

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİMDALI

**EPİLEPSİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN
LEVETİRASETAMIN XENOPUS LAEVIS EMBRİYOLARI
ÜZERİNDEKİ TERATOJENİK ETKİSİ**

Betül KALAY

**TIBBİ FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr.Mehmet Ata SEÇİLMİŞ**

ADANA-2023

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİMDALI

**EPİLEPSİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN
LEVETİRASETAMİN XENOPUS LAEVİS EMBRİYOLARI
ÜZERİNDEKİ TERATOJENİK ETKİSİ**

Betül KALAY

**TIBBİ FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMANI
Prof. Dr.Mehmet Ata SEÇİLMİŞ
Doç. Dr. Ayper BOĞA PEKMEZEKMEK

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2022-15078
Nolu proje ile desteklenmiştir

ADANA - 2023

KABUL ve ONAY

X X X X

ETİK BEYANI



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, beni destekleyen danışman hocamlarım Prof. Dr. Mehmet Ata SEÇİLMİŞ ve Doç. Dr. Ayper BOĞA PEKMEZEKMEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK olmak üzere eğitimim süresince benden destek ve yardımlarını esirgemeyen anabilim dalımızın tüm değerli hocalarına ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezin tüm basamaklarında yardımlarını esirmegen ve prosedürleri uygun ve zamanında uygulayan Çukurova Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne, tez çalışmamı destekleyen ve takip eden Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri'ne teşekkür ederim.

Beni en iyi şekilde yetiştirmek için hayat boyu çaba harcadıklarını bildiğim, çok kıymetli anneme ve babama, yüksek lisans eğitimimi başarıyla tamamlamam için beni destekleyen Doç Dr Ayper Boğa PEKMEZEKMEK, doktora öğrencisi Burçin ÜN'e sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimle.

Betül KALAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ve ONAY	ii
ETİK BEYANI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Teratojenesis.....	3
2.1.1. Tarihçe ve Talidomid Faciası	3
2.1.2. Tanımı ve Etki Mekanizması	3
2.1.3. İlaçların Gebelik Kategorisi	4
2.2. Epilepsi	4
2.2.1. Epilepsinin Tarihçesi	5
2.2.2. Epilepsinin Tanımlanması ve Sınıflandırılması	5
2.2.2.1. Parsiyel (Fokal) Epileptik Nöbetler	6
2.2.2.2. Bilateral Simetrik Nöbetler (Jeneralize Nöbetler)	6
2.2.3. EEG ve Epilepsinin EEG’de Gösterimi	7
2.2.3.1. Elektroensefalogram (EEG).....	7
2.2.3.2. EEG’de Görülen Anomaliler	9
2.2.3.2.1. Grand mal epilepsi (tonik-klonik nöbetler)	9
2.2.3.2.2. Petit mal epilepsi (fokal nöbetler).....	10
2.2.4. Antiepileptik İlaçlar.....	10
2.2.4.1. Antiepileptik İlaçların Farmakokinetiği.....	11
2.2.4.2. Antiepileptik İlaçların Kemik Yapısına Etkileri	11
2.2.5. Gebelikte Antiepileptik İlaç Kullanımı ve Etkileri	14

2.2.5.1. Deney Hayvanlarında Yapılan Çalışmalar.....	14
2.2.5.2. İnsanlarda Gebelik Döneminde Yapılan Çalışmalar.....	15
2.2.6. Antiepileptik İlaçların Yan Etkisini Azaltmada Folik Asit, B12 Vitaminin Kullanımını	17
2.3. Epilepsi Tedavisinde Kullanılan Levetirasetam	18
2.3.1. Etki Mekanizması.....	18
2.3.2. Farmakokinetik Özellikleri.....	19
2.3.3. Endikasyonları ve Kullanım Dozları	20
2.3.4. Advers Etkileri	23
2.3.5. Kan Beyin Bariyeri.....	23
2.4. <i>Xenopus laevis</i>	23
2.4.1. <i>Xenopus laevis</i> Sistematığı.....	23
2.4.2. <i>Xenopus laevis</i> Fizyolojisi.....	23
2.4.2.1. <i>Xenopus laevis</i> lerin Test Hayvanı Olarak Önemi.....	23
2.4.2.2. <i>Xenopus laevis</i> lerin Temini	24
2.4.2.3. <i>Xenopus laevis</i> in Keşfi ve Yapılan Çeşitli Araştırmalar.....	24
2.4.3. FETAX Testi	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Ergin <i>Xenopus laevis</i> Barındırılması	26
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonların Hazırlanması	27
3.3. FETAX Prosedürü	27
3.3.1. Embriyo Eldesi	27
3.4. mRNA Ekspresyonu	31
3.4.1. RNA İzolasyonu	31
3.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	32
3.4.3. Real Time PCR.....	33
3.5. Histopatolojik Analiz.....	34
3.6. Veri Analizi	34
3.6.1. RT-PCR Veri Analizi	34
3.6.2. Normal Anormal Ölüm Oranları ile Boy Uzunluğu Analizi	35
4. BULGULAR	36
4.1. <i>Xenopus laevis</i> Embriyolarının Normal Anormal Ölüm Oranları.....	36

