



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİMOKİNONUN GENETİK ABSANS EPİLEPSİSİNİN VE VALPROİK
ASİTİN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI ÜZERİNE OLASI
İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

FATMA BEDİA KARAKAYA ÇİMEN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ÖZLEM TUĞÇE ÇİLİNGİR KAYA
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİMOKİNONUN GENETİK ABSANS EPİLEPSİSİNİN VE VALPROİK
ASİTİN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI ÜZERİNE OLASI
İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

FATMA BEDİA KARAKAYA ÇİMEN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ÖZLEM TUĞÇE ÇİLİNGİR KAYA
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Öğrenci Adı ve Soyadı

İmzası

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca tecrübe ve bilgisinden faydalandığım, çalışmanın bütünlüğe ulaşması için yardımlarını esirgemeyen, sayın danışman hocam Doç. Dr. Özlem Tuğçe Çilingir-Kaya'ya,

Tez sürecimde tecrübe, bilgi ve destekleri ile yanımda olan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Feriha Ercan'a, yine aynı şekilde bilgilerini benden esirgemeyen değerli hocalarım; Prof. Dr. Şule Çetinel, Prof. Dr. Serap Şircancı ve Prof. Dr. Dilek Akakın'a,

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mukaddes Eşrefoğlu ve Dr. Öğr. Üyesi Emine Rümeysa Hekimoğlu'na,

Çalışmamıza destek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Huri Dedeakayoğulları, Doç. Dr. Savaş Üstünova ve Dr. Öğr. Üyesi Aysu Kılıç'a

Çalışmalarım sürecinde her zaman yanımda olan, desteklerini esirgemeyen Damla Kayalı, Sezen Gizem Aydoğan, Gülseren Altay Aznavur, Seda Kırmızıkan, Kübra Başol Baki, Yağmur Yeşilirmak ve Merve Sude Taş'a

Her zaman yanımda olan ve desteğini hep hissettiğim eşim Yasin Ali Çimen, annem Rana Karakaya, babam Bekir Karakaya, ablam Fulya, Eniştem Sezai, hayatıma neşe katan İnci ve Müge'ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez projesi Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2022-10765 sayılı proje ile ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 124S389 numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a ve Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ.....	i
TABLO LİSTESİ.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1 Testis Histolojisi.....	6
4.2 Kan-Testis Bariyeri	12
4.3 Epilepsi ve Erkek İnfertilitesi.....	14
4.4 Cinsiyet Hormonları ve Üreme Sistemindeki Rollerini	17
4.5 Genetik Absans Epilepsisinin Hayvan Modelleri: GAERS Suşu	18
4.6 Timokinon.....	19
4.7 Valproik Asit.....	21
4.8 Apoptoz.....	23
5. GEREÇ ve YÖNTEM	25
5.1 Deney Hayvanları.....	25
5.2 Doku Eldesi.....	26
5.3 Sperm Analizi	26
5.4.1 Morfolojik İnceleme.....	26
5.4.2 İmmünohistokimyasal Analizler.....	27
5.5 Yarı İnce Kesitlerin Eldesi.....	28
5.6 Western Blot Analizleri.....	28
5.7 Biyokimyasal Analizler.....	29
5.8 İstatistiksel Analiz.....	30
6. BULGULAR.....	31
6.1 Sperm Morfolojik Bulguları.....	31
6.2 Testis Morfolojik Bulguları	38
6.3 Oksidatif Stres Belirteçleri	56
6.4 PCNA İmmünohistokimya ve Western Blot Bulguları.....	58
6.5 Apoptoz Proteinlerinin Western Blot Bulguları.....	64
6.6 StAR İmmünohistokimya ve Western Blot Bulguları.....	66
6.7 ZO-1 Proteininin Western Blot Bulguları	72
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	74
8. KAYNAKLAR	85

9. ÖZGEÇMİŞ	100
10. BİLİMSEL FAALİYETLER.....	101
11. EKLER	103



KISALTMALAR LİSTESİ

AEİ	Antiepileptik ilaç
AR	Androjen reseptörü
CAD	Kaspaz aktivedeoksiribonükleaz
DDD	Diken-dalga-deşarjları
EEG	Elektroensefalografi
FDX1	Ferrodoksin
FDXR	Ferrodoksin-redüktaz
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GABA	Gama-aminobütirik asit
GAERS	Strasburg'dan genetik absans epilepsili rat
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
HDAC	Histon deasetilaz
HPA	Hipotalamus-hipofiz aksı
HRP	Horseradish peroksidaz
i.p	Intraperitoneal
ICAD	Kaspaz aktivedeoksiribonükleaz inhibitörü
KTB	Kan-testis bariyeri
LH	Lüteinizan hormon
OS	Oksidatif stres
OSI	Oksidatif stres indeksi
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCNA	Proliferatif hücre nükleer antijeni
StAR	Steroidojenik akut regülatör protein
TAS	Total anti-oksidan seviye
TLE	Temporal lob epilepsisi
TOS	Total oksidan seviye
VPA	Valproik asit
ZO-1	Zonula okludens-1
ZO-2	Zonula okludens-2

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1. Modifiye edilmiş Johnsen'in Histopatolojik Skorlama Parametreleri (Johnsen, 1970; Sener ve ark., 2021)	27
Tablo 2. Deney gruplarının sperm morfoloji analizlerinden elde edilen veriler (ortalama $\pm$ SD).....	37
Tablo 3. Deney gruplarına ait germinal epitel kalınlığı ve Johnsen Skoru verileri (Ortalama $\pm$ SD)....	45
Tablo 4. Deney gruplarına ait oksidan ve anti-oksidan parametrelerin biyokimyasal değerleri (ortalama $\pm$ SD)	57
Tablo 5. Deney gruplarının PCNA proteini için WB analizinden elde edilen verileri (Ortalama $\pm$ SD).	64
Tablo 6. Deney gruplarına ait Bax, BCL-2, Sitokrom C, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 proteinlerinin WB analizlerinden elde edilen veriler (Ortalama $\pm$ SD).....	65
Tablo 7. Deney gruplarına ait StAR proteininin WB analizinden elde edilen veriler (Ortalama $\pm$ SD).	72
Tablo 8. Deney gruplarına ait ZO-1 proteininin WB analizinden elde edilen veriler (Ortalama $\pm$ SD).	73

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1. Erkek üreme sistemi (Pawlina & Ross, 2018).....	6
Şekil 2. İnsan testisi sagital kesiti (Pawlina & Ross, 2018).....	7
Şekil 3. Germ hücrelerinin klonal özelliği (Pawlina & Ross, 2018).....	10
Şekil 4. Spermiyogenez sırasında sperm değişiklikleri ve olgun sperm yapısı (Pawlina & Ross, 2018).....	11
Şekil 5. Sertoli hücrelerinin ve spermatogenik hücreler ile ilişkisinin şematik çizimi (Pawlina, 2015'den yararlanılarak hazırlanmıştır).....	13
Şekil 6. Erkek üreme fonksiyonunun hormonal düzenlenişini gösteren diyagram (Pawlina & Ross, 2018).....	17
Şekil 7. <i>Nigella sativa</i> bitkisi, tohumu ve kimyasal formülü (Schneider-Stock ve ark., 2014)	20
Şekil 8. Deney gruplarının ve yapılan işlemlerin grafik özeti. (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir).....	26
Şekil 9. Kontrol gruplarına ait sperm mikrografları. A: WK grubu. B: GK grubu. Ok: Normal morfolojide spermatozoa. Siyah ok başı: Boyun anomalisi olan spermatozoa. Kırmızı ok başı: kuyruk anomalisi olan spermatozoa. Orijinal büyütme: x100, Diff-Quick boyası.....	32
Şekil 10. Sham gruplarına ait sperm mikrografları. A: WS grubu. B: GS grubu. Ok: Normal morfolojide spermatozoa. Daire: Baş anomalisi olan spermatozoa, Siyah ok başı: Boyun anomalisi olan spermatozoa. Kırmızı ok başı: Kuyruk anomalisi olan spermatozoa. Orijinal büyütme: x100, Diff-Quick boyası	33
Şekil 11. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait sperm mikrografları. A: WT grubu. B: GT grubu. Ok: Normal morfolojide spermatozoa. Orijinal büyütme: x100, Diff-Quick boyası	34
Şekil 12. VPA uygulanan deney gruplarına ait sperm mikrografları. A: WV grubu. B: GV grubu. Ok: Normal morfolojide spermatozoa. Daire: Baş anomalisi olan spermatozoa, Siyah ok başı: Boyun anomalisi olan spermatozoa. Kırmızı ok başı: Kuyruk anomalisi olan spermatozoa. Orijinal büyütme: x100, Diff-Quick boyası	35
Şekil 13. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait sperm mikrografları. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. Ok: Normal morfolojide spermatozoa. Büyütme: x100, inset x100, Diff-Quick boyası.....	36

Şekil 14. Deney gruplarına ait sperm örneklerinde belirlenen morfolojik hasar oranlarının istatistiksel analizini gösteren grafikler. A: Normal morfoloji sergileyen sperm, B: Sperm baş anomali, C: Boyun anomali, D: Kuyruk anomali oranları. (ns: Gruplar arasında fark yok, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$)37

Şekil 15. Kontrol gruplarına ait testis mikrografları. A: WK grubu. B: GK Grubu. Yıldız: Normal morfoloji sergileyen seminifer tübüller. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Çift taraflı ok: Germinal epitel kalınlığı. H&E boyası40

Şekil 16. Sham gruplarına ait testis mikrografları. A: WS grubu. B: GK grubu. Yıldız: Normal morfoloji sergileyen seminifer tübüller. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Çift taraflı ok: Germinal epitel kalınlığı. H&E boyası41

Şekil 17. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WT grubu. B: GT grubu. Yıldız: Normal morfoloji sergileyen seminifer tübüller. Çift taraflı ok: Germinal epitel kalınlığı. H&E boyası.....42

Şekil 18. VPA uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WV grubu. B: GV grubu. Ok: Yer yer açılma ve düzensizlik. Ok başı: Lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri. Çift taraflı ok: Germinal epitel kalınlığı. H&E boyası43

Şekil 19. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. Yıldız: Normal morfoloji sergileyen seminifer tübüller. Çift taraflı ok: Germinal epitel kalınlığı. H&E boyası.....44

Şekil 20. Deney gruplarına ait germinal epitel kalınlığı ve Johnsen skorlaması sonuçlarının istatistiksel analizini gösteren grafikler. (ns: Gruplar arası fark yok, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$)45

Şekil 21. Kontrol gruplarına ait testis mikrografları. A: WK grubu. B: GK grubu. Ok: Düzenli bazal membran yapısı. Ok başı: Bazal membranda düzensizlik ve yer yer ayrılmalar. PAS Reaksiyonu. 46

Şekil 22. Sham gruplarına ait testis mikrografları. A: WS grubu. B: GS grubu. Ok: Düzenli yapıdaki bazal membran yapısı. Ok başı: Bazal membranda düzensizlik ve yer yer ayrılmalar. PAS Reaksiyonu.47

Şekil 23. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WT grubu. B: GT grubu. Ok: Düzenli bazal membran yapısı. PAS Reaksiyonu.....48

Şekil 24. VPA uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WV grubu. B: GV grubu. Ok başı: Bazal membranda düzensizlik ve yer yer ayrılmalar. PAS Reaksiyonu.49

Şekil 25. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. Ok: Düzenli yapıdaki bazal membran yapısı. Ok başı: Bazal membranda düzensizlik ve yer yer ayrılmalar. PAS Reaksiyonu.....50

Şekil 26. Kontrol gruplarına ait yarı ince kesitler. A: WK grubu. B: GK grubu. n: Normal morfoloji sergileyen germinal epitel. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Ok başı: Lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri. Toluidin mavisi	51
Şekil 27. Sham gruplarına ait yarı ince kesitler. A: WS grubu. B: GS grubu. n: Normal morfoloji sergileyen germinal epitel. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Ok başı: Lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri. Toluidin mavisi	52
Şekil 28. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait yarı ince kesitler. A: WT grubu. B: GT grubu. n: Normal morfoloji sergileyen germinal epitel. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Toluidin mavisi.....	53
Şekil 29. VPA uygulanan deney gruplarına ait yarı ince kesitler.WV grubu. B: GV grubu. Yıldız: Düzensiz yapı sergileyen germinal epitel, Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Ok başı: Lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri. Toluidin mavisi	54
Şekil 30. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait yarı ince kesitler. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. n: Normal morfoloji sergileyen germinal epitel. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Toluidin mavisi.....	55
Şekil 31. Doku örneklerinin toplam antioksidan seviye (A), toplam oksidan seviye (B), oksidatif stres indeksi (C); serum örneklerinin toplam antioksidan durumu (D), toplam oksidan durumu (E), oksidatif stres indeksine (F) ait istatistiksel verilerine ait sütun grafikleri (ns: gruplar arasında fark yok, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001)	57
Şekil 32. Kontrol gruplarına ait PCNA işaretli kesitler. A: WK grubu. B: GK grubu. Ok: Çok sayıda PCNA pozitif hücreler. Yıldız: Az sayıda PCNA pozitif hücrelerin olduğu seminifer tübüller. PCNA immünohistokimyası.....	59
Şekil 33. Sham gruplarına ait PCNA işaretli kesitler. A: WK grubu. B: GK grubu. Ok: Çok sayıda PCNA pozitif hücreler. Yıldız: Az sayıda PCNA pozitif hücrelerin olduğu seminifer tübüller. PCNA İmmünohistokimyası	60
Şekil 34. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait PCNA işaretli kesitler. WT grubu. B: GT grubu. Ok: Çok sayıda PCNA pozitif hücreler. Yıldız: Az sayıda PCNA pozitif hücrelerin olduğu seminifer tübüller. PCNA immünohistokimyası.....	61
Şekil 35. VPA uygulanan deney gruplarına ait PCNA işaretli kesitler. A: WV grubu. B: GV grubu. Ok: Çok sayıda PCNA pozitif hücreler. Yıldız: Az sayıda PCNA pozitif hücrelerin olduğu seminifer tübüller. PCNA immünohistokimyası	62
Şekil 36. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait PCNA işaretli kesitler. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. Ok: Çok sayıda PCNA pozitif hücreler. Yıldız: Az sayıda PCNA pozitif hücrelerin olduğu seminifer tübüller. PCNA immünohistokimyası.....	63
Şekil 37. PCNA proteininin WB analizlerinden elde edilen bant görüntüsü ve istatistiksel değerlendirmeleri.....	64

Şekil 38. Bax, BCL-2, Sitokrom C, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 proteinlerinin WB analizlerinden elde edilen bant görüntüleri ve istatistiksel değerlendirmeleri gösteren grafikler (ns: gruplar arasında fark yok, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001)	66
Şekil 39. Kontrol gruplarına ait StAR işaretli kesitler. A: WK grubu. B: GK grubu. Ok: StAR pozitif hücreler. StAR immünohistokimyası	67
Şekil 40. Sham gruplarına ait StAR işaretli kesitler. A: WSgrubu. B: GS grubu. Ok: StAR pozitif hücreler. StAR immünohistokimyası	68
Şekil 41. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait StAR işaretli kesitler. A: WTgrubu. B: GT grubu. Ok: StAR pozitif hücreler. StAR immünohistokimyası	69
Şekil 42. VPA uygulanan deney gruplarına ait StAR işaretli kesitler. A: WVgrubu. B: GV grubu. Ok: StAR pozitif hücreler. StAR immünohistokimyası	70
Şekil 43. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait StAR işaretli kesitler. A: WV+Tgrubu. B: GV+T grubu. Ok: StAR pozitif hücreler. StAR immünohistokimyası	71
Şekil 44. StAR protein ekspresyonunun WB incelemesinden elde edilen bant görüntüsü ve verilerin istatistiksel analizini gösteren grafik (ns: gruplar arasında fark yok, *p<0,05, ****p<0,0001).....	72
Şekil 45. ZO-1 proteininin WB incelemesinden elde edilen bant görüntüsü ve verilerin istatistiksel analizini gösteren grafik (****p<0,0001)	73
Şekil 46. Çalışmadan elde edilen verilerin özet halinde gösterimi	84

1. ÖZET

Tezin başlığı : Timokinonun Genetik Absans Epilepsisinin ve Valproik Asitin Oluşturduğu Testis Hasarı Üzerine Olası İyileştirici Etkisinin Araştırılması

Öğrencinin Adı Soyadı : Fatma Bedia Karakaya Çimen

Danışmanın Adı Soyadı : Doç. Dr. Özlem Tuğçe Çilingir-Kaya

Programın Adı : Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı

Amaç: Bu çalışmanın amacı genetik absans epilepsinin ve tedavisinde kullanılan Valproik asitin testis dokusu ve sperm parametreleri üzerindeki etkisini göstermek ve timokinonu alternatif veya eş bir tedavi olarak değerlendirmektir.

Gereç ve yöntem: 25 adet Wistar albino ve 25 adet GAERS suşu erkek sıçan kendi aralarında kontrol, sham, timokinon, VPA ve VPA+Timokinon olmak üzere beşer gruba ayrılmıştır. Alınan örneklerde sperm morfolojisi, genel testis morfolojisi, PCNA ve StAR immünohistokimyasal analizleri, oksidatif stres belirteçlerinin biyokimyasal analizi ve PCNA, StAR, ZO-1 ve apoptotik yolak proteinlerinin western blot analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: GAERS sıçanlarda apoptotik yolak proteinlerinin ekspresyonları, TOS ($p<0,0001$) ve OSI ($p<0,0001$) seviyeleri artarken, normal morfoloji sergileyen sperm miktarı ($p<0,0001$), testis histopatolojik skoru ($P<0,001$), PCNA ($p<0,0001$), StAR ($p<0,001$) ve ZO-1 ($p<0,001$), proteinlerinin ekspresyonları ve TAS ($p<0,0001$) seviyeleri azalmıştır. GAERS-VPA gruplarında normal morfoloji sergileyen sperm miktarı azalırken ($P<0,05$), testis histopatolojisinde GAERS-Kontrol gruplarına göre bir fark görülmemiştir. GAERS Timokinon/VPA/VPA+Timokinon gruplarında apoptoz proteinlerinin ekspresyonları azalırken, PCNA, StAR ve ZO-1 proteinlerinin ekspresyonları artmıştır.

Sonuç: Genetik absans epilepsisi, sperm ve testis morfolojisini olumsuz etkilemiştir. PCNA, StAR ve ZO-1 proteinlerinin ekspresyonlarını azaltıp, oksidatif stresi ve apoptozu arttırmıştır. Timokinon, VPA ve VPA ile timokinonun eş zamanlı uygulaması testis ve sperm morfolojisini, PCNA, StAR ve ZO-1 proteinlerinin ekspresyonlarını, apoptoz ve oksidatif stresi olumlu etkilemiştir. Sonuçlarımız, timokinonun tek başına veya VPA ile eş zamanlı kullanımının absans epilepsinin sebep olduğu sperm ve testis hasarı üzerinde olumlu etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Genetik absans epilepsi, valproik asit, timokinon, testis, sperm analizi

2. SUMMARY

Title of Thesis: Investigation of the Possible Healing Effect of Thymoquinone on Testicular Damage Caused by Genetic Absence Epilepsy and Valproic Acid

Student Name, Surname: Fatma Bedia Karakaya Çimen

Supervisor Name : Doç. Dr. Özlem Tuğçe Çilingir Kaya

Program Name : Histology and Embriyology PhD Programe

Objective: The aim of this study was to show the effect of genetic absence epilepsy and valproic acid used in the treatment of genetic absence epilepsy on testicular tissue and sperm parameters and to evaluate thymoquinone as an alternative or co-treatment against the damage caused by absence epilepsy and valproic acid on testicular and sperm parameters.

Material and method: 25 wistar albino and 25 GAERS strain male rats were divided into five groups control, sham, thymoquinone, VPA and VPA+thymoquinone. Sperm and testicular morphology, PCNA and StAR immunohistochemical analysis, biochemical analysis of oxidative stress markers and western blot analysis of PCNA, StAR, ZO-1 and apoptotic pathway proteins were performed on the samples.

Results: In GAERS rats, the expression of apoptotic proteins, TOS ($p<0.0001$) and OSI ($p<0.0001$) levels were increased, while the amount of sperm exhibiting normal morphology ($p<0.0001$), testicular histopathologic score ($P<0.001$), PCNA ($p<0.0001$), StAR ($p<0.001$) and ZO-1 ($p<0.001$), protein expressions and TAS ($p<0.0001$) levels were decreased. While the amount of sperm exhibiting normal morphology decreased in GAERS-VPA groups ($P<0.05$), there was no difference in testicular histopathology compared to GAERS-Control groups. In GAERS-Thymoquinone/VPA/VPA+Thymoquinone groups, the expression of apoptosis proteins decreased, while the expression of PCNA, StAR and ZO-1 proteins increased.

Conclusion: Genetic absence epilepsy negatively affected sperm and testicular morphology. It decreased the expression of PCNA, StAR, ZO-1 proteins and increased oxidative stress and apoptosis. Administration of thymoquinone/VPA/VPA+thymoquinone positively affected testicular and sperm morphology, expression of PCNA, StAR and ZO-1 proteins, apoptosis and oxidative stress. Our results suggest that the use of thymoquinone/VPA/VPA+thymoquinone may have positive effects on absence epilepsy-induced sperm and testicular damage.

Keywords: Genetic absence epilepsy, valproic acid, thymoquinone, testis, sperm analysis

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Epilepsi, gelişmekte olan ülkelerde çok daha yüksek bir insidans ile dünya çapında insanların yaklaşık %1'ini etkileyen yaygın bir nörolojik hastalıktır (Essawy ve ark., 2022; Mohamed & Eltony, 2020). Epileptogenezin mekanizması hala belirsiz olmakla birlikte, epilepsinin patofizyolojisinin oksidatif stres, nöroinflamasyon ve nörotransmitter sistem disfonksiyonunu içerebildiği gösterilmiştir (Wu ve ark., 2020). Epilepsili bireyler, nörolojik fonksiyonlarda ilerleyici bozulma, psikososyal bozukluklar ve sistemik hastalıklar ile karakterizedir (Badawi ve ark., 2021; Essawy ve ark. , 2022; Zhu ve ark., 2020). Epilepsili hastalarda doğurganlık, genel popülasyona göre daha düşüktür ve üreme endokrin bozuklukları genel popülasyona göre daha yaygındır (Herzog ve ark., 1986b, 1986c; Isojarvi, 2008; Isojarvi ve ark., 1993; Wallace ve ark., 1998; Webber ve ark., 1986). Epilepsili erkeklerin yaklaşık %20'sinde azalan libido veya güç, %90'ından fazlasında sperm sayısında azalma, anormal morfoloji ve bozulmuş sperm hareketliliği dahil olmak üzere anormal semen analizleri bildirilmiştir (Herzog, 2008; Herzog ve ark., 2005; Herzog ve ark., 2004). Ayrıca epilepsili erkek hastalarda hipogonadizm, jinekomasti ve testis atrofisi de görülmektedir (Herzog, 2008; Herzog ve ark., 1986a).

Epilepsinin kendisi, epileptik nöbetler ve kullanılan antiepileptikler patofizyolojik süreçlerde rol almaktadır. Bir antikonvülzan ilaç olan valproik asit (VPA) epilepsi ve kanser başta olmak üzere birçok nörolojik ve sistemik bozukluğun tedavisinde yaygın olarak kullanılsada gastrointestinal, sinir, hematopoetik, endokrin ve üreme sistemleri üzerine yan etkileri belgelenmiştir. VPA'nın hem insan hem de hayvan çalışmalarında üreme parametrelerini ve hormonları azalttığı, testis, epididim, prostat bezi ve seminal vezikülde atrofiye neden olduğu bildirilmiştir. Testiküler atrofinin, üreme parametreleri ve azalmış cinsiyet hormonu seviyeleri ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (Iamsaard ve ark., 2017).

Birçok antiepileptik ilaç geliştirilmiş olmasına rağmen, çoğunun dirençli epilepsinin bilişsel bozukluğu üzerinde hiçbir etkisi yoktur (Essawy ve ark. , 2022) ve diğer organlar üzerinde çeşitli yan etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle, özellikle dirençli epilepsi tedavisinde daha güvenli ve etkili antiepileptik ilaçlar geliştirmek için çok sayıda araştırma bulunmaktadır

(Essawy ve ark. , 2022; Wang ve ark., 2021). Son yıllarda bu alanda yoğunlaşan çalışmalar ile timokinon gibi birçok bitkisel ürünün antikonvülsan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Nigella sativa (*N. sativa*), Ranunculaceae familyasının bir üyesi olan yıllık çiçekli bir bitkidir. Halk arasında çörek otu, olarak bilinen *N. sativa* en çok Ortadoğu Akdeniz bölgesi, Güney Avrupa, Suriye, Türkiye, Suudi Arabistan, Pakistan ve Hindistan'da bulunur ve yetiştirilir (Javidi ve ark., 2016). Timokinon ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon), *N. sativa* tohumlarının uçucu yağında %18,4-24 oranıyla en çok bulunan ve *N. sativa*'nın çoğu özelliğinin atfedildiği en önemli biyoaktif bileşendir. Etki mekanizması karmaşık olan timokinonun, patofizyolojik durumlarda birden fazla faktörü hedef aldığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Başlıca etkileri; hücre döngüsü ve çoğalması, anjiyogenez, apoptoz, migrasyon, invazyon, metastaz, inflamasyon ve oksidatif stres üzerinedir. Bunların yanı sıra, antioksidan, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antihistaminik, antimikrobiyal ve antitümör etkilerini içeren timokinonun bir dizi farmakolojik etkisi araştırılmıştır (Güzelsoy ve ark., 2018b). Ayrıca birçok veri timokinonun yan etkilerinin ve ciddi bir toksisitesinin olmadığını göstermiştir (S. Darakhshan ve ark., 2015). *N. sativa* tedavisinin infertil erkeklerde sperm sayısı, motilite ve morfoloji, semen hacmi, pH ve yuvarlak hücreleri de dahil olmak üzere sperm parametrelerini artırdığı görülmüş ve bu ajanın Leydig hücreleri, üreme organları ve cinsiyet hormonları üzerindeki faydalı etkileri doğrulanmıştır (Kolahdooz ve ark., 2014). Literatürde, morfin (Salahshoor ve ark., 2018), kadminyum (Fouad & Jresat, 2015), metotreksat (Gokce ve ark., 2011) uygulamalarının, deneysel iskemi-reperfüzyon modelinin (Erboga ve ark., 2016) ve obezitenin (Tufek ve ark., 2015) oluşturduğu testiküler hasar, anormal sperm parametreleri ve hormon seviyeleri üzerine timokinonun olumlu etkileri bildirilmiştir.

Literatürde epilepsi ile ilgili çalışmalar genellikle hem normal hem epileptik beyin yapısını, fonksiyonunu ve temel nöronal mekanizmaları karşılaştırmak üzere tasarlanmıştır. Anti-epileptik ilaçlarla ilgili deneysel çalışmalar ise epileptik olmayan hayvanlar üzerinde yapılmış olup çeşitli dokulardaki ilaç toksisitelerini ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar, epilepsinin ve epileptik tedavinin oluşturduğu değişimleri ortaya koymakta yetersiz kalmaktadır. Epilepsinin, testis histopatolojisi üzerine etkisini gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Genetik absans epilepsili hastaların çoğu, çocukluktan itibaren kontrol altında olan ve tedavi gören hastalardan

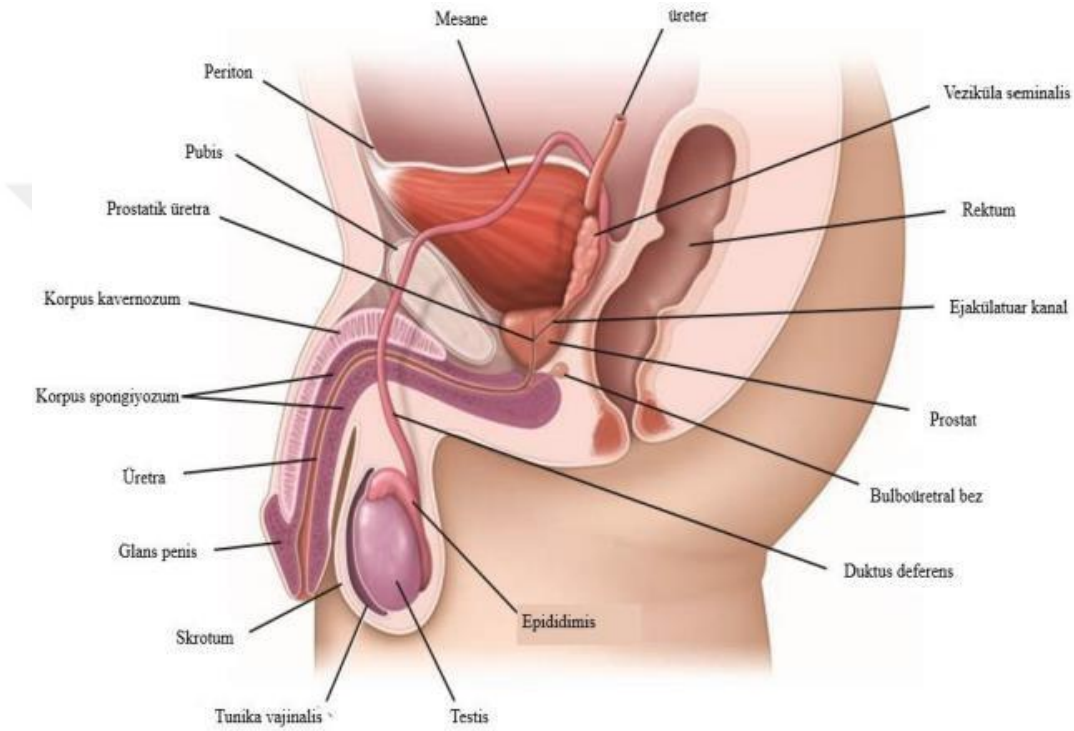
oluştugu için yapılan insan çalışmlarında üreme parametrelerindeki değişimin, epileptik nöbetlerden mi yoksa antiepileptik ilaçlardan mı kaynaklandığı net değildir. Epilepsi tedavisi için ve epilepsinin erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerinin belirlenip, tedavisi için yan etkisi olmayan alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda epilepsinin ve epilepsi hastası olup, epilepsi tedavisinde en sık kullanılan antiepileptik ilaç olan VPA tedavisi gören bireylerin testiküler hasarını ortaya koymak için sadece epilepsili ve epilepsili olup VPA uyguladığımız gruplar tasarladık ve bu gruplarda genetik absans epilepsisinin ve VPA'nın etkisini net bir şekilde ortaya kayarak bu değişim üzerine timokinon uygulamasının etkisini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamız, çocukluk çağında görölmeye başlayan, kısa ve ani bilinç kayıpları ile karakterize edilen absans epilepsinin ve dolayısıyla erken yaşlarda başlayan epilepsi tedavisinin, bireylerin üreme sistemi üzerinde oluşturacağı hasara odaklanmaktadır. Literatürde, absans epilepsinin testis hasarı ve sperm parametreleri üzerine etkisinin araştırıldığı deneysel bir çalışma yoktur. Ayrıca absans epilepsinin ve antiepileptik ilaç kullanımının oluşturduğu hasar üzerine, timokinonun olası koruyucu etkisini gösteren bir çalışmada da bulunmamaktadır. Çalışmamız, bu alanda ilk olma niteliği ile literatüre sunacağı katkı bakımından önem taşımaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Testis Histolojisi

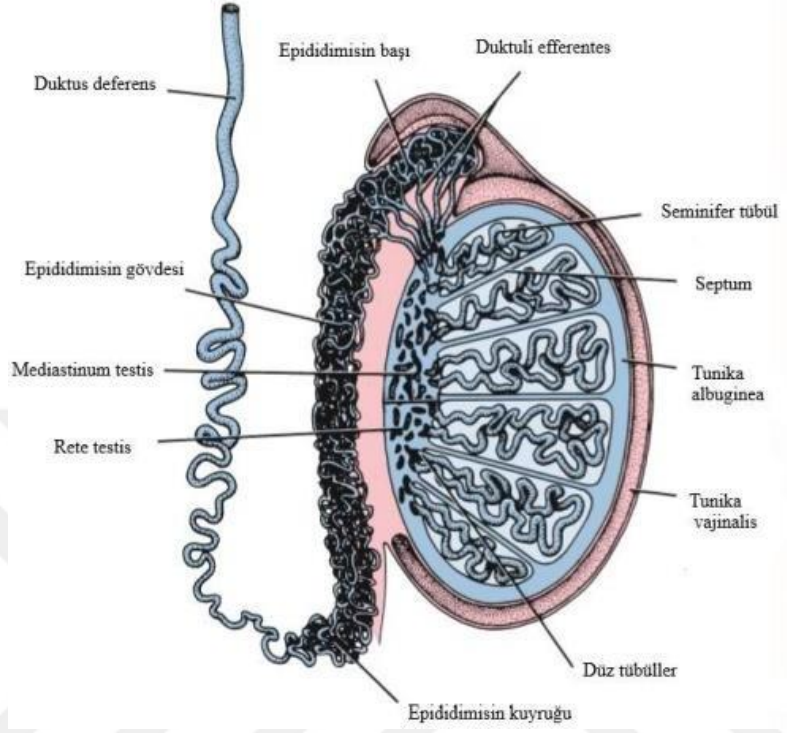
Erkek üreme sistemi testis, genital boşaltım kanalları, aksesuar cinsiyet bezleri (vezikula seminalis, bülboüretal bez ve prostattan) ve penisten oluşur (Şekil 1). Testisler tunika albuginea adı verilen sıkı bağ doku özelliğinde bir kapsül ile çevrilidir. Kapsülün iç kısmında kan damarlarını içeren gevşek bağ doku yapısındaki tunika vasküloza bulunur.



Şekil 1. Erkek üreme sistemi (Pawlina & Ross, 2018).

Her iki testis kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar tarafından yaklaşık 250 lobüle bölünür. Mediastinum testis adı verilen, testisin posterior yüzeyinde bulunan bölgeden tunika albuginea kalınlaşarak içeriye doğru uzanır. Kan ve lenf damarları ve genital boşaltım kanalları mediastinum testisin içinden geçerek testise ulaşırlar. Testisin her bir lobülünde spermin üretildiği seminifer tübüller ve testosteron üretiminden sorumlu Leydig hücrelerinin yer aldığı stroma bulunur. Her testis yaklaşık 250-1000 seminifer tübül içerir. Seminifer tübüller yaklaşık 150-200 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır. Tübüller oldukça

kıvrıntılıdır ve kısa-dar olan düz tübüller aracılığıyla rete testise bağlanır. Rete testis, mediastinum testisin içine gömülü kanallar ağıdır ve bu kanallar duktuli efferentes aracılığı ile epididimisin baş kısmına açılmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. İnsan testisi sagittal kesiti (Pawlina & Ross, 2018).

Seminifer tübüller germinal epitel olarak adlandırılan Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olmak üzere iki temel hücre grubundan oluşan özelleşmiş, çok katlı bir epitel ile döşelidir. Bu epitelin bazal membranı ise fibröz bağ doku ile kaplıdır. Fibröz bağ dokusunun en içteki katmanı yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Miyoid hücreler, tübüllerin zayıf bir şekilde kasılmasını sağlayarak spermin lümeninden kanallara iletilmesine katkı sağlar. Bu iki temel hücre grubundan destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da bilinen Sertoli hücreleri, puberteden sonra çoğalmayan, komşu spermatogenik hücreleri çevreleyen ve onların aralarındaki boşlukları dolduran, seminifer tübüllere yapısal düzen veren yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip olan uzun prizmatik ya da piramidal hücrelerdir. Spermatogenik seri hücreleri Sertoli hücrelerinin uzamış yüzeyleri ile yakından ilişkilidir ve bu şekilde Sertoli hücreleri, spermatogenik seri hücrelerine metabolik ve fiziksel destek sağlar. Sertoli hücreleri bol miktarda düz yüzlü endoplazmik retikulum, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum,

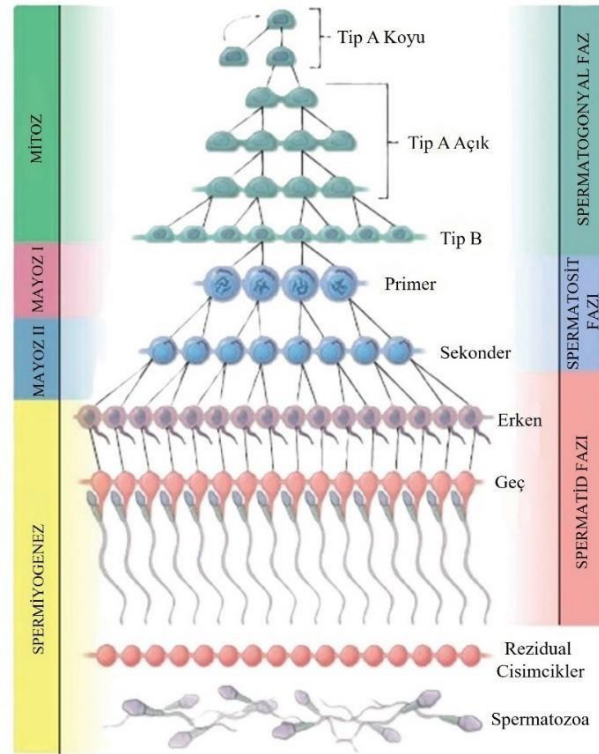
iyi gelişmiş Golgi kompleksi, lizozom ve çok sayıda mitokondriyon içeren hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin nükleusları tipik olarak oval ya da üçgen şeklindedir. Ökromatik boyanan, belirgin nükleolusları vardır ve bu özellikleriyle komşu germ hücrelerinden ayrılırlar. Sertoli hücreleri bazolateral hücre zarları arasında sıkı bağlantılar kurarak seminifer epitelde kan-testis bariyerini oluşturur. Sertoli hücreleri, hem endokrin hem de ekzokrin salgı yaparlar. Olgunlaşmak üzere olan spermlerin seminifer tübüller boyunca ilerleyerek intratestiküler kanallara geçmesini kolaylaştıran sıvıları salgılamasının haricinde, testosteronun spermiyogenez için gerekli konsantrasyona ulaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein, folikül uyarıcı hormon (FSH) sentezi ve salınımını engelleyen inhibin glikoproteinini salgılar. Ayrıca embriyonik gelişim sırasında Müller kanalının gelişimini engelleyen Müllerian-inhibe edici faktörü üretir. Bu görevlerinin dışında spermiyogenez sırasında artık cisimcikler olarak atılan fazla sitoplazmayı fagositoz ile sindirir. Seminifer tübülün temel hücreleri olan spermatogenik hücreler primordiyal germ hücrelerinden köken alan, düzenli olarak çoğalan ve geçirdiği bölünmeler sonucunda olgun sperme farklılaşabilen hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin arasında sınırları belirgin olmasa da ilerleyici gelişim sergileyen katmanlar halinde organize olurlar (Mescher, 2015; Pawlina & Ross, 2018). Bu hücrelerden bazal membrana en yakın konumda yer alan ve serinin öncül hücreleri spermatogonyumlar, lümene en yakın konumlanan siklusun ileri safhasındaki hücreler ise spermatidlerdir. Seminifer tübül lümeninde ise spermler mevcuttur (Eşrefoğlu, 2021).

Seminifer tübüller arasındaki bağ dokuya intersitisyel alan adı verilir. Bu bölge fibroblast, lenf ve kan damarlarını içeren gevşek bağ doku özelliğindedir. Bu yüzden bu alanda bulunan Leydig hücreleri interstisyel hücreler olarak da isimlendirilirler. Bu hücreler büyük, merkezi nükleuslu, poligonal, eozinofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Sitoplazmalarındaki lipid damlacıkları bu hücrelerin karakteristik özellikleridir. Leydig hücrelerinde de diğer steroid hormon salgılayan hücrelerde olduğu gibi bol miktarda düz yüzlü endoplazmik retikulum, tübüloveziküler kristal mitokondriyonlar bulunur. Fetüsün erken farklılaşmasında aktif olan Leydig hücreleri, fetal yaşamın yaklaşık beşinci ayından itibaren inaktif periyoda girer. Pubertede gonadotropik uyarıya maruz kalana kadar inaktiftirler. Puberte ile birlikte aktifleşerek androjen salgılayan hücreler haline gelirler. Yaşam boyunca testosteron salgılayarak görevlerini sürdürürler. Embriyoda testosteron ve diğer androjenlerin salgılanması gonadların normal gelişimi için,

pubertede sperm üretiminin başlaması, aksesuar cinsiyet bezlerinin salgıları ve sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişimi için, yetişkinde ise sperm oluşumu, sekonder cinsiyet karakterleri, genital boşaltım kanalları ve aksesuar cinsiyet bezlerinin sürekliliğinin sağlanması için ciddi önem taşımaktadır.

