlem uygulanmadı.
2. Grup (Sham grubu): 1 ml tek doz çeşme suyu gavaj ile uygulandı.
3. Grup (LEV-A grubu): Gebeliğin 1. trimester süresince (0.-7. gün) 7 gün boyunca gavaj ile LEV (100 mg/kg= 1 ml) uygulandı.
4. Grup (LEV-B grubu): Gebeliğin 2. trimester süresince (8.-14. gün) 7 gün boyunca gavaj yolu ile LEV (100 mg/kg= 1 ml) uygulandı.
5. Grup (LEV-C): Gebeliğin 3. trimester süresince (15.-21. gün) 7 gün boyunca gavaj yolu ile LEV (100 mg/kg= 1 ml) uygulandı.

6. grup (LEV-D): Tüm gebelik süresince (21 gün boyunca) gavaj yolu ile LEV (100 mg/kg= 1 ml) uygulandı (Resim 3). Sıçanlara gavaj yolu ile uygulanacak antiepileptik ilacın dozu Özyürek ve ark. metoduna göre ayarlandı (45).

Sıçan trimester dönemleri Peng ve ark. metoduna göre gruplandırıldı (46).

Tablo 2. Deney grupları ve uygulamaları

GRUPLAR		DENEK SAYISI (n)	UYGULAMA
1. Grup	Kontrol	3	-
2. Grup	Sham	3	1 ml çeşme suyu
3. Grup	LEV-A (1. trimester levetirasetam)	3	100 mg/kg LEV
4. Grup	LEV-B (2. trimester levetirasetam)	3	100 mg/kg LEV
5. Grup	LEV-C (3. Trimester levetirasetam)	3	100 mg/kg LEV
6. Grup	LEV-D (Tüm gebelik levetirasetam)	3	100 mg/kg LEV

Deney boyunca uygulamalar düzenli olarak her gün 9.30 – 10.00 saatleri arasında yapıldı.

Yavrulayan tüm gruplara ait anne sıçanlar deneyin bitiminde yavrularından ayrıldı. Yavrulara annelerinin grup adı verildi. Doğumdan sonra tüm gruplardan elde edilen yavru sıçanlar (postnatal 0.gün) kendi grupları dâhilinde dişi ve erkek olmak üzere cinsiyet ayrımına tabi tutuldu. Testis çalışmak amacı ile her gruptan rastgele 6 adet yavru erkek sıçan seçildi. Tüm dişi ve erkek yavrular anatomik malformasyonlar açısından değerlendirilip kaydedildi.



Resim 3. Gebe sıçanlara gavaj yoluyla madde verilmesi

5.2. Histolojik İşlemler

Çalışmanın deney aşaması, doku örneklerinin alınması KTÜ Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı izole organ banyosu laboratuvarında gerçekleştirildi. Deney sürecinin sonunda postnatal 0. gün denekler eter ile uyutularak malformasyonları değerlendirilmek üzere fotoğrafları çekildi. Fotoğrafları çekilen denekler servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

5.2.1. Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

Anestezi altındaki postnatal 0. gün yavru sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile dekapite edildi. Dekapitasyonu takiben parametrelerin çalışılması için abdominal bölgenin altından sternuma kadar olan orta hattı kesilerek testis örnekleri çıkartıldı (Resim 4). Çıkarılan testis kasetlenerek histolojik işlemler için Bouin solüsyonuna konuldu. Sağ testis biyokimyasal incelemeler için eppendorf tüpü içerisinde

biyokimyasal çalışma sürecine kadar -20°C’de muhafaza edildi. Biyokimyasal analiz için alınan doku örnekleri KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında bulunan soğutuculara yerleştirildi. Dekapite edilen yavruların testisleri çıkarıldıktan sonra malformasyon değerlendirilmek amacı ile kafa ve gövdeleri dekalsifikasyon solüsyonunda dekalsifikasyon işlemine tabi tutuldu.



Resim 4. Postnatal 0. gün sıçan yavrularından testisin çıkarılması

5.2.2. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması

Histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar için alınan örneklerin doku takibi, kesit alımı, boyanması ve bu işlemler için gerekli olan solüsyonların hazırlanması KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Testis dokuları önceden hazırlanmış olan üç günlük Bouin solüsyonu içinde; ışık almayan ortamda, oda sıcaklığında bekletildi.

Bouin solüsyonunun hazırlanışı:

- 75 ml pikrik asit
- 75 ml formaldehit

-5 ml glasiyel asetik asit

Kafa ve gövdeler formalin solüsyonunda tespit edildikten sonra dekalsifikasyon için 10 gün boyunca ışık almayan ortamda, oda sıcaklığında bekletildi.

Formalin solüsyonunun hazırlanışı:

- 50 ml %37-40'lık formalin

- 450 ml distile su

Dekalsifikasyon solüsyonunun hazırlanması:

- 30 ml formaldehit

- 30 ml formik asit

- 240 ml distile su

Bouin solüsyonunda fikse edilen testis dokuları üçüncü günün ardından; kafa ve gövdeler ise dekalsifikasyondan hemen sonra doku takibi işlemlerine tabi tutuldu. Doku takip işleminin ardından dokular, parafine gömülerek doku blokları hazırlandı.

Doku takibi aşağıdaki şekilde yapıldı:

- 1) % 70'lik alkol1 gün bekletildi.
- 2) % 90'lık alkol1 gün bekletildi.
- 3) % 96'lık alkol1 gün bekletildi.
- 4) % 100'lük alkol1 gün bekletildi.
- 5) % 100'lük alkol.....1 saat (1 kez) bekletildi.
- 6) Ksilen.....3x5 dk bekletildi.
- 7) Dokular eritilmiş parafin içerisinde 58 °C'de etüvde 3 kez 15 dakika bekletildi ve sonrasında tekrar etüv içerisinde 2 saat bekletildi.
- 8) Dokular bloklandı.

5.2.3. Kesitlerin Alınması

Kesitlerin alınması KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında bulunan LEICA RM 2255 model mikrotom aracılığıyla sağlandı. İlk olarak doku bloğundan 20 µm'lik kesitler alınarak trimlendi ve dokuya ulaşılması sağlandı. Dokuya tam olarak ulaşılmasının ardından 5 µm'lik kesitler alındı ve kesitler Benmarideki 45°C'lik su içerisine konuldu. Benmaride bekletilerek kırışıklığı açılan dokular, dikkatlice lam üzerine alındı. Lam üzerine alınan dokular Hematoksilen & Eozin (H&E) ile boyanması için zembile yerleştirilerek parafinin erimesi için bir saat 58 °C

etüvde bekletildi ve dokular daha sonra sırasıyla aşağıdaki rutin histolojik boyama işlem serilerinden geçirildi.

5.2.4. Hematoksilen – Eozin (H&E) Boyama Yöntemi

Kesitlerin 58°C'lik etüvde parafini iyice eritildikten sonra aşağıda belirtildiği gibi boyama işlemine geçildi.

- 1) Ksilen, 5x2 dakika bekletildi.
- 2) %100'lük alkol, 5 dakika bekletildi.
- 3) %96'lık alkol, 5 dakika bekletildi.
- 4) %70'lik alkol, 5 dakika bekletildi.
- 5) Distile su, 2-3 dakika bekletildi.
- 6) Hematoksilen, 35 saniye bekletildi.
- 7) Musluk suyu 5 dakika bekletildi.
- 8) Asit – Alkol 1 kez batırıp çıkarıldı.
- 9) Distile su 1 dakika bekletildi.
- 10) Amonyaklı su 10 saniye bekletildi.
- 11) Distile su 1 dakika bekletildi.
- 12) Eozin 30 saniye bekletildi.
- 13) Distile su 1 dakika bekletildi.
- 14) %70'lik alkol 5 dakika bekletildi.
- 15) %96'lık alkol 5 dakika bekletildi.
- 16) %100'lük alkol 5 dakika bekletildi.
- 17) Ksilen 2x5 dakika bekletildi.
- 18) Entellan ile kapatıldı.

5.2.5. Histolojik Ölçümler

Hazırlanan preparatlar KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji laboratuvarında bulunan Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Japan) incelendi. Seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücreler ve interstisyel alanlar görüntülenerek fotoğraflar çekildi ve dijital ortama kaydedildi. Testis dokusu interstisyel bağ dokusu alanı Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak ölçüldü ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler

Apoptozu belirlemek için testis dokusunda TUNEL metodu uygulandı. Uygulamada çekirdekleri kahverengi ile boyanan hücreler apoptoza uğrayan, yani TUNEL (+) hücreler; mor renkte boyananlar ise nonapoptotik, TUNEL (-) hücreler, olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal işlemlerin değerlendirilmesi KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji laboratuvarındaki Olympus DP 71 (Olympus, Tokyo, Japan) kameralı ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Tokyo, Japan) incelenerek Analysis 5 Research programı (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) ile yapıldı.

5.3.1. TUNEL Boyama

TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling] tekniği için In situ cell death detection kit, POD (Roche, Mannheim, Germany) kiti kullanıldı. Boyama için testis dokusuna aşağıdaki işlemler sırayla uygulandı.

- 1) Oda ısısında 3x5 dk ksilende inkübe edildi.
- 2) %100 etanol 2x5 dk bekletildi.
- 3) %95 etanol 2x5 dk bekletildi.
- 4) %70 etanol 2x5 dk bekletildi.
- 5) Distile su 2x2 dk yıkandı.
- 6) %3 H₂O₂'de 15 dk bekletildi.
- 7) PBS'de 2x5 dk yıkandı.
- 8) Oda ısısında Large Volume UV (Ultraviyole ışın) block 10 dk bekletildi.
- 9) 75 mg Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve 50 µl TdT/dUTP karışımı ile dokular kaplandı, 37 °C'lik etüvde 1,5 saat nemli ortamda tutuldu.
- 10) PBS'de 2 dk yıkandı.
- 11) 100 ml converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde kaplandı ve 37 °C'lik etüvde inkübe edildi.
- 12) PBS'de 3x5 yıkandı.
- 13) 100 µl DAB ile 5 dk karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 14) Distile suda 1x2 kez yıkandı.
- 15) Hematoksilen ile 1dk boyandı ve çeşme suyu ile yıkandı.

- 16) %70 etanol 2x5dk bekletildi.
- 17) %95 etanol 2x5 dk bekletildi.
- 18) %100 etanol 2x5 dk bekletildi.
- 19) Ksilen 2x5 dk bekletildi.
- 20) Kurutulup kapatıldı.