4.2. <i>Xenopus laevis</i> embriyolarının Boy Uzunluklarının Değerlendirilmesi.....	37
4.3. Histopatolojik İnceleme.....	38
4.4. Gen analizi	41
5. TARTIŞMA.....	43
5.1. Levetirasetamın Teratojenitesi	43
5.2 Levetirasetam ile Hipopigmentasyon İlişkisi	46
5.3. Levetirasetamın boy uzunluğuna etkisi	47
5.4. Erken gelişim döneminde embriyolardaki gen ekspresyonu ifadesi	48
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:

Sayfa No:

Şekil 1.	A) Nöbetlerin Fokal Nöbetlerden Yayılımı B) Fokal bir Nöbetin Sekonder Jeneralizasyonu C) Primer Jeneralize Nöbetler.....	7
Şekil 2.	Normal Elektroensefalogramdaki Beyin Dalgalarının Çeşitli Tipleri.....	8
Şekil 3.	Epilepsinin birkaç formunda EEG anomalileri	10
Şekil 4.	A)Ergin erkek <i>Xenopus laevis</i> B)Ergin Dişi <i>Xenopus laevis</i>	26
Şekil 5.	Ağızı açık kaplarda dinlendirilmiş su.....	26
Şekil 6.	Ergin erkek <i>Xenopus laevis</i> 'in tricain anestezisi.....	28
Şekil 7.	Disseke Edilen Testis (Tris-Fosfat çözeltisinde).....	28
Şekil 8.	Evre 8-9 aşamasındaki embriyolar.....	29
Şekil 9.	<i>Xenopus laevis</i> embriyolarının muhafaza edildiği inkübatör (23 °C ±1).....	29
Şekil 10.	IVF sonrası bölünme evreleri ve embriyo seçimi	30
Şekil 11.	IVF Protokolü	31
Şekil 12.	mRNA Ekspresyon Düzeyi Analizi	32
Şekil 13.	Levetirasetam Uygulanan <i>Xenopus laevis</i> Embriyolarında Gözlenen Anomaliler	36
Şekil 14.	<i>Xenopus laevis</i> embriyolarının boy uzunluklarının karşılaştırılması	37
Şekil 15.	Levetirasetam Uygulanan Deneylerde Kullanılan Kontrol Embriyosu.....	39
Şekil 16.	12 µg/mL Levetirasetam Dozuna Maruz Bırakılan Embriyolarda Hipopigmentasyon (okla gösterilmiştir).....	40
Şekil 17.	24 µg/mL Levetirasetam Dozuna Maruz Bırakılan Embriyolarda Hipopigmentasyon (okla gösterilmiştir).....	40
Şekil 18.	LEV uygulanan <i>Xenopus laevis</i> embriyosunda erken gelişim dönemindeki genlerin ekspresyonu.....	42

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. Gebelik kategorilerinin açıklanması	4
Tablo 2. Antiepileptik İlaçların Endikasyonları ve Yan Etkileri	13
Tablo 3. cDNA revers reaksiyonun hazırlanması	33
Tablo 4. RT-PCR Analizinde Sıcaklık ve Zaman Ayarı.....	33
Tablo 5. Real-Time PCR için kullanılacak primerlerin çizelgesi	33
Tablo 6. Real Time RT-PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları	34
Tablo 7. Bio Rad DX Real-time System as real-time RT-PCR için kullanılan ısı döngüsü	34
Tablo 8. FETAX Testi ile Levetirasetam Uygulanan Gruplarda Normal Anormal ve Ölüm Oranları ($p<0.01$).....	36
Tablo 9. Levetirasetamın Çeşitli Konsantrasyonlara Maruz Bırakılan Embriolarda Boy Uzunluğu ve %95'lik Güvenirlik Aralığı.....	38