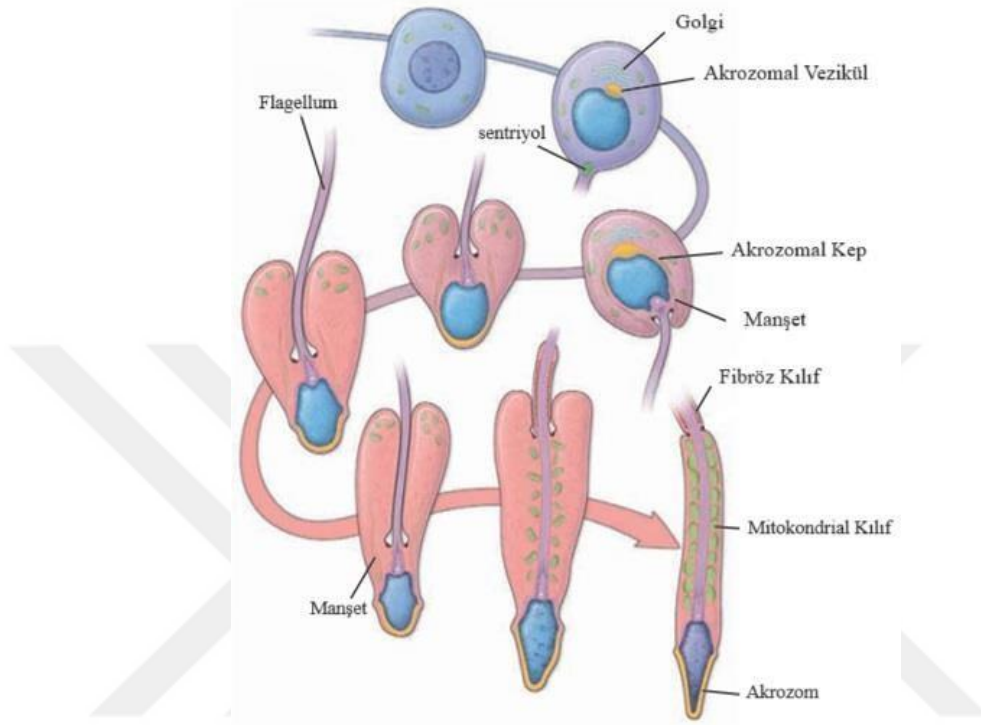
Testisler, erkek gametlerinin üretim süreci olan spermatogenezden ve androjenlerin sentez süreci olan steroidogenezden sorumlu organlardır. Bir spermatogonyumdan sperm oluşana kadar geçen süreçte bir dizi kompleks olay gerçekleşir. Spermatogenez sürecinde, puberteden bir süre önce hipofiz gonadotropin seviyelerinin artması ile birlikte spermatogonyumların proliferasyonu başlar ve hayat boyu devam eder. Spermatogenez tanımlayıcı olması açısından spermatositogenez, mayoz ve spermiyogenez olmak üzere 3 aşamada incelenir. Spermatogonyal hücreler bölünerek kendi yerlerine geçecek olan hücreleri ve ilerleyici spermatogonyum popülasyonunu oluşturan hücrelerdir. Nükleus görünümündeki farklılıklara göre tip A spermatogonyumlar ve tip B spermatogonyumlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Tip A spermatogonyumlar, çok sayıda klonal bölünme geçirir ve bu bölünmelerde hücreler birbirinden ayrılmadan sinsiityum halinde kalır. Bu sitoplazmik bağlantılar sayesinde, her hücrenin senkronize olarak gelişimi sağlanır. Hücreler arasındaki bu bağlantı spermiyogenez aşamasına kadar sürdürülür. Tip B spermatogonyumlar, yuvarlak ve soluk nükleuslu olan hücrelerdir ve son bir mitoz bölünme daha geçirerek iki tane yavru hücre oluştururlar. Bu hücreler, ökromatik nükleuslu küresel hücreler olan primer spermatositleri oluştururlar. Primer spermatositler, oluşuktan hemen sonra DNA'larını eşler ve böylece normal sayıda kromozoma ($2n$) ve normalin iki katı DNA miktarına ($4d$) sahip olurlar. Primer spermatositler, oluşumlarından hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profazına girdikleri ve bu aşamanın yaklaşık 3 hafta sürmesinden dolayı testis kesitlerinde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamadadır. Bu hücreler spermatogenik serinin en büyük hücreleridir. Kromozom eşleşmesi (Sinaps) ve Genetik çeşitlenmenin (rekombinasyon) bazı aşamalarında kısmen sıkışmış kromozomlarının bulunması ile ayırt edilebilirler. Birinci mayoz bölünmede tetrad adı verilen homolog kromozom çiftleri parça değişimi (krossing-over) olarak adlandırılan olay ile genetik materyal değişimi yaparlar ve böylece her spermatositin ürettiği dört spermatid, birbirinden ve diğer spermatidlerden genetik olarak farklı olur. Bu şekilde genetik çeşitlilik garantilenmektedir. Birinci mayoz bölünme sonucu homolog kromozomlar ayrılır ve

kromozom sayısı yarıya (n), DNA miktarı diploidden haploide ($4d$ 'den $2d$ 'ye) iner. Bu bölünme sonucu haploid kromozom sayısı ve $2d$ DNA miktarı ile karakterize olan daha küçük boyuttaki sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler interfaz evresinde çok kısa süre kalıp hızlıca ikinci mayoz bölünmeye girdikleri için testis kesitlerinde görülmesi zor hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi sonucu her bir kromozomun kromatidleri birbirinden ayrılır ve sonuçta iki tane haploid hücre oluşur. Bu oluşan hücrelere spermatid adı verilir (Şekil 3). Her bir spermatid 23 kromozom içerir. Spermatositlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında sentez fazı görülmediğinden, ikinci mayoz bölünme sonrasında her hücredeki DNA miktarı yarıya inmiş ve haploid hücreler meydana gelmiş olur. Döllenme sonucu, mayoz bölünme ile oluşan bir haploid ovum ve sperm birleşerek normal diploid kromozom sayısına sahip zigotu oluşturur ve böylece diploid kromozom sayısı korunmuş olur. Spermatogonyumların son mitoz bölünmesi ile spermatidlerin oluşması arasında gelişen hücresel olaylar ve değişiklikler yaklaşık 2 aylık bir sürede tamamlanır. Spermiyogenez, spermatidlerin olgun spermilere dönüşme sürecidir. Bu süreç, spermatogenezin son ve sıcaklığa duyarlı olan aşamasıdır.



Şekil 3. Germ hücrelerinin klonal özelliği (Pawlina & Ross, 2018).

Spermiyogenez aşaması, olgun spermin şekillenme sürecini içerir. Bu şekillenme meydana gelirken spermatidler, fiziksel olarak Sertoli hücrelerinin özelleşmiş uzantılarına tutunmuş durumdadır. Spermiyogenez sonucunda olgun hale gelmiş olan sperm, Sertoli hücre yüzeyinden tübül lümenine salınır. Spermiyogenez süreci genellikle dört faza ayrılarak tanımlanır (Şekil 4).



Şekil 4. Spermiyogenez sırasında sperm değişiklikleri ve olgun sperm yapısı (Pawlina & Ross, 2018)

1. Golgi fazı: Spermatid sitoplazmasında nükleusa yakın konumlanan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondri, bir çift sentriyol ve serbest ribozomlar bulunur. İçeriğinde yoğun glikoprotein bulunan proakrozomal granüller, nükleus membranının yakınındaki membranla sınırlı akrozomal vezikülle birleşir. Akrozomal vezikülün bulunduğu bölge, spermiyumun geliştirmekte olan ön kutbunu belirler. Ayrıca bu dönemde sentriyoller de arka kutba doğru göç eder ve bir tanesi bazal cisimcik olarak hareket eden flagella aksonemini oluşturmaya başlar (Şekil 4).

2. Kep fazı (şapka dönemi): Nükleus yoğunlaşır ve nükleus membranı kalınlaşır. Akrozomal vezikül, nükleusun ön bölümünü kaplayacak şekilde genişler ve şapka gibi bu bölümü sarar

(akrozomal kep). Akrozom, hidrolitik enzimleri içeren özelleşmiş bir lizozom tipidir. Bu enzimler, spermatozoonun oositle karşılaşması ile salınarak oositi çevreleyen korona radiata hücrelerini birbirinden ayırarak ve zona pellusidayı eriterek akrozomal reaksiyonun gerçekleşmesini sağlar (Şekil 4).

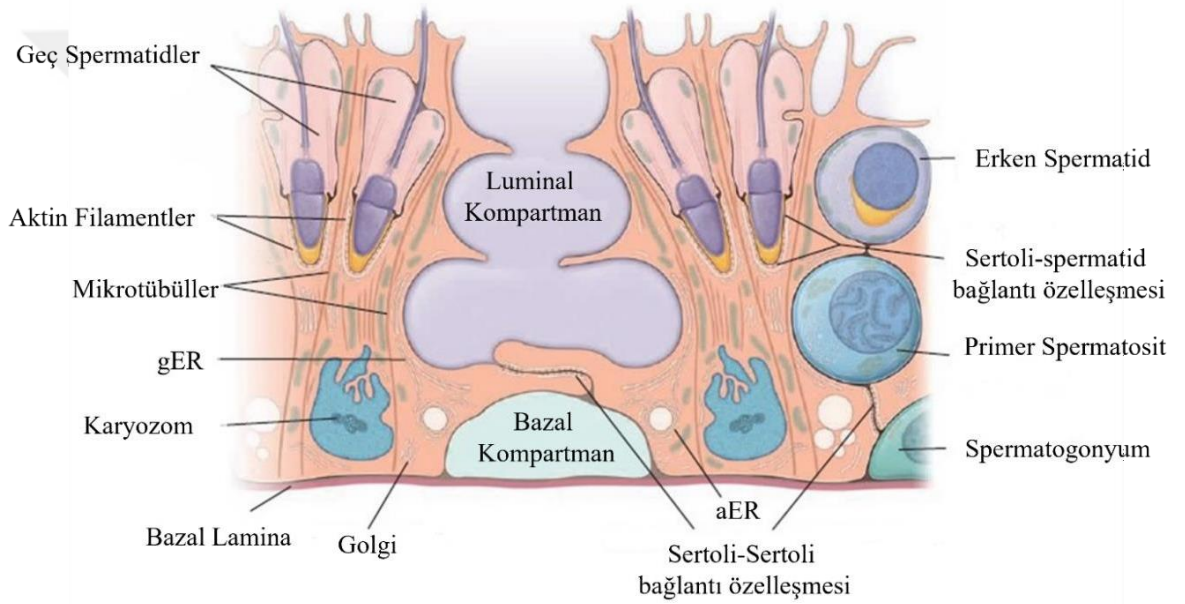
3. Akrozom Fazı: Bu dönem, spermiyogenezin en belirgin şekil değişikliğinin gözlemlendiği dönemdir. Spermiyumun başı, Sertoli hücrelerinin sitoplazmasının derinlerine doğru gömülür. Flagellum iyice uzar ve artık lümende belirgin olarak görülmeye başlar. Yoğunlaşmış nükleus yassılaşır ve uzar. Akrozom, apikal plazma membranına iyice yaklaşır. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomdan spermatidin arka kutbuna uzanarak silindirik kılıf olan manşeti oluştururlar. Manşet, daha sonra plazma membranı flagellumun yüzeyini kaplamak üzere taşınırken kaybolur. Flagellum gelişimini önceden başlatmış olan sentriyoller, daha sonra gelişmekte olan spermin boyun bölgesini oluşturmak üzere nükleusun arka yüzeyine taşınırlar. Flagellum kuyruğu bir taraftan oluşurken, proksimalde ise mitokondrionların birikerek kalınlaşmasıyla orta parça oluşur ve flagellum hareketi için gerekli olan ATP bu kısımda üretilir (Şekil 4).

4. Olgunlaşma fazı: Sitoplazma miktarının azaldığı son dönemdir. Fazla sitoplazmayı içeren bölüm boğumlanıp ayrılır ve Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır. Spermatidler birbirleri ile olan bağlantılarını kaybederler, böylece olgun ama henüz işlevsel olmayan spermatozoonlar, Sertoli hücrelerinden ayrılarak lümene geçerler (Eşrefoğlu, 2021; Mescher, 2015; Pawlina & Ross, 2018) (Şekil 4).

4.2 Kan-Testis Bariyeri

Komşu Sertoli hücreleri ile seminifer epitel arasındaki bariyer olarak bilinen kan-testis bariyeri (KTB) terimi, ilk olarak Chiquoine tarafından 1964 yılında kullanılmıştır. Fakat işlevi 1960'ların sonlarına kadar tam olarak anlaşılmamıştır (Cheng & Mruk, 2012). Bu bariyer, memeli vücudundaki en sıkı kan-doku bariyeridir. Bu fiziksel bariyer, seminifer epiteli bazal kompartman (adluminal) ve apikal (luminal) kompartman olmak üzere iki bölüme ayırır. Spermatogonyumlar ve erken primer spermatositler bazal kompartmanda sınırlı kalırlar.

Olgunlaşan hücreler (spermatozitler ve spermatidler) luminal kısımda yer alırlar. Olgunlaşan hücrelerin kompartmanlar arası geçişi, oluşan spermatozitin altında Sertoli hücrelerinin uzantıları arasında yeni bir bağlantı kompleksi oluşması ve spermatozit üzerindeki eski bağlantının yıkılması sonucu gerçekleşir. Mayoz I ve II, spermiyogenez ve spermiyasyonun tümü apikal kompartmanda, spermatogonyal farklılaşma ve hücre döngüsü progresyonu, preleptoten spermatozit aşamaları bazal kompartmanda gerçekleşir (Li ve ark., 2017). Fiziksel kompartmanlaşmanın haricinde, KTB sayesinde seminifer epitelde iyon, amino asit, karbonhidrat ve protein kompozisyonu sağlanır ve genetik açıdan farklı olan ve dolayısıyla antijenik özellikte olan haploid germ hücreleri, vücudun otoimmün saldırısından korunur (Mescher, 2015; Pawlina & Ross, 2018).



Şekil 5. Sertoli hüresinin ve spermatogenik hücreler ile ilişkisinin şematik çizimi (Pawlina, 2015'den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Bu bariyer, germ hücreleri için çok büyük bir fizyolojik öneme sahiptir. KTB'nin fizyolojik dinamikleri, ekzojen toksinlere ve çevresel kirleticiler gibi toksik maddelere maruz kaldığında bozulmaya veya yeniden düzenlenmeye maruz kalan bağlantı protein döngüsü ve etkileşimleri (Yan ve ark., 2008) tarafından kontrol edilir (Cao ve ark., 2017; Tao ve ark., 2019). Okludin, kladin-3, -5 ve -11 ve ZO-1, -2 ve -3 proteinleri ve adezyon bağlayıcı moleküller (Junctional

Adhesion Molecule -JAM)-A ve -B, KTB'nin bütünlüğünü korur. ZO proteinleri, klaudin ve okludin'i hücre iskeletindeki aktine bağlayan adaptör proteinlerdir. Bu bağlantılar ile KTB'nin bütünlüğünün korunması, normal spermatogenez için gereklidir. KTB'nin dejenerasyonu doğrudan infertiliteye yol açar (Chihara ve ark., 2010).

4.3 Epilepsi ve Erkek İnfertilitesi

Epilepsi, tekrarlayan ve uyarılma olmaksızın oluşan nöbetlerle karakterize yaygın görülen nörolojik hastalıklardan biridir ve kronik doğası, bazı belirli nöbet türleri dışında genellikle uzun süreli, hatta ömür boyu ilaç tedavisi gerektirir (Hamed, 2016; Ocek ve ark., 2018).

Absans epilepsi, aktivitenin durmasıyla eş zamanlı ve geçici bir bilinç değişikliğiyle ilişkili jeneralize non-konvülsif nöbetlerle karakterize özel bir epileptik sendromdur (Panayiotopoulos, 1999). Çocukluk çağı absans epilepsisi, pediatrik idiyopatik jeneralize epilepsinin yaygın bir şeklidir ve okul çağındaki çocuklarda teşhis edilen tüm epilepsi vakalarının %10-17'sini oluşturur (Berg ve ark., 1999). Absans nöbetleri, ilk olarak 1705 yılında Poupart tarafından tanımlanmıştır. Calmeil tarafından ortaya atılan "absans nöbetleri" ismi ise 1824 yılına dayanmaktadır (Temkin, 1994). Absans epilepsisinde iki temel belirti bulunmaktadır. Birincisi, hastaların klinik bulgularıdır. Bu nöbetlerde, ani ve kısa süreli bir bilinç kaybı (absans) meydana gelir. Nöbet sırasında devam eden faaliyet kesilir, cevap verme yeteneği azalır ve zihinsel fonksiyonlar etkilenir. Gözlerde ve perioral bölgede hafif miyoklonik seğirmeler dışında belirgin motor hareketler gözlenmez (Inoue ve ark., 1992; Mirsky & Tecce, 1968; van Luijcklaar & Sitnikova, 2006). İkincisi, hastaların elektroensefalografi (EEG) bulgusudur. Bu hastalarda, postiktal depresyon olmaksızın aniden başlayıp biten iki taraflı, senkronize ve düzenli 3-4 Hz'lik diken-dalga deşarjları (DDD) içeren karakteristik elektriksel aktivite gözlenir. DDD'ler kısa (2-5 s) veya uzun (15-30 s) olabilir ve deşarj içi frekansı 2,5-5 Hz aralığındadır (Panayiotopoulos, 2001).

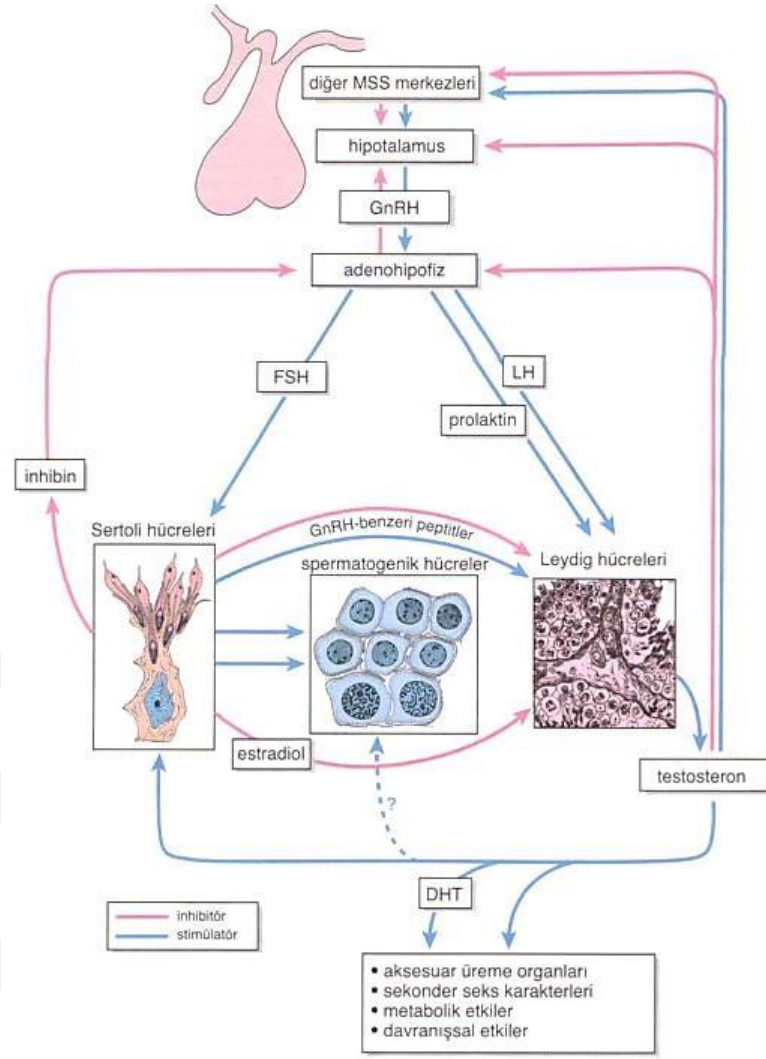
Petit mal olarak da bilinen absans epilepsi, diğer jeneralize epilepsi türlerinden temelde farklıdır. Absans epilepside semptomatik olarak ne bir aura ne de bir konvülsiyon vardır.

Çevresel uyaranlara karşı kısa süreli tepkisizlik ve aktivitenin durması ile karakterize olup, otomatizmler veya uzuvları, göz kürelerini, göz kapaklarını etkileyen orta derecede tonik veya klonik bileşenlerin eşliğiyle kendini gösterir. Ayrıca, absans nöbetleri farmakolojik olarak da diğer jeneralize nöbetlerden farklıdır. Çünkü karbamazepin, fenitoin ve tiagabin gibi iyi bilinen anti-konvülsan ilaçların bazıları, absans nöbetlerini şiddetlendirir (Genton ve ark., 2001; Lerman, 1986). Bu nedenle, tipik absans nöbetlerinde genellikle etosüksimid, sodyum valproat veya lamotrijin monoterapisi tercih edilir (Manning ve ark., 2003).

Epilepsili bireylerde cinsel işlev bozukluğunun etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte; hormonal değişiklikler, antiepileptik ilaçlar (AEİ), nöbet tipleri, hastalık durumu, oksidatif stres (OS) ve hormon düzeyleri testiküler fonksiyon üzerindeki etkilerinin bu faktörlerden bazıları olduğu düşünülmektedir (Montouris & Morris, 2005).

Serbest oksijen radikallerinin çoğu normal aerobik metabolizma sırasında vücutta düşük miktarlarda üretilir. Fizyolojik düzeydeki reaktif oksijen türleri (ROS), antioksidan savunma sistemleri tarafından temizlenebilir. Epileptik nöbetler voltaj kapılı ve N-metil-D-aspartat (NMDA) bağımlı iyon kanalları aracılığıyla önemli miktarda kalsiyum girişini başlatır (vandenPol ve ark., 1996). Hücre içi kalsiyumun yüksek seviyeleri ROS üretimine sebep olur. Artan ROS üretimi, azalan antioksidan savunma yeteneği veya her ikisinin bir araya gelmesi sonucunda aşırı ROS seviyeleri OS'ye yol açar. Oluşan aşırı ROS enzim inhibisyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına neden olabilir (Shin ve ark., 2011). OS birçok hastalığın patogenezinde ve erkek kısırlığı da dahil olmak üzere gelişimsel kusurlarda rol oynamaktadır (Sakai ve ark., 2010). Testis hücrelerinin plazma zarı çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengindir. Bu nedenle ROS'lar tarafından oksidasyona uğramaya eğilimlidir ve yüksek ROS seviyelerinden kolayca etkilenebilirler. Bu nedenle, serbest radikal temizleyici/antioksidan sistem erkek üreme sisteminde redoks dengesinin korunması için kritik öneme sahiptir (Sahin ve ark., 2017). Birçok çalışma ROS'un sperm konsantrasyonu (Agarwal ve ark., 2003; Agarwal, Sharma, ve ark., 2014; Athayde ve ark., 2007), motilite (Agarwal ve ark., 2014; Athayde ve ark., 2007), morfoloji (Agarwal ve ark., 2014; Aziz ve ark., 2004) üzerindeki zararlı etkilerini göstermiştir. Ayrıca ROS sperm DNA hasarı (Desai ve ark., 2009) ve apoptosis (Agarwal & Said, 2005), ile ilişkilendirilmiştir.

Epileptik nöbetlerin hipotalamus ve hipofiz hormonlarının salınımını değiştirerek üreme fonksiyonları üzerinde uzun vadede olumsuz etki göstermesinin yanı sıra tedavide kullanılan AEİ'lerin de cinsiyet steroid hormon konsantrasyonlarını değiştirerek üreme fonksiyonlarını olumsuz etkilediği düşünülmektedir (Morrell & Montouris, 2004). Erkek üreme sisteminin hormonal düzenlenmesi, hipotalamus-hipofiz-gonad aksının klasik geri bildirim döngüsü ile gerçekleştirilir. Hipotalamus, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) üreterek, hipofiz portal sistemine salgılar. GnRH ile indüklenen ön hipofizden dolaşıma gonadları uyarmak üzere luteinizan hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) salınır. Erkeklerde gonadotropinler testosteron ve inhibin üretimini uyarır. Düşük testosteron seviyeleri hipotalamik hipofiz sistemi için pozitif bir uyarıcıdır, Sertoli hücrelerinden salınan inhibin ise hipofiz bezi tarafından FSH salgılanması üzerinde negatif bir geri bildirime sahiptir. LH'nin etkisiyle Leydig hücrelerinden testosteron salınır. Testosteron hormonu, spermatogenezi düzenleyen başlıca androjendir ve Leydig hücre fonksiyonu testosteron ve LH'nin serum seviyeleri ile temsil edilir. Testosteron/LH oranı testis fonksiyon bozukluğunun hassas bir ölçüsüdür (Montouris & Morris, 2005). LH uyarısına yanıt olarak Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron, seminifer tübüllere difüze olan bir parakrin faktör olarak işlev görür. Germ hücrelerinde androjen için işlevsel reseptörler bulunmaz (Lyon ve ark., 1975; Smith & Walker, 2014; Tsai ve ark., 2006; Wang ve ark., 2009). Bunun yerine, Sertoli hücrelerine difüze olan testosteron spermatogenezi desteklemek için gereken fonksiyonel yanıtları başlatmak üzere sitoplazma ve çekirdekte bulunan androjen reseptörüne (AR, NR3C4 olarak da gösterilir) bağlanarak işlev görür (Şekil 6).



Şekil 6. Erkek üreme fonksiyonunun hormonal düzenlenişini gösteren diyagram (Pawlina & Ross, 2018)

Normal hipofiz-gonad fonksiyonu için tutarlı bir pulsatil GnRH üretimi esastır. Özellikle temporal lobu içeren sık nöbetler, GnRH'nin hipotalamik salınımını uyarır. Hipotalamik-hipofiz sisteminin duyarsızlaşması meydana gelir ve LH ve FSH'nin ön hipofiz salınımı baskılanarak gonadal uyarımın azalmasına neden olur. Dolayısıyla, nöbet deşarjları üreme fonksiyonu üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabilir (Cramer & Jones, 1991).

4.4 Cinsiyet Hormonları ve Üreme Sistemindeki Roller

Tüm steroid hormonları, kolesterolden üretilir. Kolesterol, Leydig hücrelerinin mitokondrisinde yer alan steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) tarafından iç mitokondriyal membrana

taşınır. Kolesterol, mitokondri içinde steroidogenezin ilk basamağı için substrattır ve CYP11A1 (sitokrom P450 yan zincir bölünmesi, P450_{scc}), ferrodoksin (FDX1) ve ferrodoksin-redüktaz (FDXR) tarafından pregnenolona (PREG, 5-pregnen-3 β -ol-20-one) dönüştürülür. Klasik yolda, PREG daha sonra sitokrom P450 17 α -hidroksilaz/17,20-liyaz (CYP17A1, P450_{c17}) tarafından delta-5 yolu ile 17 α -hidroksipregnenolona (17OHPREG, 5-pregnen-3 β) dönüştürülür. 17OHPREG, sitokrom b5 (CYB5) ve sitokrom P450 oksidoredüktaz (POR) tarafından desteklenen 17 α -hidroksilasyon aktivitesiyle dehidroepiandrosterone (DHEA) çevrilir. DHEA daha sonra 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz tip II (HSD3B2/3 β HSDII) ve 17 β -hidroksisteroid dehidrojenaz tip 3 veya tip 5 (HSD17B3 veya HSD17B5 olarak da bilinen AKR1C3) enzimleri tarafından androstenediole sonrasında da testosterona çevrilir (Naamneh Elzenaty ve ark., 2022).

4.5 Genetik Absans Epilepsisinin Hayvan Modelleri: GAERS Suşu

Strasbourg'daki bir laboratuvarında, Wistar sıçanlarının yüzde otuzunda serebral korteks üzerinde bilateral ve senkronize olan spontan DDD'lerin farkedilerek bu elektriksel deşarjları gösteren hayvanların kendi aralarında seçici olarak üretilmesi sonucunda, hayvanların %100'ünün bilateral ve senkronize spontan DDD'ler gösterdiği bir tür elde edilmiştir. Bu türe "Genetic absance epilepsy rat from Strasbourg" (GAERS) adı verilmiştir (Danover ve ark., 1998; Marescaux ve ark., 1992). Bu suş, absans epilepsisinin patofizyolojisini anlamak, jeneralize idiyopatik epilepsi ve jeneralize nöbetler hakkındaki genel bakışımızı geliştirmek için kritik bir öneme sahiptir. Absans epilepsi, sıklıkla diğer epilepsi türleri ile ortak birçok EEG ve davranışsal özelliğe sahip olan jeneralize epilepsinin prototipik bir formu olarak kabul edilir. Bununla birlikte, çoğu hastanın erken yaşlarda tanı alması ve AEİ'lere başlanması yanında etik problemlerin de olması nedeniyle absans epilepsinin klinik incelenmesi sınırlıdır. Bundan dolayı absans epilepsi hakkındaki mevcut bilgiler esas olarak hayvan modellerinden elde edilmiştir. Absans epilepsi çalışmaları daha spesifik olarak fare ve sıçanlardaki genetik modellerde gerçekleştirilmiştir. Bu genetik modeller, klinik durumlara yakın doğal geçmişi olan bireyleri incelemek için eşsiz bir fırsat sunar. Dolayısıyla, insan absans epilepsisinin patofizyolojisini ve yaşam boyunca evrimini anlamak için ideal koşullar sağlar. Davranışsal durma ile karakterize spontan DDD'lerin oluşumunu gösteren EEG kayıtlarına dayanarak

farelerde ve sıçanlarda farklı genetik modeller tanımlanmıştır. Genetik modeller; DDD'leri bir yaşam süresi boyunca düzenli olarak kaydedilmesine, epileptik ve epileptik olmayan suşlar arasındaki verilerin karşılaştırılmasına ve nöbetlerin başlangıcından önce epileptik hayvanların araştırılmasına imkan verdiği için tercih edilmektedir. Bu özellikler, çoğunlukla çalışılan iki sıçan modeli olan WAG/Rij (Depaulis & Charpier, 2018; Sarkisova & van Luijtelaa, 2011; Van Luijtelaa & Coenen, 1986) ve GAERS sıçanlarında (Depaulis & Charpier, 2018; Depaulis ve ark., 2016; Vergnes ve ark., 1982) geçerlidir.

4.6 Timokinin:

Son yıllarda sentetik ilaçların yan etkilerine ilişkin endişeler ve bitkilerden elde edilen yeni ilaçların artan etkinliği nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde doğal alternatif tedavilere yönelim artmıştır. Bitkisel ilaçların yaygın kullanımı, bilim insanlarını bu bileşiklerin sağlık üzerindeki etkilerini araştırmaya teşvik etmiştir. Bu sayede çok sayıda tıbbi bitki ve bunların aktif ekstrakt bileşenleri, kapsamlı bir şekilde incelenmektedir (Darakhshan ve ark., 2015; Sarkar ve ark., 2021).

Nigella sativa (çörek otu), *Ranunculaceae* (dügün çiçeği) familyasına ait bir yıllık çiçekli bir bitkidir. Doğu Akdeniz, Kuzey Afrika, Hindistan yarımadası ve Batı Asya'ya da yetiştirilen bu bitki 20-30 cm uzunluğunda olup, 5-10 petal içeren bir çiçek ve siyah renkli tohumlar içeren 3-7 folikülden oluşan kapsül içeren bir meyveye sahiptir. Bu tohumlar, yüzyıllardır çeşni ve gıda koruyucusu olarak kullanılmıştır. Ayrıca ateş, romatizma, öksürük, bronşit ve grip gibi birçok hastalığa karşı geleneksel bir bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır (Fatima Shad ve ark., 2021). *N. sativa*'nın siyah tohumları, hem sabit (%22-38) hem de uçucu yağlar (%0,40-0,45), alkaloidler (%0,01), amino asitler ve protein (%21-31), karbonhidratlar (%25-40), saponinler (%0,013), vitaminler (%1-4) ve mineraller (%3,7-7) içeren farklı türlerde önemli ve iyi karakterize edilmiş çeşitli fitokimyasallar içerir (Sarkar ve ark. , 2021) (Şekil 7).



Şekil 7. *Nigella sativa* bitkisi, tohumu ve kimyasal formülü (Schneider-Stock ve ark., 2014)

Timokinon, *N.sativa*'nın uçucu yağında %18,4 ila %24,0 oranında bulunan terapötik potansiyeli ve farmakolojik özellikleri nedeniyle büyük ilgi gören potansiyel bileşenlerden biridir. Literatürdeki çalışmalar Timokinonun anti-histaminik, anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-inflamatuvar, anti-konvülsan, immunomodilatör etkilerini ve gastrointestinal sistem, sinir sistemi ve üreme sistemi başta olmak üzere bir çok sistem üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır (Darakhshan ve ark. , 2015).

Literatürde timokinonun epileptik nöbetler arasındaki süreyi arttırıp nöbet süresini kısalttığına dair çalışmalar yer almaktadır. Timokinonun bu anti-konvülsan etkisini, nöbet aktivitesini ve lipidlerin oksidasyonunu, hipokampal nöronal hücre kaybını ve astrogliozisi azaltarak gösterdiği düşünülmektedir (Pottoo ve ark., 2022). Erkek üreme sistemi üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda oluşturulan çeşitli hasar modellerinde, timokinonun OS ve histolojik hasarları hafiflettiği, anti-inflamatuvar ve antioksidan özellikleri aracılığıyla erkek üreme sistemi üzerinde koruyucu bir rol oynadığı belirtilmiştir (Darakhshan ve ark. , 2015; Karakaya ve ark., 2021; Öztürk ve ark., 2020; Sayed ve ark., 2014; Yaghutian Nezhad ve ark., 2021).

4.7 Valproik Asit:

VPA ilk olarak 1882 yılında organik bir çözücü olarak üretilmiş, berrak, renksiz, sekiz karbonlu dallı zincirli bir yağ asididir. Kimyasal adı, 2-propilvalerik asittir (Lagace ve ark., 2004; Meunier, 1963). VPA'nın terapötik potansiyeli, 1962 yılında Carraz ve meslektaşları tarafından deneysel antikonvülsanlar için bir çözücü olarak kullanırken VPA'nın kendi antikonvülsan etkisini fark etmeleriyle tesadüfen keşfedilmiştir. Keşfinden bir yıl sonra, VPA'nın epilepsi tedavisinde kullanımı ile ilgili ilk klinik çalışma rapor edilmiştir (Carraz ve ark., 1964; Lagace ve ark. , 2004; Meunier, 1963). İlaç, epilepsi için 1967'de Fransa'da ve ardından 1978'de Amerika Birleşik Devletleri'nde onaylanmıştır (Henry, 2003; Lagace ve ark.

, 2004). VPA, hayvan epilepsi modellerinde ve insanlarda parsiyel ve jeneralize nöbetlerin tedavisinde etkinlik göstermiş ve 1978'den bu yana hem parsiyel hem de jeneralize nöbetlerin tedavisinde dünya çapında en sık kullanılan antiepileptik ilaçlardan biri haline gelmiştir (Davis ve ark., 1994; Lagace ve ark. , 2004; Terbach & Williams, 2009).

VPA, epilepsi tedavisine ek olarak günümüzde bipolar bozukluk (Emrich, 1981) ve migren (Calabresi ve ark., 2007) dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Kanseri (Blaheta ve ark., 2002), Alzheimer (Tariot ve ark., 2002) ve latent HIV tedavisinde de (Lehrman ve ark., 2005) kullanımı önerilmiştir. VPA'nın bu etkilerinin çoğu dolaylıdır ve/veya henüz bilinmeyen bir mekanizma aracılığıyla ortaya çıkar. VPA'nın etki mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte, önerilen etki mekanizmalarından bazıları şunlardır:

1- Voltaj kapılı sodyum kanallarının inhibisyonu: VPA, Voltaj kapılı sodyum kanallarını inhibe ederek sodyum iyonlarının nöronlara girişini engeller. Bu sayede nöron uyarılabilirliği ve ateşleme hızı azalır ve böylece nöbetlerin tetiklenmesinden sorumlu anormal elektriksel uyarıların oluşması ve yayılması engellenir (Rahman ve ark., 2024) .

2-Gama-aminobütirik asit (GABA) transaminaz inhibisyonu: VPA, beyindeki baskın inhibitör nörotransmitter olan GABA'nın bozunmasından sorumlu olan GABA transaminaz enziminin işlevini baskılayarak GABA seviyelerini ve aktivitesini artırır, böylece nöronal fonksiyonun inhibisyonu artar ve nöbetlere karşı duyarlılık azalır (Rahman ve ark. , 2024).

3- GABA sentezinin artırılması: VPA, glutamatin GABA'ya dönüştürülmesini sağlayan glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enziminin ekspresyonunu ve aktivitesini artırır ve böylece GABA sentezini indükler. Bu şekilde, aynı zamanda hem GABA seviyesi hem de aktivitesi artırılmış olur. α -ketoglutarattan trikarboksilik asit döngüsü yoluyla sentezlenen GABA, süksinat semialdehide metabolize edilir. Bu ara ürün, sırasıyla GABA transaminaz ve süksinat semialdehit dehidrogenaz tarafından süksinata dönüştürülür. Önceki araştırmalar VPA'nın GABA transaminaz ve süksinat semialdehit dehidrogenazı inhibe ederek GABA konsantrasyonunu yükselttiğini göstermiştir (Rahman ve ark. , 2024).

4- Histon deasetilazların (HDAC'ların) inhibisyonu: VPA, DNA'nın etrafını saran proteinler olan histonların asetilasyon durumunu değiştirerek gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan HDAC enzimlerinin, özellikle de HDAC1'in etkisini inhibe eder (Rahman ve ark. , 2024; Schwartz ve ark., 2007). Bu süreç kromatin yapısında değişikliklere yol açar ve daha sonra nöronal plastisite, sinaptik iletim, nörogenez, nöroproteksiyon ve inflamasyonla bağlantılı olanlar da dahil olmak üzere birçok genin transkripsiyonunu etkiler. Bu önerme, VPA'nın bilişsel, nörogelişimsel ve apoptotik süreçler üzerindeki etkilerini aydınlatılabilir (Ghodke-Puranik ve ark., 2013; Rahman ve ark. , 2024).

5- Kalsiyum kanallarının modülasyonu: VPA, T-tipi, L-tipi ve N-tipi kalsiyum kanalları dahil olmak üzere çeşitli kalsiyum kanallarının aktivitesini modüle eder. Bu kanallar nöronal sinyalizasyon, nörotransmitter salınımı, gen ekspresyonu ve hücrel sağkalım için gereklidir. VPA'nın kalsiyum kanalları üzerindeki kesin etkileri tam olarak anlaşılmamıştır. Bazı çalışmalar, VPA'nın absans nöbetlerinde ve talamokortikal osilasyonlarda rol oynayan T tipi kalsiyum kanallarını etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir (Bolanos & Medina, 1997; Rahman ve ark. , 2024).

Birçok hastalığın tedavisindeki faydalı etkilerine rağmen, VPA'nın erkek üreme sistemi de dahil çoğu sistem üzerindeki toksisitesi hastalar için gerçek bir endişe kaynağıdır. GAERS suşu sıçanlarda *in utero* VPA ve levetiracetam maruziyetinin yenidoğanlardaki etkilerini araştıran bir çalışmada, VPA ve Levetirasetam akciğer, böbrek ve beyin dokularının histopatolojisini olumsuz etkilediği gözlenmiştir (Can Kantarci ve ark., 2022). VPA alan erkek epilepsi

hastalarında kısırlık vakaları bildirilmiştir (Giovana M Ourique ve ark., 2016). Hem klinik çalışmalar (Xiaotian ve ark., 2013; Yerby & McCoy, 1999) hem de deneysel çalışmalar (Girish ve ark., 2014; Nishimura ve ark., 2000), VPA'nın sperm parametreleri, testis morfolojisi de dahil olmak üzere erkek üreme sistemi üzerinde birçok olumsuz etkisi olduğunu göstermiştir. Giderek artan sayıda kanıt, OS'nin VPA toksisitesinden sorumlu olduğunu göstermektedir. Literatürde VPA maruziyeti sonucu meydana gelen, sperm hareketliliğinde azalma (Hamza & Amin, 2007), sperm DNA hasarı ve germ hücre toksisitesinin OS ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Khan ve ark., 2011).

4.8 Apoptoz

Apoptoz, Latince 'uzaklaşma; ayrılma' anlamına gelen Apo- ve 'düşme' anlamına gelen -ptosis kelimelerinden meydana gelir ve ökaryotik canlılardaki fizyolojik hücre ölüm sürecini tanımlamak için kullanılır (Ulukaya ve ark., 2011). İnsan vücudunda her saniye yaklaşık bir milyon hücre apoptoz yoluyla ortadan kaldırılmakta ve yerlerini yeni hücreler almaktadır. Çoğalma (mitoz), yıkım (apoptoz) ile dengelenir. Mitoz ya da apoptoz lehine meydana gelebilecek olası bir dengesizlik önemli hastalıkların patogeneğinde rol oynar. Anormal veya artmış apoptoz oranı AIDS, nörodejeneratif bozukluklar, insüline bağımlı diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü ve ateroskleroz gibi hastalıklara sebep olurken, azalmış apoptoz oranı otoimmün hastalıklar ve kanser gibi hastalıklara sebep olur. Bu nedenle, organizmada apoptoz belli bir düzen içerisinde gerçekleştirilmelidir (Ulukaya ve ark. , 2011).

Apoptoz mekanizması, 1990'ların ortalarında nöbete bağlı beyin hasarı araştırmalarında, uzun süreli nöbetlerden sonra sıçan beyninden alınan doku örneklerinde *in situ* 'apoptotik' DNA parçalanması (terminal deoksinükleotidil dUTP nick end labelling; TUNEL yöntemi ile tespit edilmiştir) ve DNA merdivenlenmesinin (DNA laddering) tespit edilmesiyle ortaya çıkmıştır (Filipkowski ve ark., 1994; Henshall & Simon, 2005).

Apoptozu etkileyen faktörler temelde hücre içi ve hücre dışı faktörler olarak sınıflandırılır. Hücre içi faktörler mitokondriyal aktivasyona neden olurken, hücre dışı faktörler hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri veya granzim/perforin sistemi aracılığıyla etki eder. Hücre dışı

faktörler aynı zamanda mitokondriyal aktivasyona da sebep olabilir. Bugüne kadar yapılan araştırmalar ekstrinsik veya ölüm reseptörü yolu ve intrinsik veya mitokondriyal yol olmak üzere iki ana apoptotik yol olduğunu göstermektedir (Elmore, 2007).