5.4. Biyokimyasal İncelemeler

5.4.1. Doku 4-Hidroksinonenal Ölçümü

Testis dokusunda 4-hidroksinonenal (4-HNE) tayini CUSABIO (Çin) firmasının sıçanlar için ürettiği CSB-EQ027232RA ürün kodlu ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) kiti ile gerçekleştirildi. ELISA değerlendirmeleri KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

5.5. İstatistiksel Yöntemler

Her bir gruba ait değerler aritmetik ortalama ve standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) olarak ifade edildi. Denek sayısı her bir grupta $n=6$ olduğu için non-parametrik testler uygulandı. Bağımsız grupların değerlendirilmesinde Kruskal Wallis testi kullanıldı. Grup içindeki posthoc değerlendirmeler için Mann-Whitney U testi uygulandı. $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

Gebe sıçanların gebelik sürelerinin izlenmesi ile bazı gruplarda gebelik sürelerinin normal gebelik sürelerinden daha fazla olduğu görüldü. Kontrol grubu, LEV-A, LEV-B gruplarına ait gebe sıçanlar miadında (21. günde) doğururken LEV-C ve LEV-D grubuna ait gebe sıçanlar normal gebelik sürelerinden daha geç (24. ve 25. günlerde) doğurdular.

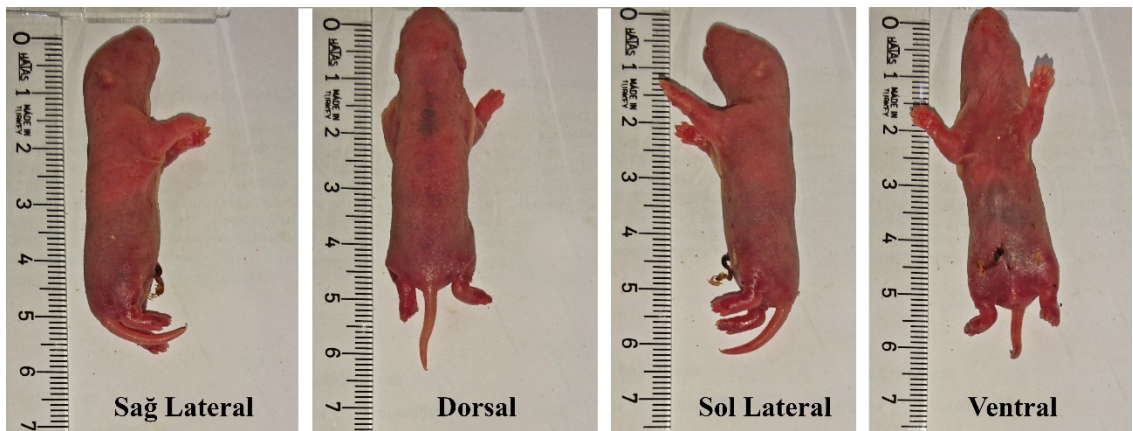
6.1. Teratojenik Bulgular

6.1.1 Morfolojik bulgular

Tüm gruplara ait yenidoğan sıçanların dış görünüşleri incelendiğinde Kontrol, LEV-A, LEV-B ve LEV-C gruplarına ait yenidoğan sıçanlarda herhangi bir morfolojik anomaliye rastlanmadı (Resim 5-6-7-8).



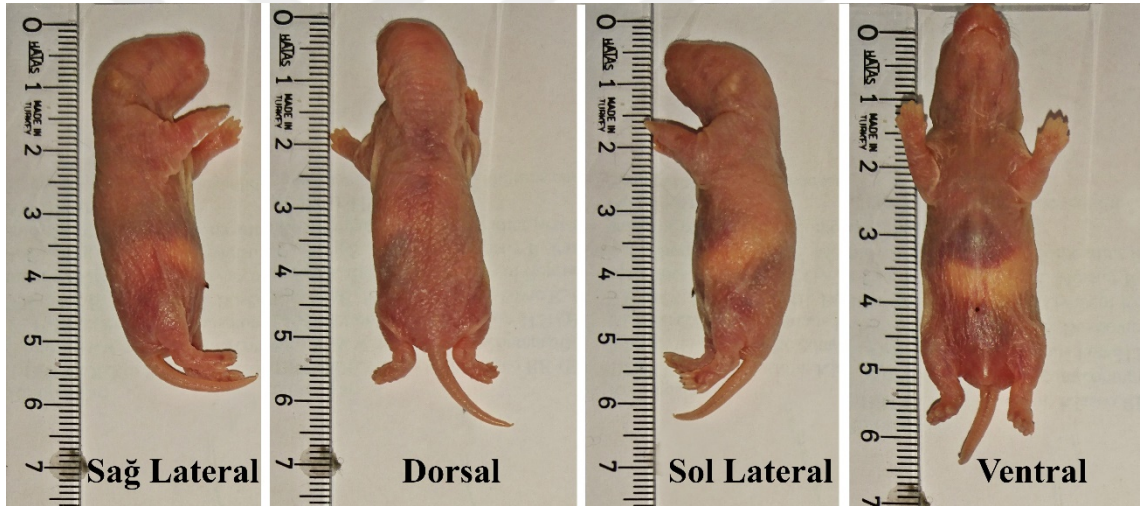
Resim 5. Kontrol grubuna ait yenidoğan sıçanın vücut morfolojisi



Resim 6. LEV-A grubuna ait yenidoğan sıçanın vücut morfolojisi



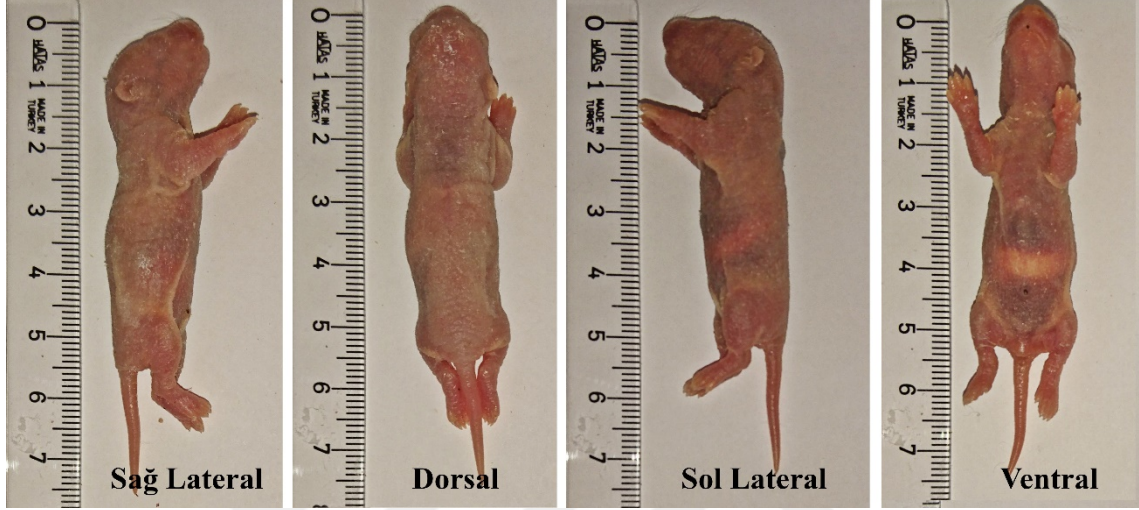
Resim 7. LEV-B grubuna ait yenidoğan sıçanın vücut morfolojisi



Resim 8. LEV-C grubuna ait yenidoğan sıçanın vücut morfolojisi

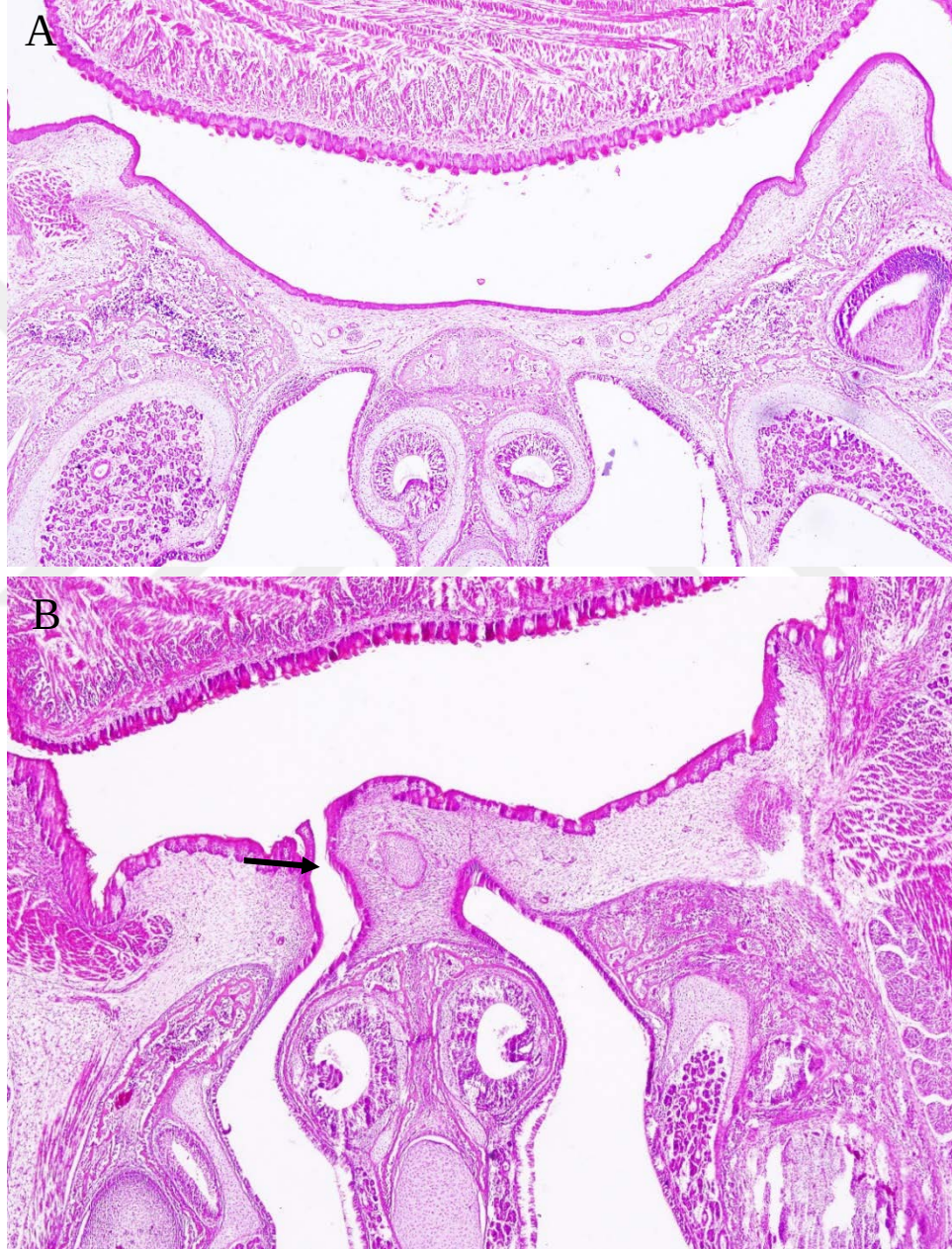
LEV-D grubu yenidoğan sıçanların bazılarında öncelikli kafatası ve eklem bölgeleri olmak üzere, vücudun diğer bölgelerinde deride pullanma tespit edildi. Ayrıca bu gruba ait yavru sıçanlarda yarı damak anomalisi de belirlendi (Resim 9).