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

EEG	: Elektroensefalogram
HSP70	: 70 Kilodaltonluk Isı Şok Proteini
VEGF	: Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü
HIF-1α	: Hipoksi ile uyarılabilir faktör 1 α
P-gp	: Para glikoprotein
SV2A	: Sinaptik vezikül glikoprotein 2A
MRP	: Çoklu İlaç Direnci ile İlişkili Protein



ÖZET

Epilepsi Tedavisinde Kullanılan Levetirasetamın *Xenopus laevis* Embriyoları Üzerindeki Teratojenik Etkisi

İlaçlar teratojeniziste önemli etkenlerden biridir. Bu durum birçok ilacın gebelikte klinik kullanımı sınırlamaktadır. Epilepsi tedavisinde kullanılan levetirasetamın gebelikte kullanımı ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada levetirasetamın teratojenik etkisi araştırıldı. Bu amaçla, Xenobiyotiklerin etkisini %89 oranında doğru öngördüren, FETAX (Kurbağa Embriyo Teratogenez Deneyi: *Xenopus*) testi kullanıldı.

Bu çalışmada 6 adet kontrol, 9 adet deney grubu olmak üzere 15 adet ergin *Xenopus laevis* kullanıldı ve embriyolar 96 saat 1.2, 12, 24, 48 µg/mL levetirasetam konsantrasyonlarına maruz bırakıldıktan sonra tüm gruplarda ölüm oranları tespit edildi, ayrıca bu gruplar mikroskop altında incelendi, boyları ölçüldü ve anomaliler mikroskop bağlantılı kamera ile fotoğraflandı. *Xenopus laevis* erken embriyo gelişiminde rol oynayan ve mRNA ekspresyonunda spesifik genler olan ESR1, PAX6, BMP4, MYF5 ve HSP70 gen analizi yapıldı. Ayrıca embriyoların histopatolojik analizi incelendi.

Çalışmalar sonucunda anomali oranı (%1.45) bulundu ve kontrole (%0.8) aralarında bir farklılık gözlenmedi. Boy uzunluklarında kontrol grubu (10.8mm) ile aralarında tüm konsantrasyonlarda boyca farklılık gözlenmedi (10.7 mm). Histopatolojik analizde birkaç anormal embriyo haricinde hem kontrol ve hem de deney gruplarında elde edilen organlarda bir anomali gözlenmedi, sadece levetirasetametirasetam uygulanan tüm gruplarda hipopigmentasyon gözlemlendi. Son olarak erken gelişim döneminde önemli genler olan ESR1, BMP4, MYF5 ve HSP70'in ekspresyonunda azalma, PAX6 ekspresyonunda ise artma görüldü. Ancak ekspresyon düzeylerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bu sonuçlar bir antiepileptik ajan olan levetirasetamın, incelenen parametreler açısından *Xenopus laevis* embriyolarında teratojenik etkisinin olmadığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Antiepileptik ilaç, FETAX, Levetirasetam, Teratojenite, *Xenopus laevis*

ABSTRACT

Teratogenic Effect of Levetiracetam Used in the Treatment of Epilepsy on *Xenopus laevis* Embryos

Drugs are one of the important factors in teratogenesis, which limits the clinical use of many drugs in pregnancy. Teratogenic effect of levetiracetam, an antiepileptic agent is still controversial in pregnancy. In this study, the teratogenic effect of levetiracetam was investigated. For this purpose, the FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus*) test, which predicts the effect of Xenobiotics with 89% accuracy, was used.

In our study, 15 adult *Xenopus laevis*, including 6 control and 9 experimental groups, were used and after the embryos were exposed to 1.2, 12, 24, 48 µg/mL levetiracetam concentrations for 96 hours, mortality rates were determined in all groups, and these groups were examined under a microscope. Their lengths were measured and anomalies were photographed with a microscope-mounted camera. ESR1, PAX6, BMP4, MYF5 and HSP70 genes, which are specific genes in mRNA expression and play a role in *Xenopus laevis* early embryo development, were analyzed. In addition, histopathological analysis of embryos was examined.