Ekstrinsik apoptoz yolu, Fas (APO-1, CD95), TNF reseptörü-1 (TNFR-1), DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2) gibi ölüm reseptörlerinin ligandlarıyla etkileşimi ile indüklenir (Degli-Esposti, 1999; Friesen ve ark., 1996; Pan ve ark., 1997). Ölüm reseptörlerinin ligandları, oligomerizasyona ve dolayısıyla reseptörlerin aktivasyonuna neden olur. Reseptörlerin oligomerizasyonunu spesifik adaptör proteinlerin (FADD, TRADD) reseptörlerine bağlanması takip eder ve bu da kaspaz sisteminin aktivasyonuna yol açar ve pro-kaspaz-8 aktive edilerek kaspaz kaskadını başlatır. Aktif kaspaz-8, apoptotik süreci iki şekilde yürütür:

- I. Kaspaz-3'ün doğrudan bölünmesi ve aktivasyonu
- II. Pro-apoptotik bir protein olan BID proteininin bölünmesi ile aktive olması ve sitozolden mitokondriye translokasyon yaparak, burada sitokrom C salınımını indüklemesi.

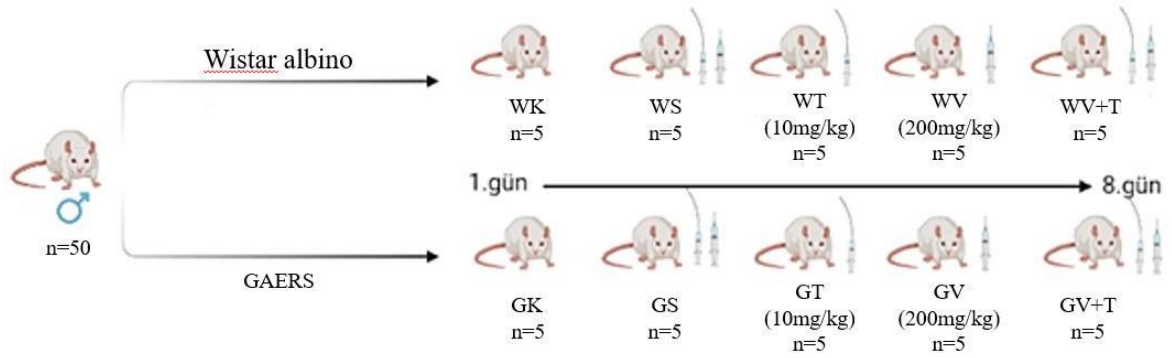
İntrinsik apoptoz yolu, hücre içi organel işlevini bozan hücre stres faktörlerinden sonra başlatılır (Danial & Korsmeyer, 2004; Henshall & Simon, 2005). Hücre içi Ca^{2+} artışı, pro-apoptotik Bcl-2 protein aktivasyonu veya ROS içerebilir (Henshall & Simon, 2005; Orrenius ve ark., 2003; Polster & Fiskum, 2004). Mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitokrom C salınımı, mitokondri kaynaklı intrinsik yol için tetikleyici görevi görür (Henshall & Simon, 2005; Liu ve ark., 1996). Sitokrom C, iç mitokondriyal membranda bulunan ve elektron transfer zincirinde yer alan bir proteindir. Sitokrom C, apoptozu indükleyen faktörlerle (AIF'ler) birlikte, mitokondriden sitozole salınmaktadır (Joza ve ark., 2001; Ulukaya ve ark., 2011). Sitokrom C, sitoplazmik bir protein olan Apaf-1'e (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) bağlanarak onu aktive eder ve apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, pro-kaspaz-9'u aktive ederek aktif kaspaz-9'a dönüştürebilir. Aktif kaspaz-9, efektör kaspazlardan biri olan kaspaz-3'ü aktive eder (Li ve ark., 1997). Aktif kaspaz-3, kaspaz-aktive deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktive eder, böylece ICAD'ye bağlı kaspaz-aktive deoksiribonükleaz (CAD) serbest kalır, bu da apoptozun karakteristik özellikleri olan kromatin yoğunlaşması ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonu ile sonuçlanır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 Deney Hayvanları

Çalışmamızda, Marmara Üniversitesi DEHAMER'den temin edilen GAERS (n=25) ve Bezmialem Üniversitesi HADYEK'ten temin edilen Wistar albino (n=25) suşu olmak üzere toplam 50 adet erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar, standart koşullar altında sabit sıcaklık ve nem sağlanan ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %65-70 nem), uygun havalandırması olan laboratuvar ortamında tutuldu. Hayvanlar, uygun kafesler içinde, her kafeste en fazla 3 hayvan olacak şekilde, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsü olan ortamda musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Çalışma için Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan izin alındı (11.04.2022-24.2022mar). Çalışmamızda oluşturulan deney grupları aşağıdaki gibidir (Şekil 8):

- 1-Wistar Kontrol (WK) Grubu:** Hiçbir müdahalede bulunulmayan Wistar albino suşu sıçanlar.
- 2-Wistar Sham (WS) Grubu:** 8 gün boyunca VPA çözücüsü olan PBS (i.p) ve timokinon çözücüsü olan mısır yağı (gavaj) uygulanan Wistar albino suşu sıçanlar.
- 3-Wistar Timokinon (WT) Grubu:** 8 gün boyunca 10 mg/kg timokinon (gavaj)(Karakaya ve ark. , 2021) uygulanan Wistar albino suşu sıçanlar.
- 4-Wistar Valproik asit (WV) Grubu:** 8 gün boyunca 200mg/kg VPA (i.p)(Khan ve ark. , 2011) uygulanan Wistar albino suşu sıçanlar.
- 5-Wistar Valproik asit+Timokinon (WV+T) Grubu:** 8 gün boyunca eş zamanlı VPA (i.p) ve timokinon (gavaj) uygulanan Wistar albino suşu sıçanlar.
- 6-GAERS Kontrol (GK) Grubu:** Hiçbir müdahalede bulunulmayan GAERS suşu sıçanlar.
- 7-GAERS Sham (GS) Grubu:** 8 gün boyunca VPA çözücüsü olan PBS (i.p) ve timokinon (gavaj) çözücüsü olan mısır yağı (gavaj) uygulanan GAERS suşu sıçanlar
- 8-GAERS Timokinon (GT) Grubu:** 8 gün boyunca 10 mg/kg timokinon (gavaj) uygulanan GAERS suşu sıçanlar.
- 9-GAERS Valproik asit (GV) Grubu:** 8 gün boyunca 200mg/kg VPA (i.p) uygulanan GAERS suşu sıçanlar.
- 10- GAERS Valproik asit+Timokinon (GV+T) Grubu:** 8 gün boyunca eş zamanlı VPA (i.p) ve timokinon (gavaj) uygulanan GAERS suşu sıçanlar.



Şekil 8. Deney gruplarının ve yapılan işlemlerin grafik özeti. (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)

5.2 Doku Eldesi

Denekler, son uygulamadan 24 saat sonra ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg) ile oluşturulan derin anestezi altında, kalpten kan alınarak sakrifiye edildi. Tüm sıçanlardan testis dokuları ve sol epididimis dikkatli bir şekilde diseke edildi.

5.3 Sperm Analizi

Tüm deneklerden diseke edilen sol epididimisin kaudası 5 ml'lik PBS içine alınıp, küçük parçalara ayrıldı. Hazırlanan sperm örneğinden bir damla alınarak lam üzerine sperm yayması hazırlandı ve Diff-Quick boyası ile boyandı. x40 objektifte, her preparattan 100 adet spermin baş, boyun, kuyruk anomalileri değerlendirildi (Kenjale ve ark., 2008) ve x100 objektifte fotoğraflandı.

5.4 Işık Mikroskopisi

5.4.1 Morfolojik İnceleme

Diseke edilen sol testis dokuları, 72 saat Bouin solüsyonunda fiksle edildi. Fiksativin oluşturduğu sarı renk uzaklaştırılana kadar lityum karbonatlı %70 alkolde bekletilen dokular, yükselen alkol serilerinden (%90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi. Ksilen ile şeffaflaştırılan testis dokuları sıvı parafine alındı. Gece boyu 60°C'de sıvı parafinde inkübe

edilen dokular, parafin bloklama cihazında (Leica EG1150H, Almanya) bloklandı. Parafin bloklardan alınan 4 µm kalınlığında kesitler, genel morfolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin (H&E) boyası ile boyandı. Kesitlere, bazal membrandaki değişiklikleri göstermek için periyodik asit-Schiff (PAS) reaksiyonu uygulandı. Nikon ışık mikroskobu (Eclipse 920248, USA) kullanılarak, x20 objektif ile her kesitte toplam 20 seminifer tübül olacak şekilde fotoğraf çekildi. Bu fotoğraflar üzerinde germinal epitel kalınlığı, Image j (NIH) programı kullanılarak ölçüldü. Tübül hasarı, modifiye edilmiş Johnsen skorlamasına göre skorlandı (Tablo 1) (Gozen ve ark., 2013; Johnsen, 1970).

Tablo 1. Modifiye edilmiş Johnsen’in Histopatolojik Skorum Parametreleri (Johnsen, 1970; Sener ve ark., 2021)

1	Seminifer tübül içinde hiç hücre yok
2	Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var
3	Yalnızca spermatogonyumlar var
4	Spermatozoa veya spermatid yok, birkaç spermatosit var
5	Spermatozoa veya spermatid yok, çok sayıda spermatosit var
6	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid var
7	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, çok sayıda erken spermatid var
8	Her tübül lümeninde 5’den az spermatozoa, az sayıda geç spermatid var
9	Hafif bozulmuş spermatogenez, çok sayıda geç spermatid, epitel organizasyonunda bozukluk
10	Tam spermatogenez

5.4.2 İmmunohistokimyasal Analizler

Pozitif şarjlı lamlara alınan 4 µm kalınlığında parafin kesitler, 60°C’lik etüvde 1 saat bekletildikten sonra, deparafinize etmek amacıyla ksilende ve sonrasında %96’lık alkolde bekletildi. Kesitler, endojen enzim blokajı yapmak için metanol ile hazırlanmış %3’lük hidrojen peroksit ile alındı. Kesitler, önce musluk suyu sonra distile suda yıkama işleminin ardından antijen geri kazanımı için ısıtılmış sitrat tamponunda 20 dk/200 W mikrodalgaya maruz bırakıldı. Akabinde oda ısısında soğumaya bırakılan kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra bloklama solüsyonunda bekletildi. Hücre proliferasyonunu incelemek için Tavşan anti-PCNA (Bioss bs-0754R, 1:100), steroid hormon üretimini araştırmak için tavşan anti-StAR (Abcam

ab203193, 1:100) primer antikorlarında bir gece +4°C’de nemli bir ortamda bekletildi. Kesitler yıkandıktan sonra, anti-polivalan sekonder antikorda (Scytek SHP125) oda ısısında 1 saat bekletildi. PBS’te yıkanan kesitler, peroksidazda (Scytek SHP125) bekletildi ve tekrar PBS ile yıkandı. DAB kromojeninde (Thermofisher Scientific, 34002) bekletilerek oluşan reaksiyon ürünü mikroskop altında izlendi. Distile suda yıkanan kesitlere Mayer’in hematoksilini ile zıt boyama yapıldı. Musluk suyu ve distile su ile yıkamanın ardından %96’lık alkolde bekletilen kesitler, kurutulduktan sonra entellan ile kapatıldı. Nikon ışık mikroskobu (Eclipse 920248, USA) kullanılarak, x20 objektif ile fotoğraflandı.

5.5 Yarı İnce Kesitlerin Eldesi

Sağ testislerden alınan doku örneklerinin %2,5’luk 0,1 M PBS tamponlu (pH 7,2) glutaraldehit fiksatif i içerisinde 4 °C’de 6 saat fiksasyonu yapıldı. Tamponla yıkamadan sonra, %1’lik osmiyum tetroksitle 1 saat postfiksasyon yapıldı. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildikten sonra propilen oksitten geçirilen dokular, epona gömüldü ve 1 gece 60 °C’de bekletilerek bloklandı (Elmas ve ark., 2022). Ultramikrotomla alınan yarı ince kesitler (1 µm) metilen mavisi ile boyandı. Kesitler, Nikon ışık mikroskobu (Eclipse 920248, USA) kullanılarak, x100 objektif ile fotoğraflandı.

5.6 Western Blot Analizleri

WB analizi için ayrılmış dokular buz üzerinde 30 dakika boyunca önceden hazırlanmış RIPA hücre liziz tamponunda (proteaz inhibitörü kokteyli ilaveli) bekletilip, 4°C’de 10 dakika boyunca 13000 x rpm’de santrifüjlendi ve elde edilen süpernatant, sitozolik fraksiyon olarak kullanıldı. Total protein konsantrasyonları, Bradford protein analiz yöntemi (Zelikovic, 2004) ile belirlendi. Proteinler, WB analizi için %8-12’lik SDS-PAGE jel üzerinde ayrıldı. Ayrım sonrası proteinler PVDF membranına aktarıldı. Membrana aktarılan proteinler, ilk olarak ticari olarak elde edilen PCNA(1:500, Bioss,USA), Bax (1:500, Cell signaling, USA), Bcl-2(1:500 Cell signaling, USA), sitokrom C (1:500, Affinity bioscience, Çin) , kaspaz-8 (1:500, Elabscience, USA), kaspaz-9 (1:500, Cell signaling, USA), bölünmüş kaspaz-3 (1:500, Affinity bioscience, Çin), StAR (1:500 Abcam, USA) ve ZO-1(1:500, Affinity bioscience, Çin) primer

antikorları ile, daha sonrasında horseradish peroksidaz (HRP) ile konjuge sekonder antikorlar ile inkübe edildi. Protein bantları PCNA, Bax, Bcl-2, sitokrom C, kaspaz-8 , kaspaz-9, bölünmüş kaspaz-3, StAR, ZO-1 proteinlerine ve housekeeping antikor β -aktin'e özgü ikincil antikorlar (1:1000, Cell signaling, USA) üzerindeki enzime bağlanarak aktivite gösteren Pierce ECL WB substratı (Bio-Rad, CA, ABD) ile görsel hale getirildi (Moe ve ark., 2008). Her bir antikor için oluşan bantlar, Vilbert Laurmart Fusion Fx5 cihazında görüntülendi ve bant yoğunlukları analiz edildi.

5.7 Biyokimyasal Analizler

Doku örneklerinde yapılacak biyokimyasal analizler için -80°C 'de saklanan sağ testis dokularının bir kısmı soğutuldu ve 0.9% NaCl içinde yıkandı. Ardından homojenizator cihazı (Merck Millipore, ABD) kullanılarak soğuk tampon (100 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 ; pH 7.4 içeren 1.15% KCl) içinde homojonize edildi.

Tüm örnekler, analizden hemen önce 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve sıvı bileşen yeni bir Eppendorf tüpüne aktarıldı. Doku ve serum örnekleri, eş zamanlı olarak analiz edildi. OS parametreleri (TAS, TOS ve OSI) ticari kitler (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) ve tam otomatik bir spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific Co., USA) kullanılarak ölçüldü.

Total Antioksidan Seviyesi (TAS), ticari kit kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Örneklerdeki antioksidan içerik, koyu mavi/yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirgediğinden 660 nm'deki absorbans değişimi numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkili kabul edilir. Numunelerin TAS seviyeleri, mmol Trolox Equiv/L cinsinden ifade edildi.

Total Oksidan Seviyesi (TOS) ticari kit kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Numunelerde bulunan oksidanlar, demir iyonu şelatör kompleksini demir iyonuna oksitler. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan artırıcı moleküller tarafından uzatılır. Ferrik iyon, asidik bir ortamda kromojen ile bir renk kompleksi oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan oksidan moleküllerin

toplam miktarı ile ilişkilidir. Numunelerin TOS seviyeleri, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./gr cinsinden ifade edildi.

OSI değeri; $\text{OSI} = \text{TOS}/\text{TAS}$ işlemi kullanılarak hesaplandı.

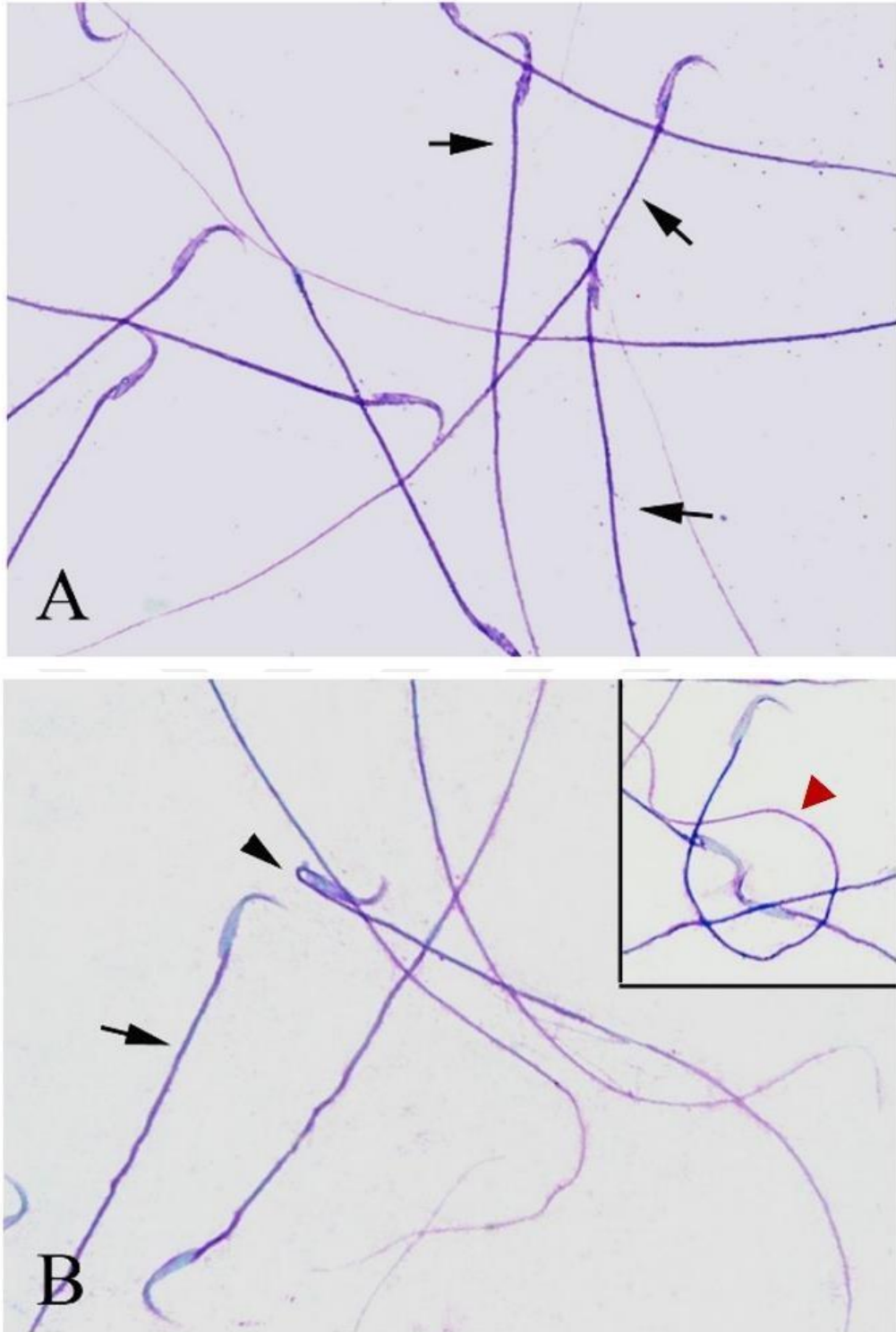
5.8 İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen veriler, GraphPad Prism 8 İstatistiksel Paket Programı (InStat GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) aracılığı ile analiz edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma ($\text{mean} \pm \text{SD}$) olarak verildi. Veriler, grupların dağılımının, normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben tek yönlü varyans analizi uygulanarak Tukey çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

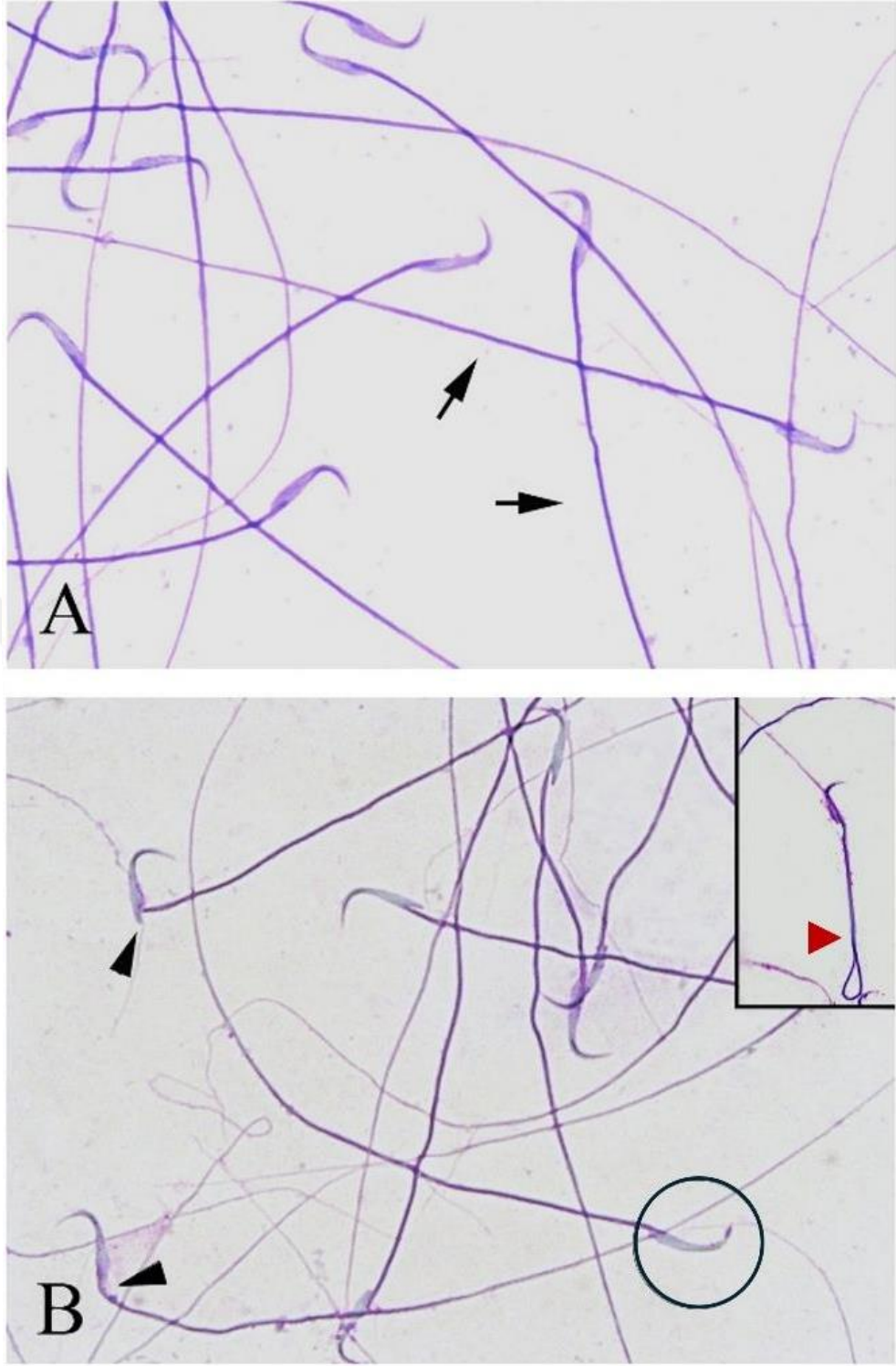
6. BULGULAR

6.1 Sperm Morfolojik Bulguları

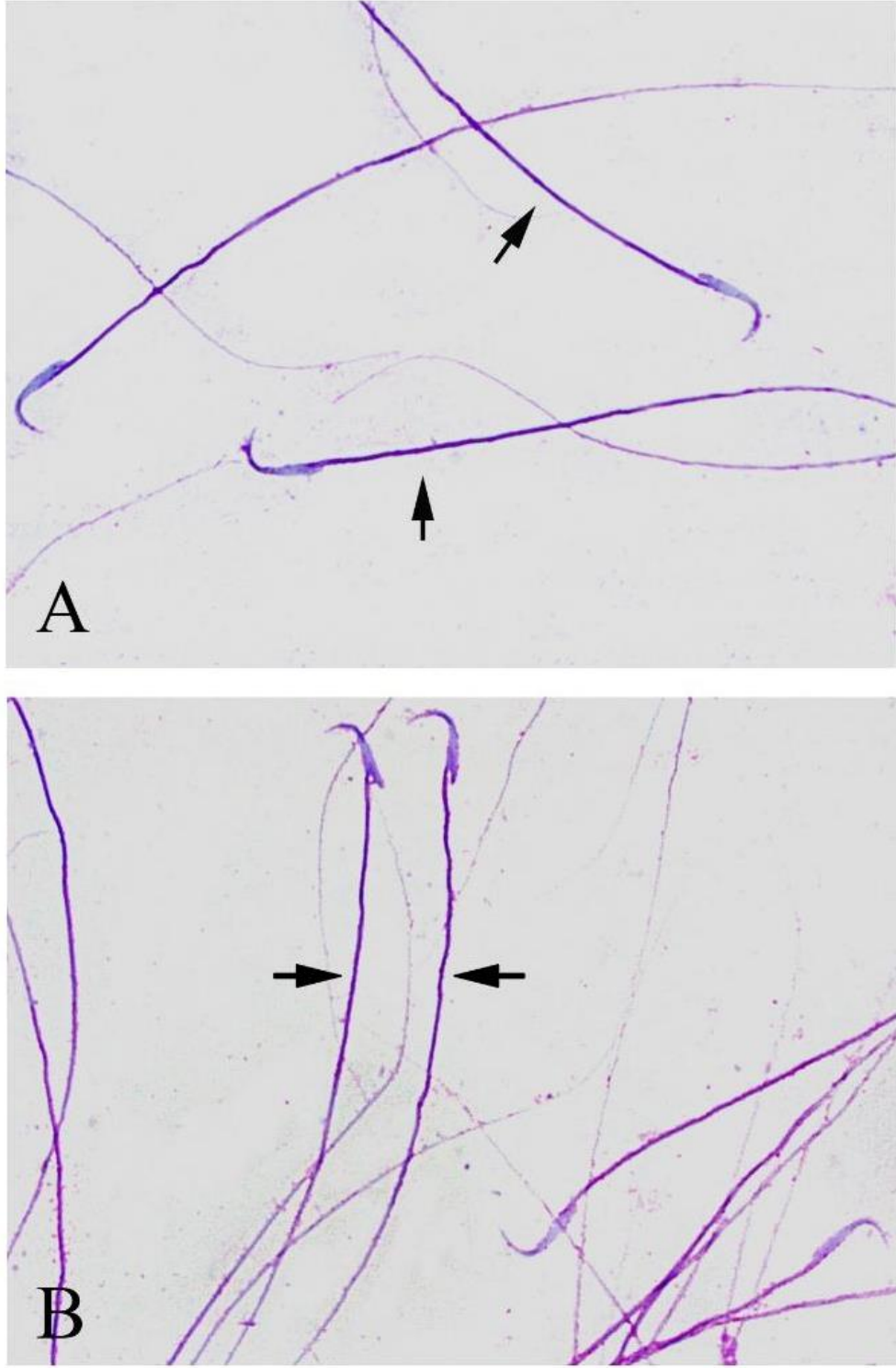
Sperm yayma preparatları, Diff-Quik ile boyama sonrası morfolojik olarak değerlendirildi. WK, WS ve WT gruplarında normal morfoloji sergileyen spermilerin yanı sıra az sayıda baş, boyun ve kuyruk hasarı olan spermier gözlendi (Şekil 9A, 10A ve 11A). WV grubu spermierde normal morfolojiye sahip spermierin sayısında önemli ölçüde azalma ($p<0,0001$) gözlenirken; baş ($p<0,0001$), boyun ($p<0,05$) ve kuyruk ($p<0,001$) anomalilerine sahip sperm sayısında artış gözlendi (Şekil 12A). WV+T grubunda normal morfolojiye sahip sperm sayısının arttığı ($p<0,001$); baş ($p<0,0001$), boyun, kuyruk anomalilerine sahip sperm sayısının azaldığı veya azalma eğiliminde olduğu tespit edildi (Şekil 13A). GK ve GS gruplarında normal morfolojiye sahip sperm sayısının, WK ve WS gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0,0001$), baş ($p<0,001$), boyun ve kuyruk ($p<0,001$) anomalisine sahip sperm sayısının arttığı veya artma eğiliminde olduğu tespit edildi (Şekil 9B, 10B). GT grubu ile GK ve GS grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 11B). GV grubunda normal morfolojiye sahip sperm sayısının azaldığı ($p<0,05$); baş, boyun ($p<0,05$), kuyruk anomalisine sahip sperm sayısının arttığı veya artma eğiliminde olduğu görüldü (Resim 12B). GV+T grubunda normal morfoloji gösteren sperm sayısında anlamlı bir artış ($p<0,0001$); baş ($p<0,001$), boyun ($p<0,001$) ve kuyruk anomalilerinde anlamlı bir azalma ($p<0,05$) izlendi (Şekil 13B, Şekil 14 ve Tablo 2).



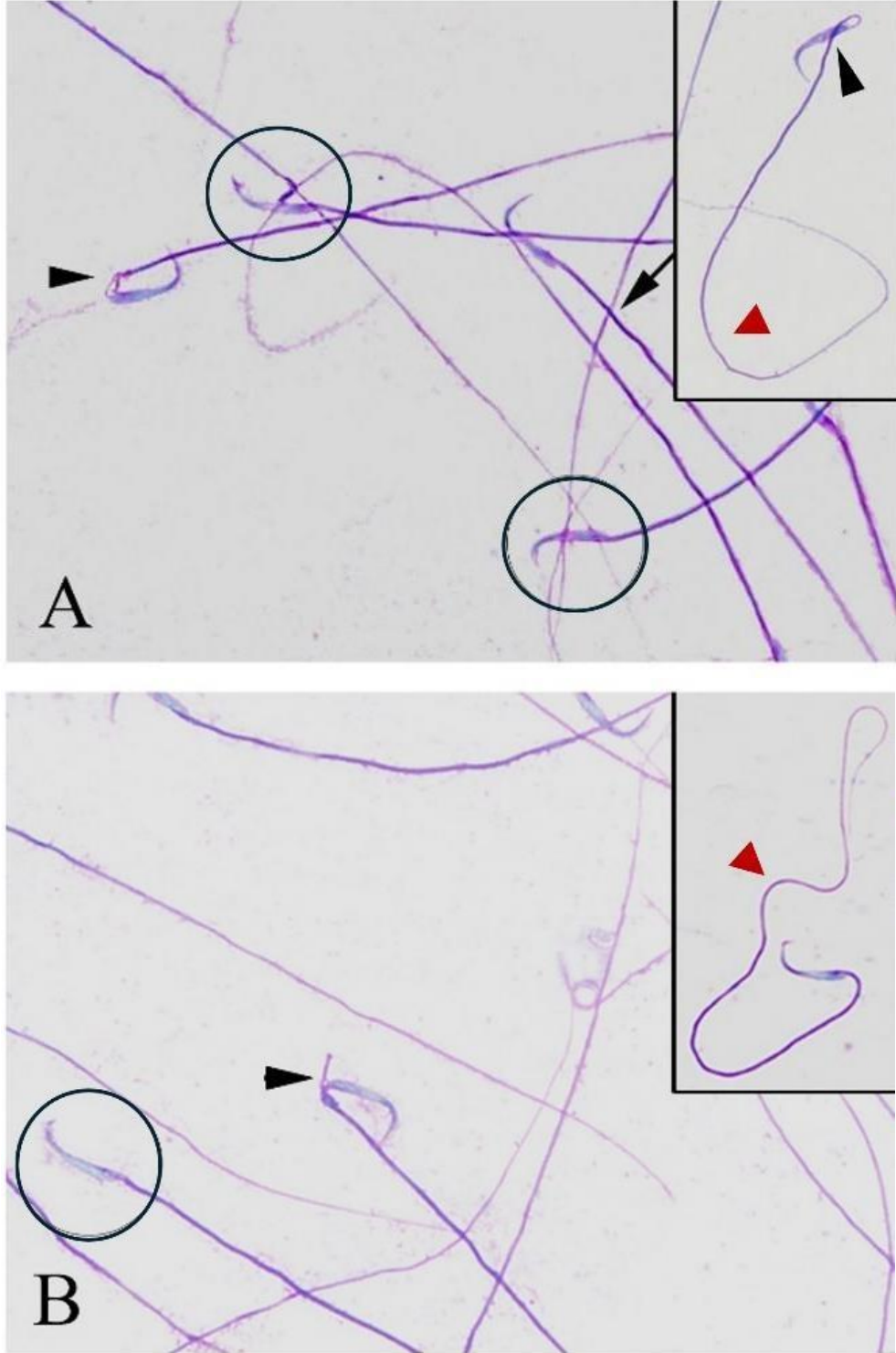
Şekil 9. Kontrol gruplarına ait sperm mikrografları. A: WK grubu. B: GK grubu. Ok: Normal morfolojide spermatozoa. Siyah ok başı: Boyun anomali olan spermatozoa. Kırmızı ok başı: kuyruk anomali olan spermatozoa. Orijinal büyütme: x100, Diff-Quick boyası.



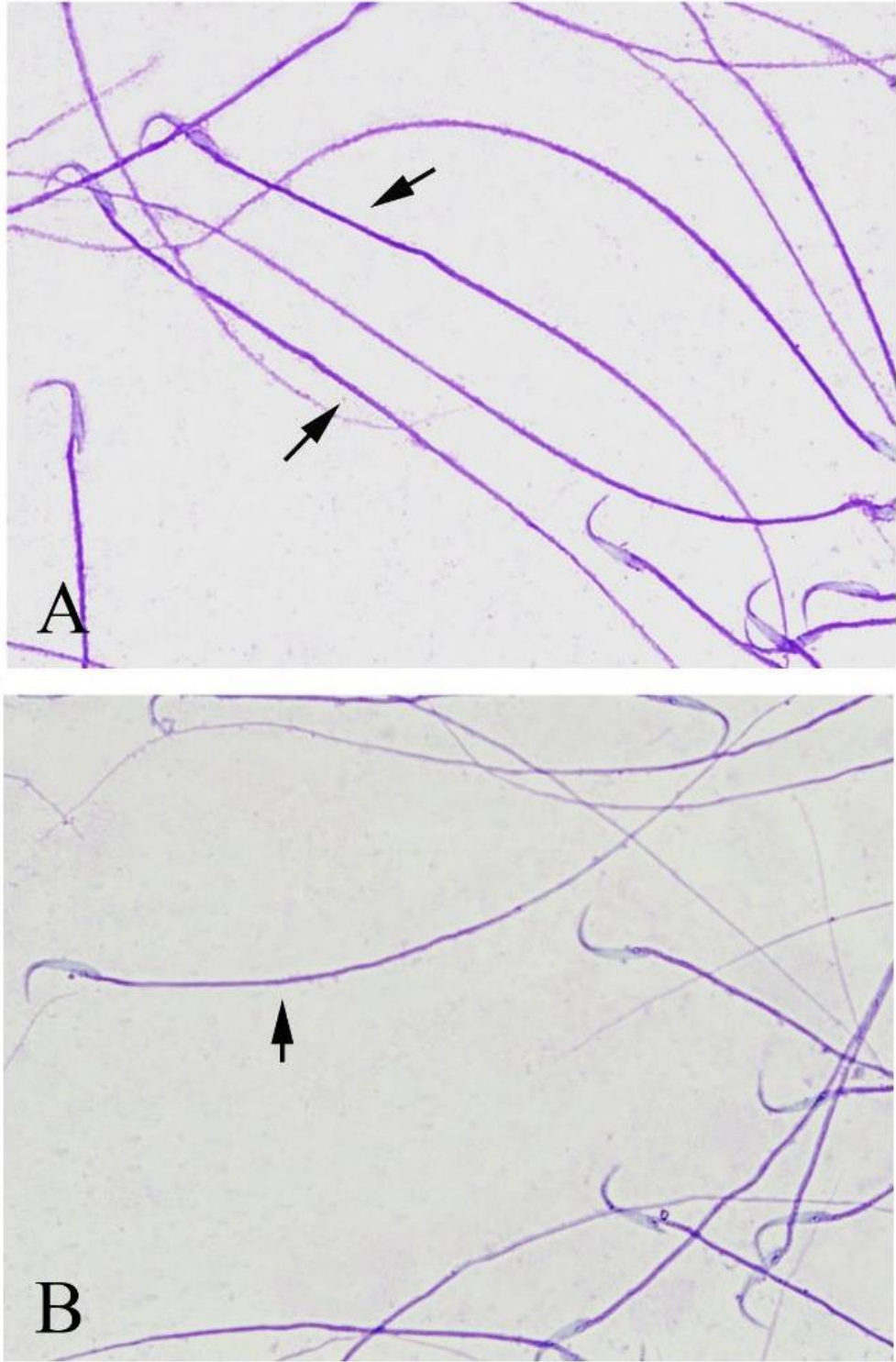
Şekil 10. Sham gruplarına ait sperm mikrografları. A: WS grubu. B: GS grubu. Ok: Normal morfolojide spermatozoa. Daire: Baş anomali olan spermatozoa, Siyah ok başı: Boyun anomali olan spermatozoa. Kırmızı ok başı: Kuyruk anomali olan spermatozoa. Orijinal büyütme: x100, Diff-Quick boyası.



Şekil 11. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait sperm mikrografları. A: WT grubu. B: GT grubu. Ok: Normal morfolojide spermatozoa. Orijinal büyütme: x100, Diff-Quick boyası.



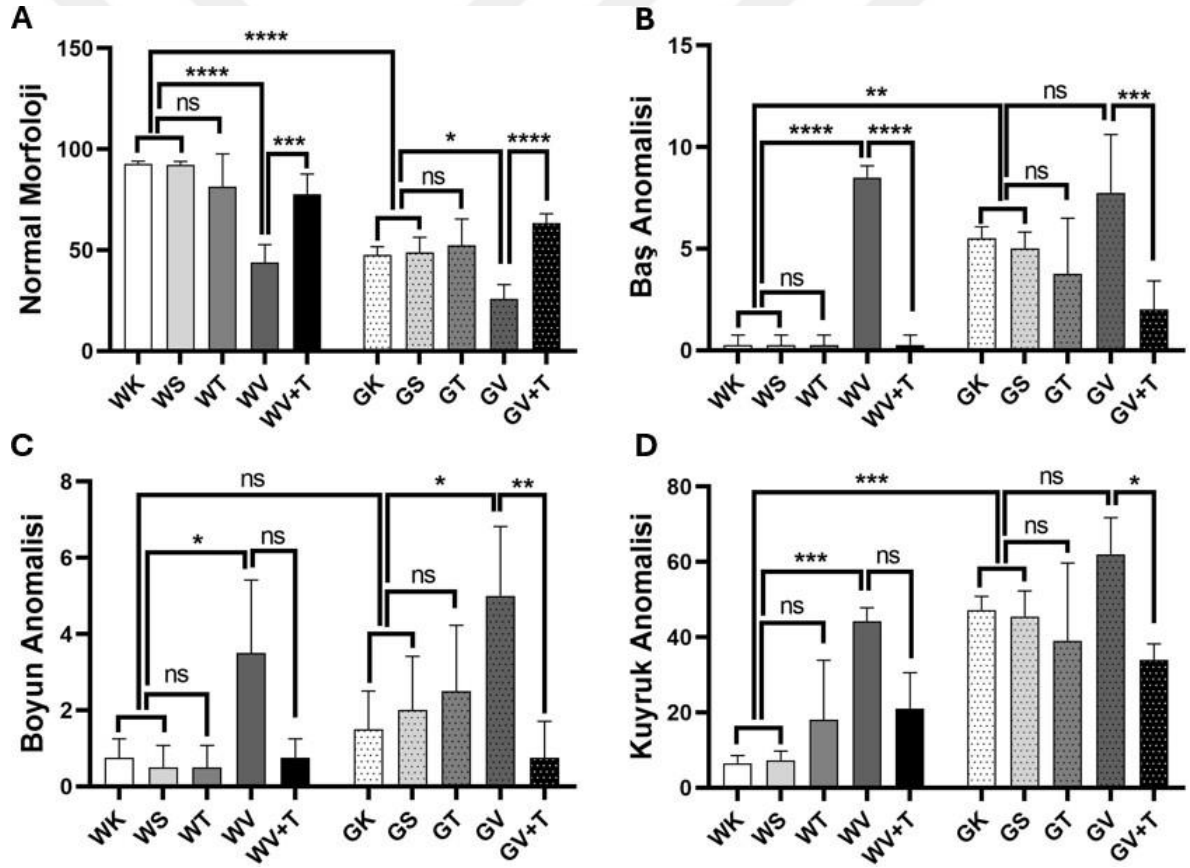
Şekil 12. VPA uygulanan deney gruplarına ait sperm mikrografları. A: WV grubu. B: GV grubu. Ok: Normal morfolojide spermatozoa. Daire: Baş anomali olan spermatozoa, Siyah ok başı: Boyun anomali olan spermatozoa. Kırmızı ok başı: Kuyruk anomali olan spermatozoa. Orijinal büyütme: x100, Diff-Quick boyası.



Şekil 13. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait sperm mikrografları. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. Ok: Normal morfolojide spermatozoa. Büyütme: x100, inset x100, Diff-Quick boyası.

Tablo 2. Deney gruplarının sperm morfoloji analizlerinden elde edilen veriler (ortalama $\pm$ SD).