Resim 9. LEV-D grubuna ait yenidoğan sıçanın vücut morfolojisi



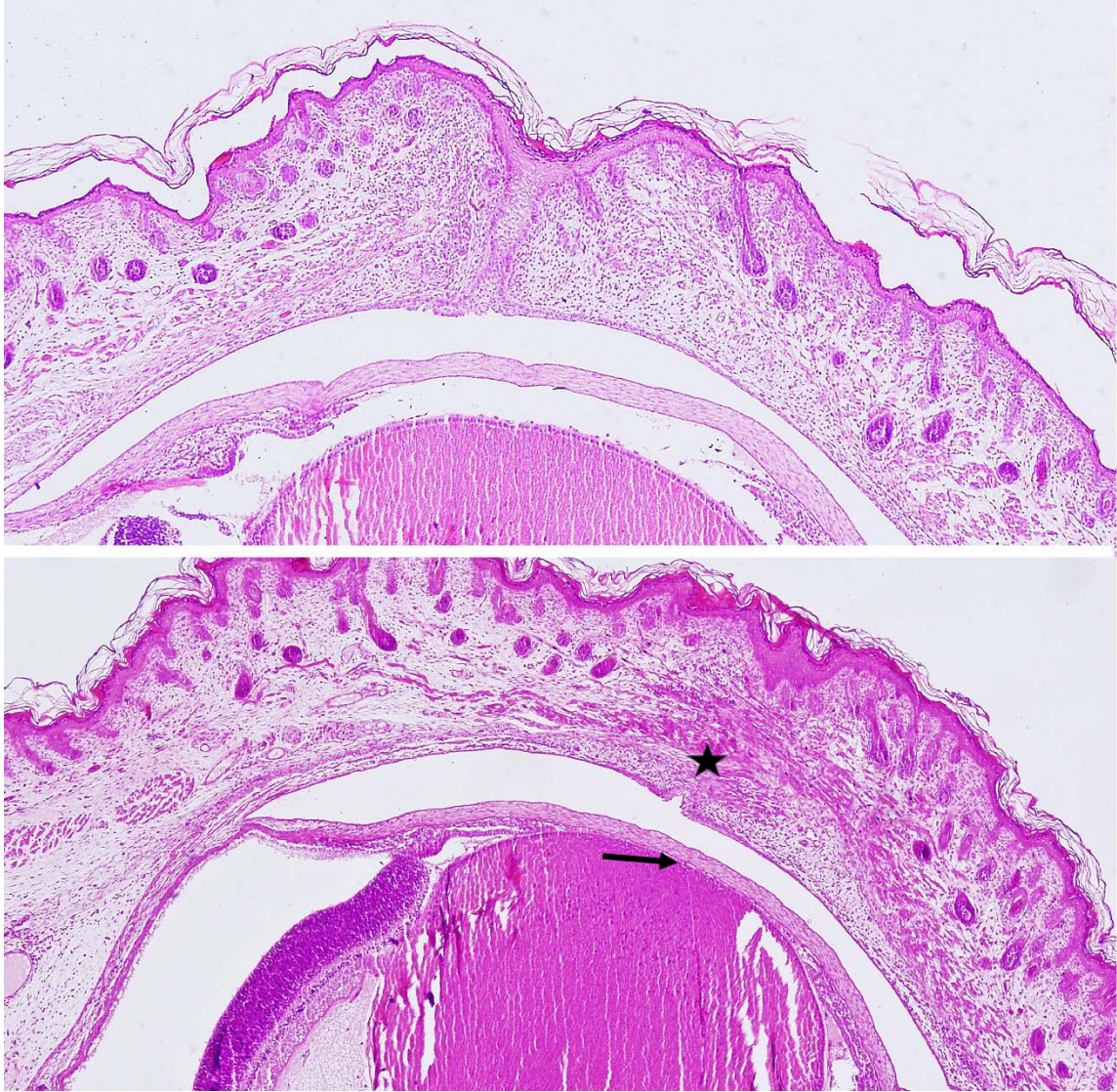
6.1.2 Kafa Kesitlerinin Mikroskopisi

Kontrol, LEV-A, LEV-B ve LEV-C gruplarına ait kafa kesitlerinde herhangi bir malformasyona rastlanmadı. LEV-D grubuna ait sıçanların kafa kesitlerinde ağız boşluğu ile nazal boşluk arasında damak yarığı görüldü (Resim 10).



Resim 10. Kontrol grubu (A) ve LEV-D grubu (B) yenidoğan sıçanlara ait kafa histolojisi (H&E, X200). Herhangi bir malformasyon görülmemektedir (A). LEV-D grubuna ait sıçanların burun boşluğu ile ağız boşluğu arasında yarık damak görülmektedir (B). Yarık damak ok (→) ile gösterilmiştir.

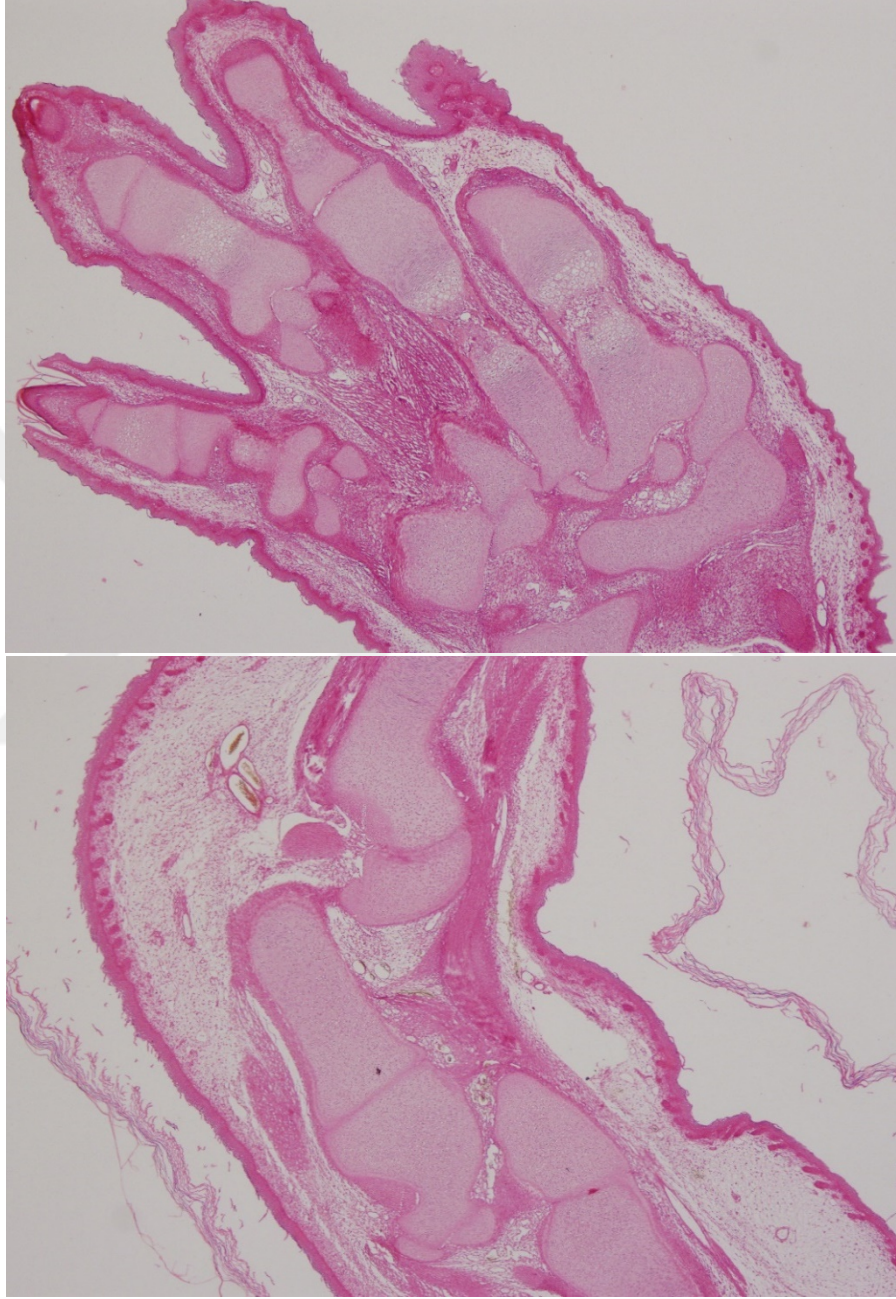
LEV-A, LEV-B ve LEV-C gruplarına ait sıçan yavrularının göz ve orbitalarında herhangi bir malformasyona rastlanmazken, LEV-D grubuna ait kafa kesitlerinde yapışık göz kapağı malformasyonu görüldü (Resim 11).



Resim 11. Kontrol grubu (A) ile LEV-D grubuna (B) ait göz ve göz kapağı kesiti (H&E, X200). Yapışık göz kapağı yıldız işareti (★) ile gösterilmektedir. Ok işareti (→) yapışık kornea ve lensi göstermektedir.

6.1.3 Uzun Kesitlerinin Mikroskopisi

Tüm gruplara ait sıçan yavrularının el ve ayak kesitlerinde herhangi bir malformasyona rastlanmadı (Resim 12).