As a result of the studies, the rate of anomaly was (1.45%) and no difference was observed between them and the control (0.8%). There was no difference in height (10.7 mm) between the control group (10.8mm) and the control group at all concentrations. In the histopathological analysis, except for a few abnormal embryos, no anomaly was observed in the organs obtained in both the control and experimental groups, and hypopigmentation was observed in all groups that were administered only levetiracetam. Finally, there was a decrease in the expression of ESR1, BMP4, MYF5 and HSP70, which are important genes in early development, and an increase in the expression of PAX6. However, these changes in expression levetiracetam were not statistically significant.

These results show that levetiracetam, an antiepileptic agent, has no teratogenic effect in *Xenopus laevis* embryos in terms of the parameters examined.

Key words: Antiepileptic drug, FETAX, Levetiracetam, Teratogenite, *Xenopus laevis*

1. GİRİŞ

Bebeklerde oluşan morfolojik ve gelişme bozukları insanoğlunun varoluşundan beri görülmektedir. Toplumlar oluşab bu anomalileri farklı yorumlamışlardır¹. Bilimin ilerlemesiyle beraber kullanılan, maruz kalınan kimyasal maddelerin fetüse etki ettiği anlaşılmış² ve 150 yıldan beri teratoloji çalışmaları yapılmıştır³. Talidomid faciasının (1960) yaşanmasıyla bu konu üzerine eğilim artmış, gebelerin kullandığı, maruz kaldığı hormonlar, pestisitler, ilaçlar incelenmeye başlanmıştır². Birçok ilacın gebelerde kullanımının sakıncalı olmasından dolayı FDA, ilaçları sınıflandırmış ve gebelere bu sınıflandırma doğrultusunda ilaç reçetelenmeye başlanmıştır⁴.

Antik çağlardan beri süregelen epilepsi, günümüzde de güncelliğini koruyan bir sağlık problemidir. İnsanlarda tetiklenmeden, beynin belirli bölgelerindeki harabiyet sonucu ortaya çıkan nöbetlerle karakterizedir. Birçok gen ve çevresel faktörlerin birbirleriyle etkileşim sonucu oluşan hem genetik hem de hem de klinik özellikleri olan ve klinik belirtilerin heterojen olduğu kabul edilen bir hastalıktır^{5,6}.

Epilepsinin altta yatan travma, tümör, enfeksiyon ve dejeneratif değişimler gibi serebral hasara neden olan çeşitli fizyopatolojik mekanizmaları yansıttığı ileri sürülmüştür. Epilepsi de kalıtsal faktörlerin önemli olduğu görülmekle birlikte çoğu hastada özel bir neden belirlenememiştir⁶.

Epilepsiyi tedavi etmek amacıyla birçok antiepileptik ilaç geliştirilmiştir. Epilepsi teşhisi konulan gebe kadınlarda da bu ilaçlar kullanılmış ve kullanımı arttıkça fetüslerde zararlı etkiler görüldüğü fark edilmiştir. Çoğu ilaç gebelerde kontrendike olup, kullanılan ilaçların da fetüse etkileri tam olarak bilinmemektedir. Yeni nesil antiepileptik bir ilaç olan levetirasetamın gebelerde kullanımı yaygındır. Bununla beraber levetirasetametirasetam üzerine yapılan çalışmalar yetersizdir. Yapılan çalışmalarda ise birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Tavuk embriyolarında yapılan çalışmalarda levetirasetamın nöral tüp gelişiminde defektlere yol açtığı gözlenmiştir^{7,8}. Tavuk embriyolarında yapılan başka bir çalışmada ise nöral tüp gelişiminde bir etkisi olmadığı bildirilmiştir⁹. Prenatal dönemde (2010) levetirasetametirasetama maruz bırakılan postnatal yavrularda yapılan çalışmalarda kognitif ve lokomotor aktiviteleri değerlendirilmiş ve herhangi bir etkisi görülmemiştir¹⁰. Zebra balıklarında yapılan çalışmalarda levetirasetamın teratojenik indeksi düşük

bulunmuştur. Bu bulgular levetirasetamın teratojenik etkisinin tartışmalı olduğunu göstermektedir^{11,12}.