	Baş Anomalisi	Boyun Anomalisi	Kuyruk Anomalisi	Normal Morfoloji
WK	0,25 $\pm$ 0,5	0,75 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 2,08	92,75 $\pm$ 1,26
WS	0,25 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,58	7,25 $\pm$ 2,5	92,25 $\pm$ 1,71
WT	0,25 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,58	18,0 $\pm$ 15,87	81,5 $\pm$ 16,13
WV	8,5 $\pm$ 0,58	3,5 $\pm$ 1,92	44,25 $\pm$ 3,59	43,75 $\pm$ 8,96
WV+T	0,25 $\pm$ 0,5	0,75 $\pm$ 0,5	21,0 $\pm$ 9,56	77,75 $\pm$ 9,91
GK	5,5 $\pm$ 0,58	1,5 $\pm$ 1,0	47,25 $\pm$ 3,59	47,5 $\pm$ 4,2
GS	5,0 $\pm$ 0,82	2,0 $\pm$ 1,41	45,5 $\pm$ 6,81	48,75 $\pm$ 7,54
GT	3,75 $\pm$ 2,75	2,5 $\pm$ 1,73	39,0 $\pm$ 20,7	52,25 $\pm$ 13,15
GV	7,75 $\pm$ 2,9	5,0 $\pm$ 1,83	62,0 $\pm$ 9,76	25,75 $\pm$ 7,18
GV+T	2,0 $\pm$ 1,4	0,75 $\pm$ 0,96	34,0 $\pm$ 4,24	63,25 $\pm$ 4,79



Şekil 14. Deney gruplarına ait sperm örneklerinde belirlenen morfolojik hasar oranlarının istatistiksel analizini gösteren grafikler. A: Normal morfoloji sergileyen sperm, B: Sperm baş anomalisi, C: Boyun anomalisi, D: Kuyruk anomalisi oranları. (ns: Gruplar arasında fark yok, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

6.2 Testis Morfolojik Bulguları

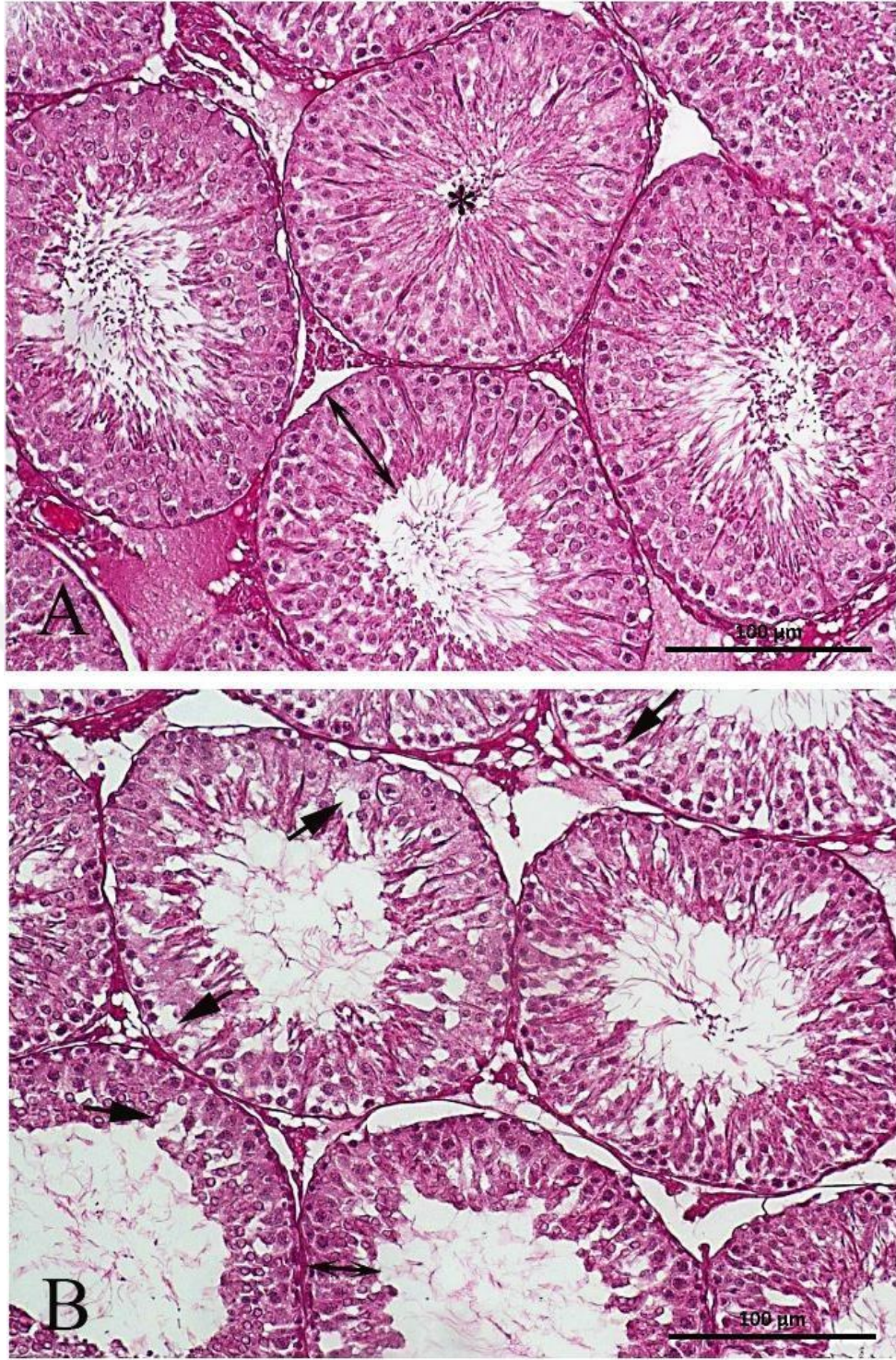
Işık mikroskopik incelemelerde WK, WS, WT gruplarına ait seminifer tübüllerde, bazaldan lümene doğru spermatogenik seriyi oluşturan spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatidler normal morfolojide izlendi. Seminifer tübüllerin çoğunda lümende spermatozoa görüldü (Şekil 15A, 16A, 17A, 26A, 27A ve 28A). Bazal membran düzenli ve devamlı bir yapıda izlendi (Şekil 21A, 22A ve 23A). WV grubunda germinal epitelde ayrılma, düzensizlik ve lümende spermatogenik hücre döküntüleri görüldü (Şekil 18A ve 29A). Bazal membranda düzensizlik ve yer yer ayrılmalar tespit edildi (Şekil 24A). WV+T grubunda tübüllerin büyük çoğunluğu kontrole benzer morfolojide ve bazal membran düzenli bir yapıda izlendi. (Şekil 19A, 25A ve 30A). GK ve GS gruplarında tübüllerin hemen hepsinde germinal epitelde ve bazal membranda ayrılma ve düzensizlik görüldü (Şekil 15B, 16B, 26B ve 27B). GT grubunda tübüllerin büyük kısmında, normal morfoloji ve düzenli bazal membran yapısı izlendi (Şekil 17B, 23B ve 28B). GV grubunda, GK ve GS gruplarına benzer şekilde germinal epitelde ayrılma, düzensizlik ve germinal epitelde incelmenin yanı sıra lümende spermatogenik hücre döküntüleri mevcuttu (Şekil 18B ve 29B), ayrıca bazal membranda ayrılma ve düzensizlik görüldü (Şekil 24B). GV+T grubunda hasarlı tübüllerle birlikte çok sayıda normal morfolojiye sahip tübül ve düzenli bazal membran yapısı belirlendi (Şekil 19B, 25B ve 30B).

Germinal epitel kalınlığı, WV grubunda WK ve WS gruplarına kıyasla anlamlı olarak azalırken ($p<0,0001$), WV+T grubunda WV grubuna kıyasla anlamlı olarak arttı ($p<0,0001$). GK ve GS gruplarında, WK ve WS gruplarına kıyasla germinal epitel kalınlığı belirgin bir şekilde azaldı ($p<0,0001$). GT grubunda, GK ve GS gruplarına kıyasla germinal epitel kalınlığı artış gösterdi ($p<0,0001$). GV grubunun germinal epitel kalınlığı, kontroller ile benzer idi. GV+T grubunun germinal epitel kalınlığı, GV grubuna göre anlamlı şekilde arttı ($p<0,0001$) (Şekil 20).

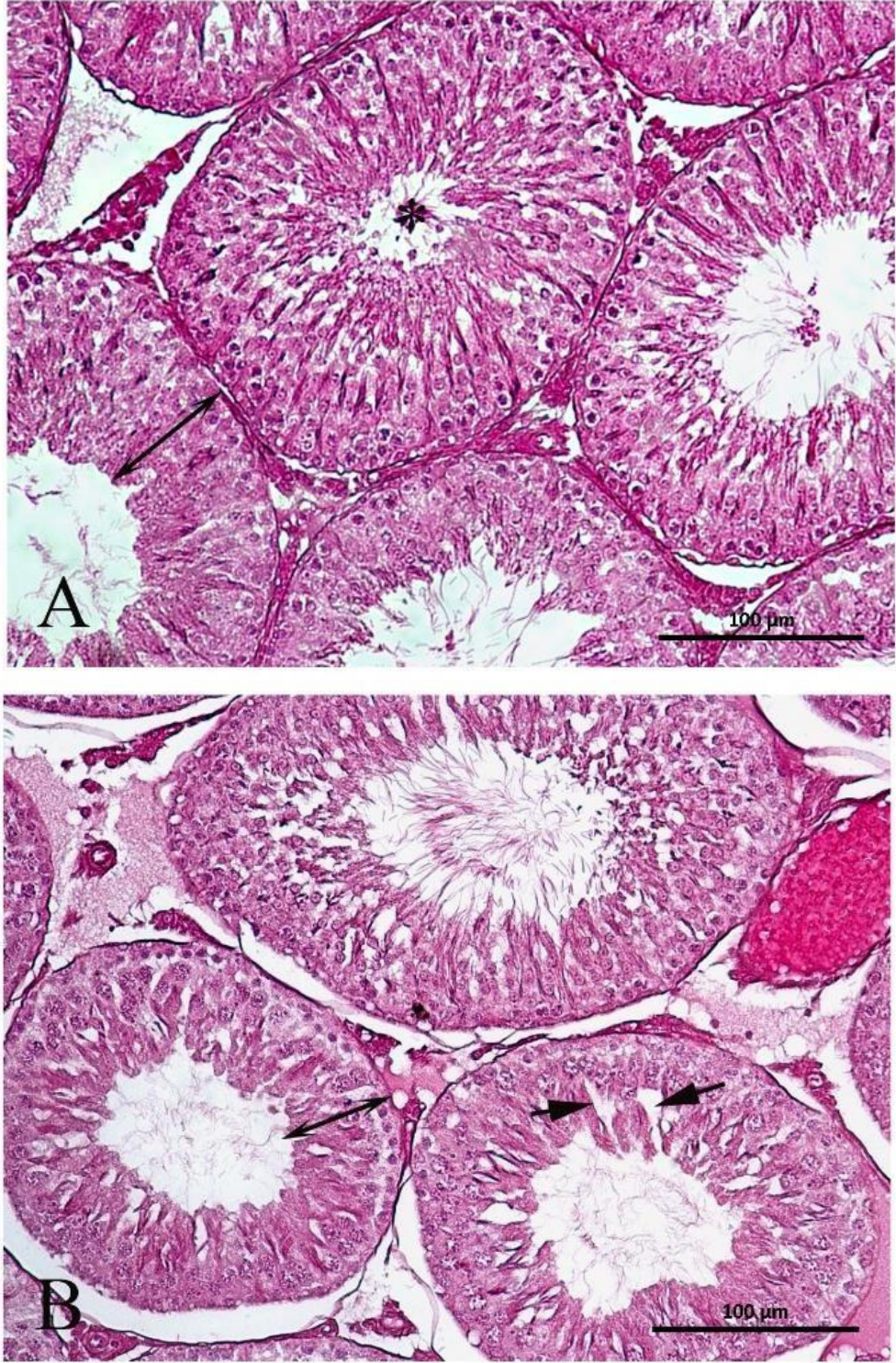
Seminifer tübül hasarının bir göstergesi olan Johnsen skoru, WV grubunda WK ve WS gruplarına kıyasla anlamlı olarak azaldı ($p<0,0001$). Timokinon uygulaması, VPA uygulaması sonucu azalan Johnsen skorunu anlamlı olarak arttırdı ($p<0,01$) GK ve GS gruplarında, WK ve WS gruplarına kıyasla Johnsen skoru daha düşük olarak tespit edildi ($p<0,001$). GT grubunda,

GK ve GS grubunda azalan Johnsen skorunun anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0,01$). GV grubunda, Johnsen skorunun kontrollerle benzer olduğu belirlenirken, GV+T grubunda anlamlı olarak artış gösterdi ($p<0,01$) (Şekil 20 ve Tablo 3).

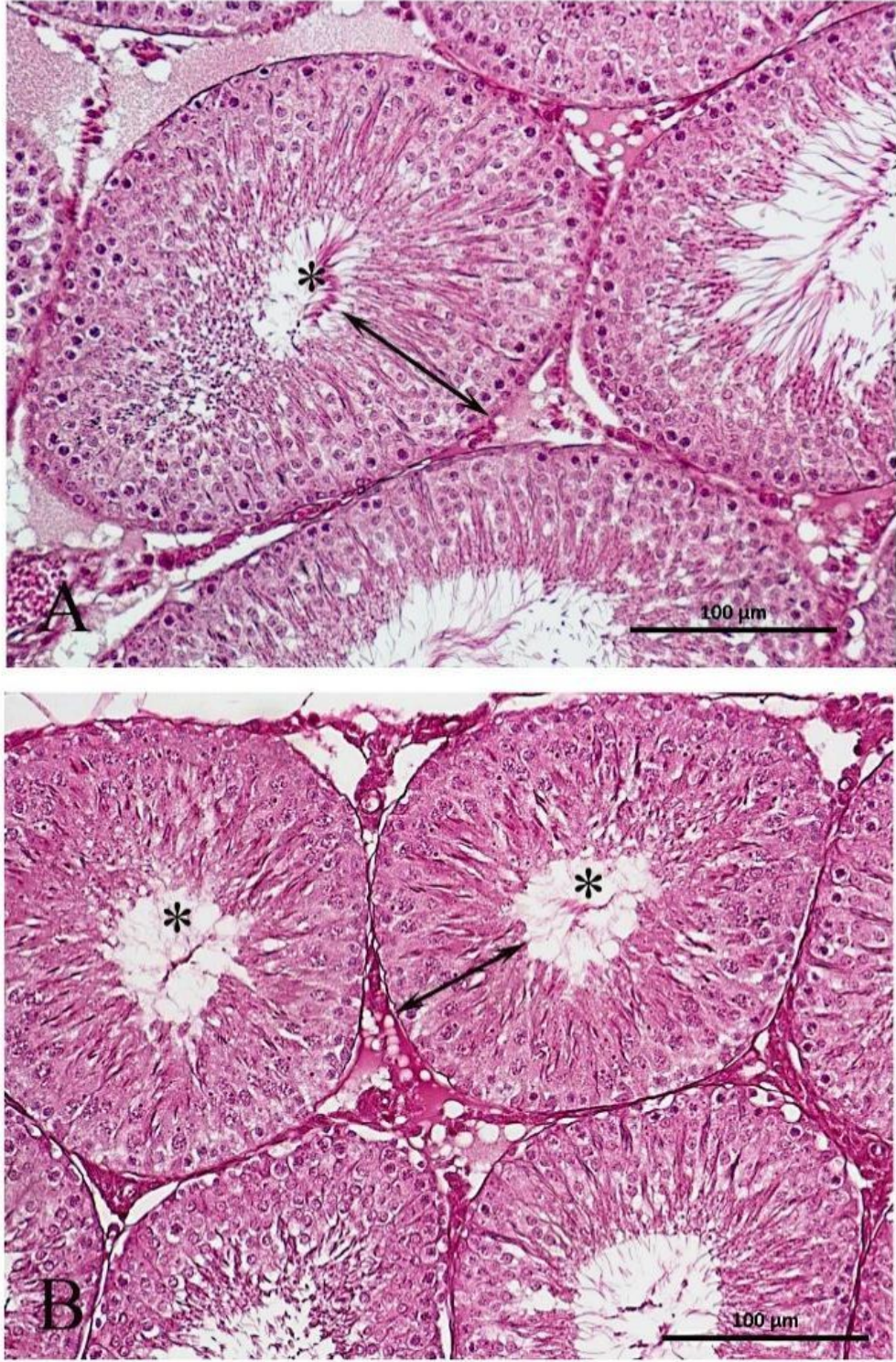




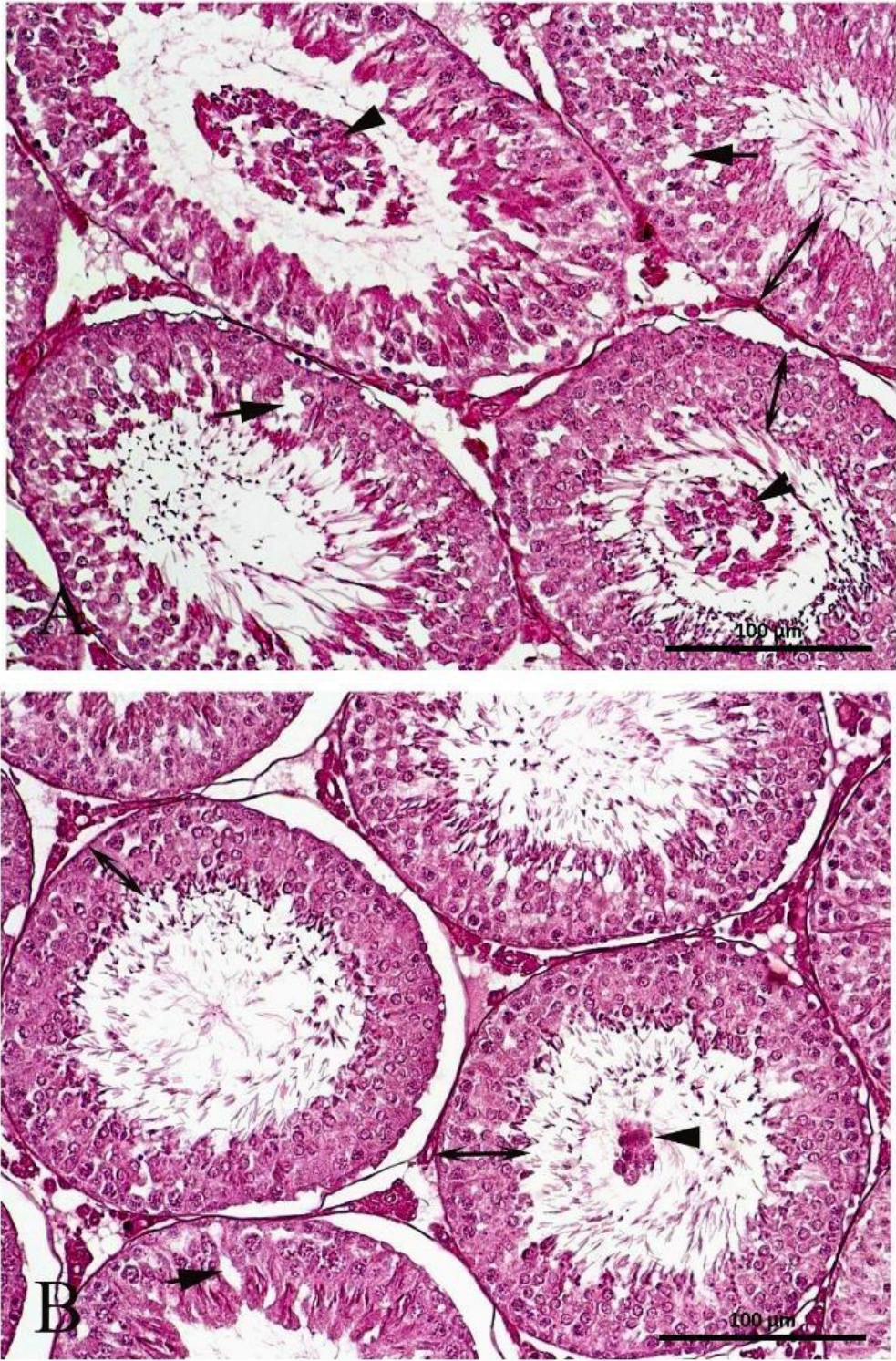
Şekil 15. Kontrol gruplarına ait testis mikrografları. A: WK grubu. B: GK Grubu. Yıldız: Normal morfoloji sergileyen seminifer tübüller. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Çift taraflı ok: Germinal epitel kalınlığı. H&E boyası.



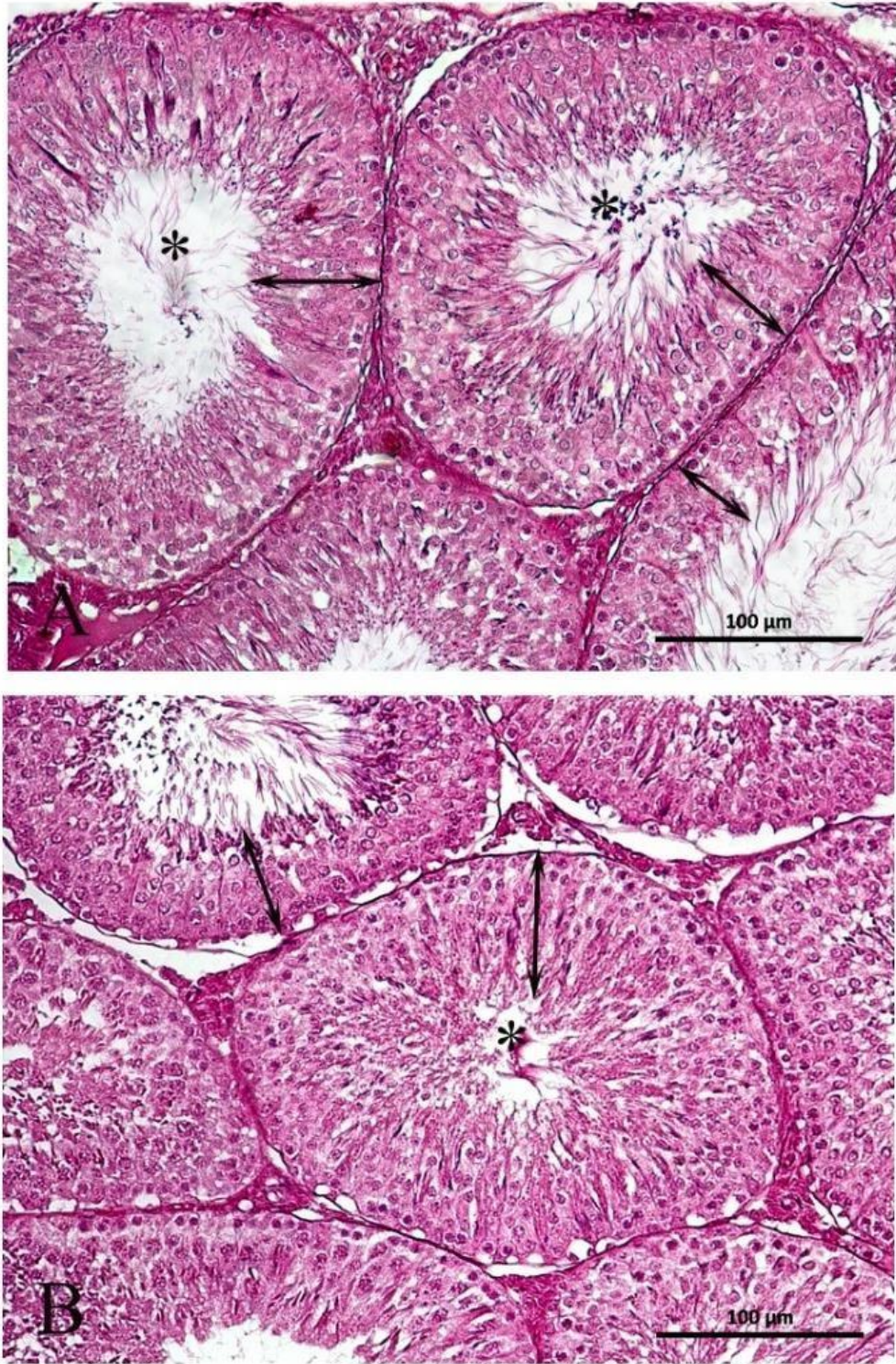
Şekil 16. Sham gruplarına ait testis mikrogramları. A: WS grubu. B: GK grubu. Yıldız: Normal morfoloji sergileyen seminifer tübüller. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Çift taraflı ok: Germinal epitel kalınlığı. H&E boyası.



Şekil 17. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WT grubu. B: GT grubu. Yıldız: Normal morfoloji sergileyen seminifer tübüller. Çift taraflı ok: Germinal epitel kalınlığı. H&E boyası.



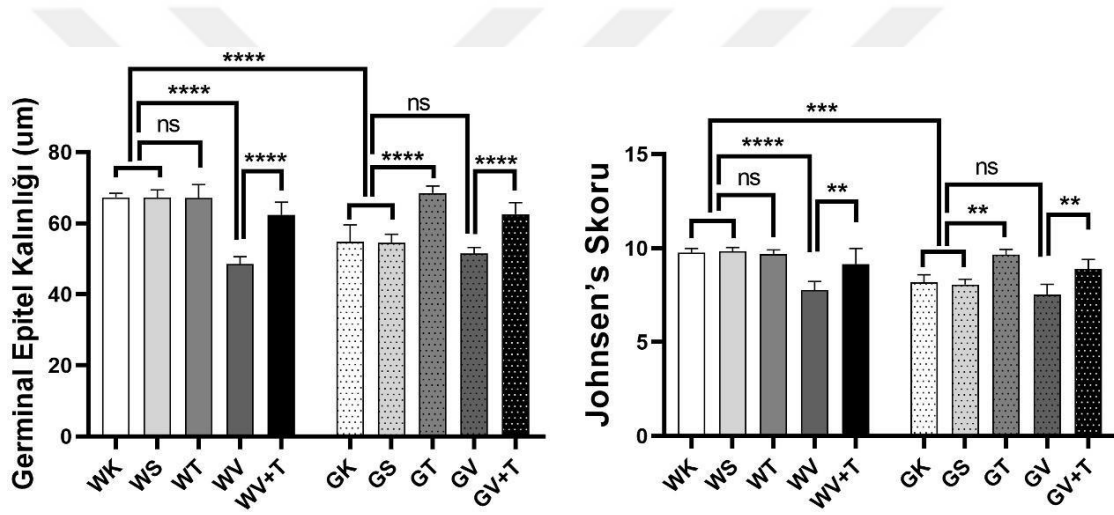
Şekil 18. VPA uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WV grubu. B: GV grubu. Ok: Yer yer açılma ve düzensizlik. Ok başı: Lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri. Çift taraflı ok: Germinal epitel kalınlığı. H&E boyası.



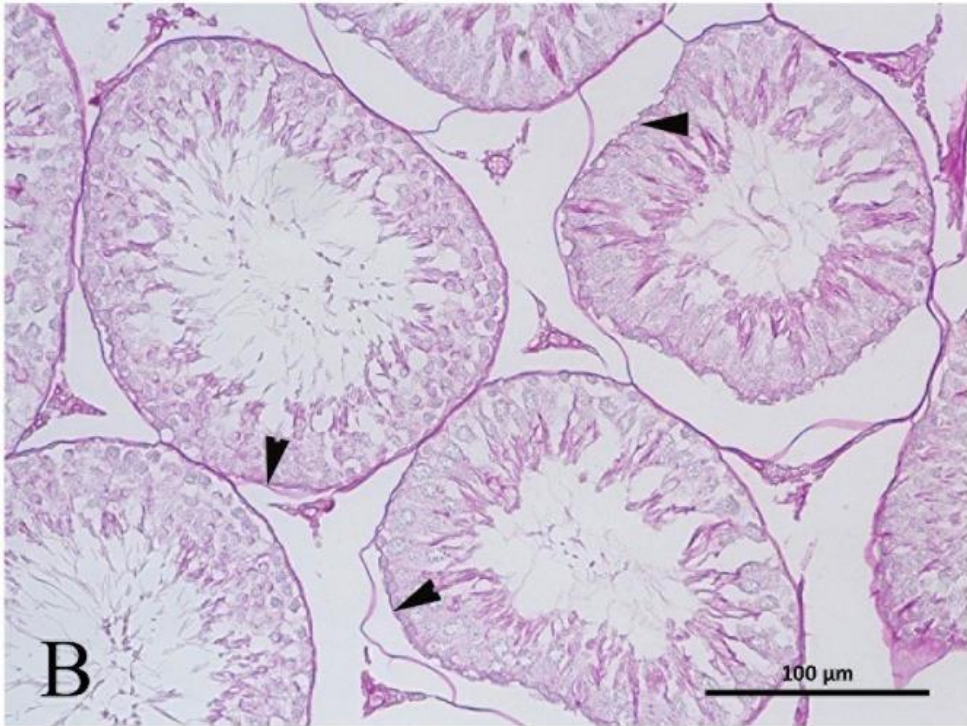
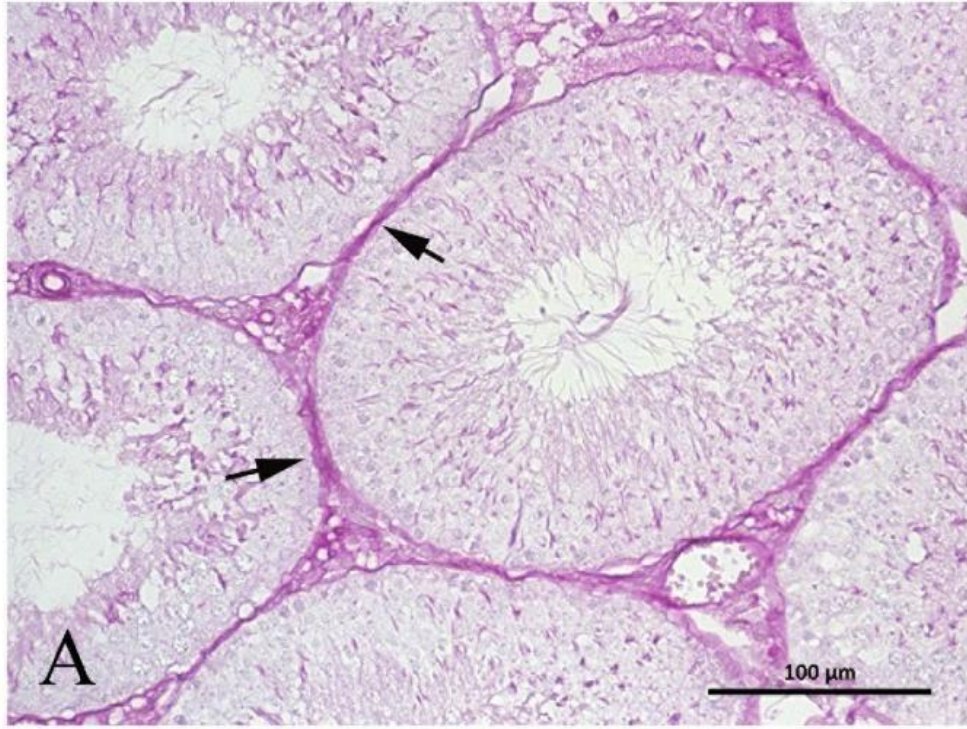
Şekil 19. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. Yıldız: Normal morfoloji sergileyen seminifer tübüller. Çift taraflı ok: Germinal epitel kalınlığı. H&E boyası.

Tablo 3. Deney gruplarına ait germinal epitel kalınlığı ve Johnsen Skoru verileri (Ortalama $\pm$ SD).

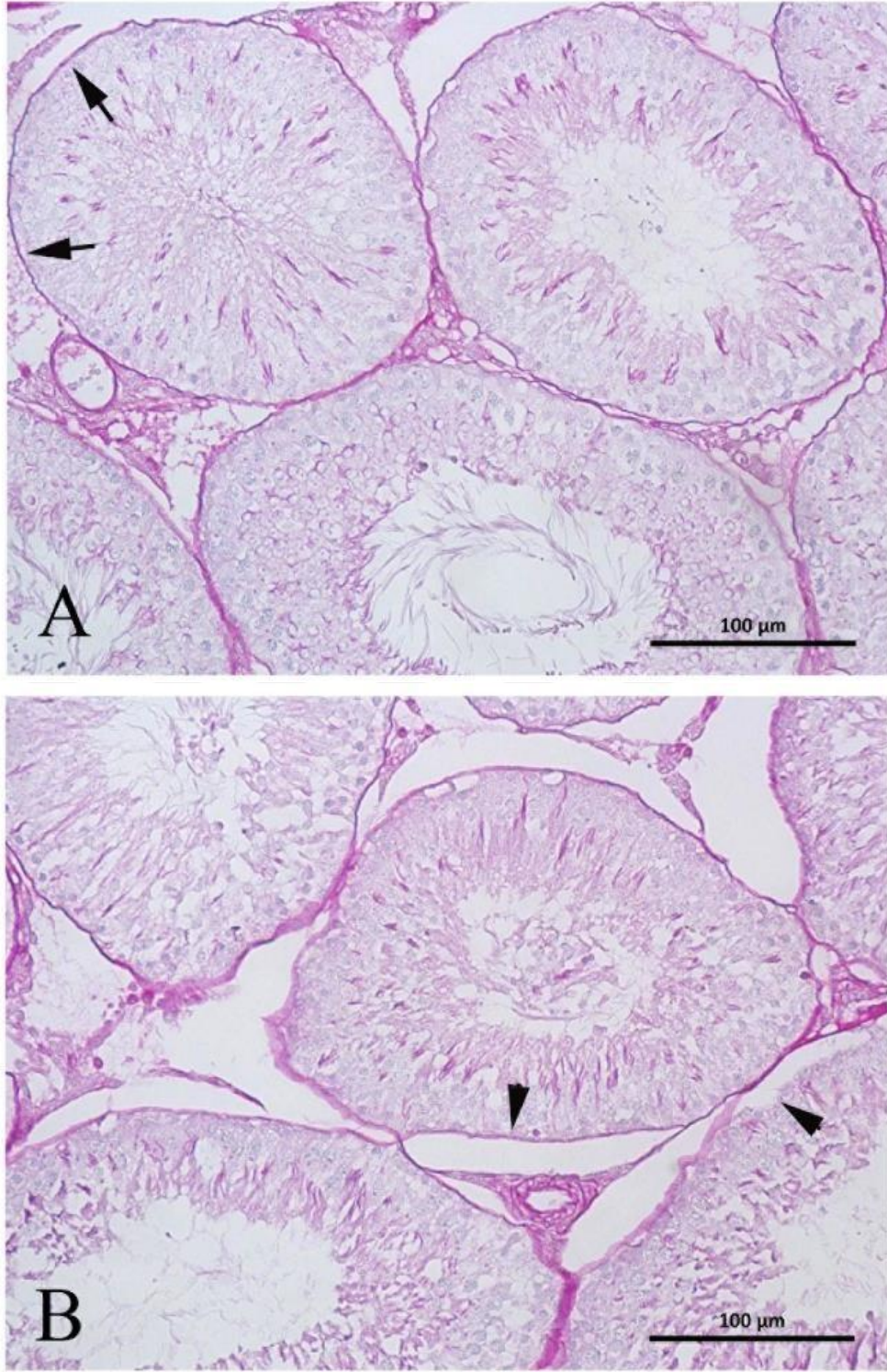
	Germinal Epitel Kalınlığı (μm)	Johnsen Skoru
WK	67,30 $\pm$ 1,14	9,775 $\pm$ 0,21
WS	67,21 $\pm$ 2,19	9,838 $\pm$ 0,20
WT	67,16 $\pm$ 3,74	9,688 $\pm$ 0,23
WV	48,61 $\pm$ 1,99	7,775 $\pm$ 0,46
WV+T	62,41 $\pm$ 3,51	9,163 $\pm$ 0,82
GK	54,78 $\pm$ 4,79	8,175 $\pm$ 0,41
GS	54,56 $\pm$ 2,33	8,063 $\pm$ 0,28
GT	68,51 $\pm$ 1,97	9,650 $\pm$ 0,28
GV	51,59 $\pm$ 1,63	7,525 $\pm$ 0,56
GV+T	62,56 $\pm$ 3,25	8,888 $\pm$ 0,51



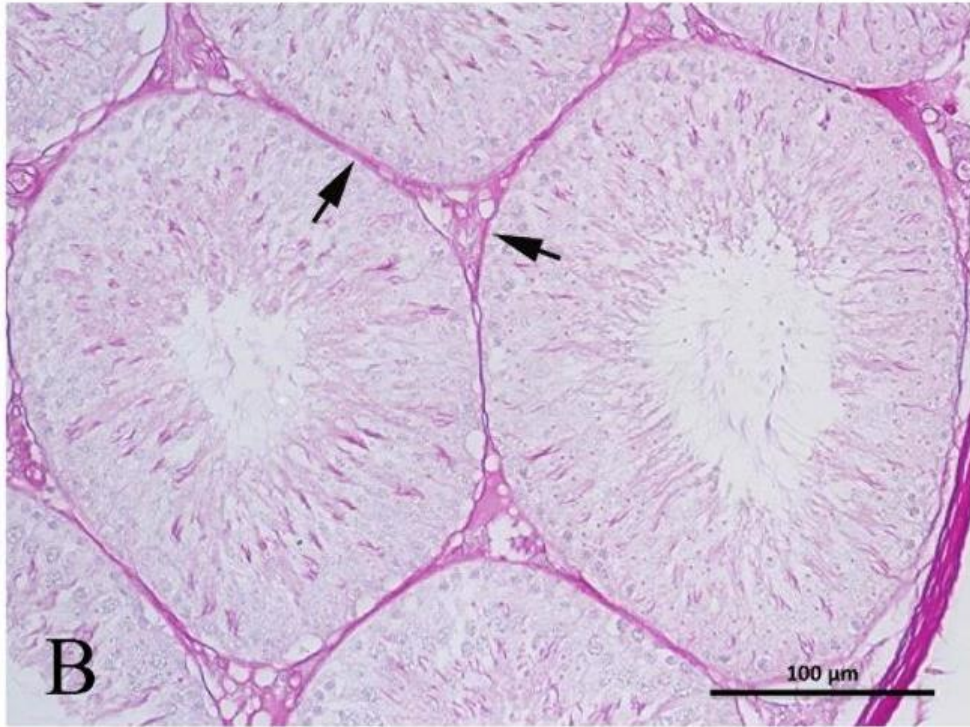
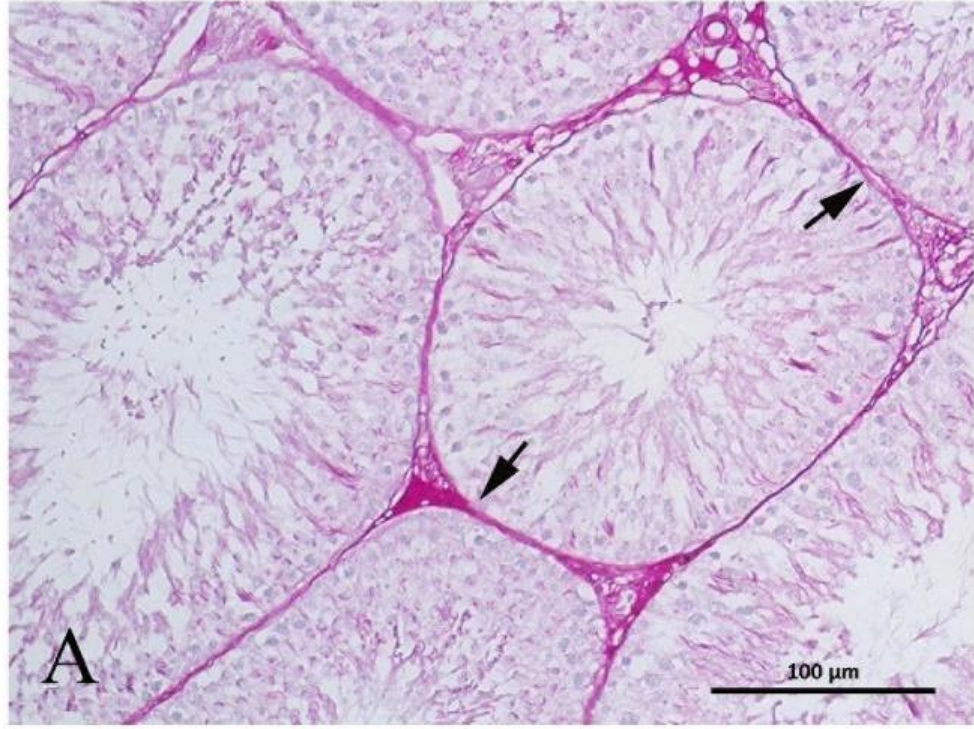
Şekil 20. Deney gruplarına ait germinal epitel kalınlığı ve Johnsen skorlaması sonuçlarının istatistiksel analizini gösteren grafikler. (ns: Gruplar arası fark yok, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$).