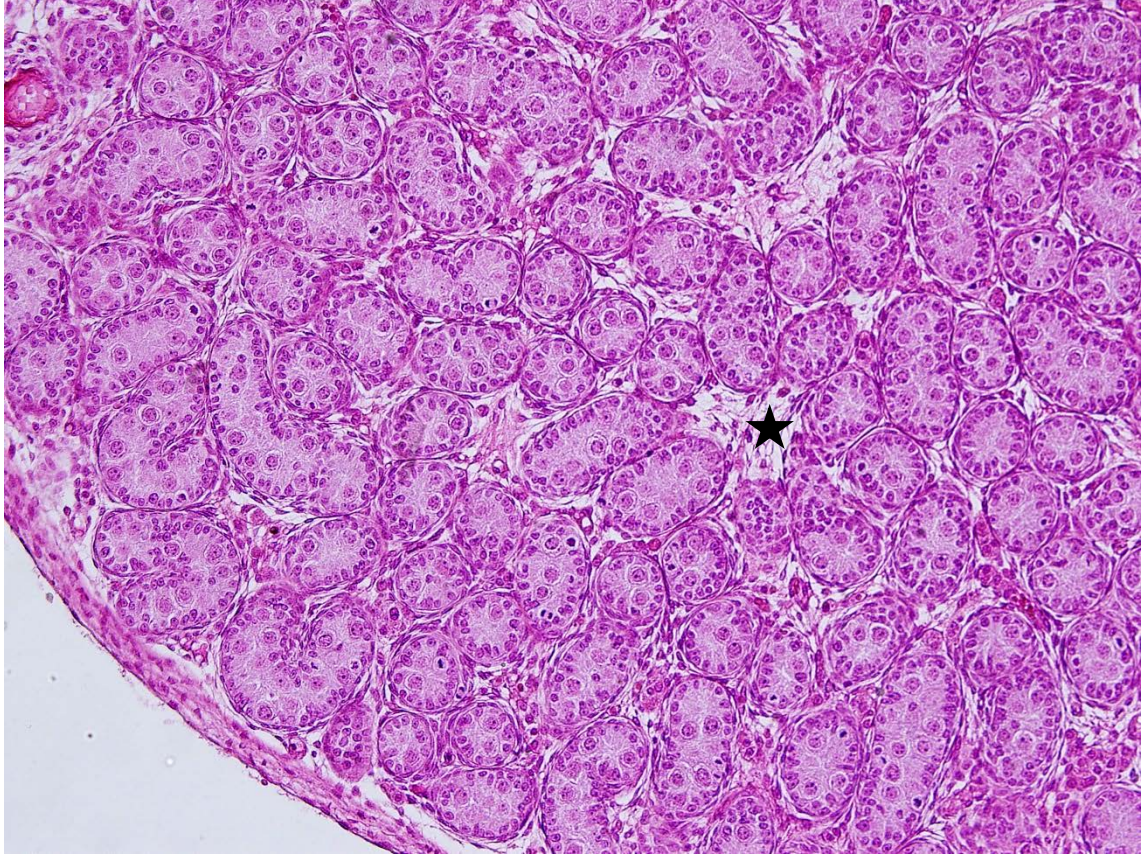


Resim 12. LEV-D grubu ön sağ (A) ve arka sağ (B) uzuva ait kesit (H&E, X400)

6.2. Histopatolojik Bulgular

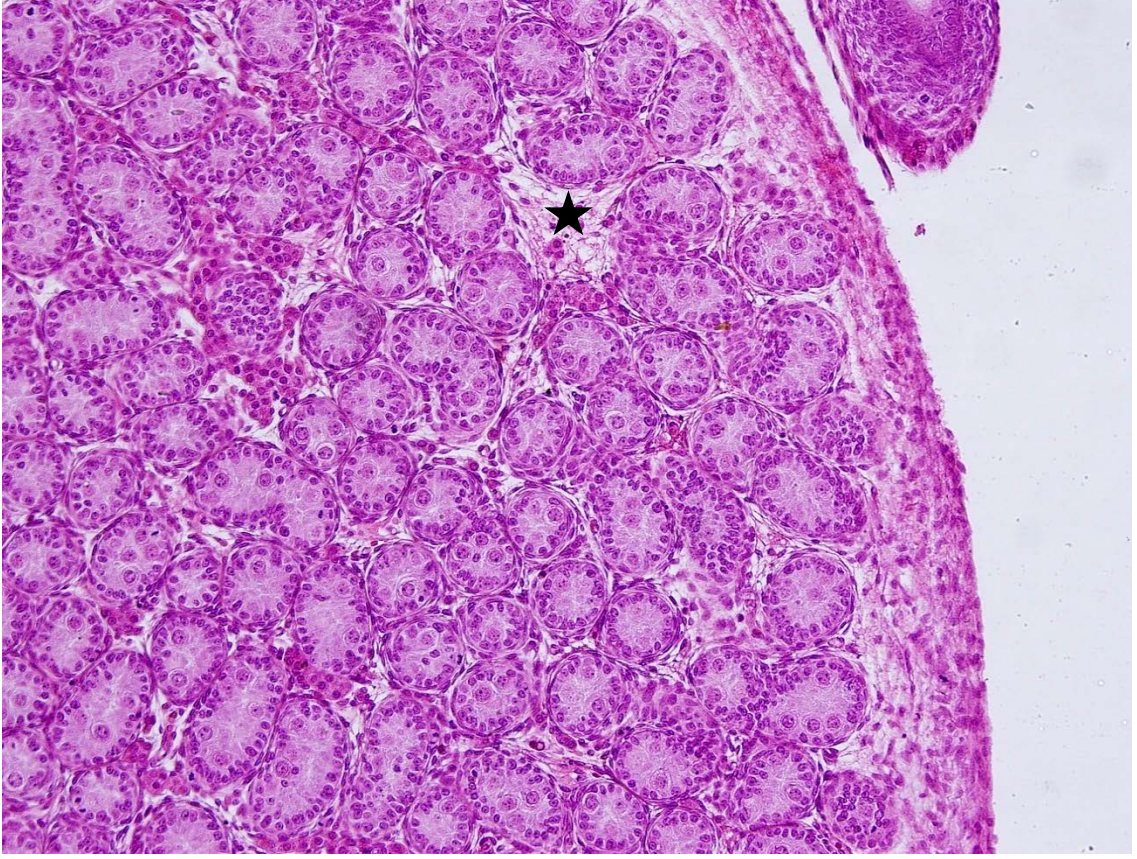
6.2.1 Testis Mikroskopisi

Kontrol grubunda seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri, spermatogonyumlar ve miyoid hücreler normal yapıda izlendi. İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinin normal morfolojisini koruduğu görüldü (Resim 13).



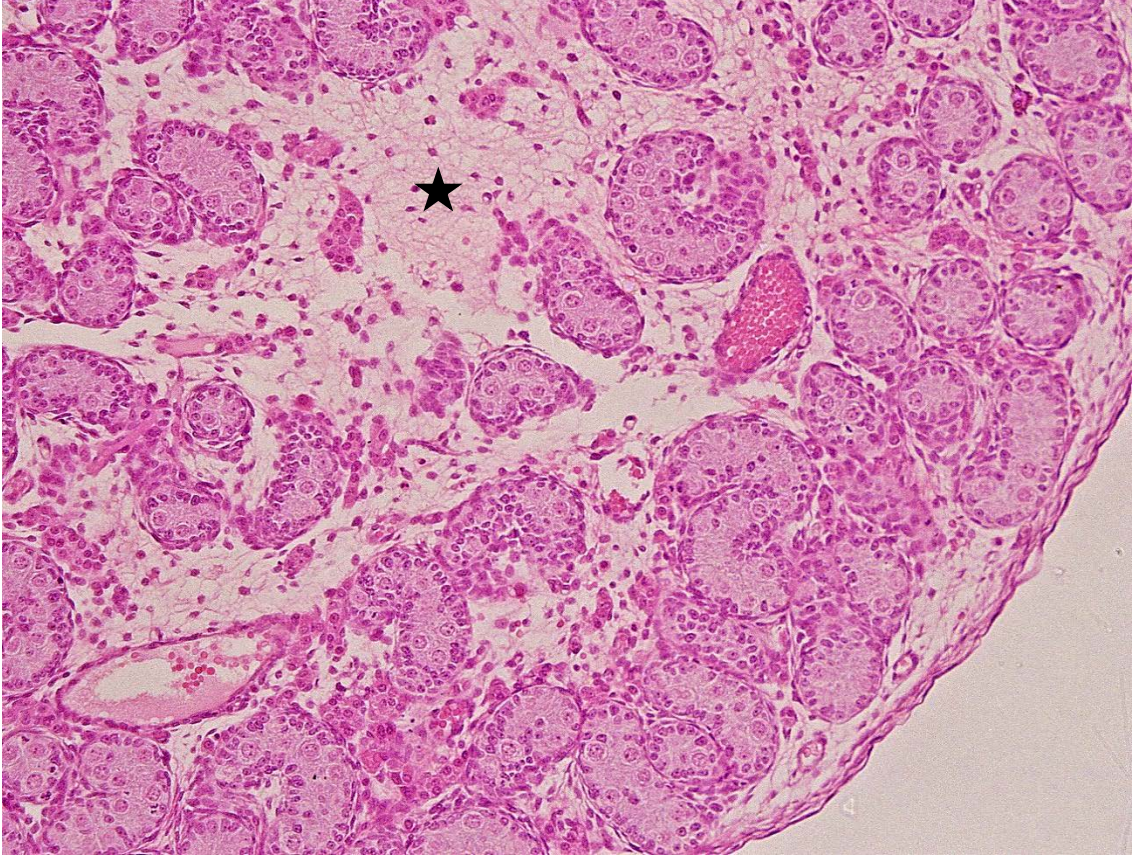
Resim 13. Kontrol grubuna ait testis dokusu (H&E, X200). Bağ dokusu artışı (★) ile gösterilmiştir.

Sham grubunda spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri ve miyoid hücreler normal yapıda gözlendi. Seminifer tübülde ve Leydig hücrelerinde herhangi bir farklılık tespit edilmedi (Resim 14).