Yukarıdaki bilgilerin ışığında yapılan bu çalışmada levetirasetametirasetamın teratojenik etkisi araştırıldı. Bu amaçla, ilaçların veya çeşitli ksenobiyotiklerin etkisini %89 oranında doğru öngördüren, *Xenopus laevis* embriyolarında FETAX testi uygulandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Teratojenezis

2.1.1. Tarihçe ve Talidomid Faciası

Bebeklerde oluşan malformasyonlar insanlık tarihinin başlangıcından beri görülmektedir. Farklı medeniyetlerde bu durumlar farklı şekilde algılanmaktadır. Babil’de, konjenital malformasyonlar gelecekte olacak olayların habercisi olarak görülmekte; Antik Yunanistan, Hindistan gibi medeniyetlerde ise, tanrıların dış görünüşleri olarak yorumlanmaktadır. Antik Yunanistan’da iki yüzü olan Janus, Hindistan’da ise birçok uzvu olan ölüm tanrıçası Kali oluşan malformasyonlardan ilham alınarak oluşturulduğu düşünülmektedir¹.

Bebeklerde görülen anomalilere son 150 yıldır daha bilimsel olarak yaklaşılmış ve doğumsal anomalilerin nedenini konu alan teratolojiye olan ilgi artmıştır. Alkol, hormonlar ve diğer maddelerin anomaliye yol açtığı bulunmuştur³. Talidomid faciasının (1960) yaşanmasıyla beraber teratoloji bilimine daha çok önem verilmiştir. Gebe kadınlarda sabah bulantısını durdurmak amacıyla piyasaya sürülen talidomid, bebeklerde konjenital malformasyonlar oluşturması(fokomeli), hatta düşüğe neden olması nedeniyle 1961 yılında piyasadan kaldırılmıştır². Birçok ülke tarafından gebe kadınlarda kullanımı onaylanan talidomidin ülkemizde kullanımı onaylanmamıştır. Ordinaryüs Profesör Doktor Süreyya Tahsin Aygün ve Profesör Doktor Şükrü Kaymakçalan talidomid üzerine yapılan toksisite testlerini yeterli bulmamışlardır ve hocalarımız sayesinde birçok bebeğin hayatı kurtulmuştur¹³.

2.1.2. Tanımı ve Etki Mekanizması

Talidomid faciasıyla çalışmalar artmıştır. Gebelerin kullandığı, maruz kaldığı maddelerin bebeklerde morfolojik, gelişme bozukluklarına oluşturmalarına hatta ölüme neden olmasına teratojenezis adı verilmiş, bu durumların görülmesine sebep olan maddelere ise teratojenik maddeler denilmiştir.

Teratojenik maddeler etkilerini fetüsteki DNA’ya, DNA sentez mekanizmalarına ya da mitoz esnasında içcik oluşmasını engelleyerek, fetüsün gerekli koruyucu besinleri almaması veya enerji üretimini engelleyerek, uteropleasantal akımı azaltarak veya doku

farklılaşmasını değiştirerek gösterebilirler¹⁴.

Fetüs 18-21. günde başlayan, 55-60. güne kadar süren organogenez döneminde teratojenlere daha fazla duyarlıdır¹⁴.

2.1.3. İlaçların Gebelik Kategorisi

Gebelerin hamilelik dönemi boyunca aldığı, tükettiği bütün besinlere dikkat edilmelidir. Birçok gebe hamilelik sırasında ilaç kullanmakta olup, kullandığı ilaçların fetüste yaptığı etkiyi göz ardı etmektedir. FDA ilaçların teratojenik etkilerini değerlendirip, 5 kategoriye (**Tablo 1**) ayırmıştır. Gebelerin bu kategorileri göz önüne alarak ilaç kullanması gerekmektedir.