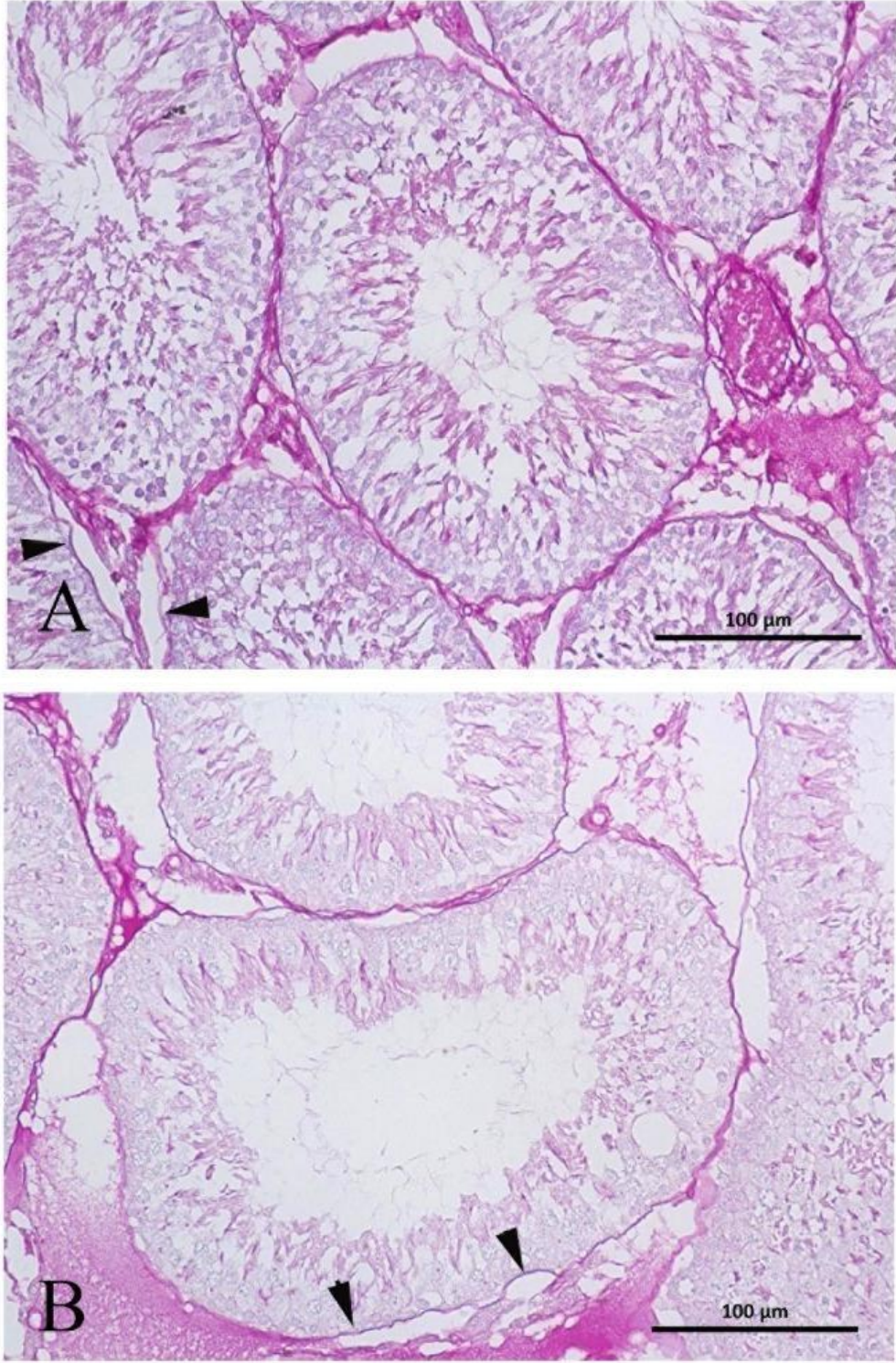
Şekil 21. Kontrol gruplarına ait testis mikrogramları. A: WK grubu. B: GK grubu. Ok: Düzenli bazal membran yapısı. Ok başı: Bazal membranda düzensizlik ve yer yer ayrılmalar. PAS Reaksiyonu.



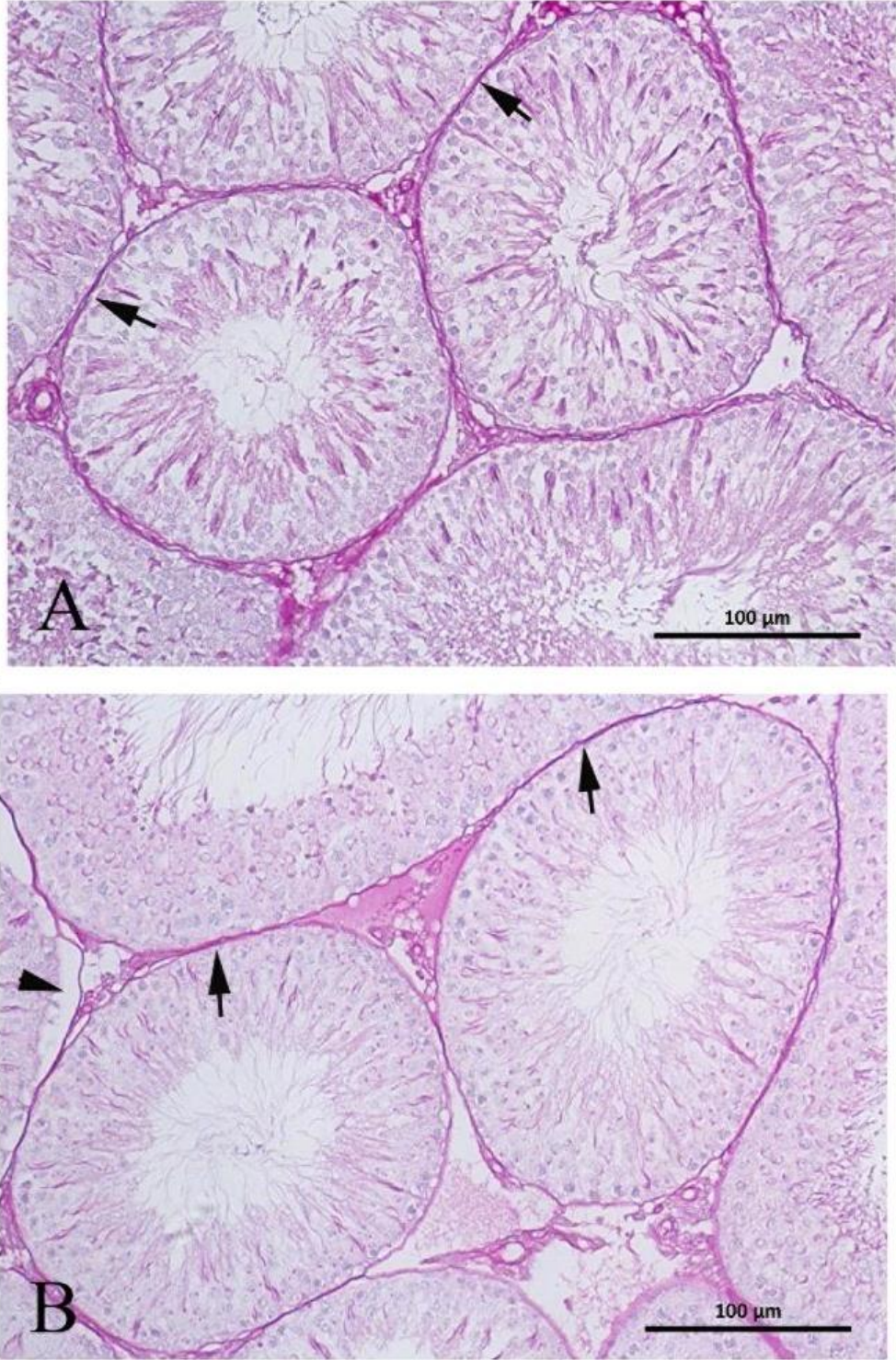
Şekil 22. Sham gruplarına ait testis mikrogramları. A: WS grubu. B: GS grubu. Ok: Düzenli yapıdaki bazal membran yapısı. Ok başı: Bazal membranda düzensizlik ve yer yer ayrılımlar. PAS Reaksiyonu.



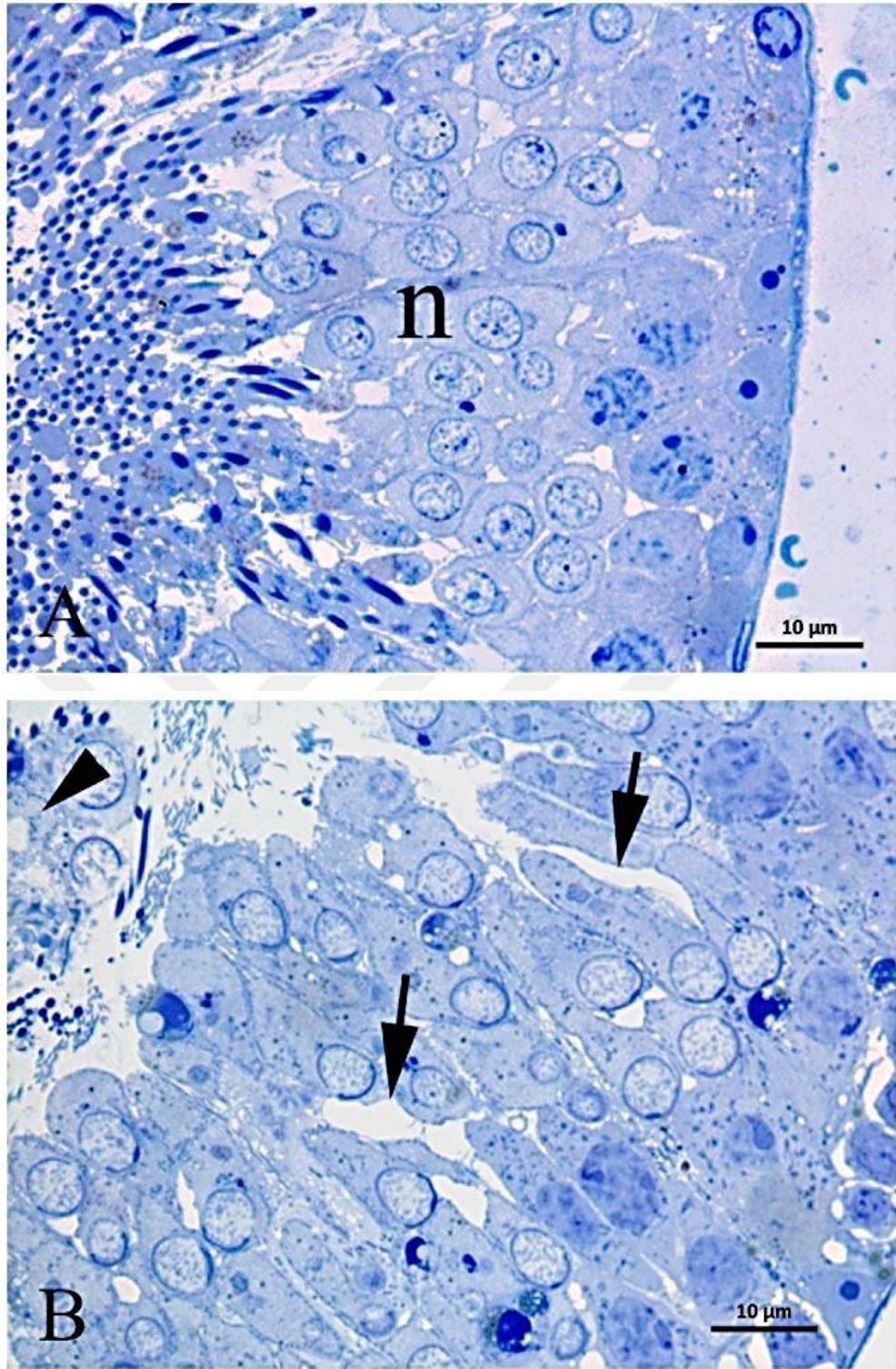
Şekil 23. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WT grubu. B: GT grubu. Ok: Düzenli bazal membran yapısı. PAS Reaksiyonu.



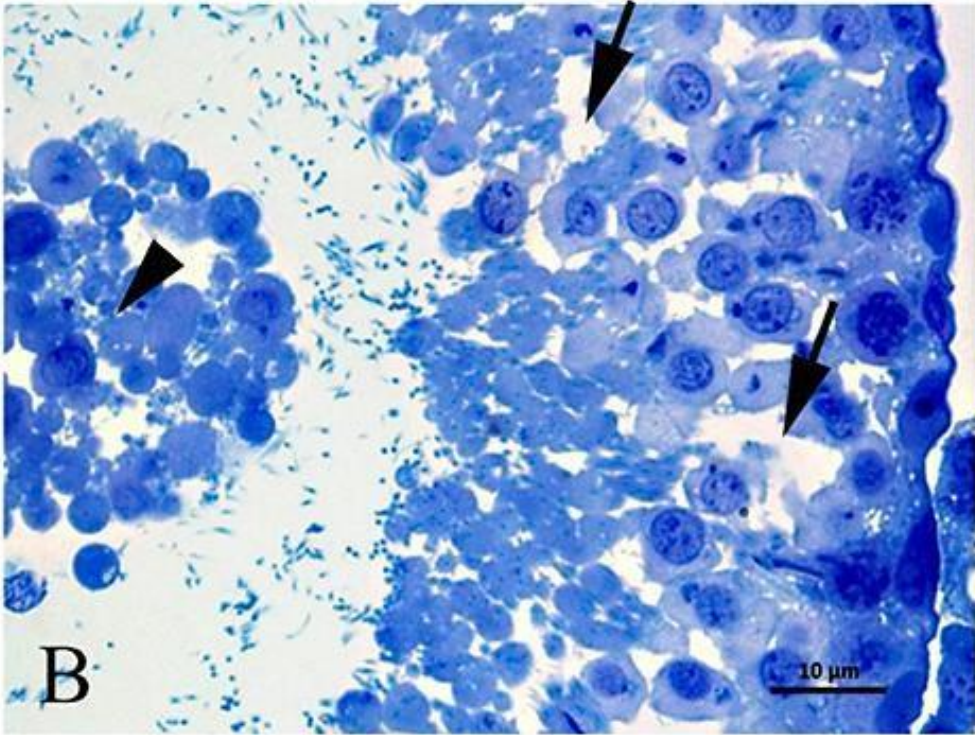
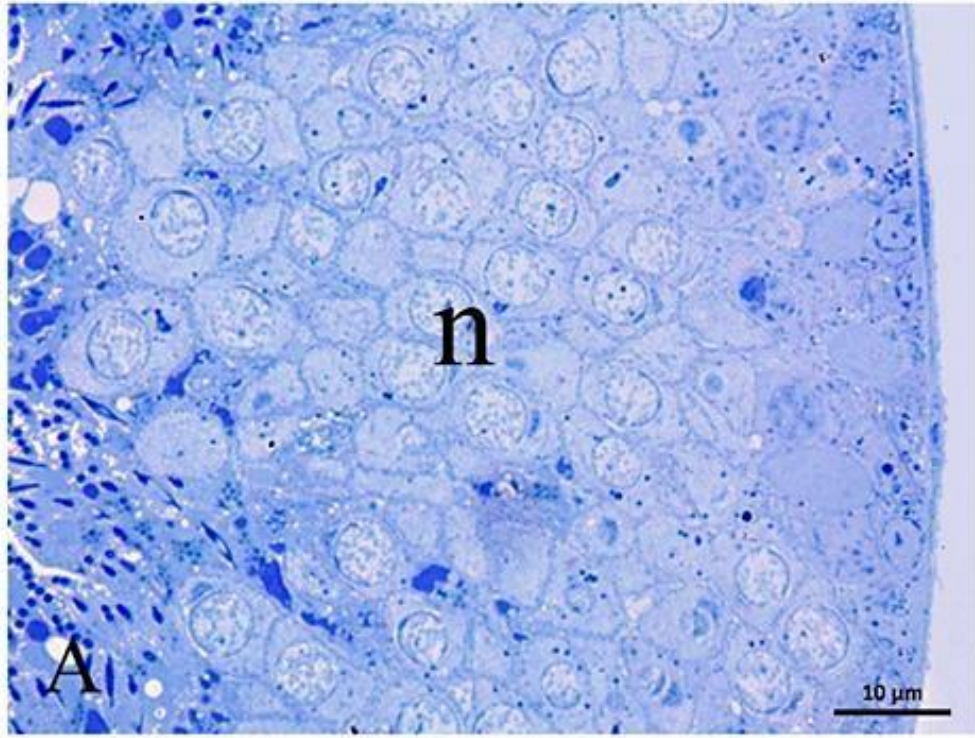
Şekil 24. VPA uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WV grubu. B: GV grubu. Ok başı: Bazal membranda düzensizlik ve yer yer ayrılmalar. PAS Reaksiyonu.



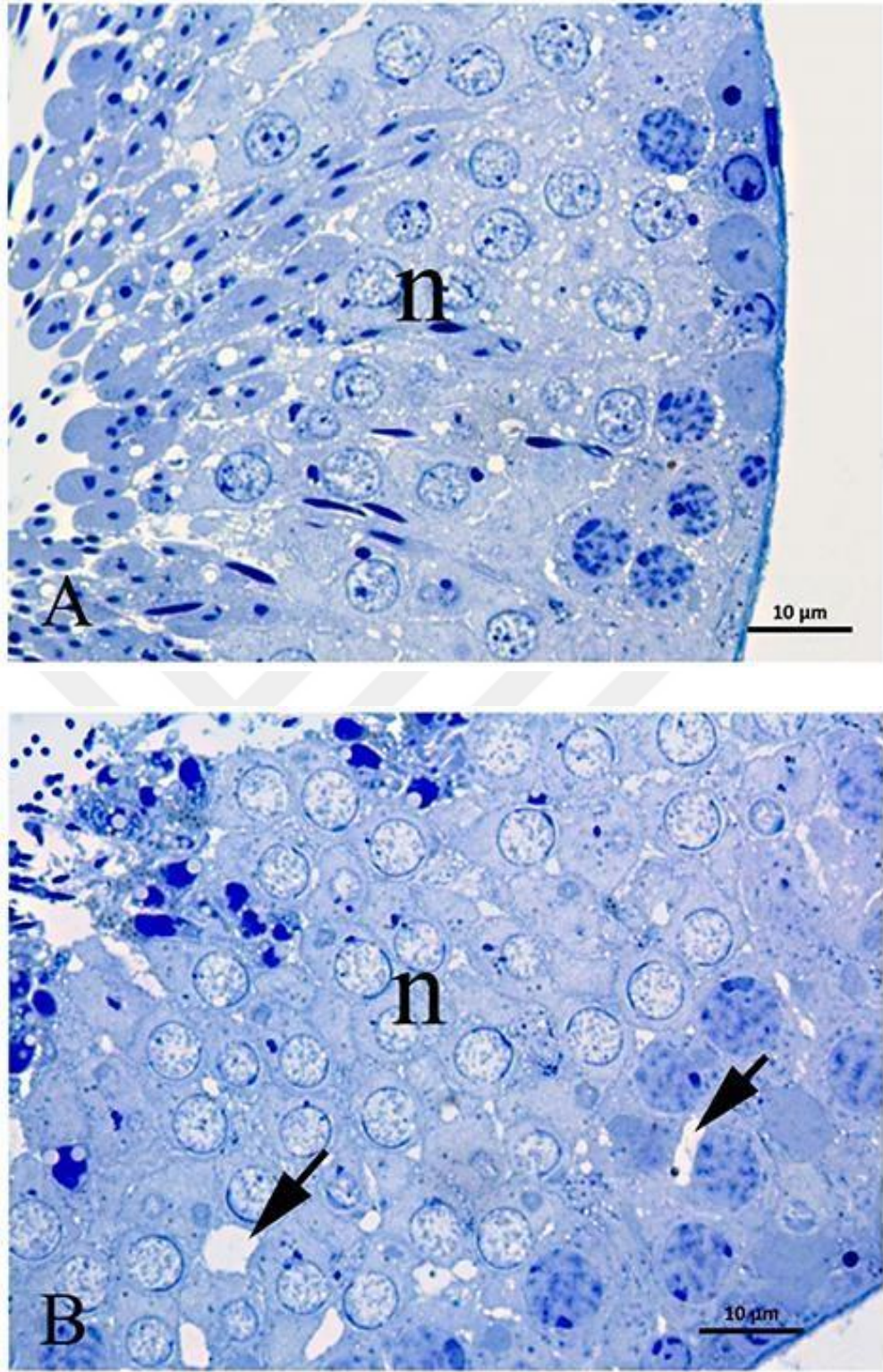
Şekil 25. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait testis mikrografları. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. Ok: Düzenli yapıdaki bazal membran yapısı. Ok başı: Bazal membranda düzensizlik ve yer yer ayrılmalar. PAS Reaksiyonu.



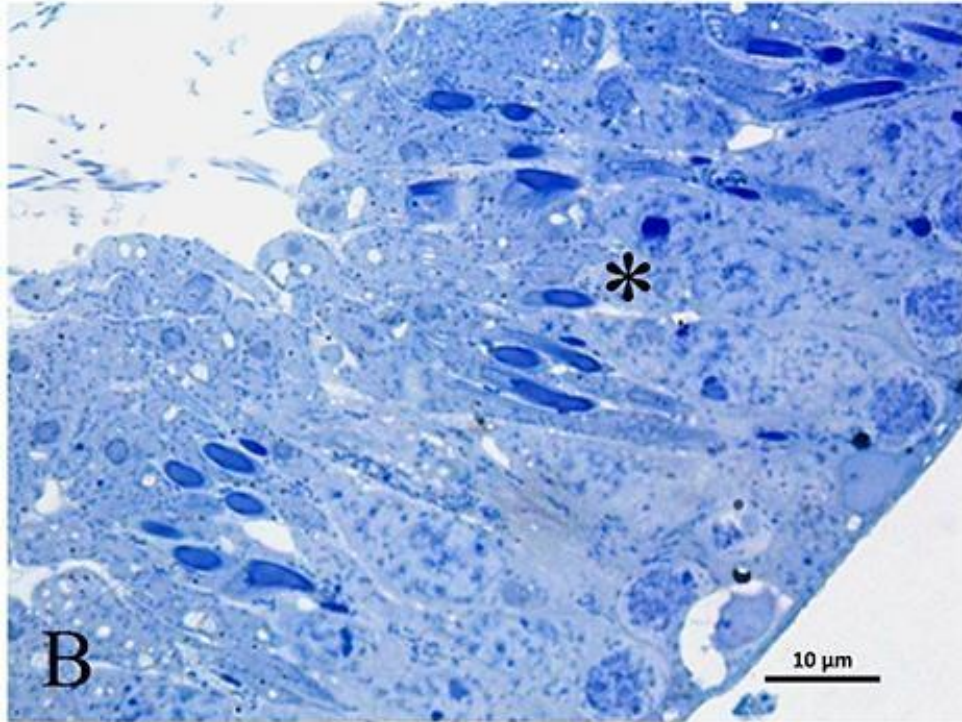
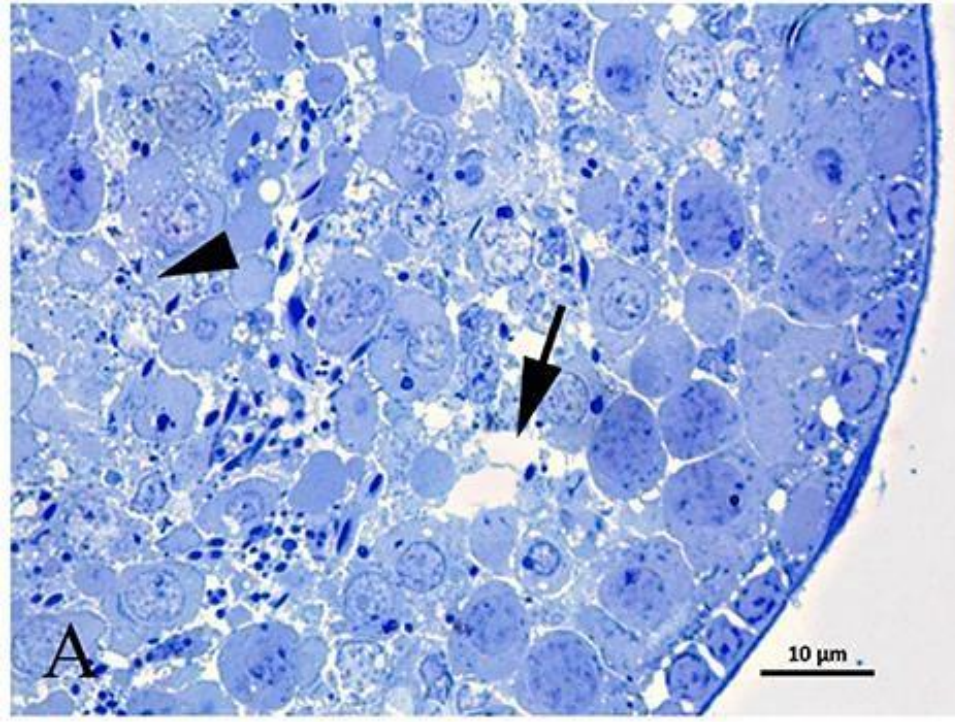
Şekil 26. Kontrol gruplarına ait yarı ince kesitler. A: WK grubu. B: GK grubu. n: Normal morfoloji sergileyen germinal epitel. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Ok başı: Lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri. Toluidin mavisi.



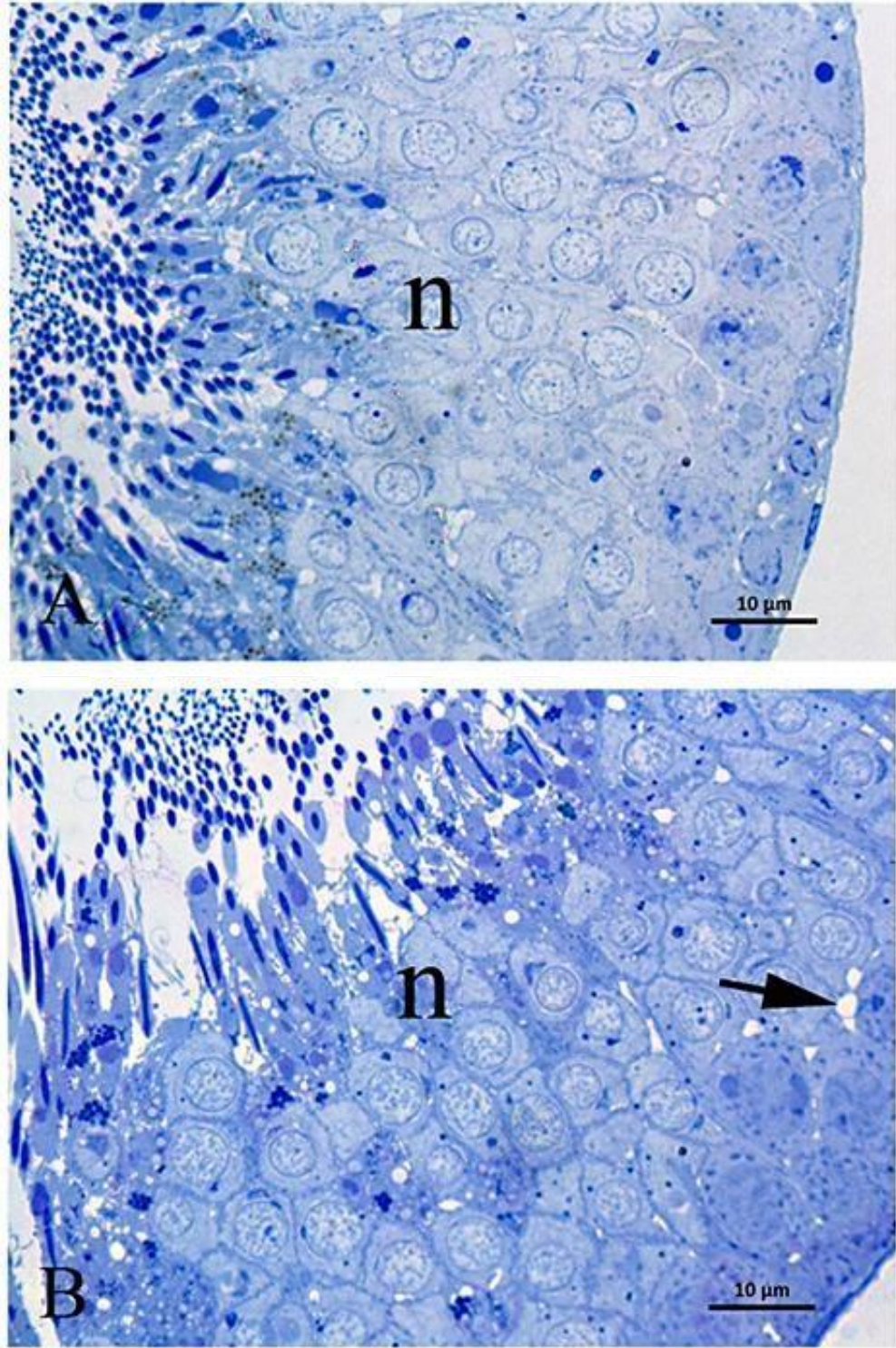
Şekil 27. Sham gruplarına ait yarı ince kesitler. A: WS grubu. B: GS grubu. n: Normal morfoloji sergileyen germinal epitel. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Ok başı: Lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri. Toluidin mavisi.



Şekil 28. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait yarı ince kesitler. A: WT grubu. B: GT grubu. n: Normal morfoloji sergileyen germinal epitel. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Toluidin mavisi.



Şekil 29. VPA uygulanan deney gruplarına ait yarı ince kesitler.WV grubu. B: GV grubu. Yıldız: Düzensiz yapı sergileyen germinal epitel, Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Ok başı: Lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri. Toluidin mavisi.



Şekil 30. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait yarı ince kesitler. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. n: Normal morfoloji sergileyen germinal epitel. Ok: Germinal epitelde yer yer açılma ve düzensizlik. Toluidin mavisi.

6.3 Oksidatif Stres Belirteçleri

Doku ve serum örneklerinde TAS, TOS ve OSI seviyeleri spektrofotometrik yöntem ile belirlendi (Tablo 4).

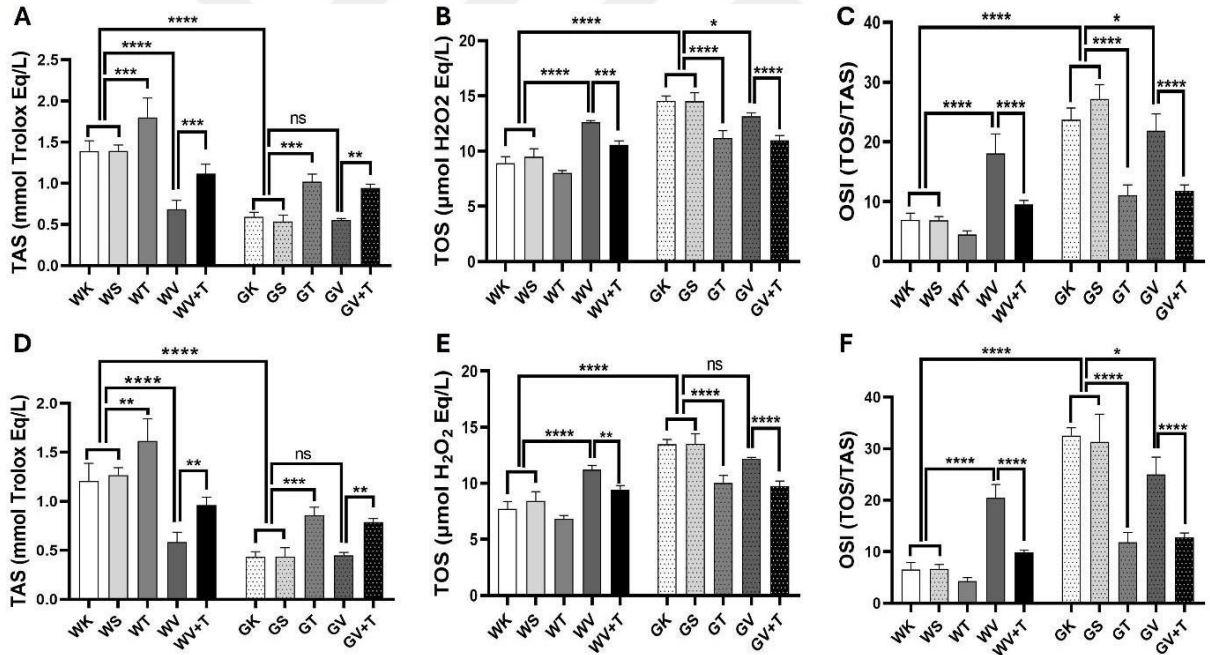
Doku ve serum örneklerindeki TAS seviyeleri, WV grubunda WK ve WS grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p<0,0001$). WV+T grubunda, WV grubunda azalmış olan TAS değerinin anlamlı olarak arttığı görüldü (dokuda $p<0,001$, serumda $p<0,01$). GK ve GS gruplarında, WK ve WS gruplarına kıyasla TAS seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı ($p<0,0001$), timokinon uygulamasının ise TAS değerlerini anlamlı ölçüde arttırdığı ($p<0,001$) görüldü. GV grubunda, GK ve GS gruplarına göre anlamlı bir fark görülmezken, GAERS hayvanlarda timokinon uygulamasının TAS değerlerini belirgin şekilde arttırdığı ($p<0,001$) gösterildi (Şekil 31A ve 31D).

Doku ve serum örneklerindeki TOS seviyeleri, WV grubunda WK ve WS grubuna göre anlamlı olarak arttı ($P<0,0001$). Timokinon uygulaması, artmış olan TOS değerini WV grubuna göre anlamlı olarak azalttı (dokuda $p<0,001$, serumda $p<0,01$). GK ve GS gruplarında, WK ve WS gruplarına kıyasla TOS seviyelerinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p<0,0001$). GT grubunda, TOS değerinin anlamlı olarak azaldığı ($p<0,0001$) görüldü. GV grubunda TOS değeri, dokuda azalırken ($p<0,05$) serumda azalma eğilimi gösterdiği belirlendi. GV+T grubunda, TOS değerinin GV grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0,0001$) görüldü (Şekil 31B ve 31E).

Doku ve serum örneklerindeki OSI seviyeleri, WV grubunda WK ve WS gruplarına kıyasla anlamlı olarak arttı ($P<0,0001$). WV+T grubunda, artan OSI seviyelerinin belirgin şekilde azaldığı ($P<0,0001$) tespit edildi. GK ve GS gruplarında, WK ve WS gruplarına kıyasla OSI seviyeleri arttı ($P<0,0001$). GT ($p<0,0001$), GV ($p<0,05$) ve GV+T ($p<0,0001$) gruplarında OSI seviyeleri, GK ve GS gruplarına kıyasla azaldı (Şekil 31C ve 31F).

Tablo 4. Deney gruplarına ait oksidan ve anti-oksidan parametrelerin biyokimyasal değerleri (ortalama $\pm$ SD).

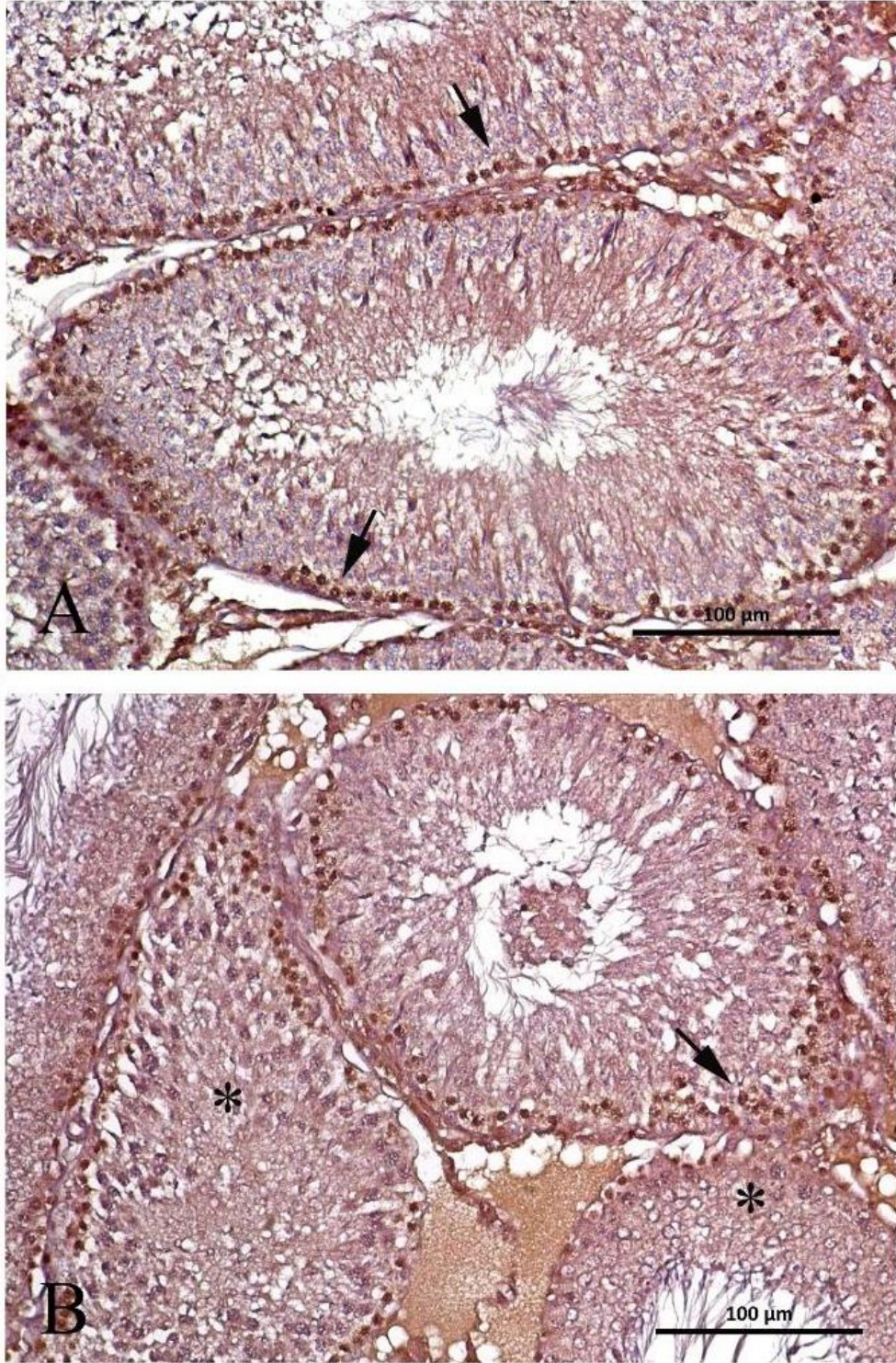
	DOKU			SERUM		
	TAS (mmol Trolox Equiv./L.)	TOS (mmol H ₂ O ₂ Equiv./L.)	OSI (TOS/TAS)	TAS (mmol Trolox Equiv./L.)	TOS (mmol H ₂ O ₂ Equiv./L.)	OSI (TOS/TAS)
WK	1,39 $\pm$ 0,13	8,92 $\pm$ 0,59	6,93 $\pm$ 1,16	1,2 $\pm$ 0,18	7,72 $\pm$ 0,63	6,55 $\pm$ 1,38
WS	1,39 $\pm$ 0,07	9,49 $\pm$ 0,72	6,86 $\pm$ 0,65	1,27 $\pm$ 0,08	8,42 $\pm$ 0,82	6,70 $\pm$ 0,81
WT	1,8 $\pm$ 0,24	8,02 $\pm$ 0,23	4,52 $\pm$ 0,57	1,62 $\pm$ 0,23	6,83 $\pm$ 0,29	4,3 $\pm$ 0,68
WV	0,68 $\pm$ 0,11	12,60 $\pm$ 0,16	18,07 $\pm$ 3,23	0,59 $\pm$ 0,1	11,19 $\pm$ 0,4	20,42 $\pm$ 2,62
WV+T	1,12 $\pm$ 0,12	10,59 $\pm$ 0,34	9,54 $\pm$ 0,69	0,96 $\pm$ 0,08	9,42 $\pm$ 0,37	9,84 $\pm$ 0,49
GK	0,59 $\pm$ 0,05	14,56 $\pm$ 0,44	23,7 $\pm$ 1,99	0,43 $\pm$ 0,05	13,49 $\pm$ 0,43	32,56 $\pm$ 1,5
GS	0,54 $\pm$ 0,08	14,52 $\pm$ 0,76	27,19 $\pm$ 2,39	0,44 $\pm$ 0,09	13,51 $\pm$ 0,91	31,33 $\pm$ 5,35
GT	1,02 $\pm$ 0,09	11,17 $\pm$ 0,68	11,08 $\pm$ 1,71	0,86 $\pm$ 0,08	10,02 $\pm$ 0,67	11,81 $\pm$ 1,9
GV	0,55 $\pm$ 0,02	13,16 $\pm$ 0,31	21,89 $\pm$ 2,8	0,45 $\pm$ 0,03	12,22 $\pm$ 0,1	24,96 $\pm$ 3,4
GV+T	0,94 $\pm$ 0,05	10,98 $\pm$ 0,44	11,82 $\pm$ 0,97	0,79 $\pm$ 0,04	9,73 $\pm$ 0,48	12,81 $\pm$ 0,85