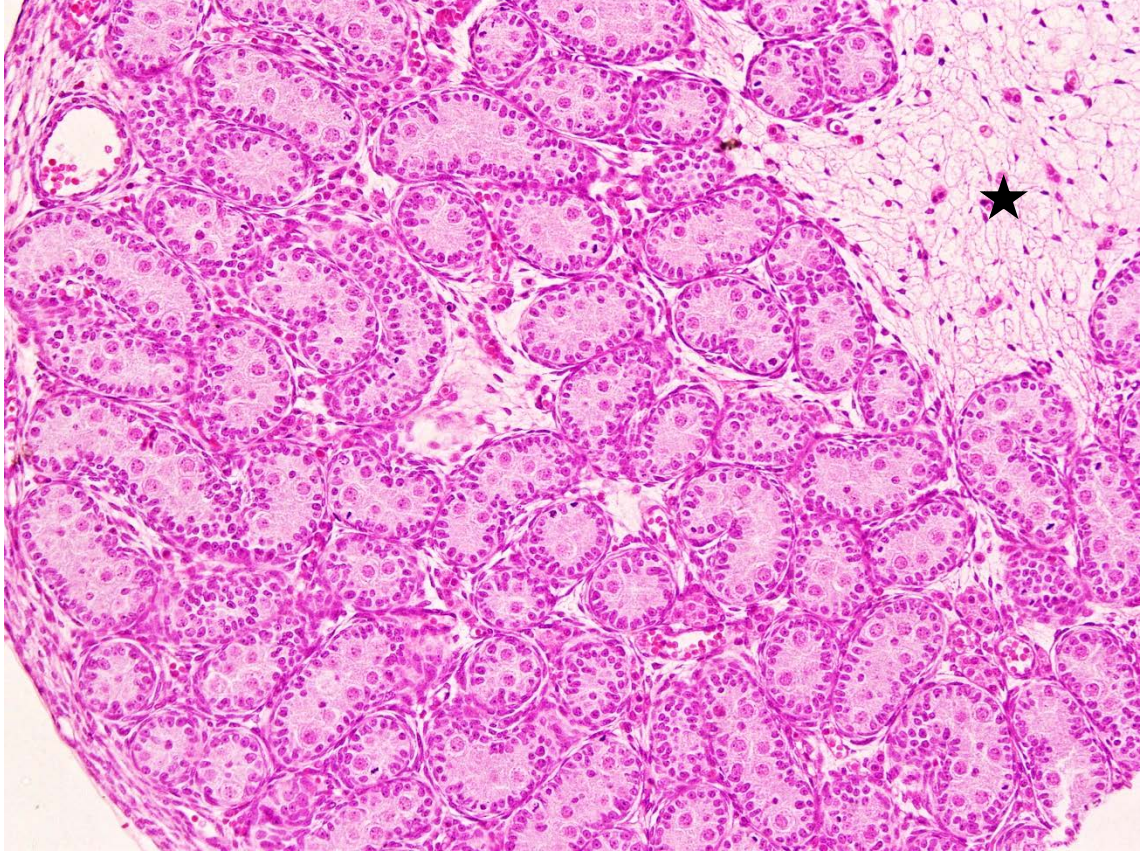
Resim 14. Sham grubuna ait testis dokusu (H&E, X200). Bağ dokusu artışı (★) ile gösterilmiştir.

LEV-A grubuna ait testis dokusu kesitlerinde spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri ve miyoid hücreler normal yapıda izlendi. Testisin merkezine doğru interstisyel alanda bağ dokusunda artış gözlemlendi (Resim 15).



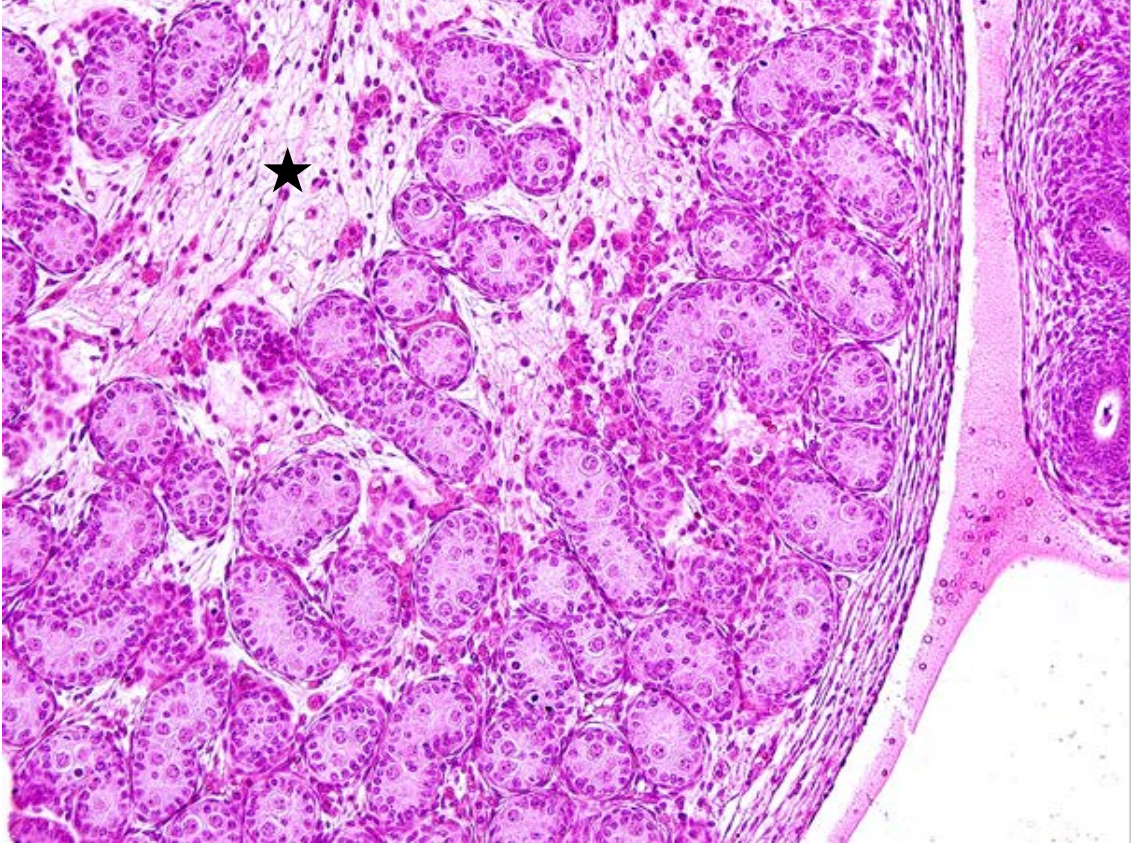
Resim 15. LEV-A grubuna ait sıçan testis dokusu (H&E, X200). Bağ dokusu artışı (★) ile gösterilmiştir.

LEV-B grubuna ait testis dokusu kesitlerinde spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri ve miyoid hücreler normal yapıda izlendi. Testisin merkezine doğru interstisyel alanda bağ dokusunda artış gözlemlendi (Resim 16).



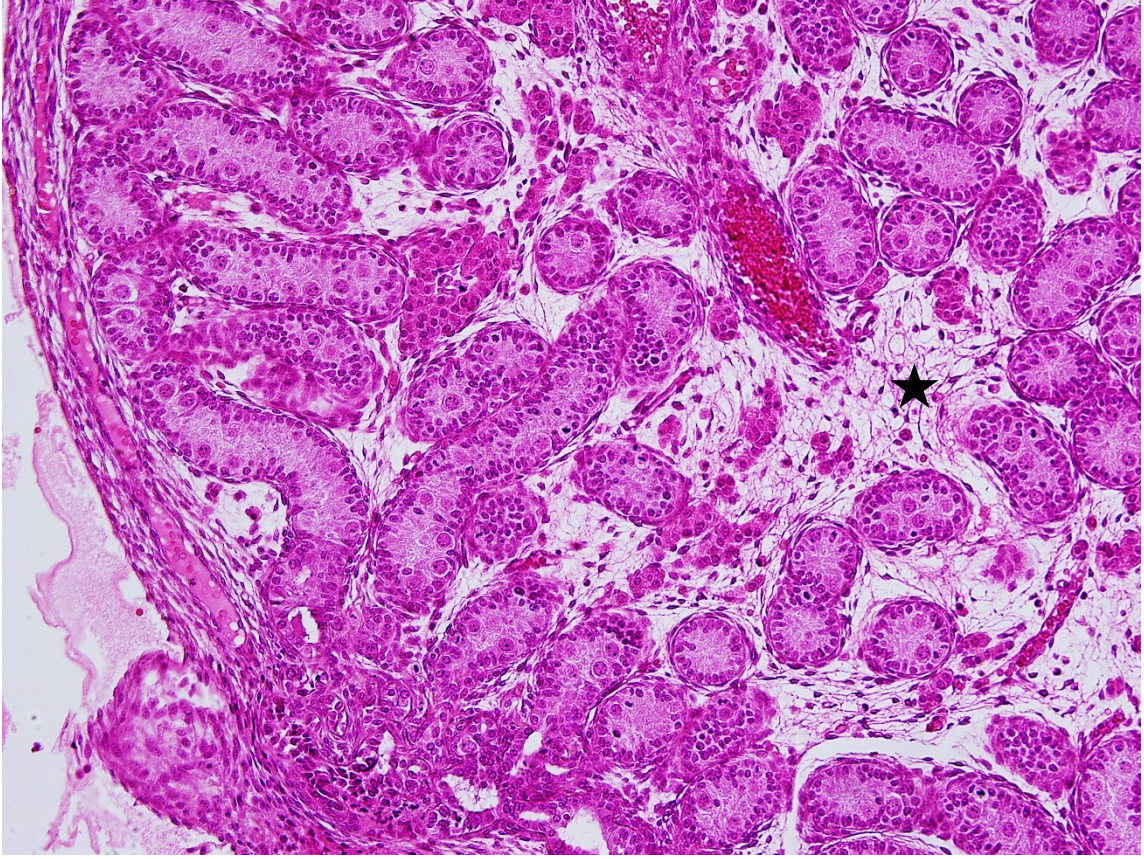
Resim 16. LEV-B grubuna ait sıçan testis dokusu (H&E, X200). Bağ dokusu artışı (★) ile gösterilmiştir.

LEV-C grubuna ait testis dokusu kesitlerinde spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri ve miyoid hücreler normal yapıda izlendi. Testisin merkezine doğru interstisyel alanda bağ dokusunda artış gözlemlendi (Resim 17).