Tablo 1. Gebelik kategorilerinin açıklanması⁴

Gebelik Kategorisi	
A	Yapılan deneysel ve klinik çalışmalara göre fetüste anomali oluşturmeyen ilaçlar
B	Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar fetüste anomali gözlenmeyen, klinik çalışmaların yetersiz bulunan ilaçlar
C	Hayvansal deney çalışmalarında fetüslerde anomaliler olduğu gözlenen, klinik çalışmaların yetersiz olduğu bulunan ilaçlar
D	Klinik çalışmalarda fetüste anomaliler görülen yarar-zarar ilişkisine göre gebe kadına verilen ilaçlar
X	Çalışmalarda fetüste birçok anomali olduğu gözlenen, yarar-zarar ilişkisine göre zarar basamağının daha ağır bastığı ilaçlar

2.2. Epilepsi

Epilepsi, nöbet oluşturmaya yönelik kalıcı bir yatkınlık ve nöbet tekrarlarının nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçları ile karakterize edilen bir beyin hastalığıdır. Epileptik nöbetler, hastalığın altta yatan nöral mekanizmalarını yansıtan basmakalıp davranışsal değişikliklerle karakterize, tekrarlayan paroksizmal olaylardır. Epilepsinin ayırıcı tanısı, farkındalık ve/veya davranışta geçici değişiklik ile karakterize edilen bir dizi klinik durumu kapsar. Çoğu durumda hastalık, dikkatli bir anamnez veya bir nöbetin gözlenmesiyle teşhis edilebilir. Bir etiyolojik ajan tanımlanabilse de, vakaların yaklaşık yarısında hala nedeni bilinmemektedir⁶.

2.2.1. Epilepsinin Tarihçesi

Epilepsinin tarihi antik döneme kadar uzanmaktadır. Epilepsi ile ilgili bulgular M.Ö. 1500'lü yıllarda Mısır kaynaklarında görülmeye başlanmışken¹⁵, Babil ve Asur kaynaklarında M. Ö. 2000 yıllarında görülmektedir¹⁶⁻¹⁷. Eski kaynaklarda epilepsinin, tanrıların gazabından dolayı oluştuğu³ ya da kötü bir alamet olduğu yazılmaktadır¹⁸.

19. yy'dan sonra diğer hastalıklarda olduğu gibi epilepsi üzerinde de çalışmalar hız kazanmış, ' Kutsal Hastalık ' ve ' Tanrının Gazabı ' gibi tanımlamaların kullanımı bırakılmıştır. Bu çalışmalarda yer alan bilim insanlarından biri olan İngiliz nörolog Jackson (1835-1911) , epilepsi kavramını netleştirmiş ve ek olarak bilişsel ve duyuşsal belirtilerin meydana geldiği ve kısmi nöbetlerin öncüsü olarak kabul ettiğimiz nöbet biçimlerini de spesifik olarak tanımlamıştır¹⁹⁻²⁰.

Epilepsinin prevalansı yaklaşık % 0.5-1.0'dır ve yüzdeler birbirine yakın olmakla birlikte erkek hastalarında görülme oranı daha fazladır²¹.

2.2.2. Epilepsinin Tanımlanması ve Sınıflandırılması

Epilepsi, ani başlayan, genellikle kendiliğinden geçen, bazen bilinç kaybına neden olan kısa süreli ve tekrarlayan nöbetler olarak görülen nörolojik bir hastalıktır¹⁴. Epilepsi nöbetleri iki ayrı şekilde sınıflandırılabilir;

(1) Hemisferin belirli bir alanında oluşan fokal nöbetler (parsiyel nöbetler)

(2) Her iki hemisferde de görülen jeneralize nöbetler

Bazı durumlarda fokal nöbetler, jeneralize nöbetlere dönüşebilir.

Parsiyal (fokal) nöbetler

- Kortikal fokal
- Temporal lop epilepsisi
- Sekonder jeneralize

Bilateral simetrik nöbetler (jeneralize nöbetler)

- Petit mal Epilepsi (absans)
- Grand mal Epilepsi (tonik-klonik nöbetler)
- Miyoklonik Nöbetler
- Lennox-Gastaut sendromu, myoklonik epilepsi, atonik epilepsi
- Unilateral nöbetler