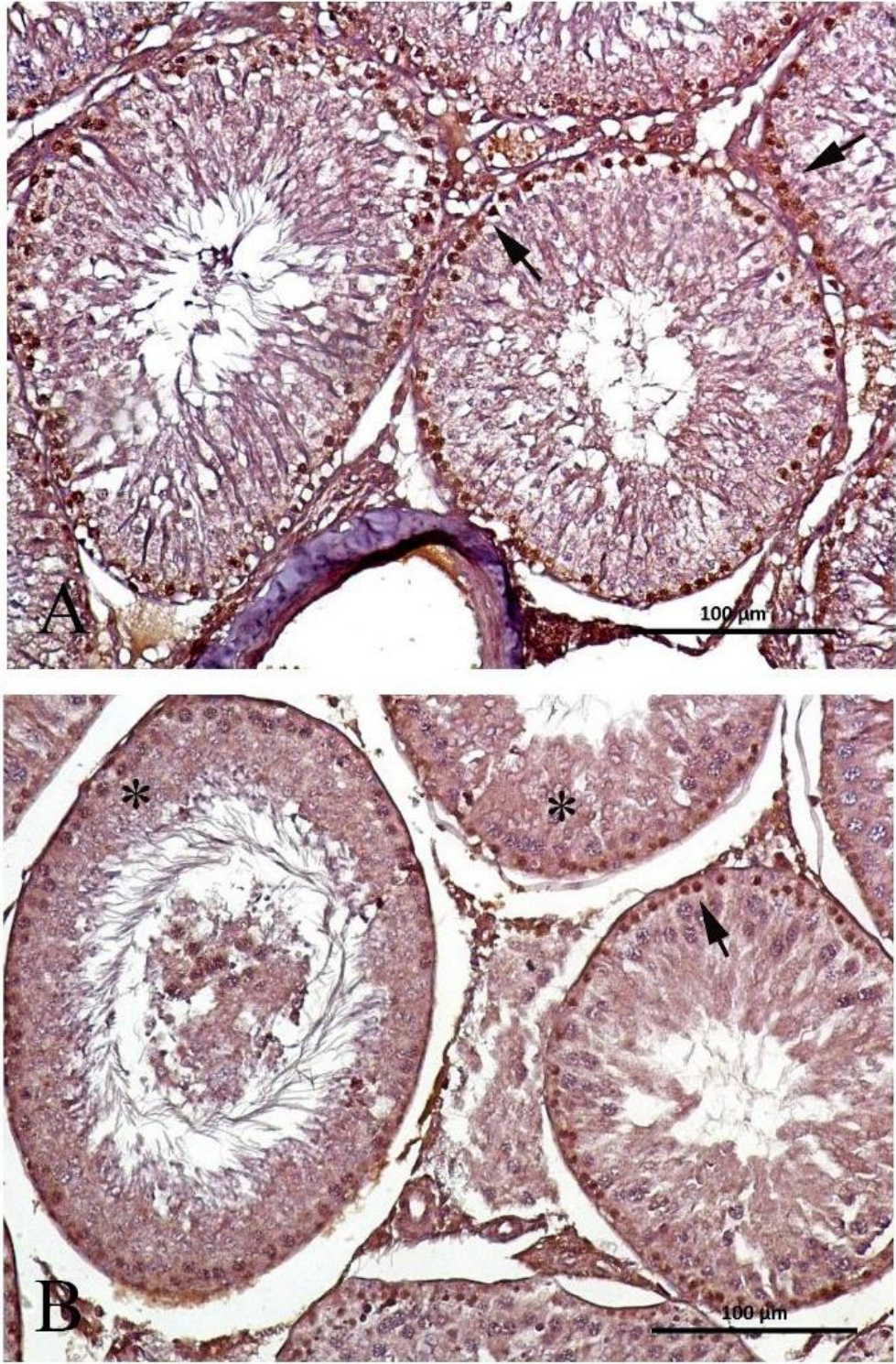
Şekil 31. Doku örneklerinin toplam antioksidan seviye (A), toplam oksidan seviye (B), oksidatif stres indeksi (C); serum örneklerinin toplam antioksidan durumu (D), toplam oksidan durumu (E), oksidatif stres indeksine (F) ait istatistiksel verilerine ait sütun grafikleri (ns: gruplar arasında fark yok, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

6.4 PCNA İmmünohistokimya ve Western Blot Bulguları

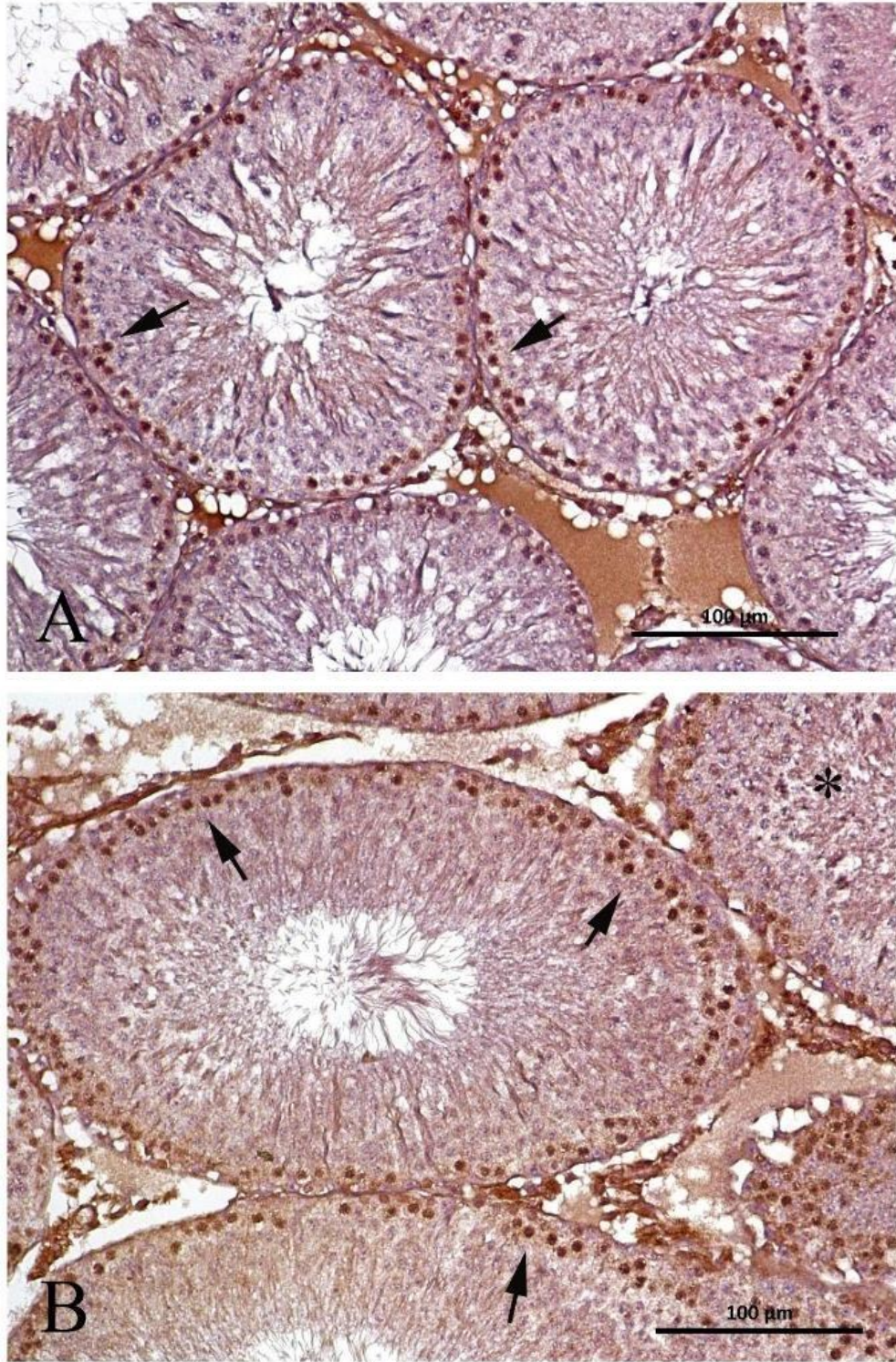
Hücre proliferasyonu ile ilişkili olan PCNA proteininin immunhistokimyasal ve WB analizleri gerçekleştirildi (Tablo 5). WB analizlerinde kontrol olarak β -Aktin kullanıldı. WK, WS ve WT gruplarına ait testis dokularında çok sayıda PCNA pozitif hücre içeren seminifer tübül mevcuttu (Şekil 32A, 33A ve 34A). WV grubunda seminifer tübüllerde PCNA pozitif hücrelerin azaldığı gözlemlendi (Şekil 35A) ve WK, WS ve WT gruplarına kıyasla PCNA ekspresyonu anlamlı şekilde azaldı ($p<0,0001$). WV+T grubunda çok sayıda PCNA pozitif hücre içeren seminifer tübül görüldü (Şekil 36A), PCNA ekspresyonu anlamlı olarak arttı ($p<0,0001$). GK ve GS gruplarında, WK ve WS gruplarına göre seminifer tübüllerde PCNA pozitif hücrelerin azaldığı gözlemlendi ve PCNA ekspresyonu anlamlı olarak azaldı ($p<0,0001$) (Şekil 32A-32B ve 33A-33B). GT grubunda çok sayıda PCNA pozitif hücre içeren tübüllerin yanı sıra az sayıda PCNA pozitif hücrenin bulunduğu seminifer tübüller mevcuttu (Şekil 34B). PCNA ekspresyon seviyeleri, GK ve GS grupları ile benzer şekildeydi (Şekil 37). GV ve GV+T gruplarında çok sayıda PCNA pozitif hücre içeren seminifer tübül izlendi ve PCNA ekspresyonu anlamlı olarak arttı ($p<0,0001$) (Şekil 35B ve 36B).



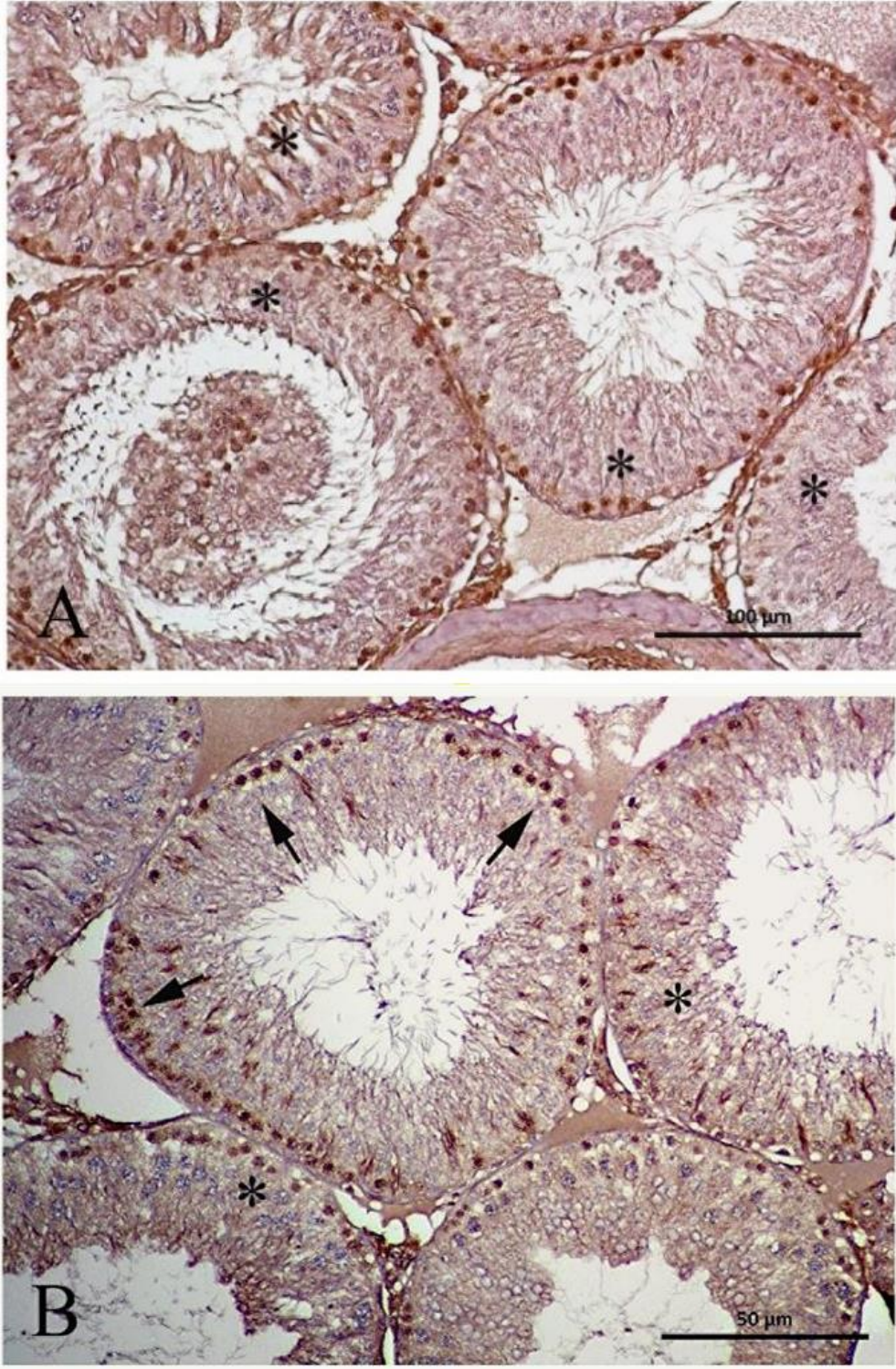
Şekil 32. Kontrol gruplarına ait PCNA işaretli kesitler. A: WK grubu. B: GK grubu. Ok: Çok sayıda PCNA pozitif hücreler. Yıldız: Az sayıda PCNA pozitif hücrelerin olduğu seminifer tübüller. PCNA immünohistokimyası.



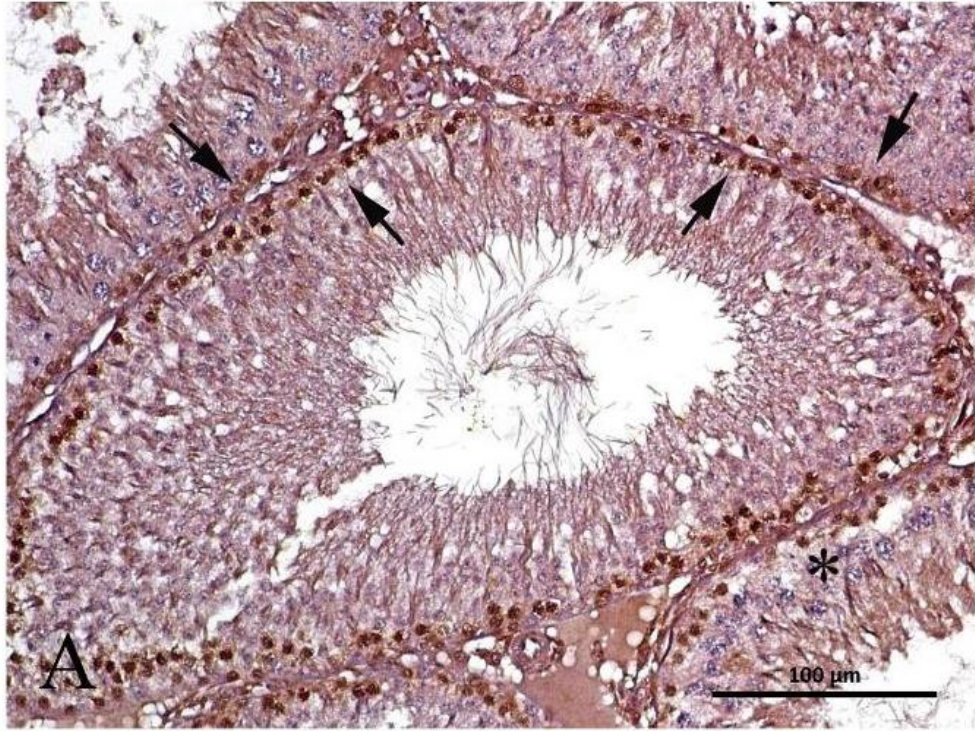
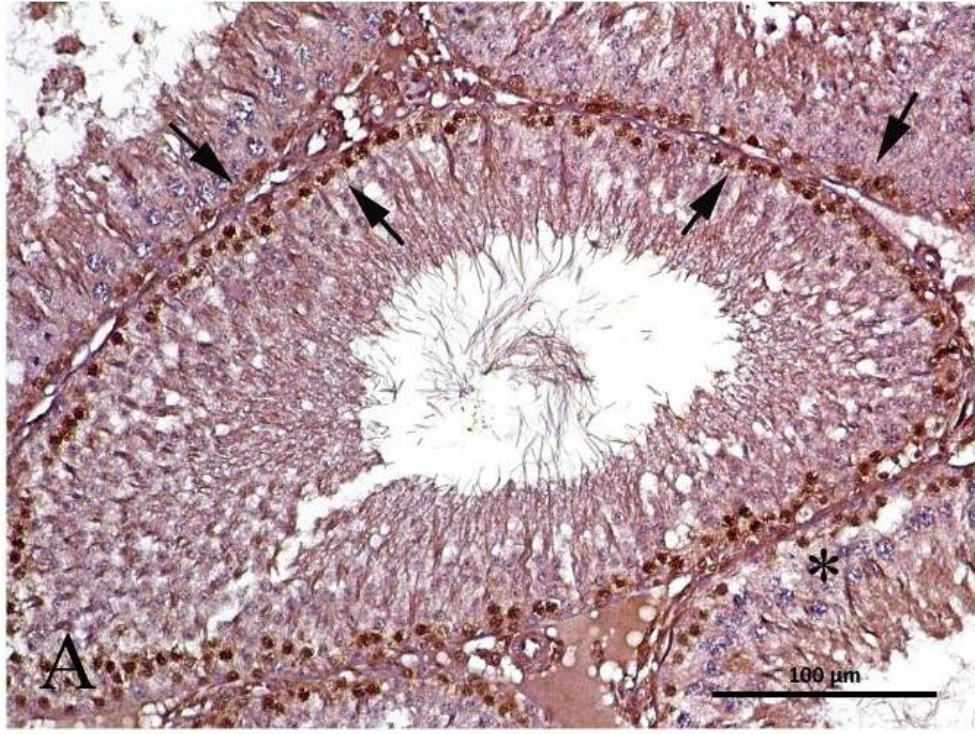
Şekil 33. Sham gruplarına ait PCNA işaretli kesitler. A: WK grubu. B: GK grubu. Ok: Çok sayıda PCNA pozitif hücreler. Yıldız: Az sayıda PCNA pozitif hücrelerin olduğu seminifer tübüller. PCNA İmmünohistokimyası.



Şekil 34. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait PCNA işaretli kesitler. WT grubu. B: GT grubu. Ok: Çok sayıda PCNA pozitif hücreler. Yıldız: Az sayıda PCNA pozitif hücrelerin olduğu seminifer tübüller. PCNA immünohistokimyası.



Şekil 35. VPA uygulanan deney gruplarına ait PCNA işaretli kesitler. A: WV grubu. B: GV grubu. Ok: Çok sayıda PCNA pozitif hücreler. Yıldız: Az sayıda PCNA pozitif hücrelerin olduğu seminifer tübüller. PCNA immünohistokimyası.

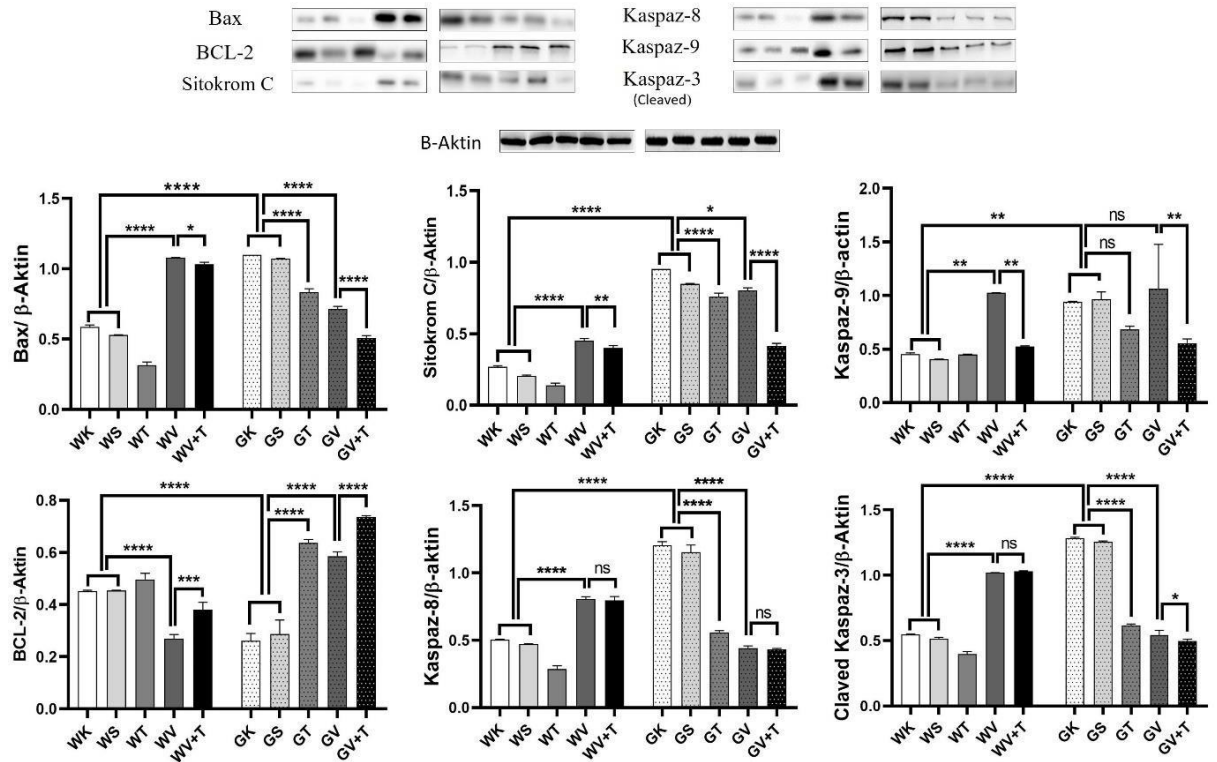


Şekil 36. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait PCNA işaretli kesitler. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. Ok: Çok sayıda PCNA pozitif hücreler. Yıldız: Az sayıda PCNA pozitif hücrelerin olduğu seminifer tübüller. PCNA immünohistokimyası.

ve bölünmüş Kaspaz-3($p<0,0001$) proteinlerinin ekspresyonları WK ve WS gruplarına göre artarken, Bcl-2 ($p<0,0001$) proteininin ekspresyonu azaldı. WV+T grubunda, VPA uygulaması ile artmış olan Bax ($p<0,05$), Sitokrom C ($p<0,01$) ve Kaspaz-9 ($p<0,01$) proteinlerinin ekspresyonlarında azalma görülürken, azalan Bcl-2 ($p<0,001$) seviyeleri anlamlı olarak arttı. GK ve GS gruplarında WK ve WS gruplarına kıyasla Bax ($p<0,0001$), Sitokrom C ($p<0,0001$), Kaspaz-8 ($p<0,0001$), Kaspaz-9 ($p<0,01$) ve bölünmüş Kaspaz-3 ($p<0,0001$) proteinlerinin ekspresyonları anlamlı olarak arttığı Bcl-2 ($p<0,0001$) seviyeleri anlamlı olarak azaldığı görüldü. GT, GV ve GV+T gruplarında Bax ($p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$), Sitokrom C ($p<0,001$; $p<0,05$; $p<0,001$), Kaspaz-8 ($p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$) ve bölünmüş Kaspaz-3 ($p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$) proteinlerinin ekspresyonları anlamlı olarak azalırken, Bcl-2 ($p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$) seviyeleri ise arttı (Şekil 38).

Tablo 6. Deney gruplarına ait Bax, BCL-2, Sitokrom C, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 proteinlerinin WB analizlerinden elde edilen veriler (Ortalama $\pm$ SD).

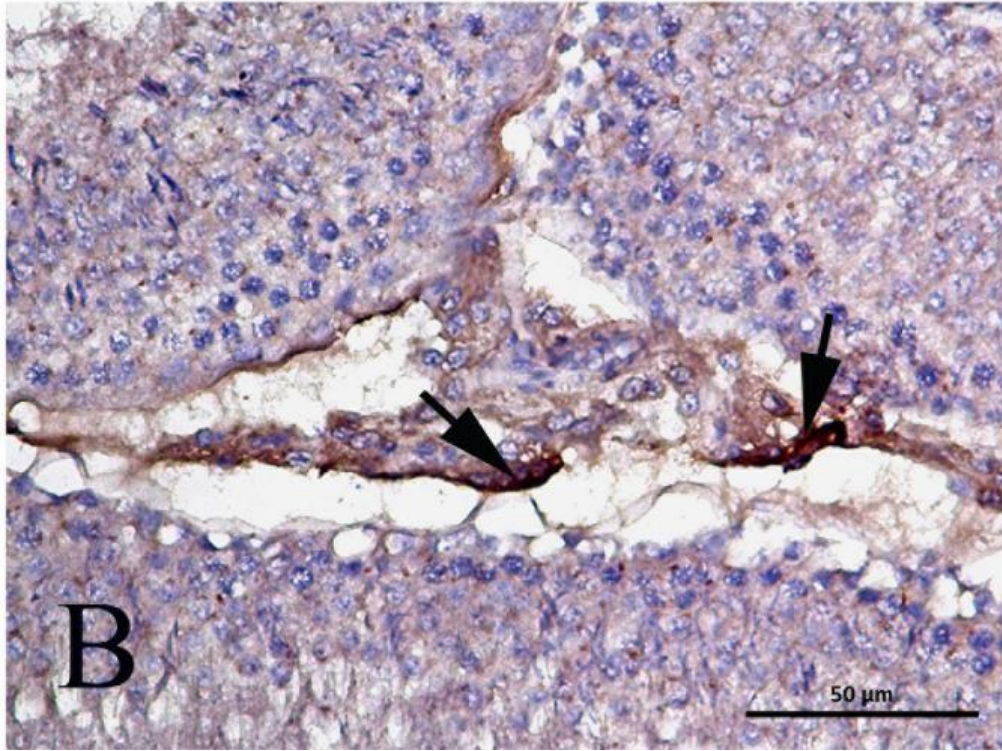
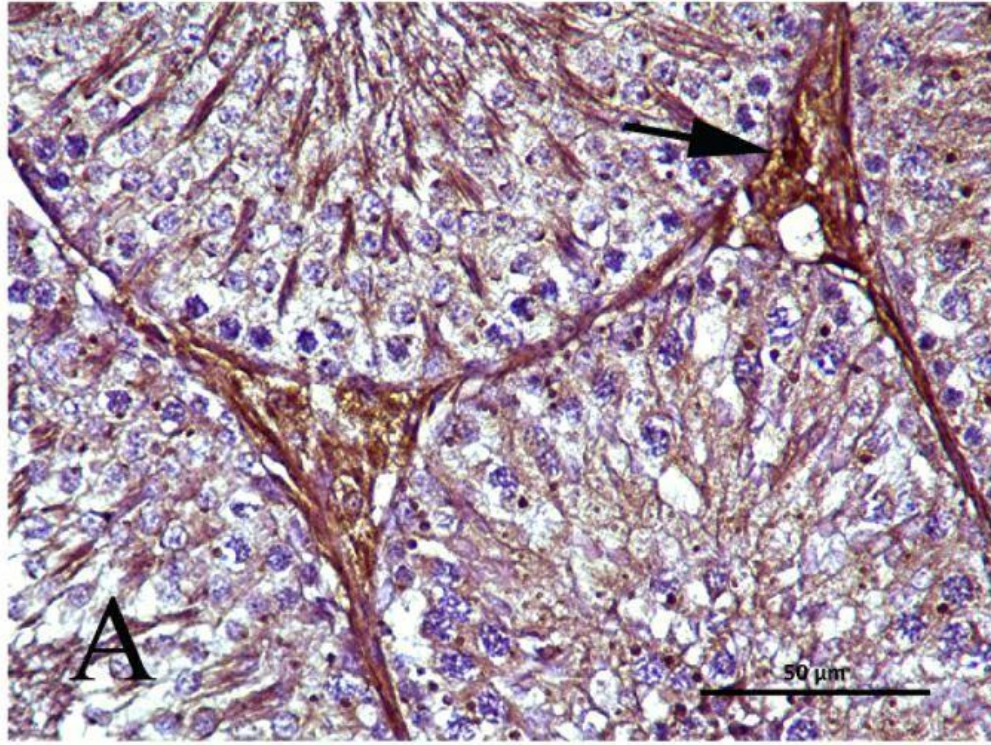
	Bax	BCL-2	Sitokrom C	Kaspaz-8	Kaspaz-9	Kaspaz-3 (Bölünmüş)
WK	0,59 $\pm$ 0,014	0,45 $\pm$ 0,004	0,27 $\pm$ 0,007	0,5 $\pm$ 0,004	0,45 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,004
WS	0,53 $\pm$ 0,0009	0,45 $\pm$ 0,002	0,21 $\pm$ 0,005	0,47 $\pm$ 0,002	0,41 $\pm$ 0,001	0,52 $\pm$ 0,01
WT	0,31 $\pm$ 0,024	0,5 $\pm$ 0,0243	0,14 $\pm$ 0,015	0,29 $\pm$ 0,024	0,45 $\pm$ 0,002	0,4 $\pm$ 0,02
WV	1,08 $\pm$ 0,0007	0,27 $\pm$ 0,016	0,45 $\pm$ 0,015	0,81 $\pm$ 0,017	1,03 $\pm$ 0,001	1,02 $\pm$ 0,001
WV+T	1,03 $\pm$ 0,014	0,38 $\pm$ 0,029	0,4 $\pm$ 0,016	0,8 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,005	1,03 $\pm$ 0,005
GK	1,1 $\pm$ 0,00012	0,26 $\pm$ 0,028	0,95 $\pm$ 0,001	1,21 $\pm$ 0,028	0,94 $\pm$ 0,004	1,29 $\pm$ 0,005
GS	1,07 $\pm$ 0,0027	0,29 $\pm$ 0,054	0,85 $\pm$ 0,003	1,15 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,006
GT	0,83 $\pm$ 0,024	0,64 $\pm$ 0,013	0,76 $\pm$ 0,024	0,56 $\pm$ 0,013	0,68 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,009
GV	0,72 $\pm$ 0,019	0,59 $\pm$ 0,017	0,8 $\pm$ 0,019	0,44 $\pm$ 0,017	1,06 $\pm$ 0,4	0,54 $\pm$ 0,036
GV+T	0,51 $\pm$ 0,018	0,74 $\pm$ 0,005	0,41 $\pm$ 0,018	0,43 $\pm$ 0,005	0,56 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,014



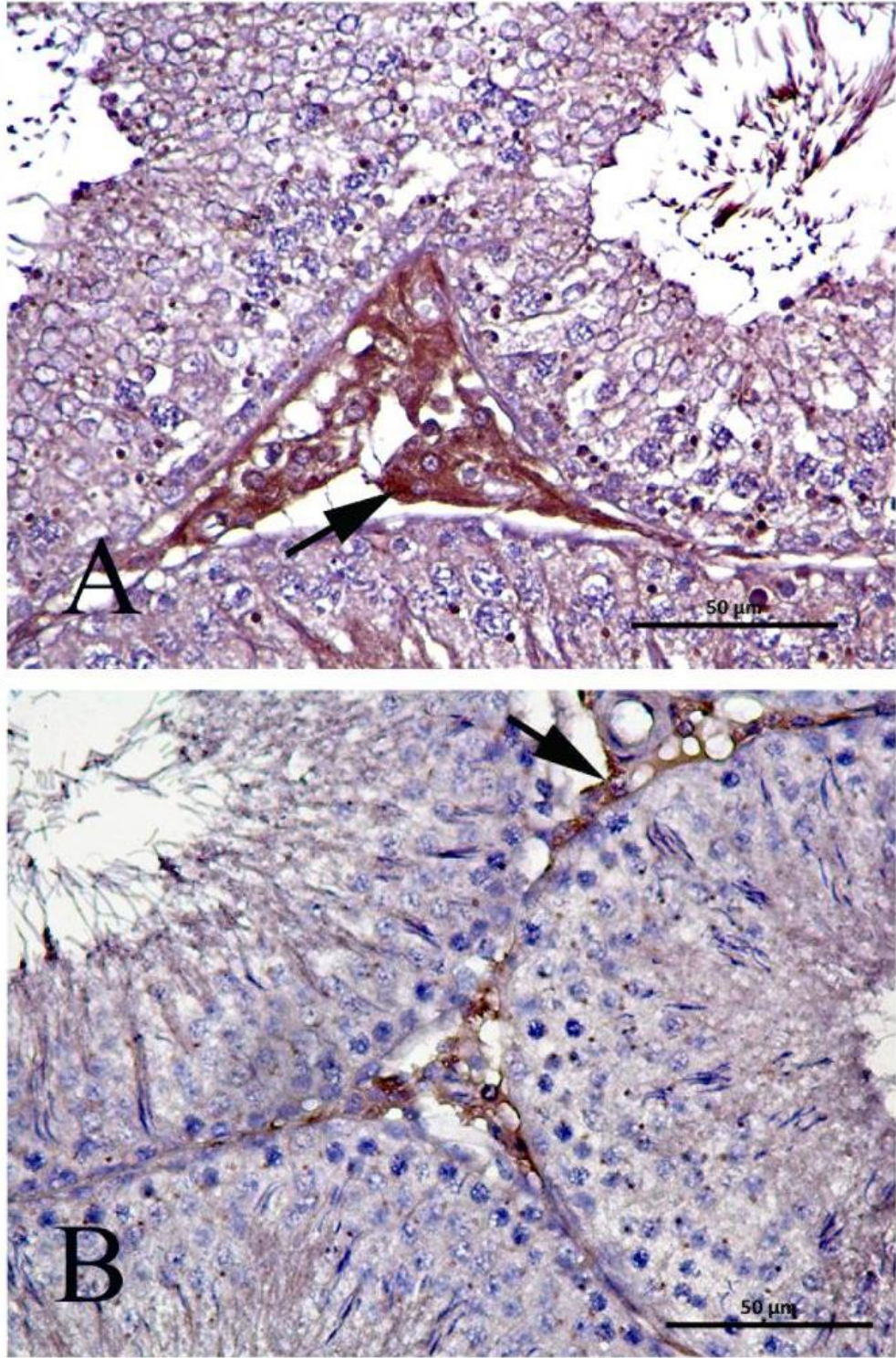
Şekil 38. Bax, BCL-2, Sitokrom C, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 proteinlerinin WB analizlerinden elde edilen bant görüntüleri ve istatistiksel değerlendirmeleri gösteren grafikler (ns: gruplar arasında fark yok, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

6.6 StAR İmmünohistokimya ve Western Blot Bulguları

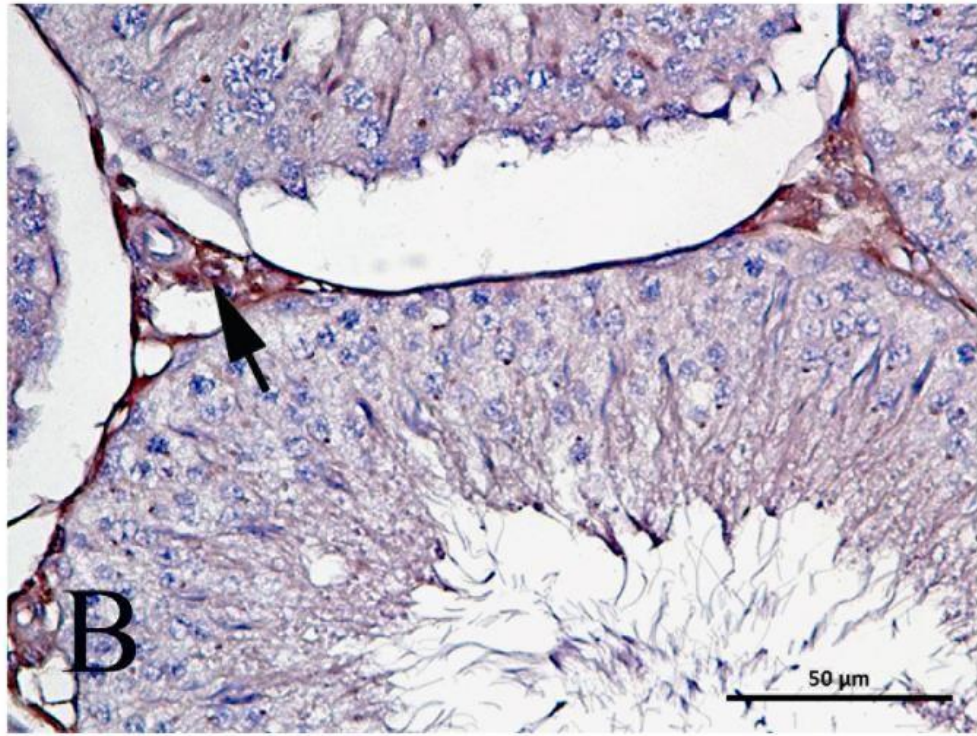
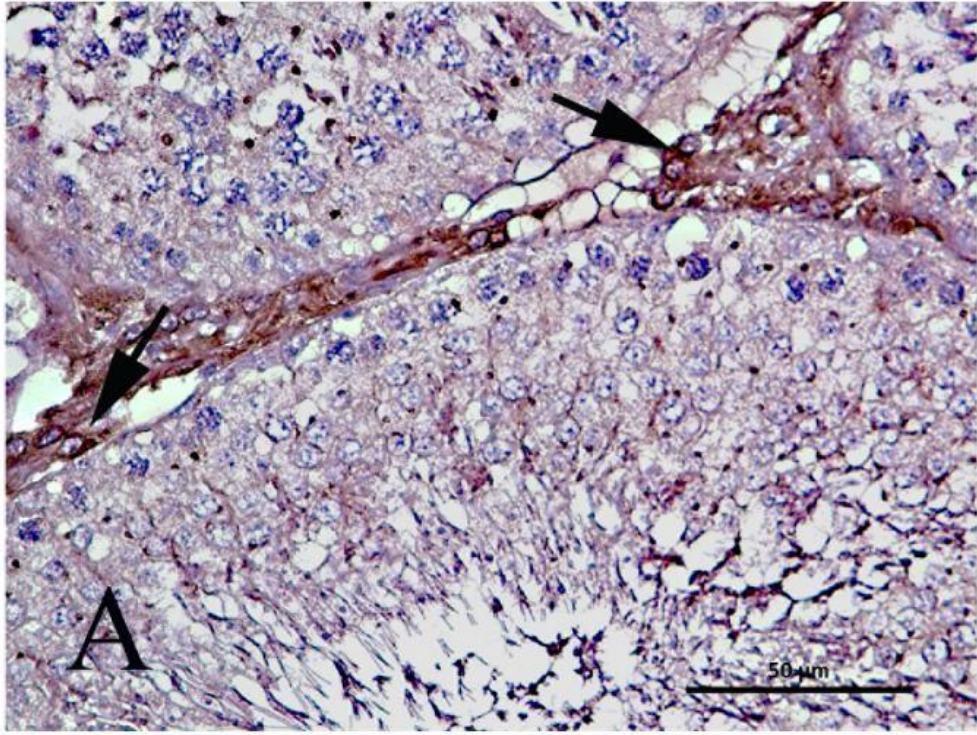
Deney gruplarının, testosteron üretimi ile ilişkili bir protein olan StAR ekspresyonu, İmmünohistokimya ve western blot yöntemi ile araştırıldı (Tablo 7). Western blot analizlerinde kontrol olarak β -Aktin kullanıldı. WV grubunda, intersitisyel alanlarda StAR pozitif hücre sayısı (Şekil 42A) ve StAR ekspresyonunun WK ve WS gruplarına (Şekil 39A ve 40A) kıyasla anlamlı olarak azaldığı ($p < 0,0001$) görüldü. Timokinon uygulaması (Şekil 41A), WV grubuna (Şekil 42A) kıyasla intersitisyel alanlarda StAR pozitif hücre sayısını ve StAR ekspresyonunu anlamlı olarak arttırdı ($p < 0,0001$). GK ve GS gruplarında (Şekil 39B ve 40B), WK ve WS gruplarına (Şekil 39A ve 40A) göre StAR pozitif hücre sayısı ve StAR seviyeleri anlamlı olarak azaldı ($p < 0,0001$). GT, GV ve GV+T gruplarında (Şekil 41B, 42B ve 43B), intersitisyel alanlardaki StAR pozitif hücre sayısı ve StAR ekspresyonu anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p < 0,0001$) (Şekil 44).