Resim 17. LEV-C grubuna ait sıçan testis dokusu (H&E, X200). Bağ dokusu artışı (★) ile gösterilmiştir.

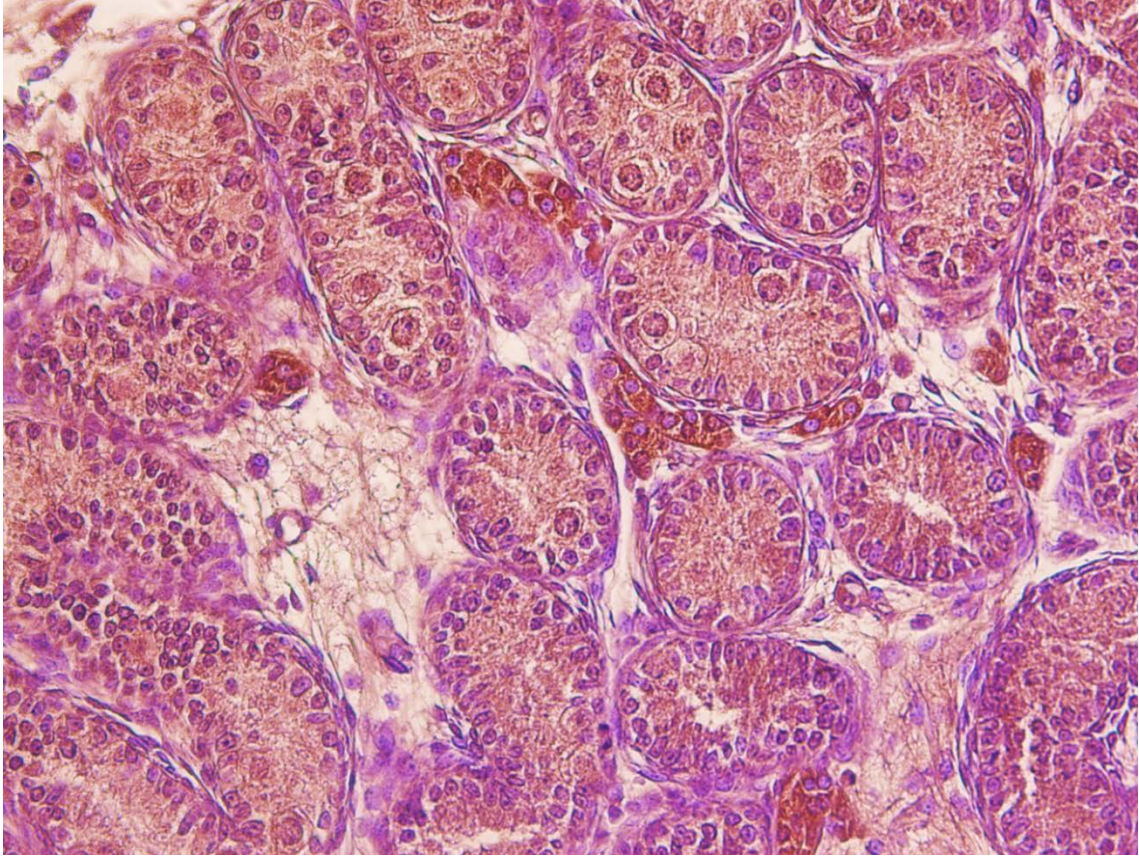
LEV-D grubuna ait testis dokusu kesitlerinde spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri ve miyoid hücreler normal yapıda izlendi. Testisin merkezine doğru interstisyel alanda bağ dokusunda artış gözlemlendi (Resim 18).



Resim 18. LEV-D grubuna ait sıçan testis dokusu (H&E, X200). Bağ dokusu artışı (★) ile gösterilmiştir.

6.2.2. TUNEL Sonuçları

Tüm gruplara ait testis doku örnekleri apoptotik hücreleri belirlemek amacı ile TUNEL tekniği kullanılarak 3,3-diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Testise ait hücrelerin nükleuslarında herhangi bir boyanma izlenmedi. İnterstisyel alandaki Leydig hücreleri sitoplazmaları koyu kahverengi olarak boyandı (Resim 19).



Resim 19. LEV-D grubuna ait sıçan yavrularının testis dokusu (TUNEL, X400)

6.3. Morfometrik Bulgular

Deney gruplarına ait yavru sıçanların testis dokusunda gelişen bağ dokusu alan ölçüm sonuçları tablo 3'te verilmiştir. Verilerin istatistiksel değerlendirmelerine ait sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

Bağ dokusu miktarının kontrol grubuna kıyasla LEV-C ve LEV-D gruplarında arttığı görüldü. Bu artış kontrol grubuna göre LEV-C ve LEV-D gruplarında anlamlı iken, SHAM, LEV-A, LEV-B gruplarında anlamlı değildi (sırasıyla; $p<0.05$, $p>0.05$)(Tablo 3).

Tablo 3. Testis bağ dokusu alanı

GRUPLAR		Bağ dokusu alanı (μm^2)
1.	Kontrol	52196,7 $\pm$ 27406,1
2.	SHAM	63279,1 $\pm$ 26803,4
3.	LEV-A	56040,1 $\pm$ 25902,1
4.	LEV-B	70099,2 $\pm$ 27412,5
5.	LEV-C	149447,2 $\pm$ 21924,1 ^{a, b, c, d}
6.	LEV-D	186231,1 $\pm$ 27669,4 ^{a, b, c, d}

^a Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

^b SHAM grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

^c LEV-A grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

^d LEV-B grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

6.4. Biyokimyasal Değerlendirmeler

Deney gruplarına ait testis dokusunda 4-hidroksinonenal (4-HNE) değerleri ölçüldü ve sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirildi (Tablo 4).

Testis dokusunda 4-HNE seviyesinde, kontrol grubuna göre, Sham ve LEV-A grubunda anlamlı bulunmayan bir artış görülürken ($p>0.05$), LEV-B ve LEV-C grubunda anlamlı bir artış görüldü ($p<0.05$). LEV-D grubunda ise kontrol grubuna göre değişiklik olmadığı görüldü ($p>0.05$). Sham grubuna göre LEV-A grubunda 4-HNE seviyesinde anlamlı bir olmazken, LEV-B grubunda anlamlı artış görüldü ($p<0.05$). LEV-A grubuna göre LEV-D grubu 4-HNE seviye değişiklikleri anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Testis dokusu 4-HNE seviyesinde LEV-B grubuna göre, LEV-C ve LEV-D grubunda anlamlı olmayan azalış gösterdi (Tablo 4).

Tablo 4. Testis dokusunda biyokimyasal değerlerin aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	4-HNE (ng/mL)
1. Kontrol	22,7±2,6
2. Sham	27,5±3,3
3. LEV-A	27,4±3,8
4. LEV-B	37,1±4,4 ^{a, b, c}
5. LEV-C	32,8±6,1 ^a
6. LEV-D	22,9±6,1

^a Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

^b SHAM grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

^c LEV-A grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

^d LEV-B grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gebelik sağlıklı geçirilmesi gereken bir süreçtir. Fakat çevresel faktörler ya da çeşitli kronik hastalıklar bu durumu etkileyebilir. Gebelikte ilaç kullanımı oldukça sıktır. Yaşam tarzı değişiklikleri sebebi ile kullanılan psikotrop ilaçların yanı sıra çeşitli kronik hastalıklar da gebelikte ilaç kullanımını gerekli kılmaktadır (47). Günümüzde epilepsi tedavisinde yaygın olarak yeni nesil antikonvülzan ilaçlar kullanılmaktadır. Geniş spektrumlu antikonvülzan olarak LEV kullanımı giderek artmaktadır. Meador ve arkadaşları en sık reçete edilen monoterapilerden birinin LEV olduğunu ve bu ilacın eski antikonvülzanlardan daha güvenli olabileceğini bildirmişlerdir (48, 49). Ancak daha güncel çalışmalarda, LEV'in karaciğer fonksiyon ve serum amonyak düzeylerinde değişikliğe neden olduğuna dair kanıtlar vardır (50). Yine aynı şekilde Hill ve ark.'nın sıçan ve tavşanlar üzerinde yapmış oldukları bir araştırmada, yüksek dozlarda uygulanan LEV'in fetal ölümlere sebep olduğu bildirilmiştir (12). Yapmış olduğumuz çalışmada Kontrol grubu, LEV-A, LEV-B gruplarına ait gebe sıçanlar normal süresinde doğururken LEV-C ve LEV-D grubuna ait gebe sıçanlar normal sürelerinden daha geç (24. ve 25. günlerde) doğurmuşlardır. Bu durum bize LEV'in intrauterin yaşam süresinin uzamasına neden olduğunu göstermektedir. LEV özellikle 3. trimesterde uterus disfonksiyonuna sebep olarak prenatal gelişim süresinin gecikmesine neden olmuş olabilir.

Teratojenik maddelerin 3. trimesterde fonksiyonel bozukluk oluşturduğu bilinmektedir (16). Üçüncü trimesterde 100 mg/kg LEV uyguladığımız LEV-C grubuna ait gebe sıçanların bir tanesi beklenen doğum zamanında doğuramamış ve 23. günde ölmüştür. Ölen gebe sıçanın otopsisinde herhangi anatomik anormallik görülmemiştir. Bu sıçanın yavrularının otopsisinde de herhangi bir teratojenik bulguya rastlanılmamıştır. Belli dozlarda uygulanan LEV'in uterusun kontraktıl disfonksiyonuna sebep olabileceği, bu bağlamda LEV-C grubunda gerçekleşen anne ölümünün, LEV'in uterus yetersizliği sonucu doğumun gerçekleşmemesi ile ilgili olabileceği düşünülebilir.