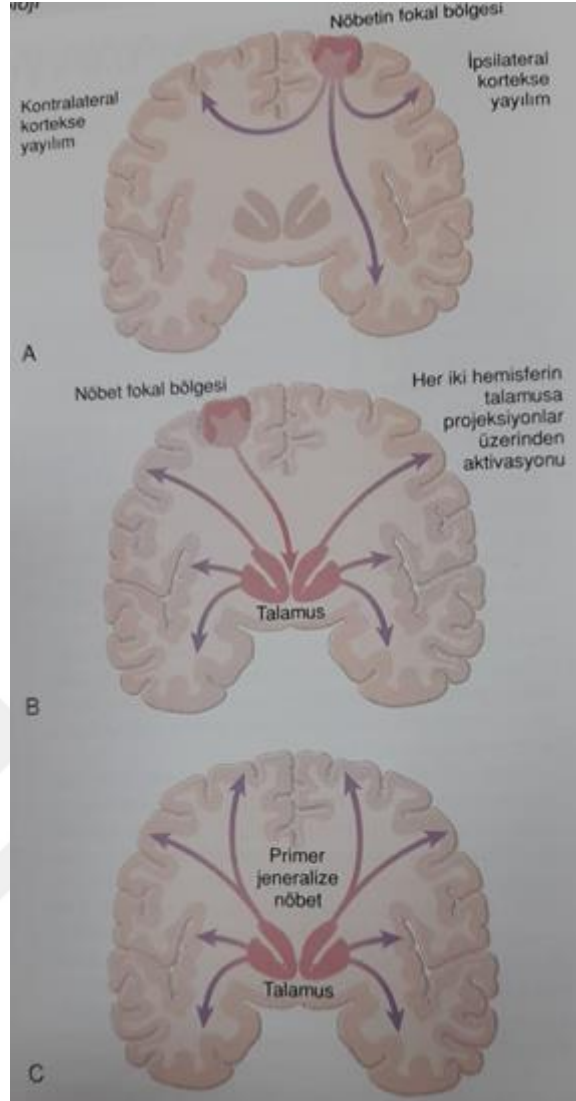
Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler²²

2.2.2.1. Parsiyel (Fokal) Epileptik Nöbetler

Fokal Epilepsi, hemisferin belirli bir bölgesinde (bu bölge beyin sapı, serebral korteks veya serebrum olabilir) oluşan, olduğu bölgedeki hasarlar, tümörler veya konjenital malformasyonlar sonucu bozuk bir nöral devreden dolayı ortaya çıkan anomalilerden veya lezyonlardan kaynaklanan bir epileptik nöbet türüdür. Bu anomaliler ve lezyonlardan dolayı hasar görmüş bölgedeki nöronlarda hızlı ve aşırı bir şekilde deşarj görülmekte ve deşarjlar normal frekansın üzerine çıkmakta, yerel bölgenin yakınında olan korteks alanlarına eşzamanlı olarak dalgalar yayılmaktadır. Dalgaların yayılımı dakikada birkaç milimetreden saniyede birkaç santimetreye kadar değişebilen hızlarla yayılmaktadır²³.

2.2.2.2. Bilateral Simetrik Nöbetler (Jeneralize Nöbetler)

Jeneralize epileptik nöbetler, korteks ve talamus arasındaki bağlantı aracılığıyla hızlıca beynin her iki hemisferine yayılan, kontrol edilemeyen, aşırı nöranal deşarjlarla ilişkilidir. Zaman zaman primer jeneralize epileptik nöbetler hızla yayılan fokal nöbetlerle karıştırılabilir²⁴.