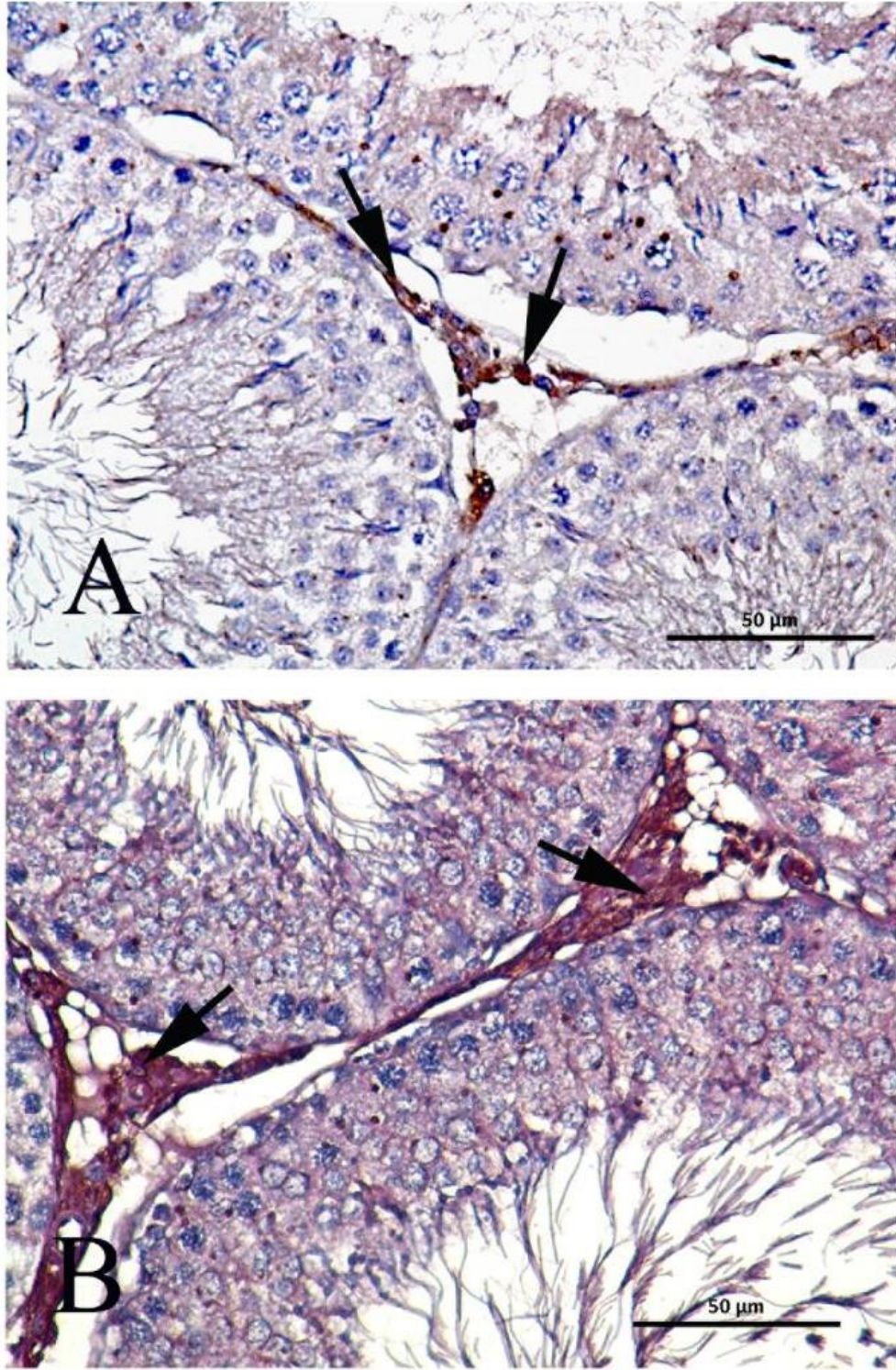
Şekil 39. Kontrol gruplarına ait StAR işaretli kesitler. A: WK grubu. B: GK grubu. Ok: StAR pozitif hücreler. StAR immünohistokimyası.



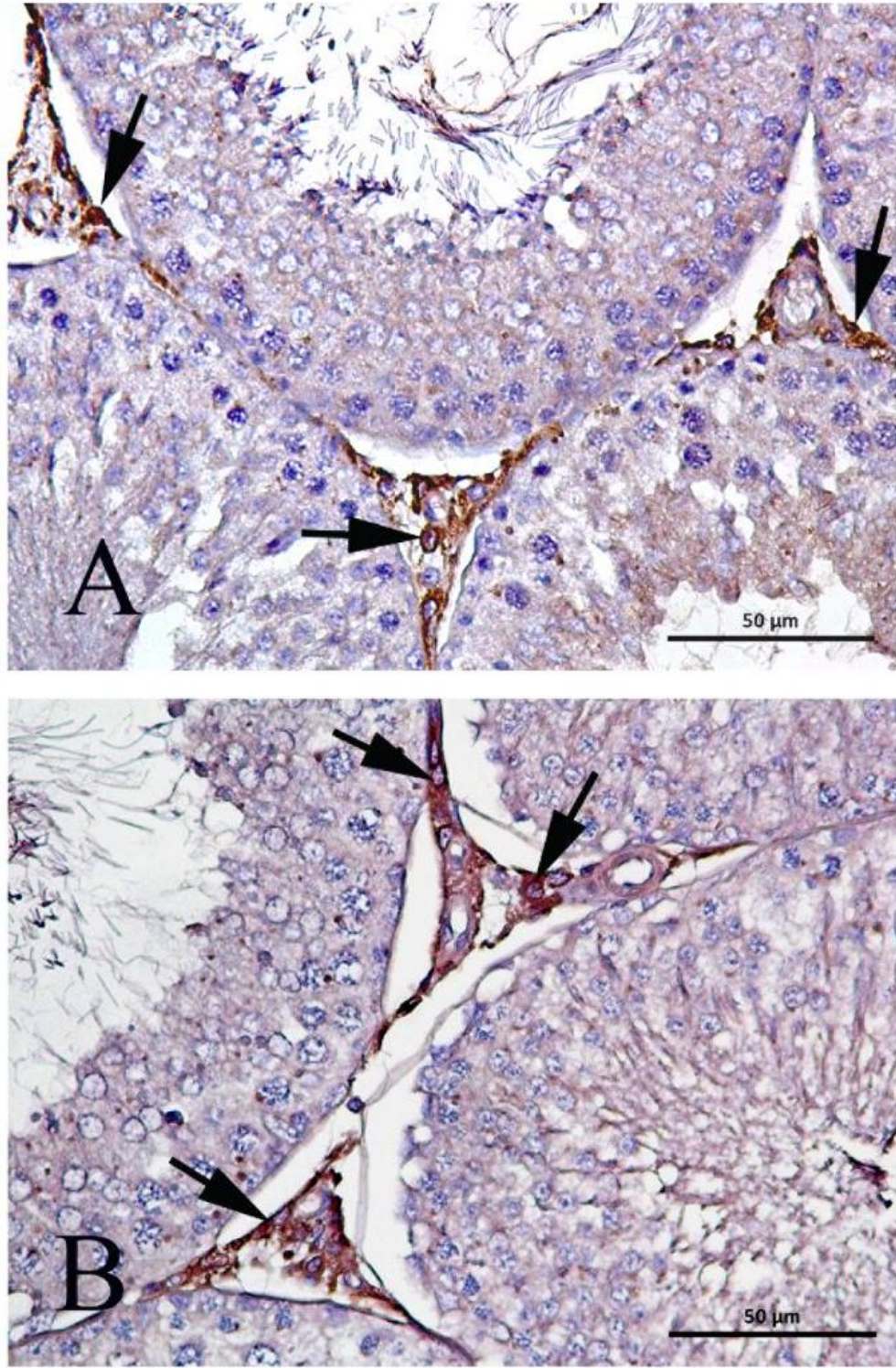
Şekil 40. Sham gruplarına ait StAR işaretli kesitler. A: WSgrubu. B: GS grubu. Ok: StAR pozitif hücreler. StAR immünohistokimyası.



Şekil 41. Timokinon uygulanan deney gruplarına ait StAR işaretli kesitler. A: WT grubu. B: GT grubu. Ok: StAR pozitif hücreler. StAR immünohistokimyası.



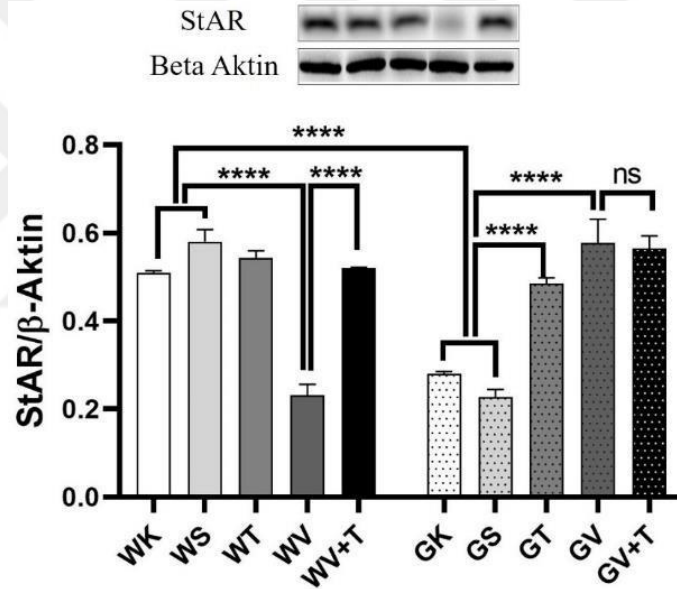
Şekil 42. VPA uygulanan deney gruplarına ait StAR işaretli kesitler. A: WV grubu. B: GV grubu. Ok: StAR pozitif hücreler. StAR immünohistokimyası.



Şekil 43. VPA+Timokinon uygulanan deney gruplarına ait StAR işaretli kesitler. A: WV+T grubu. B: GV+T grubu. Ok: StAR pozitif hücreler. StAR immünohistokimyası.

Tablo 7. Deney gruplarına ait StAR proteininin WB analizinden elde edilen veriler (Ortalama $\pm$ SD).

	StAR
WK	0,51 $\pm$ 0,004
WS	0,58 $\pm$ 0,027
WT	0,54 $\pm$ 0,017
WV	0,23 $\pm$ 0,024
WV+T	0,52 $\pm$ 0,002
GK	0,28 $\pm$ 0,005
GS	0,23 $\pm$ 0,017
GT	0,49 $\pm$ 0,013
GV	0,58 $\pm$ 0,054
GV+T	0,56 $\pm$ 0,029



Şekil 44. StAR protein ekspresyonunun WB incelemesinden elde edilen bant görüntüsü ve verilerin istatistiksel analizini gösteren grafik (ns: gruplar arasında fark yok, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

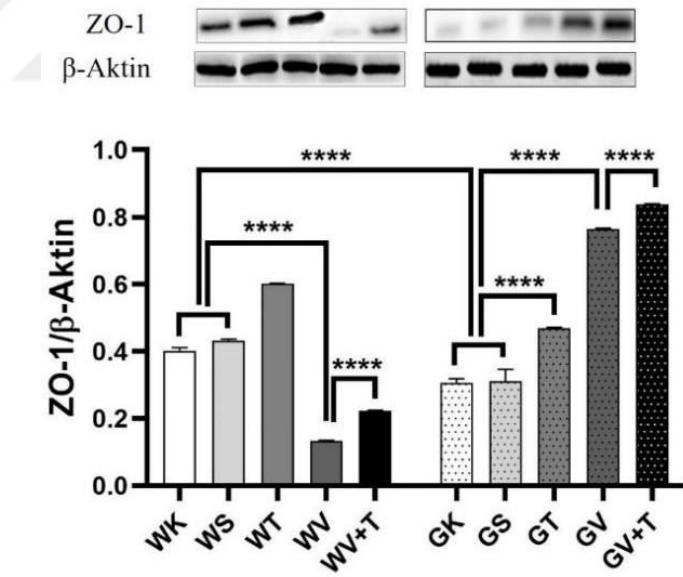
6.7 ZO-1 Proteininin Western Blot Bulguları

Deney gruplarında KTB'nin sıkı bağlantı proteini olan ZO-1'in ekspresyon seviyesi, WB yöntemi ile ölçüldü (Tablo 8). Kontrol olarak β -Aktin kullanıldı. WV grubunda, WK ve WS

gruplarına kıyasla ZO-1 ekspresyonu anlamlı olarak azaldı ($p<0,0001$). Wistar hayvanlarda timokinon uygulaması, VPA grubuna kıyasla ZO-1 ekspresyonunu anlamlı olarak arttırdı ($p<0,0001$). GK ve GS gruplarının ZO-1 ekspresyonu, WK ve WS gruplarına kıyasla azaldı ($p<0,0001$). GT, GV ve GV+T gruplarında, VPA uygulamasıyla azalan ZO-1 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0,0001$) (Şekil 45).

Tablo 8. Deney gruplarına ait ZO-1 proteininin WB analizinden elde edilen veriler (Ortalama $\pm$ SD).

	ZO-1
WK	0,4 $\pm$ 0,01
WS	0,43 $\pm$ 0,004
WT	0,6 $\pm$ 0,00079
WV	0,13 $\pm$ 0,0024
WV+T	0,22 $\pm$ 0,0009
GK	0,31 $\pm$ 0,01
GS	0,31 $\pm$ 0,036
GT	0,47 $\pm$ 0,0034
GV	0,76 $\pm$ 0,0027
GV+T	0,84 $\pm$ 0,0028



Şekil 45. ZO-1 proteininin WB incelemesinden elde edilen bant görüntüsü ve verilerin istatistiksel analizini gösteren grafik (**** $p<0,0001$).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hem epileptik nöbetler hem de epilepsi tedavisinde kullanılan AEİ'lerin, gonadları etkilediği ve epilepsili bireylerde üreme disfonksiyonu görüldüğü bilinmektedir (Atli Eklioglu & Ilgin, 2022). Epilepsinin üreme işlev bozukluğu üzerindeki uzun vadeli etkisinin yanı sıra, AEİ'lerin uzun süreli kullanımının da cinsel bozukluklarına neden olduğu bildirilmiştir (Ganjkhani et al., 2019). Epilepsili erkeklerde, doğurganlığın genel popülasyona kıyasla daha düşük olduğu ve bu hastaların yaklaşık %71'inde hiposeksüalite ve azalmış potens görüldüğü bilinmektedir. Tedavi edilmemiş epileptik erkeklerde düşük seminal sıvı hacmi, oligospermi ve anormal spermatozoa sayısında artış görülür (Sherifa A Hamed, 2016; Taneja et al., 1994). Literatürde epileptik erkeklerde, genital kan akımında azalma, testiküler atrofi ve spermatogenezde bozulma meydana geldiği bildirilmektedir. Aly ve arkadaşları, epileptik sıçan testislerinde germinal epitelde ayrılma ve vakuolizasyon, seminifer tübül dejenerasyonu, ödem ve seminifer tübül lümenindeki spermelerde belirgin azalma olduğunu rapor etmiştir (Aly et al., 2023). Bu olumsuz etkiyi geri çevirebilecek ya da azaltabilecek ajanların arayışı devam etmektedir. *Nigella sativa*'nın aktif ana bileşenlerinden biri olan timokinonun, antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, antiparaziter ve antikanser etkisi gibi birçok biyomedikal etkisi gösterilmiştir. Ayrıca literatürde timokinonun epilepsi, Parkinson, anksiyete, öğrenme ve hafızanın iyileştirilmesi gibi nörolojik durumlardaki etkilerine ilişkin birçok çalışma mevcuttur (Farkhondeh et al., 2018).

Deneysel hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar, epilepsinin ve AEİ'lerin etkilerini, ek faktörler olmaksızın araştırmamıza olanak tanır (Taubøll et al., 2008). Literatürde absans epilepsi araştırmalarında en çok kullanılan ve doğrulanan modellerden biri, GAERS hayvan modelidir (Cilingir-Kaya ve ark., 2021; Sirvanci ve ark., 2020). Bu sebeple, çalışmamızda absans epilepsinin ve tedavisinde kullanılan VPA'nın, erkek üreme sistemi üzerinde oluşturduğu etkileri göstermek ve timokinonun, sperm parametreleri ile testis dokusu üzerindeki terapötik etkisini incelemek için mevcut çalışmamızda da GAERS suşu sıçanlar kullanıldı.

Çalışmamızdan elde edilen veriler, absans epilepsili hayvanlarda sağlıklı hayvanlara kıyasla normal morfolojiye sahip sperm sayısının azaldığını ve baş, boyun, kuyruk anomalisine sahip sperm sayısının arttığını ortaya koymuştur. Shokri ve ark. Lityum pilokarpin ile oluşturulan TLE modelinde epilepsinin toplam sperm sayısını azalttığını, anormal morfolojili sperm yüzdesini arttırdığını göstermiştir (Shokri ve ark., 2015). Çalışmamızda GAERS sıçanların testis dokularında, germinal epitelde ve bazal membranda ayrılma ve düzensizlik; germinal epitel kalınlığı ve Johnsen skorunda azalma görüldü. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, Wistar ve GAERS sıçanların testis dokusunda GABA immünoreaktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, GAERS sıçanların testis dokusunda germinal epitel organizasyonunun bozulduğu ve hücreler arası boşlukların arttığı, ayrıca germinal epitel kalınlığının azaldığı bildirilmiştir (Gürsoy Gürgen ve ark., 2021). Elde ettiğimiz veriler, önceki çalışmalarla uyumlu olarak, absans epilepsinin erkek üreme sistemi histolojisi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu gösterdi.

Çalışmamızın sonuçları ile, VPA uygulanan deney gruplarında normal sperm sayısının azaldığı ve baş, boyun, kuyruk anomalisine sahip sperm sayısının arttığı ortaya koyuldu. Jeneralize nöbetlerin tedavisi için VPA uygulanan 27 erkek hastanın incelendiği bir çalışmada, sperm motilitesinin azaldığı ve morfolojik anomali riskinin arttığı kaydedilmiştir (Isojarvi ve ark., 2004). Başka bir araştırmada, juvenil miyoklonik epilepsi için VPA alan bir erkek hasta vakası tanımlanmış, VPA dozu artırıldıkça ardışık semen analizleri yapılmış ve artan dozlarla birlikte sperm sayısında ve sperm hareketliliğinde azalma olduğu görülmüştür (Kose-Ozlece ve ark., 2015). Çalışmamız, daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen bu verilerle uyumlu olarak, hem Wistar hem de GAERS hayvanlarda, VPA uygulamasının olumsuz etkilerini ortaya koymuştur. Ayrıca VPA uygulamasının Wistar grubu hayvanlarda toksisiteye sebep olarak testis morfolojisini olumsuz etkilediği, Johnsen skorunu ve epitel kalınlığını azalttığı görülmüştür. Sukhorum ve Iamsaard, 500mg/kg 10 günlük VPA uygulaması sonrasında germinal epitel kalınlığının azaldığını, seminifer tübüller arası açılmanın arttığını ve seminifer tübüllerin atrofiye uğradığını rapor etmiştir (Sukhorum & Iamsaard, 2017). Ganjkhani ve arkadaşları TLE ve 200mg/kg 30 günlük VPA uygulamasının sağlıklı ve epilepsili sıçanlarda sperm anomali oranını arttırdığını ve kontrollerde 9.92 ± 0.36 olan Johnsen skorunun VPA uygulanan epileptik grupta 9.37 ± 0.34 seviyelerine, VPA uygulanan sağlıklı grupta 8.87 ± 0.14 seviyelerine düştüğünü göstermiştir (Ganjkhani et al., 2019). Aly ve arkadaşları lityum

pilokarpin ile status epileptikus modeli oluşturdıkları çalışmalarında epilepsi grubunda germ hücrelerinin bazal membrandan ayrıldığı, dejenere seminifer tübüllerde ödem ve spermelerde belirgin azalmanın görüldüğünü ve model öncesi oral yolla tek doz 500 mg/kg VPA uygulanan sıçanların testislerinde, germ hücresinin bazal membrandan hafifçe ayrılması dışında seminifer tübüllerin neredeyse normal yapısını gösterdiğini bildirmiştir (Aly ve ark., 2023). Benzer şekilde çalışmamızda da VPA uygulanan genetik absans epilepsili hayvanların testis morfolojisi, Johnsen skoru ve germinal epitel kalınlığında, genetik absans epilepsili kontrollerle kıyaslandığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. VPA'nın sağlıklı ve epileptik hayvanlardaki farklı sonuçlara hangi mekanizma ile yol açtığı bilinmemektedir. Ancak epileptik yolağın GAERS hayvanlarda oluşturduğu mevcut hasarın VPA uygulaması ile ilerlememesi, bu hayvanlarda epileptik sürecin tedavi sürecine bağlı olabilir. Bu hasarın epilepsi mi yoksa VPA kaynaklı mı olduğunu aydınlatabilmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Elde ettiğimiz veriler, timokinon uygulamasının epileptik hayvanlarda ve hem sağlıklı hem epilepsili hayvanlarda VPA uygulaması ile azalmış olan normal morfolojili sperm sayısını her iki grupta da anlamlı olarak arttırdığını ayrıca timokinonun aynı gruplarda testis morfolojisini iyileştirdiğini ve germinal epitel kalınlığını ve Johnsen skorunu arttırdığını gösterdi. Daha önce tamamladığımız, PTZ ile oluşturulan TLE'nin testis üzerine etkisini araştırdığımız çalışmamızda, epileptik sıçanlarda Johnsen skorunda azalma, germinal epitelde ayrılma ve vakuolizasyon, spermatogenik hücrelerde dökülme, bazal membranda düzensizlik ve atrofik seminifer tübüllerin varlığını gösterdik (Karakaya ve ark., 2021). Söz konusu araştırmada, timokinon uygulamasının, TLE sonucu oluşan testiküler hasarı azaltıp Johnsen skorunu arttırdığını tespit ettik. Önceki çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olarak elde ettiğimiz veriler, epilepsi ve VPA'nın sebep olduğu sperm ve testis morfoloji bozukluğunda timokinonun potansiyel bir tedavi alternatifi olabileceğini düşündürmektedir.

OS erkek infertilitesi de dahil olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır (Sakai ve ark., 2010). Birçok çalışmada, epilepsi hastalarının tümünde kontrol grubuna kıyasla OS düzeylerinin daha yüksek ve antioksidan düzeylerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir (Ethemoglu ve ark., 2021; Geronzi ve ark., 2018; Menon ve ark., 2014). Çalışmamızda, genetik

absans epilepsili ve VPA uygulanan sağlıklı hayvanlarda, TAS seviyeleri azalmış TOS ve OSI seviyeleri artmıştır. GAERS hayvanlarda VPA uygulamasının TAS seviyelerini değiştirmede fakat TOS ve OSI seviyelerini azalttığı görülmüştür. Çok sayıda çalışma, epilepsi ve epileptik nöbetler ile OS arasında bir korelasyon olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır ve literatürde epilepsi ve VPA'nın, OS kaynaklı olarak germ hücrelerinde toksisiteye, spermelerde DNA hasarına sebep olduğunu bildirmektedir (Hamza & Amin, 2007; Khan ve ark. , 2011; G. M. Ourique ve ark., 2016). Shokri ve arkadaşları, lityum pilokarpin ile oluşturdukları TLE modelinde testis dokusundaki total antioksidan, süperoksit dismutaz ve katalaz seviyeleri azalırken, malondialdehit seviyesinin arttığını bildirmişlerdir (Shokri ve ark. , 2015). Lityum pilokarpin ile oluşturulan başka bir TLE modelinde, epileptik hayvanlarda pro-oksidan enzimlerin arttığı, anti-oksidan enzimlerin azaldığı; VPA uygulanan epilepsili hayvanlarda ise pro-oksidan enzimler azalırken, antioksidan enzimlerin arttığı bildirilmiştir (Aly ve ark. , 2023). Testis dokusunda VPA toksisitesini inceleyen bir başka araştırmada, VPA uygulamasının TOS ve OSI düzeylerini arttırıp TAS düzeyini azalttığı gösterilmiştir (Savran ve ark., 2020). Literatüre benzer şekilde mevcut çalışmamızın sonuçları da VPA'nın epileptik nöbetler sonucu oluşan OS'yi azaltabildiğini göstermektedir. Ayrıca timokinon uygulaması hem sağlıklı hem de genetik absans epilepsili hayvanlarda total antioksidan seviyeyi arttırmış, total oksidan seviyeyi ve OS'yi azaltmıştır. VPA ve timokinonun eş zamanlı uygulaması ise total antioksidan kapasiteyi arttırıp, total oksidan seviyelerini düşürerek OS'yi azalttığından, testis dokusunu epileptik nöbetlerden kaynaklanan oksidatif hasarı azaltabilecek potansiyeldedir.

OS artışı, özellikle mitokondri tarafından ROS üretimi, ya doğrudan sperm DNA'sına zarar verir ya da spermatozoa gibi hücrelerde apoptozu başlatabilir (Aitken & Curry, 2011). Spermatogenez, vücuttaki en aktif kendini yenileme süreçlerinden biridir. Hücre çoğalması ve apoptoz arasındaki denge, yetişkinlerde normal gelişim ve doku homeostazı için çok önemlidir. Spermatogenez sürecinde mitoz ile çoğalan hücreler apoptoz ile uygun germ hücresi/Sertoli hücresi oranını korumak, kusurlu germ hücrelerini ortadan kaldırmak ve sperm üretiminde genel kalite kontrolünü sürdürmek için ortadan kaldırılmalıdır. Proliferasyon ile apoptoz arasındaki bu hassas dengenin apoptoz veya proliferasyon lehine bozulması infertilite dahil çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır (Aitken & Curry, 2011; Shukla ve ark., 2012). Proliferasyon ve apoptotik yolağın spermatogenez ve sperm olgunlaşmasındaki önemi, testis

ve epididimde çeşitli belirteçlerin ekspresyonu ile gösterilmektedir (Shukla ve ark. , 2012). Bu çalışmada proliferasyonu araştırmak için PCNA, apoptozu incelemek için ise Bax, Bcl-2, sitokrom C, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-3 (bölünmüş) proteinlerinin WB analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda, genetik absans epilepsili hayvanlarda sağlıklı hayvanlara kıyasla proliferasyon belirteci olan PCNA ve apoptoz belirteçlerinden biri olan Bcl-2 ekspresyonları azaldığı belirlenmiştir. Bax, sitokrom C, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-3 (bölünmüş) proteinlerinin ekspresyonlarını arttırmıştır. Bu bulgular, genetik absans epilepsisinin hem intirinsik hem de ekstrinsik yolak üzerinden proliferasyon/apoptoz dengesinin, apoptoz lehine değiştiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, literatürdeki lityum pilokarpin (Shokri ve ark. , 2015) ve PTZ (Karakaya ve ark. , 2021) ile indüklenmiş epilepsi çalışmalarında bildirilen proliferasyon indeksinde azalma ve apoptotik indeksteki artış ile uyumludur. Conei ve ark. intrauterin VPA uygulamasının testis gelişimine etkisini inceledikleri araştırmalarında, VPA uygulanan annelerin 6 haftalık yavrularında spermatogonyumlarda ve spermatositlerde PCNA pozitif hücrelerin azaldığını ve TUNEL pozitif hücrelerin arttığını bildirmiştir (Conei ve ark., 2021). Savran ve arkadaşları ise VPA'nın sağlıklı sıçanlarda OS'yi artırarak kaspaz-3 ekspresyonunda artışa sebep olduğunu göstermiştir (Savran ve ark. , 2020). Benzer şekilde, VPA uygulanan Wistar hayvanlarda PCNA ve Bcl-2 ekspresyonunu azaltırken, Bax sitokrom C, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-3 (bölünmüş) proteinlerinin ekspresyonlarını arttırmıştır. Öte yandan, GAERS hayvanlara uygulanan VPA, PCNA ve Bcl-2 ekspresyonlarını arttırırken, Bax, sitokrom C, kaspaz-8, kaspaz-3 (bölünmüş) proteinlerinin ekspresyonlarını azaltmıştır. Alyami ve ark. PTZ uygulanan farelerde Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunun arttığını, Bcl-2 ekspresyonunun azaldığını bildirmiş, artan Bax/Bcl-2 oranının, apoptozun mitokondriyal yolak üzerinden gerçekleştiğini ve mitokondriyal yolağın OS sebebiyle aktive olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada, PTZ enjeksiyonundan önce VPA uygulanan farelerde Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı, Bcl-2 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Alyami ve ark., 2022). Çalışmamızın sonuçları, literatürdeki diğer sonuçlara benzer şekilde VPA'nın genetik absans epilepsinin sebep olduğu apoptozu, epileptik nöbetlerin sebep olduğu OS'yi baskılayarak azalttığını düşündürmekte ve ileride bu mekanizmayı araştırarak çalışmaların planlanmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda GAERS sıçanlara timokinon uygulandığında proliferasyonun, GAERS kontrollere benzer seviyelerde olduğu fakat Bcl-2 ekspresyonunun artıp Bax, sitokrom C, kaspaz-8, kaspaz-3 (bölünmüş) proteinlerinin ekspresyonlarının azaldığı belirlenmiştir. VPA ve timokinonun eş zamanlı uygulaması ise proliferasyonu sağlıklı kontrol seviyelerine döndürmüş, Bcl-2 ekspresyonunu artırmış Bax, bcl-2, sitokrom C, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz- 3 (bölünmüş) proteinlerinin ekspresyonlarını azaltmıştır. Timokinon, birçok patofizyolojik durumda birden fazla faktörü hedef alarak etki göstermektedir. Literatürde hücre döngüsü, proliferasyon, apoptoz, anjiyogenez, sinir ve üreme sistemi üzerindeki etkileri kanıtlanmıştır (Güzelsoy ve ark., 2018a). Ayrıca, hücresel bileşenlerin oksidatif hasarını ve enflamatuvar yanıtları inhibe ettiği, metabolik süreçlerde yer alan proteinleri modüle ettiği bilinmektedir. Literatürde petit mal epilepsisinde (Hosseinzadeh & Parvardeh, 2004) ve dirençli epilepsi gösteren hastalarda (Akhondian ve ark., 2011) yapılan çalışmalarda, timokinonun antikonvülzan etkisi gösterilmiştir. Ayrıca timokinon uygulamasının, varikozel modelinde artan apoptotik indeksi, Bax ve sitokrom C ekspresyonunu ve Bax/Bcl-2 oranını azalttığı (Gur ve ark., 2021), TLE modelinde testis dokusunda azalan proliferasyonu artırdığı, artan apoptotik indeksi azalttığı gösterilmiştir (Karakaya ve ark. , 2021). Literatürdeki verilerle tutarlı olarak elde ettiğimiz sonuçlarla, timokinonun antikonvülzan ve antioksidan özelliği ile epileptik nöbetlerin sebep olduğu OS'yi azaltarak apoptozu önlemiş olabileceği düşünülmektedir.

Epilepsili erkeklerde endokrin bozukluklar yaygındır. Bu durumun hem epileptik nöbetlerden hem de AEİ'lerden kaynaklanığı düşünülmektedir (Taubøll ve ark., 2015). Testosteron, spermatojenik sürecin sürdürülmesi ve germ hücre apoptozunun inhibisyonu için gereklidir (Singh ve ark., 1995). Bu hormonun sentezi için kolesterol, Leydig hücresinin mitokondrisinde yer alan StAR proteini tarafından iç mitokondriyal membrana taşınır. Kolesterol, mitokondri içinde steroidogenezin ilk basamağı için substrattır (Naamneh Elzenaty ve ark. , 2022). StAR proteini, gonadal steroidler söz konusu olduğunda üreme kapasitesinin sürdürülmesinde, adrenal steroidler söz konusu olduğunda yaşam için gerekli olan steroid hormonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, incelenen hemen hemen her sistemde, StAR ifadesini etkileyen ajanlar endokrin, otokrin ve parakrin düzenleme yoluyla steroid biyosentezini de etkiler. Düzenleyici olaylardan bağımsız olarak çalışmalar, StAR proteininin sentezi ile çeşitli klasik (örn. adrenal ve gonadal) ve klasik olmayan (örn. glial ve epidermal)

steroidojenik dokularda steroid sentezi arasında sıkı bir ilişki olduğunu göstermiştir (Khalil ve ark., 2017). StAR'ın steroid hormon üretimi için gerekli olduğu ve StAR gen ekspresyonundaki azalmanın steroidogenezde azalmaya yol açtığı bilinmektedir (Leers-Sucheta ve ark., 1999). Literatürde, genetik absans epilepside StAR ekspresyonunun değişimi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Fakat florür (Abd-Allah & Abd El-Rahman, 2023), selenyum (Yildirim ve ark., 2024) ve nikel (Yang ve ark., 2021) kaynaklı testis hasarında StAR ekspresyonlarının azaldığı bildirilmiştir. TLE modeli oluşturduğumuz önceki çalışmamızda, StAR ekspresyonunun azaldığını tespit ettik (Karakaya ve ark. , 2021). Mevcut çalışmamızda da genetik absans epilepsili hayvanlarda, StAR ekspresyonunun azaldığını gösterdik. Literatürde, VPA'nın hem epileptik erkeklerde hem de deney hayvanlarında üreme parametrelerini ve hormonlarını azalttığı bildirilmiştir (Isojärvi, 2008). Alsemeh ve arkadaşları sıçanlara 100mg/kg, 300mg/kg ve 500 mg/kg VPA uygulamasının, ROS'u arttırarak testiküler StAR ekspresyonlarını doza bağlı olarak azalttığını rapor etmiştir (Alsemeh ve ark., 2022). Benzer şekilde mevcut çalışmamızda, VPA uygulaması sağlıklı hayvanlarda StAR ekspresyonlarını azaltmıştır. GAERS sıçanlarda ise StAR ekspresyonu, sağlıklı hayvanların tersine VPA uygulaması ile artmıştır. Bu sonuçlar, genetik absans epilepsili ve VPA uygulanan Wistar hayvanlarda steroidogenezin azaldığını göstermektedir. Bu gruplara uygulanan timokinon, StAR seviyelerini sağlıklı kontrollere benzer seviyelere getirmiştir. Sonuçlarımız, timokinonun antioksidan etkisiyle OS'yi azaltarak, steroidogenezi düzenlemiş olabileceğini düşündürmektedir.

Sertoli hücreleri, olgun spermatidlere dönüşene kadar gelişmekte olan germ hücrelerine beslenme ve mekanik destek sağlayarak spermatogenez sırasında postmayotik germ hücresi gelişimine katkı sağlamanın yanı sıra seminifer epiteli fiziksel olarak bazal (bariyerin dışında) ve adluminal (bariyerin arkasında) bölmelere ayıran KTB'yi oluşturur. Hücre içi ortamdaki anormalliklerin ve Sertoli hücre bağlantı kompleksindeki konneksin-43 (Cx43), kludin-5 ve -11, okludin ve ZO-1 gibi proteinlere verilen zararın, spermatogenez üzerinde doğrudan etkisi olan ve infertilite ile sonuçlanan KTB yıkımının birincil nedenleri olduğu bildirilmiştir (Elmas ve ark. , 2022; Xu ve ark., 2009). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar çevresel toksik etmenler, ısı, kemoterapötik ilaçlar, ve bazı hastalıkların aşırı ROS oluşumuna neden olduğunu (Agarwal, Durairajanayagam, ve ark., 2014) ve oluşan ROS'un Sertoli hücresinin yapısını ve

işlevini bozarak KTB'nin bütünlüğünün bozulmasına neden olduğunu göstermiştir (Yi ve ark., 2018; Wu ve ark., 2019). ROS'un Sertoli hücrelerinde yaygın apoptoza, ZO-1 ve Cx43 ekspresyonunda belirgin azalmaya (Yi ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2020) ve Sertoli hücrelerinin işlevini bozarak spermatogoniyal kök hücrelerin zarar görmesine neden olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2020). Kainik asit ile oluşturulan TLE modelinde kan beyin bariyerinin bütünlüğünü inceleyen bir çalışmada, epileptiform aktivitenin kainik asit enjeksiyonunu takip eden 2 saatten sonra ZO-1 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Morin-Brureau ve ark., 2011). Literatürde genetik absans epilepsinin KTB üzerine etkisini inceleyen bir araştırma mevcut değildir. Mevcut çalışmamızda KTB'nin bütünlüğünü incelemek için, sıkı bağlantıların üç ana proteininden biri olan ZO-1'in ekspresyonu western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Daha önce PTZ ile oluşturduğumuz TLE modelinde epilepsili hayvanların testis dokularında, ZO-1 proteininin ekspresyonunun azaldığını tespit ettik (Karakaya ve ark., 2021). Benzer olarak, bu çalışmamızda da GAERS hayvanların ZO-1 protein ekspresyonunun, sağlıklı hayvanlara kıyasla azaldığı belirlendi. Literatürde, VPA'nın spinal kord hasarı üzerindeki etkisi incelenmiş, okludin ve ZO-1 proteinlerinin ekspresyonlarını arttırıp matriks metalloproteaz-9 aktivitesini inhibe ederek kan-spinal kord bariyerini koruduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2012). Başka bir çalışma, VPA'nın ZO-1 ekspresyonunu arttırarak bağırsak bariyerinin işlev bozukluğunu engellediğini göstermiştir (Luo ve ark., 2013). Çalışmamızda VPA uygulaması, Wistar hayvanlarda ZO-1 ekspresyonunu azaltırken, GAERS hayvanlarda ZO-1 ekspresyonunu arttırarak KTB'nin bütünlüğünün korunmasına katkı sağlamıştır. Veriler, VPA'nın Wistar ve GAERS hayvanlar üzerinde farklı sonuçlanan etkisinin, epilepsi mekanizması üzerinden gerçekleştiğini işaret etmekte ve bu alanda yeni planlanacak çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır.

Literatürde, OS'yi önlediği için çeşitli antioksidan ilaçların kullanılmasının KTB hasarının hafifletilmesi ve/veya önlenmesi için potansiyel bir tedavi yöntemi olabileceği öne sürülmüştür (Gurel ve ark., 2019; Ye ve ark., 2019). Timokinonun genetik absans epilepsi modelinde, ZO-1 ekspresyonu ve KTB üzerine etkisini araştıran bir çalışma yoktur. TLE'de timokinonun etkisini incelediğimiz daha önceki çalışmamızda, timokinonun ZO-1 ekspresyonunu arttırdığını tespit ettik (Karakaya ve ark., 2021). Mevcut çalışmamızda, timokinon uygulamasının, VPA maruziyeti ile azalan ZO-1 ekspresyonunu arttırarak VPA toksisitesi sonucu oluşan KTB

hasarını önlediği belirlendi. GAERS hayvanlara uygulanan timokinon, VPA ve VPA ile eş zamanlı timokinon uygulamaları, genetik absans epilepside azalan ZO-1 proteininin ekspresyonunu arttırarak KTB'nin bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunmuştur. Bu sonuçlarımız, timokinonun VPA ile birlikte kullanımının KTB bariyerini korumak amaçlı tedavi potansiyeli taşıdığını göstermektedir.

Literatürde, genetik absans epilepsinin testis ve sperm parametreleri üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar çok sınırlıdır. Mevcut çalışmada genetik absans epilepsinin sperm morfolojisini azalttığı ve testis morfolojisini olumsuz etkilediği, germinal epitelde ve bazal membranda düzensizliklerin yanında germinal epitel kalınlığında ve seminifer tübüllerin histopatolojik skorlamasında azalmaya sebep olduğu, serum ve testis dokusunda TAS seviyelerini düşürüp TOS seviyelerini arttırarak OS'ye sebep olduğu, hücre proliferasyonunu azaltıp apoptozunu arttırdığı, ZO-1 ve StAR proteinlerinin ekspresyonlarını azaltarak KTB ve stereidogenezi etkilediği tespit edilmiştir.

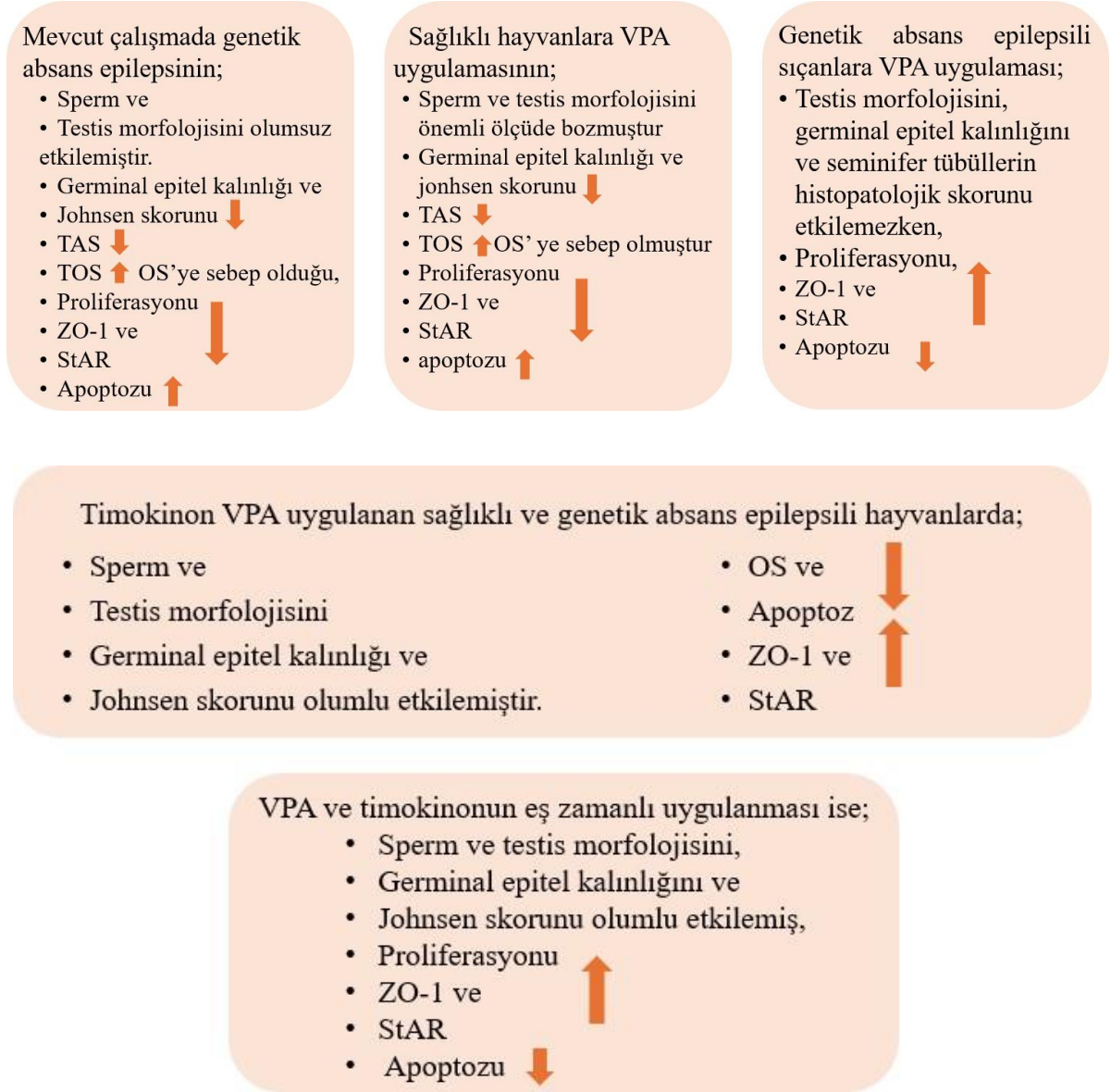
Sağlıklı hayvanlara VPA uygulamasının sperm ve testis morfolojisini önemli ölçüde bozduğunu normal morfolojili sperm sayısını azaltıp, baş, boyun, kuyruk anomalisi olan spermelerin sayısını arttırdığı germinal epitel kalınlığı ve seminifer tübül histopatolojik skorunu azalttığı görülmüştür. Ayrıca serum ve doku TAS seviyelerini düşürüp TOS seviyelerini yükselterek, OS'nin artmasına sebep olmuştur. Hücre proliferasyonu azalmış ve apoptoz artmıştır. ZO-1 proteinlerinin ekspresyonlarını azaltarak KTB'yi, StAR proteininin ekspresyonu azaltarak stereidogenezi olumsuz etkilemiştir.