LEV'a benzer olarak en çok kullanılan yeni nesil antiepileptik ilaçlardan biri de Lamotrijindir (LTG). Literatürde bu etken madde ile ilgili birçok çalışma mevcut olup en düşük malformasyon oranına sahip antikonvülzanlar arasında yer almaktadır (49). Manent ve arkadaşları 2008 yılında yaptığı çalışmada, LTG'in doza bağımlı olarak yüksek dozlarda (20 mg/kg/day) hipokampal ve kortikal beyin malformasyonlarına sebep olduğu bildirmiştir (51). Padmanabhan ve arkadaşlarının 2003 yılında fareler üzerinde

yaptıkları çalışmada Lamotrijinin intraperitoneal olarak düşük dozlarda uzun süreli uygulanması yüksek dozlarda tek doz uygulamalarından daha fazla malformasyona sebep olduğu bildirilmiştir. Bu yavrularda embriyonik rezorpsiyon insidansının artması ve kraniyofasiyal malformasyonların (yarık damak, kemerli damak ve midfasiyal hipoplazi) yanı sıra, ürogenital anomaliler ve çeşitli derecelerde iskelet kusurlarına da neden olduğu bildirilmiştir (52). Biz çalışmamızda üç trimester dönemi ve tüm gebelik boyunca 100 mg/kg LEV uyguladık. Deney bitiminde yapmış olduğumuz morfolojik incelemeler sonucunda LEV'in tüm gebelik (LEV-D grubu) süresince uygulanması ile deride pullanma ve kraniyofasiyal malformasyonlar oluştuğunu tespit ettik. Ayrıca bu yavrulara ait kafa kesitlerinin histolojisinde, yarık damak ve göz kapağı anomalileri ile retina anomalisi görüldü.

Nissen-Meyer ve arkadaşları 2007 yılında immatür sıçanlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, 150 mg/kg dozunda uzun süreli kullanılan LEV'in iskelet boyuna büyümesini bozduğunu ve olgunlaşmamış sıçanlarda kırık riskini arttırdığı bildirmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada 100 mg/kg LEV uygulanan gebe sıçanların yavrularının kol ve bacak kesitlerinde herhangi yapısal bozukluk ile karşılaşmadı.

Literatürde sıçanların testis dokusu üzerine LEV toksisitesiyle ilgili çok az çalışma mevcuttur (53, 54). Tüm yaş gruplarında iyi güvenlik profili nedeniyle epilepsi tedavisinde üreme çağındaki erkek hastalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilacın erkek üreme sistemi üzerindeki toksik etkilerini değerlendiren az çalışma mevcuttur. Yenidoğanlar ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Cincioğlu-Palabıyık ve arkadaşları 2017 de kainik asit ile deneysel epilepsi modeli oluşturulmuş erişkin sıçanlarda LEV'in hipokampal ve testiküler aromataz ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Yetişkin sıçanlara 8 hafta boyunca düzenli olarak 27 ve 54 mg/kg LEV uygulanmış, gonadların histolojik kesitlerinde herhangi patolojik bulguya rastlanmamıştır (53).

Baysal ve arkadaşları üreme toksisitesi ile ilgili yapmış oldukları çalışmada erişkin sıçanlara 70 gün boyunca 50, 150 ve 300 mg/kg LEV uygulamış, çalışma sonucunda LEV'in DNA hasarını artırdığını bildirmişlerdir. Testis dokusunda LEV tarafından oluşturulan oksidatif stres spermatogenez sürecinde rol oynayan serum hormon düzeylerinin değişmesine neden olmuştur. Ayrıca doza bağımlı olarak vakuolizasyon, hücresel ödem, spermatid hasarı, hücre dejenerasyonu ve nekrozu gibi

histopatolojik bulgular görülmüştür (54). Biz, yapmış olduğumuz çalışmada, testislerde herhangi hücresel dejenerasyona rastlamadık; fakat seminifer tübül gelişim sırasında bağ dokusunda artış olduğunu tespit ettik. 3. trimester ve tüm gebelik boyunca yapılan uygulamalarda yenidoğan sıçan testislerinde bağ dokusu alanında kontrol grubuna nazaran anlamlı bir artış olduğunu gördük. Bu bağlamda LEV'in 3. trimester ve tüm gebelik boyunca uygulanması ile testis gelişimini belli ölçüde olumsuz etkilediğini söyleyebiliriz.

Oksidatif stres, dokunun antioksidan kapasitesini aşan oksijen radikallerin üretiminden kaynaklanmaktadır. Oksidatif stres erkek infertilitesi ile ilgili birçok olay veya durumun indükleyicisidir. Oksidatif stresin, ateroskleroz, hipertansiyon, diabetes mellitus, iskemik hastalıklar ve maligniteler gibi yaşam tarzı ile ilişkili hastalıkların patogenezinde rol oynadığı iyi bilinmektedir. Örneğin, çevresel maruziyet, kriptorşidizm ve varikosel gibi fiziksel koşulların testiküler oksidatif stresi arttırdığı ve germ hücresi apoptozuna bağlı hipospermatogeneze neden olduğu bilinmektedir. Bu stres koşulları, testiküler mikrovasküler kan akımı, germ hücre apoptozunun dinamiklerinde değişimlere neden olabilir. Testiküler oksidatif stres, erkek infertilitesinin altında yatan etkenlerin çoğunda ortak bir özellik olarak görünmektedir (55).

Oksidatif stresin, erkek infertilitesinde rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır. Pek çok reaktif oksijen türü arasında, 4-HNE, lipid peroksidasyonunun önemli bir ürünüdür ve bu ürün, proteinlerin sistein, lizin ve histidin kalıntılarına kovalent olarak bağlanarak proteinlerin bozulmasına neden olur (56). Literatürde yenidoğan sıçanlarda 4-HNE ile ilgili kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Bunlardan biri Yang ve arkadaşlarının akroleine maruz kalan gebe sıçanların yavrularında üreme toksisitesi ile ilgili yapmış oldukları çalışmadır. Yang ve arkadaşları gebe sıçanlara, gestasyonun 14.-20. günleri 1, 2 ve 5 mg/kg akrolein intraperitoneal olarak uygulamış ve deney bitiminde (gestasyonun 21. gününde) testisler biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Histolojik incelemelerde Hematoksilen-Eozin ve TUNEL metodu ile immünohistokimyasal olarak boyanan testislerde herhangi bir bulguya rastlanılmamıştır. Biyokimyasal incelemelerde fetal testislerde oksidatif stres göstergesi olan 4-HNE'nin protein ekspresyon düzeyleri incelenmiş, 4-HNE'nin protein ekspresyon seviyeleri Kontrol grubuna kıyasla 2 ve 5 mg/kg akrolein gruplarında doza bağımlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir (57).

Baysal ve arkadaşları histopatolojik bulgulara ilaveten biyokimyasal parametreleri de değerlendirmişlerdir. Erişkin erkek sıçanlarda LEV'in üreme toksisitesi üzerine etkisini inceledikleri çalışmada bir lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) ölçmüşlerdir. Yapmış oldukları çalışmada sıçanlara 70 gün boyunca 50, 150 ve 300 mg/kg LEV uygulamışlardır. Deney sonucunda Kontrol ve 50 mg/kg LEV uygulanan gruplara kıyasla, 150 ve 300 mg/kg uyguladıkları grupta testis dokularında MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görmüşlerdir (54).

Teratojenler ve toksik ajanlar organogenez döneminde daha çok bozukluklar oluşturmaktadırlar (16). Bizim çalışmamızda, testis dokusu 4-HNE seviyesinde Kontrol grubuna göre Sham grubunda artış belirlendi. Bu artış oral gavaj manipülasyonu sonucu oluşan stresten kaynaklanmış olabilir. LEV-B grubu gebe sıçanlara 2. trimesterde verildiği için, LEV'in bu dönemde daha fazla dejeneratif etki ile oksidatif stres oluşturma ihtimali bulunmaktadır. LEV-B grubundaki dikkat çeken bu 4-HNE artışı oksidatif stresin bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir. LEV-D grubuna baktığımızda Sham grubuna göre 4-HNE seviyesinde düşüş olduğunu tespit ettik. Bu bağlamda tüm gebelik süresince uygulanan LEV'in metabolik koruyucu antioksidan sistemlerini devreye sokarak, doku oksidatif stresini azaltmış olabileceğini düşünüyoruz.

Doku hasarını belirleyebilmek için kullanılan önemli yöntemlerden biri de TUNEL tekniğiyle AI değerlendirmesidir. TUNEL metodu ile 7 kere tekrarlayarak yaptığımız immün işaretlemelemlerde testis hücrelerinin nükleuslarında herhangi bir pozitif boyamaya rastlamadık. Tüm gruplara ait yapılan TUNEL boyamalarında Leydig hücrelerinin sitoplazmalarının koyu kahverengi, çekirdeklerinin ise mavi-mor boyandığı görüldü. Hem TUNEL hem de Hematoksilen - Eozin boyaması ile hazırlanan preparatlarda bu hücrelerin interstisyel dokuda gruplar halinde bulunduğu ve bu hücrelerde hipertrofi oluştuğu tespit edildi. Hematoksilen - Eozin boyası ile hazırlanan preparatlarda Leydig hücre sitoplazmalarında LEV verilen gruplarda eozinofili artışı belirlendi. Eozinofili artışı özellikle LEV-C grubunda en belirgindi. Bu bulgular LEV'in Leydig hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna neden olabileceğini işaret etmektedir. Bununla birlikte konuya açıklık getirilmesi açısından kan testosteron düzeylerinin belirlenmesi başta olmak üzere bazı Leydig hücre fonksiyonlarının çalışılmasına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada elde edilen veriler, LEV verilen gebe sıçanların yavrularının testislerinde bazı histopatolojik ve biyokimyasal bozukluklar olduğunu göstermektedir. Bu konuya daha fazla katkıda bulunulması açısından elektron mikroskobu, moleküler biyoloji gibi daha ileri teknoloji ve teknikler ile LEV'in farklı dozlarda kullanılacağı daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu alışma gebe sıçanlara verilen LEV'in yavru testisleri üzerindeki toksik etkilerini inceleyen tek çalışmadır. Bu açıdan sonuçlarımız literatüre katkı sağlayacaktır.