VPA uygulanan sağlıklı hayvanlar ve genetik absans epilepsili hayvanlarda timokinon uygulaması sperm ve testis morfolojisini germinal epitel kalınlığı ve seminifer tübül histopatolojik skorunu olumlu etkilemiştir. OS ve apoptotik proteinlerin ekspresyonlarını azaltarak, VPA ve genetik absans epilepsiden kaynaklanan artmış apoptozu azaltmıştır; ZO-1 ve StAR ekspresyonlarını arttırarak KTB bütünlüğüne ve stereidogeneze olumlu katkı sağlamıştır.

Genetik absans epilepsili sıçanlara VPA uygulaması testis morfolojisini, germinal epitel kalınlığını ve seminifer tübüllerin histopatolojik skorunu etkilemezken, hücre proliferasyonunu, ZO-1 ve StAR ekspresyonlarını arttırıp apoptozu azaltmıştır. VPA ve timokinonun eş zamanlı uygulanması ise genetik absans epilepsi sonucu azalan sperm ve testis morfolojisini, germinal epitel kalınlığını ve seminifer tübül histopatolojik skorunu iyileştirmiş, azalan proliferasyonu ve artan apoptozu tersine çevirmiş, ZO-1 ile StAR proteinlerinin ekspresyonlarını arttırmıştır. Verilerimiz, timokinonun ve VPA'nın bu olumlu etkileri, epileptik nöbetler sonucu ortaya çıkan OS'yi azaltarak gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Çalışmamız, literatürde sınırlı bilgiler bulunan genetik absans epilepsinin sperm ve testis morfolojisi, OS parametreleri, apoptoz, proliferasyon, ZO-1 ve StAR proteinlerinin ekspresyonları açısından araştıran ve bu parametreler üzerinde timokinon ve VPA'nın tek başına ve eş zamanlı uygulamasını değerlendiren ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır. Çalışma sonuçlarımız, hem genetik absans epilepsi sonucu oluşan hem de AEİ kullanımına bağlı gelişebilen testis hasarını önlemek ve sperm parametrelerini korumak için VPA ve timokinonun beraber kullanımının faydalı olabileceğini göstermektedir (Şekil 46.)

Şekil 46. Çalışmadan elde edilen verilerin özet halinde gösterimi.



8. KAYNAKLAR

- Abd-Allah, E. R., & Abd El-Rahman, H. A. (2023). Ameliorative effects of nano Moringa on fluoride-induced testicular damage via down regulation of the StAR gene and altered steroid hormones. *Reproductive Biology*, 23(1), 100724. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2022.100724>
- Agarwal, A., Durairajanayagam, D., Halabi, J., Peng, J., & Vazquez-Levin, M. (2014). Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 29(1), 32-58. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.013>
- Agarwal, A., & Said, T. M. (2005). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU international*, 95(4), 503-507. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05328.x>
- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility*, 79(4), 829-843. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
- Agarwal, A., Sharma, R. K., Sharma, R., Assidi, M., Abuzenadah, A. M., Alshahrani, S., Durairajanayagam, D., & Sabanegh, E. (2014). Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-33>
- Aitken, R. J., & Curry, B. J. (2011). Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants & redox signaling*, 14(3), 367-381. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3186>
- Akhondian, J., Kianifar, H., Raoofziaee, M., Moayedpour, A., Toosi, M. B., & Khajedaluee, M. (2011). The effect of thymoquinone on intractable pediatric seizures (pilot study). *Epilepsy Res*, 93(1), 39-43. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.10.010>
- Alsemeh, A. E., Ahmed, M. M., Fawzy, A., Samy, W., Tharwat, M., & Rezq, S. (2022). Vitamin E rescues valproic acid-induced testicular injury in rats: Role of autophagy. *Life Sciences*, 296, 120434. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120434>
- Aly, E. K., Mahmoud, H. S., Alkhalifah, D. H. M., Shehab, G. M. G., Abuelsaad, A. S. A., Abdel-Rehiem, E. S., & Abdul-Hamid, M. (2023). Bee venom ameliorates oxidative stress and histopathological changes of hippocampus, liver and testis during status epilepticus. *Neuropeptides*, 101, 102368. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2023.102368>
- Alyami, N. M., Abdi, S., Alyami, H. M., & Almeer, R. (2022). Proanthocyanidins alleviate pentylentetrazole-induced epileptic seizures in mice via the antioxidant activity.

- Athayde, K. S., Cocuzza, M., Agarwal, A., Krajcir, N., Lucon, A. M., Srougi, M., & Hallak, J. (2007). Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *Journal of andrology*, 28(4), 613-620. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.001966>
- Atli Eklioglu, O., & Ilgin, S. (2022). Adverse effects of antiepileptic drugs on hormones of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in males: A review. *Toxicology*, 465, 153043. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.153043>
- Aziz, N., Saleh, R. A., Sharma, R. K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas Jr, A. J., & Agarwal, A. (2004). Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and sterility*, 81(2), 349-354. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.06.026>
- Badawi, G. A., Shokr, M. M., Zaki, H. F., & Mohamed, A. F. (2021). Pentoxifylline prevents epileptic seizure via modulating HMGB1/RAGE/TLR4 signalling pathway and improves memory in pentylenetetrazol kindling rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 48(8), 1111-1124. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13508>
- Berg, A. T., Shinnar, S., Levy, S. R., & Testa, F. M. (1999). Newly diagnosed epilepsy in children: Presentation at diagnosis. *Epilepsia*, 40(4), 445-452. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1999.tb00739.x>
- Blaheta, R. A., Nau, H., & Michaelis, M. (2002). Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 9(15), 1417-1433. <https://doi.org/10.2174/0929867023369763>
- Bolanos, J. P., & Medina, J. M. (1997). Effect of valproate on the metabolism of the central nervous system. *Life Sci*, 60(22), 1933-1942. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(96\)00687-x](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(96)00687-x)
- Calabresi, P., Galletti, F., Rossi, C., Sarchielli, P., & Cupini, L. M. (2007). Antiepileptic drugs in migraine: from clinical aspects to cellular mechanisms. *Trends in pharmacological sciences*, 28(4), 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.02.005>
- Can Kantarci, B., Sanli, A., Gavas, S., Toplu, A., Nur Turgan Asik, Z., Tugce Cilingir- Kaya, O., Gulcebi Idrizoglu, M., Ercan, F., & Onat, F. (2022). Effects of in utero exposure to valproate or levetiracetam on the seizures and newborn histopathology of genetic absence epilepsy rats. *Neurosci Lett*, 776, 136574. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136574>
- Cao, X. N., Shen, L. J., Yan, C., Zhou, Y., Xiong, G., Wang, Y. C., Liu, Y., Liu, B., Tang, X. L., & Guo, M. (2017). Urban fine particulate matter exposure causes male reproductive injury through destroying blood-testis barrier (BTB) integrity. *Toxicology letters*, 266, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.004>

- Carraz, G., Fau, R., Chateau, R., & Bonnin, J. (1964). Communication concerning 1st clinical tests of the anticonvulsive activity of N-dipropylacetic acid (sodium salt). *Annales Medico-Psychologiques*, 122, 577-585.
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev*, 64(1), 16-64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>
- Chihara, M., Otsuka, S., Ichii, O., Hashimoto, Y., & Kon, Y. (2010). Molecular dynamics of the blood-testis barrier components during murine spermatogenesis. *Mol Reprod Dev*, 77(7), 630-639. <https://doi.org/10.1002/mrd.21200>
- Cilingir-Kaya, O. T., Moore, C., Meshul, C. K., Gursoy, D., Onat, F., & Sirvanci, S. (2021). Neurogenesis is Enhanced in Young Rats with Genetic Absence Epilepsy: An Immunoelectron Microscopic Study. *Turkish Neurosurgery*, 31(4), 623-633. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.Jtn.31996-20.2>
- Conei, D., Rojas, M., Santamaría, L., & Risopatrón, J. (2021). Protective role of vitamin E in testicular development of mice exposed to valproic acid. *Andrologia*, 53(8), e14140. <https://doi.org/10.1111/and.14140>
- Cramer, J. A., & Jones, E. E. (1991). Reproductive function in epilepsy. *Epilepsia*, 32(69), 19-26. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1991.tb05887.x>
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00046-7)
- Danober, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M., & Marescaux, C. (1998). Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Progress in neurobiology*, 55(1), 27-57. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00091-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00091-9)
- Darakhshan, S., Pour, A. B., Colagar, A. H., & Sisakhtnezhad, S. (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol Res*, 95-96, 138-158. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.03.011>
- Davis, R., Peters, D. H., & McTavish, D. (1994). Valproic acid. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs*, 47(2), 332-372.
- Degli-Esposti, M. (1999). To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol*, 65(5), 535-542. <https://doi.org/10.1002/jlb.65.5.535>
- Depaulis, A., & Charpier, S. (2018). Pathophysiology of absence epilepsy: Insights from genetic models. *Neuroscience Letters*, 667, 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.02.035>

- Depaulis, A., David, O., & Charpier, S. (2016). The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *Journal of neuroscience methods*, 260, 159-174. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.05.022>
- Desai, N., Sharma, R., Makker, K., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2009). Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertility and sterility*, 92(5), 1626-1631. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.109>
- Elmas, M. A., Ozakpinar, O. B., Kolgazi, M., Sener, G., Arbak, S., & Ercan, F. (2022). Exercise improves testicular morphology and oxidative stress parameters in rats with testicular damage induced by a high-fat diet. *Andrologia*, 54(11), e14600. <https://doi.org/10.1111/and.14600>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Emrich, H. (1981). Therapeutic effect of valproate in mania. *American Journal of Psychiatry*, 138(2), 256-256. <https://doi.org/10.1176/ajp.138.2.256>
- Erboga, M., Aktas, C., Kurt, O., Uygur, R., Caglar, V., Turan, B. C., Topcu, B., Fidanol Erboga, Z., Gurel, A., & Ozen, O. A. (2016). Protective effects of thymoquinone on experimental testicular ischaemia-reperfusion injury: an apoptotic, proliferative and biochemical study. *Andrologia*, 48(2), 222-230. <https://doi.org/10.1111/and.12436>
- Essawy, A. E., El-Sayed, S. A., Tousson, E., Abd El-Gawad, H. S., Alhasani, R. H., & Abd Elkader, H. A. E. (2022). Anti-kindling effect of Ginkgo biloba leaf extract and L-carnitine in the pentylenetetrazol model of epilepsy. *Environ Sci Pollut Res Int*. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19251-6>
- Eşrefoğlu, M. (2021). Özel Histoloji (Geliştirilmiş 3. Baskı). İstanbul Tıp Kitabevleri.
- Ethemoglu, O., Calık, M., Koyuncu, I., Ethemoglu, K. B., Göcmen, A., Güzelcicek, A., & Cadırcı, D. (2021). Interleukin-33 and oxidative stress in epilepsy patients. *Epilepsy Research*, 176, 106738. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2021.106738>
- Fatima Shad, K., Soubra, W., & Cordato, D. J. (2021). The role of thymoquinone, a major constituent of Nigella sativa, in the treatment of inflammatory and infectious diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 48(11), 1445-1453. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13553>
- Filipkowski, R. K., Hetman, M., Kaminska, B., & Kaczmarek, L. (1994). DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *Neuroreport*, 5(12), 1538-1540. <https://doi.org/10.1097/00001756-199407000-00032>

- Fouad, A. A., & Jresat, I. (2015). Thymoquinone therapy abrogates toxic effect of cadmium on rat testes. *Andrologia*, 47(4), 417-426. <https://doi.org/10.1111/and.12281>
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., & Debatin, K. M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med*, 2(5), 574-577. <https://doi.org/10.1038/nm0596-574>
- Genton, P., Guerrini, R., & Perucca, E. (2001). Tiagabine in clinical practice. *Epilepsia*, 42, 42-45. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.042suppl.3042.x>
- Geronzi, U., Lotti, F., & Grosso, S. (2018). Oxidative stress in epilepsy. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 18(5), 427-434. <https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1465410>
- Ghodke-Puranik, Y., Thorn, C. F., Lamba, J. K., Leeder, J. S., Song, W., Birnbaum, A. K., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2013). Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*, 23(4), 236-241. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835ea0b2>
- Girish, C., Shweta, O., Raj, V., Balakrishnan, S., & Varghese, R. G. b. (2014). Ellagic acid modulates sodium valproate induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 58(4), 416-422.
- Gokce, A., Oktar, S., Koc, A., & Yonden, Z. (2011). Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. *Hum Exp Toxicol*, 30(8), 897-903. <https://doi.org/10.1177/09603271110382564>
- Gozen, A., Demiryurek, S., Taskin, A., Ciralik, H., Bilinc, H., Kara, S., Aydin, A., Aksoy, N., & Ceylan, H. (2013). Protective activity of ischemic preconditioning on rat testicular ischemia: effects of Y-27632 and 5-hydroxydecanoic acid. *Journal of Pediatric Surgery*, 48(7), 1565-1572. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.10.074>
- Gur, F. M., Timurkaan, S., Taskin, E., Guven, C., Gur, H. E., Senturk, M., Dastan, S., Nurdinov, N., Unalan, A., Cankut, S., & Tatyuz, I. (2021). Thymoquinone improves testicular damage and sperm quality in experimentally varicocele-induced adolescent rats. *Andrologia*, 53(5), e14033. <https://doi.org/10.1111/and.14033>
- Gürsoy Gürgen, D., Çilingir Kaya, Ö. T., & Şırvancı, S. (2021). Gamma-amino butyric acid immunoreactivity in the testis tissue of wistar and genetic absence epilepsy rats. *International Journal of Morphology*. 39(6), 1709-1718. <https://hdl.handle.net/20.500.12511/8738>
- Güzelsoy, P., Aydın, S., & Başaran, N. (2018a). Çörek otunun (*Nigella sativa* L.) aktif bileşeni timokinonun insan sağlığı üzerine olası etkileri. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 7(2), 118-135. <https://doi.org/10.5336/pharmsci.2018-59816>

- Güzelsoy, P., Aydın, S., & Başaran, N. (2018b). Çörek otunun (*Nigella sativa* L.) aktif bileşeni timokinonun insan sağlığı üzerine olası etkileri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 7(2), 118-135. <https://doi.org/10.5336/pharmsci.2018-59816>
- Hamed, S. A. (2016). The effect of epilepsy and antiepileptic drugs on sexual, reproductive and gonadal health of adults with epilepsy. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 9(6), 807-819. <https://doi.org/10.1586/17512433.2016.1160777>
- Hamza, A. A., & Amin, A. (2007). Apium graveolens modulates sodium valproate-induced reproductive toxicity in rats. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 307(4), 199-206. <https://doi.org/10.1002/jez.357>
- Henry, T. R. (2003). The history of valproate in clinical neuroscience. *Psychopharmacology bulletin*, 37, 5-16.
- Henshall, D. C., & Simon, R. P. (2005). Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(12), 1557-1572. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600149>
- Herzog, A. G. (2008). Disorders of reproduction in patients with epilepsy: Primary neurological mechanisms. *Seizure-European Journal of Epilepsy*, 17(2), 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2007.11.025>
- Herzog, A. G., Drislane, F. W., Schomer, D. L., Pennell, P. B., Bromfield, E. B., Dworetzky, B. A., Farina, E. L., & Frye, C. A. (2005). Differential effects of antiepileptic drugs on sexual function and reproductive hormones in men with epilepsy. *Neurology*, 64(6), A116- A116. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000178988.78039.40>
- Herzog, A. G., Drislane, F. W., Schomer, D. L., Pennell, T. B., Bromfield, T. B., Kelly, K. M., Farina, E. L., & Frye, C. A. (2004). Differential effects of antiepileptic drugs on sexual function and reproductive hormones in men with epilepsy: Interim analysis of a comparison between lamotrigine and enzyme-inducing antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 45(7), 764-768. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.60703.x>
- Herzog, A. G., Seibel, M. M., Schomer, D. L., Vaitukaitis, J. L., & Geschwind, N. (1986a). Reproductive Endocrine Disorders in Men with Partial Seizures of Temporal-Lobe Origin. *Archives of Neurology*, 43(4), 347-350. <https://doi.org/DOI 10.1001/archneur.1986.00520040035015>
- Herzog, A. G., Seibel, M. M., Schomer, D. L., Vaitukaitis, J. L., & Geschwind, N. (1986b). Reproductive endocrine disorders in men with partial seizures of temporal lobe origin. *Arch Neurol*, 43(4), 347-350. <https://doi.org/10.1001/archneur.1986.00520040035015>
- Herzog, A. G., Seibel, M. M., Schomer, D. L., Vaitukaitis, J. L., & Geschwind, N. (1986c). Reproductive endocrine disorders in women with partial seizures of temporal lobe origin. *Arch Neurol*, 43(4), 341-346. <https://doi.org/10.1001/archneur.1986.00520040029014>

- Hosseinzadeh, H., & Parvardeh, S. (2004). Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine*, 11(1), 56-64. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00376>
- Iamsaard, S., Sukhorum, W., Arun, S., Phunchago, N., Uabundit, N., Boonruangsri, P., & Namking, M. (2017). Valproic acid induces histologic changes and decreases androgen receptor levels of testis and epididymis in rats. *Int J Reprod Biomed*, 15(4), 217-224. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28835938>
- Inoue, M., Van Luijckelaar, E., Vossen, J., & Coenen, A. (1992). Visual evoked potentials during spontaneously occurring spike-wave discharges in rats. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section*, 84(2), 172-179. [https://doi.org/10.1016/0168-5597\(92\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0168-5597(92)90022-4)
- Isojarvi, J. (2008). Disorders of reproduction in patients with epilepsy: antiepileptic drug related mechanisms. *Seizure*, 17(2), 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2007.11.007>
- Isojarvi, J., Lofgren, E., Juntunen, K., Pakarinen, A., Paivansalo, M., Rautakorpi, I., & Tuomivaara, L. (2004). Effect of epilepsy and antiepileptic drugs on male reproductive health. *Neurology*, 62(2), 247-253. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000098936.46730.64>
- Isojarvi, J. I., Laatikainen, T. J., Pakarinen, A. J., Juntunen, K. T., & Myllyla, V. V. (1993). Polycystic ovaries and hyperandrogenism in women taking valproate for epilepsy. *N Engl J Med*, 329(19), 1383-1388. <https://doi.org/10.1056/NEJM199311043291904>
- Javidi, S., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2016). A review of Neuropharmacology Effects of *Nigella sativa* and Its Main Component, Thymoquinone. *Phytother Res*, 30(8), 1219-1229. <https://doi.org/10.1002/ptr.5634>
- Johnsen, S. G. (1970). Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormone Research in Paediatrics*, 1(1), 2-25. <https://doi.org/10.1159/000178170>
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G., & Penninger, J. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), 549-554. <https://doi.org/10.1038/35069004>
- Karakaya, F. B., Yavuz, M., & Sirvanci, S. (2021). Histological analysis of the effects of thymoquinone on testicular damage in pentylenetetrazole-induced temporal lobe epilepsy model. *Andrologia*, 53(10). <https://doi.org/10.1111/and.14130>
- Kenjale, R., Shah, R., & Sathaye, S. (2008). Effects of *Chlorophytum borivilianum* on sexual behaviour and sperm count in male rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*,

- Khalil, S. R., Awad, A., & Ali, S. A. (2017). Melamine and/or formaldehyde exposures affect steroidogenesis via alteration of StAR protein and testosterone synthetic enzyme expression in male mice. *Environ Toxicol Pharmacol*, 50, 136-144. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.018>
- Khan, S., Ahmad, T., Parekh, C. V., Trivedi, P. P., Kushwaha, S., & Jena, G. (2011). Investigation on sodium valproate induced germ cell damage, oxidative stress and genotoxicity in male Swiss mice. *Reproductive Toxicology*, 32(4), 385-394. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.09.007>
- Kolahdooz, M., Nasri, S., Modarres, S. Z., Kianbakht, S., & Huseini, H. F. (2014). Effects of *Nigella sativa* L. seed oil on abnormal semen quality in infertile men: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine*, 21(6), 901-905. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.02.006>
- Kose-Ozlece, H., Ilik, F., Cecen, K., Huseyinoglu, N., & Serim, A. (2015). Alterations in semen parameters in men with epilepsy treated with valproate. *Iranian Journal of Neurology*, 14(3), 164-167.
- Lagace, D. C., O'Brien, W. T., Gurvich, N., Nachtigal, M. W., & Klein, P. S. (2004). Valproic acid: how it works. Or not. *Clinical Neuroscience Research*, 4(3-4), 215-225. <https://doi.org/10.1016/j.cnr.2004.09.013>
- Lee, J. Y., Kim, H. S., Choi, H. Y., Oh, T. H., Ju, B. G., & Yune, T. Y. (2012). Valproic acid attenuates blood-spinal cord barrier disruption by inhibiting matrix metalloproteinase-9 activity and improves functional recovery after spinal cord injury. *Journal of neurochemistry*, 121(5), 818-829. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07731.x>
- Leers-Sucheta, S., Stocco, D. M., & Azhar, S. (1999). Down-regulation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in rat Leydig cells: implications for regulation of testosterone production during aging. *Mechanisms of ageing and development*, 107(2), 197- 203. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(98\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00149-3)
- Lehrman, G., Hogue, I. B., Palmer, S., Jennings, C., Spina, C. A., Wiegand, A., Landay, A. L., Coombs, R. W., Richman, D. D., & Mellors, J. W. (2005). Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *The Lancet*, 366(9485), 549-555. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67098-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67098-5)
- Lerman, P. (1986). Seizures induced or aggravated by anticonvulsants. *Epilepsia*, 27(6), 706-710. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1986.tb03598.x>
- Li, L., Gao, Y., Chen, H., Jesus, T., Tang, E., Li, N., Lian, Q., Ge, R. S., & Cheng, C. Y. (2017). Cell polarity, cell adhesion, and spermatogenesis: role of cytoskeletons. *F1000Res*, 6, 1565. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11421.1>

- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80434-1)
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1), 147-157. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80085-9)
- Luo, H.-M., Du, M.-H., Lin, Z.-L., Zhang, L., Ma, L., Wang, H., Yu, W., Lv, Y., Lu, J.-Y., & Pi, Y.-L. (2013). Valproic acid treatment inhibits hypoxia-inducible factor 1 α accumulation and protects against burn-induced gut barrier dysfunction in a rodent model. *PloS one*, 8(10), e77523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077523>
- Lyon, M. F., Glenister, P. H., & Lamoreux, M. L. (1975). Normal spermatozoa from androgen-resistant germ cells of chimaeric mice and the role of androgen in spermatogenesis. *Nature*, 258(5536), 620-622. <https://doi.org/10.1038/258620a0>
- Manning, J. P., Richards, D. A., & Bowery, N. G. (2003). Pharmacology of absence epilepsy. *Trend Pharmacol Sci*, 24(10), 542-549. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.08.006>
- Marescaux, C., Vergnes, M., & Depaulis, A. (1992). Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg—a review. *Generalized Non-Convulsive Epilepsy: Focus on GABA-B Receptors*, 37-69. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9206-1_4
- Menon, B., Ramalingam, K., & Kumar, R. V. (2014). Low plasma antioxidant status in patients with epilepsy and the role of antiepileptic drugs on oxidative stress. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 17(4), 398-404. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.144008>
- Mescher, A. L. (2009). Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas. (12. ed.). McGraw-Hill & Lange.
- Meunier, H. (1963). Propriétés pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacétique et de la mémoire: propriétés antiepileptiques. *Thérapie*, 18, 435-438. <https://doi.org/10024204071>
- Mirsky, A., & Tecce, J. (1968). The analysis of visual evoked potentials during spike and wave EEG activity. *Epilepsia*, 9(3), 211-220. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1968.tb04621.x>
- Moe, O. W., Wright, S. H., & Palacín, M. (2008). Renal handling of organic solutes. *Brenner and Rector's The Kidney (8th ed., pp.214-247.)*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Mohamed, H. K., & Eltony, S. A. (2020). Effect of acute pentylenetetrazol injection induced epileptic seizures on rat dentate gyrus at different postnatal ages. *Anatomy & Cell Biology*, 53(1), 84. <https://doi.org/10.5115/acb.19.083>

- Montouris, G., & Morris, G. L., 3rd. (2005). Reproductive and sexual dysfunction in men with epilepsy, *Epilepsy Behav*, 7 (2), 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2005.08.026>
- Morin-Brureau, M., Lebrun, A., Rousset, M. C., Fagni, L., Bockaert, J., de Bock, F., & Lerner-Natoli, M. (2011). Epileptiform activity induces vascular remodeling and zonula occludens 1 downregulation in organotypic hippocampal cultures: role of VEGF signaling pathways. *J Neurosci*, 31(29), 10677-10688. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5692-10.2011>
- Morrell, M. J., & Montouris, G. D. (2004). Reproductive disturbances in patients with epilepsy. *Cleve Clin J Med.*, 71(2), 19-24. https://doi.org/10.3949/ccjm.71.suppl_2.s19
- Naamneh Elzenaty, R., du Toit, T., & Fluck, C. E. (2022). Basics of androgen synthesis and action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 36(4), 101665. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2022.101665>
- Nishimura, T., Sakai, M., & Yonezawa, H. (2000). Effects of valproic acid on fertility and reproductive organs in male rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 25(2), 85-93. <https://doi.org/10.2131/jts.25.85>
- Ocek, L., Tarhan, H., Uludag, F. I., Sariteke, A., Kose, C., Colak, A., Zorlu, F., & Zorlu, Y. (2018). Evaluation of sex hormones and sperm parameters in male epileptic patients. *Acta Neurol Scand*, 137(4), 409-416. <https://doi.org/10.1111/ane.12892>
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7), 552-565. <https://doi.org/10.1038/nrm1150>
- Ourique, G. M., Saccol, E. M., Pes, T. S., Glanzner, W. G., Schiefelbein, S. H., Woehl, V. M., Baldissotto, B., Pavanato, M. A., Goncalves, P. B., & Barreto, K. P. (2016). Protective effect of vitamin E on sperm motility and oxidative stress in valproic acid treated rats. *Food Chem Toxicol*, 95, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.011>
- Ourique, G. M., Saccol, E. M., Pês, T. S., Glanzner, W. G., Schiefelbein, S. H., Woehl, V. M., Baldissotto, B., Pavanato, M. A., Gonçalves, P. B., & Barreto, K. P. (2016). Protective effect of vitamin E on sperm motility and oxidative stress in valproic acid treated rats. *Food and Chemical Toxicology*, 95, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.011>
- Öztürk, E., Kaymak, E., Akin, A. T., Karabulut, D., Ünsal, H. M., & Yakan, B. (2020). Thymoquinone is a protective agent that reduces the negative effects of doxorubicin in rat testis. *Human & Experimental Toxicology*, 39(10), 1364-1373. <https://doi.org/10.1177/0960327120924108>
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., & Dixit, V. M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 276(5309), 111-113. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.111>

- Panayiotopoulos, C. (1999). Typical absence seizures and their treatment. *Archives of disease in childhood*, 81(4), 351-355. <https://doi.org/10.1136/adsc.81.4.351>
- Panayiotopoulos, C. (2001). Treatment of typical absence seizures and related epileptic syndromes. *Paediatric drugs*, 3, 379-403. <https://doi.org/10.2165/00128072-200103050-00006>
- Pawlina, W., & Ross, M. H. (2018). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology* (6th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Polster, B. M., & Fiskum, G. (2004). Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem*, 90(6), 1281-1289. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02572.x>
- Pottoo, F. H., Ibrahim, A. M., Alammari, A., Alsinan, R., Aleid, M., Alshehhi, A., Alshehri, M., Mishra, S., & Alhajri, N. (2022). Thymoquinone: Review of Its Potential in the Treatment of Neurological Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/ph15040408>
- Sahin, Z., Ozkaya, A., Cuce, G., Uckun, M., & Yologlu, E. (2017). Investigation of the effect of naringenin on oxidative stress-related alterations in testis of hydrogen peroxide-administered rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(9), e21928. <https://doi.org/10.1002/jbt.21928>
- Sakai, Y., Aminaka, M., Takata, A., Kudou, Y., Yamauchi, H., Aizawa, Y., & Sakagami, H. (2010). Oxidative stress in mature rat testis and its developmental changes. *Development, growth & differentiation*, 52(7), 657-663. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01201.x>
- Salahshoor, M. R., Haghjoo, M., Roshankhah, S., Makalani, F., & Jalili, C. (2018). Effect of Thymoquinone on Reproductive Parameter in Morphine-treated Male Mice. *Adv Biomed Res*, 7, 18. https://doi.org/10.4103/abr.abr_69_17
- Sarkar, C., Jamaddar, S., Islam, T., Mondal, M., Islam, M. T., & Mubarak, M. S. (2021). Therapeutic perspectives of the black cumin component thymoquinone: A review. *Food Funct*, 12(14), 6167-6213. <https://doi.org/10.1039/d1fo00401h>
- Sarkisova, K., & van Luijckelaar, G. (2011). The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Progress in Neuro- Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(4), 854-876. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010>
- Savran, M., Asci, H., Armagan, İ., Erzurumlu, Y., Azırak, S., Kaya Ozer, M., Bilgic, S., & Korkmaz, D. T. (2020). Thymoquinone could be protective against valproic acid-induced testicular toxicity by antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Andrologia*, 52(7),

- Sayed, M. M., Hassanein, K. M. A., & Senosy, W. (2014). Protective effects of thymoquinone and l-cysteine on cadmium-induced reproductive toxicity in rats. *Toxicol Rep*, 1, 612-620. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.08.001>
- Schneider-Stock, R., Fakhoury, I. H., Zaki, A. M., El-Baba, C. O., & Gali-Muhtasib, H. U. (2014). Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug Discov Today*, 19(1), 18-30. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.08.021>
- Schwartz, C., Palissot, V., Aouali, N., Wack, S., Brons, N. H., Leners, B., Bosseler, M., & Berchem, G. (2007). Valproic acid induces non-apoptotic cell death mechanisms in multiple myeloma cell lines. *Int J Oncol*, 30(3), 573-582. <https://doi.org/10.3892/ijo.30.3.573>
- Sener, T. E., Atasoy, B. M., Cevik, O., Kaya, O. T. C., Cetinel, S., Degerli, A. D., & Sener, G. (2021). Effects of resveratrol against scattered radiation-induced testicular damage in rats. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi*, 46(4), 425-433. <https://doi.org/10.1515/tjb-2020-0320>
- Shin, E. J., Jeong, J. H., Chung, Y. H., Kim, W. K., Ko, K. H., Bach, J. H., Hong, J. S., Yoneda, Y., & Kim, H. C. (2011). Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochemistry international*, 59(2), 122-137. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.03.025>
- Shokri, S., Kazemi, M., Firouzjaei, M., Hemadi, M., Moayeri, A., Ganjkhani, M., & Nejatbakhsh, R. (2015). Melatonin protects testes against lithium-pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in rats: a time course study. *Andrologia*, 47(3), 343-353. <https://doi.org/10.1111/and.12269>
- Shukla, K. K., Mahdi, A. A., & Rajender, S. (2012). Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4(2), 746-754. <https://doi.org/10.2741/415>
- Singh, M., Meyer, E. M., & Simpkins, J. W. (1995). The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology*, 136(5), 2320-2324. <https://doi.org/10.1210/en.136.5.2320>
- Sirvanci, S., Akakin, D., Idrizoglu, M. G., Kaya, O. T., Karamahmutoglu, T., Asik, Z. N. T., & Onat, F. (2020). Ultrastructural GABA immunogold labeling in the substantia nigra pars reticulata of kindled genetic absence epilepsy rats. *Ultrastructural Pathology*, 44(4-6), 379-386. <https://doi.org/10.1080/01913123.2020.1839153>
- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol*, 30, 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>
- Tao, S., Wang, L., Zhu, Z., Liu, Y., Wu, L., Yuan, C., Zhang, G., & Wang, Z. (2019). Adverse

effects of bisphenol A on Sertoli cell blood-testis barrier in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 475-483. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.007>

- Tariot, P. N., Loy, R., Ryan, J. M., Porsteinsson, A., & Ismail, S. (2002). Mood stabilizers in Alzheimer's disease: symptomatic and neuroprotective rationales. *Advanced drug delivery reviews*, 54(12), 1567-1577. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00153-9)
- Taubøll, E., Sveberg, L., & Svalheim, S. (2015). Interactions between hormones and epilepsy. *Seizure*, 28, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2015.02.012>
- Temkin, O. (1994). *The falling sickness: a history of epilepsy from the Greeks to the beginnings of modern neurology*. JHU Press.
- Terbach, N., & Williams, R. S. (2009). Structure–function studies for the panacea, valproic acid. *Biochemical Society Transactions*, 37(5), 1126-1132. <https://doi.org/10.1042/BST0371126>
- Tsai, M. Y., Yeh, S. D., Wang, R. S., Yeh, S., Zhang, C., Lin, H. Y., Tzeng, C. R., & Chang, C. (2006). Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(50), 18975-18980. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608565103>
- Tufek, N. H., Altunkaynak, M. E., Altunkaynak, B. Z., & Kaplan, S. (2015). Effects of thymoquinone on testicular structure and sperm production in male obese rats. *Syst Biol Reprod Med*, 61(4), 194-204. <https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1044135>
- Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell biochemistry and function*, 29(6), 468-480. <https://doi.org/10.1002/cbf.1774>
- Van Luijtelaar, E., & Coenen, A. (1986). Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats. *Neuroscience letters*, 70(3), 393-397. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90586-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90586-0)
- Van Luijtelaar, G., & Sitnikova, E. (2006). Global and focal aspects of absence epilepsy: The contribution of genetic models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(7), 983-1003. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.03.002>
- VandenPol, A. N., Obrietan, K., & Belousov, A. (1996). Glutamate hyperexcitability and seizure-like activity throughout the brain and spinal cord upon relief from chronic glutamate receptor blockade in culture. *Neuroscience*, 74(3), 653-674. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00153-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00153-4)
- Vergnes, M., Marescaux, C., Micheletti, G., Reis, J., Depaulis, A., Rumbach, L., & Warter, J. (1982). Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neuroscience letters*, 33(1), 97-101. <https://doi.org/10.1016/0304->

- Wallace, H., Shorvon, S., & Tallis, R. (1998). Age-specific incidence and prevalence rates of treated epilepsy in an unselected population of 2,052,922 and age-specific fertility rates of women with epilepsy. *Lancet*, 352(9145), 1970-1973. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04512-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04512-7)
- Wang, R. S., Yeh, S., Tzeng, C. R., & Chang, C. (2009). Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 30(2), 119-132. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0025>
- Wang, X., Huang, S., Liu, Y., Li, D., Dang, Y., & Yang, L. (2021). Effects of ketogenic diet on cognitive function in pentylenetetrazol-kindled rats. *Epilepsy Res*, 170, 106534. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2020.106534>
- Webber, M. P., Hauser, W. A., Ottman, R., & Annegers, J. F. (1986). Fertility in persons with epilepsy: 1935-1974. *Epilepsia*, 27(6), 746-752. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1986.tb03605.x>
- Wu, Y., Wang, Y., Wu, Y., Li, T., & Wang, W. (2020). Salidroside shows anticonvulsant and neuroprotective effects by activating the Nrf2-ARE pathway in a pentylenetetrazol-kindling epileptic model. *Brain Research Bulletin*, 164, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.08.009>
- Xiaotian, X., Hengzhong, Z., Yao, X., Zhipan, Z., Daoliang, X., & Yumei, W. (2013). Effects of antiepileptic drugs on reproductive endocrine function, sexual function and sperm parameters in Chinese Han men with epilepsy. *Journal of clinical Neuroscience*, 20(11), 1492-1497. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2012.11.028>
- Xu, J. L., Anuar, F., Ali, S. M., Ng, M. Y., Phua, D. C. Y., & Hunziker, W. (2009). Zona Occludens-2 Is Critical for Blood-Testis Barrier Integrity and Male Fertility. *Molecular Biology of the Cell*, 20(20), 4268-4277. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-12-1236>
- Yaghutian Nezhad, L., Mohseni Kouchesfahani, H., Alaei, S., & Bakhtari, A. (2021). Thymoquinone ameliorates bleomycin-induced reproductive toxicity in male Balb/c mice. *Human & Experimental Toxicology*, 40(12), S611-S621. <https://doi.org/10.1177/09603271211048184>
- Yan, H. H., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2008). Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(6), 1945. <https://doi.org/10.1096/fj.06-070342>
- Yang, Y., Zuo, Z., Yang, Z., Yin, H., Wei, L., Fang, J., Guo, H., Cui, H., Ouyang, P., & Chen, X. (2021). Nickel chloride induces spermatogenesis disorder by testicular damage and

hypothalamic-pituitary-testis axis disruption in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 225, 112718. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112718>

Yerby, M. S., & McCoy, G. B. (1999). Male infertility: possible association with valproate exposure. *Epilepsia*, 40(4), 520-521. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1999.tb00752.x>

Yildirim, S., Sengul, E., Aksu, E. H., Cinar, İ., Gelen, V., Tekin, S., & Dag, Y. (2024). Selenium reduces acrylamide-induced testicular toxicity in rats by regulating HSD17B1, StAR, and CYP17A1 expression, oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and DNA damage. *Environmental Toxicology*, 39(3), 1402-1414. <https://doi.org/10.1002/tox.23996>

Zelikovic, I. (2009). Aminoaciduria and Glycosuria. In: Avner, E., Harmon, W., Niaudet, P., Yoshikawa, N. (eds) *Pediatric Nephrology*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-76341-3_37

Zhu, H., Xu, H., Ma, H., Luo, L., Yang, L., Chen, F., Qu, X., Liu, H., & Zhang, R. (2020). LncRNA CASC2 inhibits astrocytic activation and adenosine metabolism by regulating PTEN in pentylenetetrazol-induced epilepsy model. *J. Chem. Neuroanat.*, 105, 101749. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101749>

9. ÖZGEÇMİŞ



10.BİLİMSEL FAALİYETLER

Makale

- Karakaya, F. B.**, Yavuz, M., & Sirvanci, S. (2021). Histological analysis of the effects of thymoquinone on testicular damage in pentylenetetrazole-induced temporal lobe epilepsy model. *Andrologia*, 53(10), e14130. <https://doi.org/10.1111/and.14130>.
- Hekimoglu ER., Esrefoglu M., **Karakaya Cimen FB.**, Elibol B., Dedeakayogullari H., Pasin Ö. (2024). Beneficial effects of adipose-derived stromal vascular fraction on testicular injury caused by busulfan. *Drug Chem Toxicol.*, 11:1-15. <https://doi.org/10.1080/01480545.2024.2324332>.
- Esrefoğlu M., Kalkan TK., Karatas E., Elibol B., Hekimoglu ER., **Karakaya Cimen FB.**, Yay AH. (2024). Hepatoprotective actions of melatonin by mainly modulating oxidative status and apoptosis rate in lipopolysaccharide-induced liver damage. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 46(2):161-171. <https://doi.org/10.1080/08923973.2023.2291751>.
- Aslan, B., **Karakaya, B.**, Sirvanci, S., & Yildirim, A. (2023). The Effect of Melanocortin 4 Receptor Agonist RM-493 on Cognitive Functions in Rats Fed with Western Diet. *Int. J. Nutr. Sci.*, 8(1), 47-56. <https://doi.org/10.30476/ijns.2023.97449.1212>.
- Karakaya-Çimen, F. B.**, Macit, C., Sivas, G. G., Tunalı-Akbay, T., Şener, G., Ercan, F. Morphological and Biochemical Investigation of the Protective Effects of Panax ginseng on Methotrexate-Induced Testicular Damage. *Eur J Biol.* 2023; 82(1): 31-37. <https://doi.org/10.26650/EurJBiol.2023.1271825>.
- Macit, Ç., Ede Pazarbaşı, S., Yılmaz Karaoğlu, S., Tunalı Akbay, T., **Karakaya Çimen, F. B.**, Ercan, F., & Şener, G. (2023). Panax ginseng extract ameliorates methotrexate- induced multi-organ damage via the regulation of oxidative stress. *Journal of Research in Pharmacy.* <https://doi.org/10.29228/jrp.477>.
- Kandemir, C., Yavuz, M., **Karakaya, F. B.**, Çilingir-Kaya, Ö. T., Onat, F. & Şirvancı, S. (2022). Investigation of Neurogenesis in Kindled Wistar and Genetic Absence Epilepsy Rats. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 12 (3), 753-759. <https://doi.org/10.33808/clinexphealthsci.1021171>.

Bildiri (Poster veya Sözel)

Karakaya-Cimen, F.B., Cilingir-Kaya, O.T., Dedekayogulları, H., Cimen, Y.A. Investigation of The Possible Ameliorative Effect of Thymoquinone On Testicular Damage Caused by Valproic Acid In Genetic Absence Epilepsy. IX-International European Conference on Interdisciplinary Scientific Research Congress January 19-21, 2024 / Valencia, Spain.

Karakaya, F.B., Yavuz, M., Onat, F., Şirvancı, S. Temporal lob epilepsi modelinde timokinonun testis hasarı üzerindeki iyileştirici etkileri. 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 2019, Edirne.



11.EKLER