8. KAYNAKLAR

1. Erten N, Erişgin Z (2014). Gebelikte Epilepsi Tedavisinde Yeni Nesil Antiepileptik İlaçlar. Journal of Harran University Medical Faculty 11(3).
2. Karadaş B, Can H, Yılmaz İ, Demir Ö, Temiz TK, Kaplan YC (2014). İlaçların gebelikte kullanımlarına dair risk iletişiminde yeni dönem: FDA gebelik risk kategorileri değişiyor. Türkiye Aile Hekimliği Dergisi 18(4): 195-198.
3. Madazli R, Öncül M, Albayrak M, Uludağ S, Eşkazan E, Vildan O (2004). Gebelik ve epilepsi: 44 olgunun değerlendirilmesi. Cerrahpaşa tıp dergisi 35(3).
4. Thorpy M, Zhao CG, Dauvilliers Y (2013). Management of narcolepsy during pregnancy. Sleep medicine 14(4): 367-376.
5. Kayaalp SO (2000). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 1. cilt Hacettepe-Taş Kitapçılık Limited Şti.
6. Wlodarczyk BJ, Palacios AM, George TM, Finnell RH (2012). Antiepileptic drugs and pregnancy outcomes. American Journal of Medical Genetics Part A 158(8): 2071-2090.
7. Yavuz ENV, Baykan B. Epilepsi Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar.
8. Patel SI, Pennell PB (2016). Management of epilepsy during pregnancy: an update. Therapeutic advances in neurological disorders 9(2): 118-129.
9. Mazarati AM, Baldwin R, Klitgaard H, Matagne A, Wasterlain CG (2004). Anticonvulsant effects of levetiracetam and levetiracetam–diazepam combinations in experimental status epilepticus. Epilepsy research 58(2-3): 167-174.
10. Bhushan V. (2003). Antiepileptic Drugs: Rene H Levy, Richard H Mattson, Brian S Meldrum, Emilio Perucca (Eds); Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2002, 900 pages, hardback, ISBN: 0-7817-2321-3 (US \$179.00). WB Saunders; p.
11. Berto P (2002). Quality of life in patients with epilepsy and impact of treatments. Pharmacoeconomics 20(15): 1039-1059.
12. Hill DS, Wlodarczyk BJ, Palacios AM, Finnell RH (2010). Teratogenic effects of antiepileptic drugs. Expert review of neurotherapeutics 10(6): 943-959.
13. Eroschenko VP, Di Fiore MS (2013). DiFiore's atlas of histology with functional correlations Lippincott Williams & Wilkins.
14. Ross MH, Pawlina W (2006). Histology Lippincott Williams & Wilkins.

15. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (2003). Basic histology: text & atlas McGraw-Hill New York.
16. Langman J, Sadler T (1981). Langman's medical embryology Williams & Wilkins.
17. Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns CF (1997). Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocrine Reviews* 18(2): 259-280.
18. Burgu B, Telli O (2010). Testiküler Embriyoloji ve Testiküler İnış Mekanizmalarına Dair Hipotezler. *Turk Urol Sem* 1: 47-51.
19. Snell R (2000). Structures of the Anterior Abdominal Wall: Scrotum, Testis, and Epididymides. *Clinical Anatomy for Medical Students* 6th ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 153-157.
20. Spence AP (1986). Basic human anatomy Benjamin-Cummings Publishing Company.
21. Ovalle WK, Nahirney PC (2013). Netter's Essential Histology E-Book Elsevier Health Sciences.
22. Bittman EL (2016). Timing in the testis. *Journal of biological rhythms* 31(1): 12-36.
23. Haider SG (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 233(4): 181-241.
24. Su L, Mruk DD, Cheng CY (2011). Drug transporters, the blood–testis barrier, and spermatogenesis. *Journal of Endocrinology* 208(3): 207-223.
25. Griswold MD (2015). Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiological reviews* 96(1): 1-17.
26. Iliadou PK, Tsametis C, Kaprara A, Papadimas I, Goulis DG (2015). The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones* 14(4): 504-514.
27. Dym M (1994). Spermatogonial stem cells of the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(24): 11287-11289.
28. Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster RL, Palmiter RD (1989). Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 337(6205): 373.
29. Mecklenburg JM, Hermann BP (2016). Mechanisms regulating spermatogonial differentiation. *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*. Springer, 253-287.

30. Lindemann CB, Lesich KA (2016). Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton* 73(11): 652-669.
31. Kühn AL, Scortegagna E, Nowitzki KM, Kim YH (2016). Ultrasonography of the scrotum in adults. *Ultrasonography* 35(3): 180.
32. Rahman MS, Kwon WS, Pang MG (2017). Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. *Molecular reproduction and development*.
33. Ernst LM, Ruchelli ED, Huff DS (2011). Color atlas of fetal and neonatal histology Springer Science & Business Media.
34. Mulder GJ, Dencker L (2006). Pharmaceutical toxicology: safety sciences of drugs Pharmaceutical Press.
35. Hanson JW, Harris C, Holmes LB, Juchau MR, Kimmel GL, Knudsen TB, Mirkes PE, Sadler TW, Schoenwolf GC, Sulik KK (1996). A teratologist to extinction. Ad Hoc Committee on Grant Funding. *Teratology* 53(4): 223-224.
36. Hale F (1935). The relation of vitamin A to the eye development in the pig. *Proceedings of the American Society of Animal Nutrition* 1935(1): 126-128.
37. Jamkhande PG, Chintawar KD, Chandak PG (2014). Teratogenicity: a mechanism based short review on common teratogenic agents. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(6): 421-432.
38. Abou-Khalil B (2008). Levetiracetam in the treatment of epilepsy. *Neuropsychiatric disease and treatment* 4(3): 507.
39. Kartal A (2017). Can High-Dose Levetiracetam Be Safe? A Case Report of Prolonged Accidental High-Dose Levetiracetam Administration and Review of the Literature. *Clinical neuropharmacology* 40(5): 217-218.
40. Nash EM, Sangha KS (2001). Levetiracetam. *American journal of health-system pharmacy* 58(13): 1195-1199.
41. Akşit H, Bildik A (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 19(1): 55-63.
42. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP, Wang X (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303): 1129-1132.

43. Güleş Ö, Ülker E (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 19(2): 73-78.
44. Fang Y-Z, Yang S, Wu G (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *nutrition* 18(10): 872-879.
45. Ozyurek H, Bozkurt A, Bilge S, Ciftcioglu E, Ilkaya F, Bas DB (2010). Effect of prenatal levetiracetam exposure on motor and cognitive functions of rat offspring. *Brain and Development* 32(5): 396-403.
46. Peng Y, Wang W, Tan T, He W, Dong Z, Wang YT, Han H (2016). Maternal sleep deprivation at different stages of pregnancy impairs the emotional and cognitive functions, and suppresses hippocampal long-term potentiation in the offspring rats. *Molecular brain* 9(1): 17.
47. Çetin M (2011). Gebelikte Psikotrop İlaç Kullanımı: Bir Güncelleme. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni-Bulletin of Clinical Psychopharmacology* 21(2): 161-173.
48. Meador KJ, Penovich P, Baker GA, Pennell PB, Bromfield E, Pack A, Liporace JD, Sam M, Kalayjian LA, Thurman DJ (2009). Antiepileptic drug use in women of childbearing age. *Epilepsy & Behavior* 15(3): 339-343.
49. Bastaki S, Padmanabhan R, Abdulrazzaq Y, Chandranath S, Shafiulla M (2001). Studies on the teratogenic effects of lamotrigine in mouse fetuses. *Front Fetal Health* 3(11-12): 295.
50. İncecik F, Hergüner MÖ, Altunbaşak Ş (2014). Levetirasetam ve Valproik asid: Çocuklarda Karaciğer Fonksiyonları ve Amonyak Düzeyleri Üzerine Etkileri. *Cukurova Medical Journal* 39(1): 70-74.
51. Manent J-B, Jorquera I, Franco V, Ben-Ari Y, Perucca E, Represa A (2008). Antiepileptic drugs and brain maturation: fetal exposure to lamotrigine generates cortical malformations in rats. *Epilepsy research* 78(2-3): 131-139.
52. Padmanabhan R, Abdulrazzaq Y, Bastaki S, Shafiullah M, Chandranath S (2003). Experimental studies on reproductive toxicologic effects of lamotrigine in mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 68(5): 428-438.
53. Cincioglu-Palabiyik M, Üner M, Ertoý-Baydar D, Sara Y, Karahan H, Kelicen-Uğur P (2017). Chronic levetiracetam decreases hippocampal and testicular aromatase expression in normal but not kainic acid-induced experimental model of acute seizures in rats. *Neuroreport* 28(14): 903-909.

54. Baysal M, Ilgin S, Kilic G, Kilic V, Ucarcan S, Atli O (2017). Reproductive toxicity after levetiracetam administration in male rats: Evidence for role of hormonal status and oxidative stress. *PloS one* 12(4): e0175990.
55. Turner TT, Lysiak JJ (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of andrology* 29(5): 488-498.
56. Shiraishi K, Naito K (2007). Effects of 4-hydroxy-2-nonenal, a marker of oxidative stress, on spermatogenesis and expression of p53 protein in male infertility. *The Journal of urology* 178(3): 1012-1017.
57. Yang Y, Zhang Z, Zhang H, Hong K, Tang W, Zhao L, Lin H, Liu D, Mao J, Wu H (2017). Effects of maternal acrolein exposure during pregnancy on testicular testosterone production in fetal rats. *Molecular medicine reports* 16(1): 491-498.

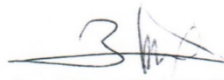
9. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı : “Levetirasetama Maruz Kalan Gebe Sıçanların Yenidoğanlarında Teratojenite ve Gonad Toksisitesi” Çalışmacılar : Prof.Dr.Engin YENİLMEZ, Yük.Lis.Öğr.Cansu KAYA, Arş.Gör.İrem ÇAVUŞOĞLU, Doç.Dr.Mine KADIOĞLU DUMAN, Prof.Dr.Ahmet ALVER Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji			
Etik Kurul Dosya No 2016/ 31	Etik Kurul Toplantı Tarihi 13/07/2016	Etik Kurul Toplantı No 2016-09	Etik Kurul Karar No 5
Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Bilal KUTRUP'un başkanlığında toplanıp; “Levetirasetama Maruz Kalan Gebe Sıçanların Yenidoğanlarında Teratojenite ve Gonad Toksisitesi” başlığını taşıyan tez çalışmanın, Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (13.07.2016)  Prof. Dr. Bilal KUTRUP Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı			

10. ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : KAYA, Cansu

Uyruğu : T. C.

Doğum tarihi ve yeri : 07.04.1991 – GELİBOLU

Medeni hali : Bekar

Telefon : 0462 3252821

E-Posta : cansukaya1991@hotmail.com

Yazışma adresi : Aydınlıkevler Mah. Çabuk sok. Ada apt. No:1 Daire:1
Ortahisar/TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi – Biyoloji bölümü – TRABZON - 2014

Tülay Başaran Anadolu Lisesi – SAMSUN – 2009

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

1. Stajyer – Gülhane Tıp Akademisi ÜYTE Laboratuvarı – 2013

YABANCI DİL

İngilizce

Almanca