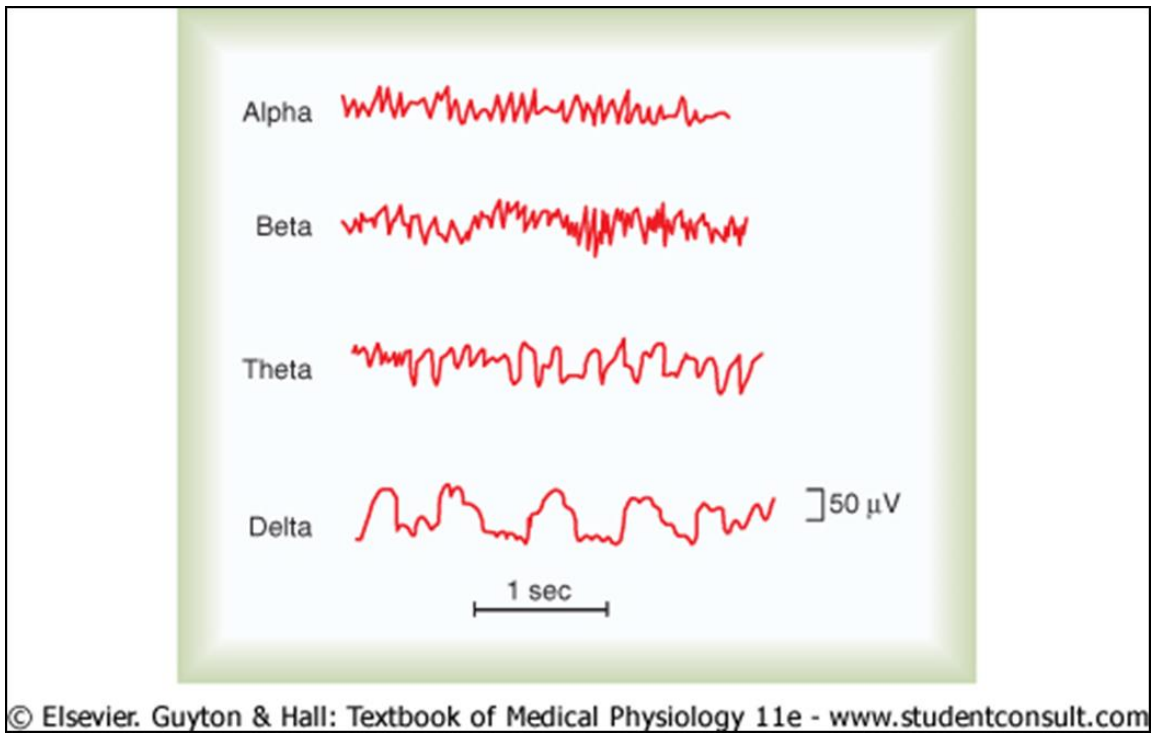
Şekil 1. A) Nöbetlerin Fokal Nöbetlerden Yayılımı B) Fokal bir Nöbetin Sekonder Jeneralizasyonu C) Primer Jeneralize Nöbetler²³

2.2.3. EEG ve Epilepsinin EEG’de Gösterimi

2.2.3.1. Elektroensefalogram (EEG)

Elektroensefalogram (EEG), kafatasına yerleştirilen elektrotlar vasıtasıyla beyin korteksinden elde edilebilen ritmik elektriksel aktivitelerin bir kayıdır. Elektrokortikogramda ise korteksin elektriksel aktivitesi beyin yüzeyine yerleştirilen elektrotlar vasıtasıyla kaydedilir. İnsan çalışmalarında EEG’ler bir bireyden farklı zamanlarda aynı bölgelerden veya farklı kişilerde aynı bölgeden kaydedilebilir. EEG klinik nörolojide önemli bir teşhis aracıdır ve özellikle epilepsili hastalarda kullanışlıdır.

Normal EEG değişik frekansların dalgalarından oluşur. Baskın frekanslar, uyanıklık durumu, bireyin yaşı, kayıt elektrotlarının yerleşimi ve ilaç veya hastalığın varlığına ya da yokluğunu içeren çeşitli faktörlere bağlıdır. Normal, uyanık bir yetişkin gözleri kapalı olarak yatar halde iken, pariyetal ve oksipital bölgeler üzerinden kaydedilen EEG'nin baskın frekansları, yaklaşık 8-13 Hz'lik alfa ritmidir. Eğer kişiden gözleri açması istenirse, EEG daha az senkronize olur ve baskın frekans beta ritmi olarak adlandırılan 13-30 Hz'e yükselir. Delta (0.5-4 Hz) ve teta (4-7 Hz) ritimleri uyku sırasında gözlenmektedir²⁴.



şekil 2. Normal Elettroensefalogramdaki Beyin Dalgalarının Çeşitli Tipleri²³

Sağlıklı kişilerde EEG'deki dalgaların çoğu görüldüğü gibi alfa, beta, teta ve delta dalgaları olarak sınıflandırılabilir. Alfa dalgaları 8 ila 13 döngü/saniye arasındaki frekanslarda oluşan ritmik dalgalardır ve uyanık erişkinlerin hemen tümünün EEG'sinde uyanık ve sakin, dinlenim durumu beyin aktivitesi sırasında ortaya çıkarlar. Bu dalgalar en güçlü olarak oksipital bölgede ölçülmekle birlikte, pariyetal ve frontal bölgelerden de kaydedilebilir.

Beta dalgaları, 14 döngü/saniyeden yüksek sıklıktadır ve 80 döngü/saniyeye kadar çıkabilir. Daha çok beynin pariyetal ve frontal alanlarından, bu bölgelerin aktivasyonu sırasında kaydedilirler.

Teta dalgaları, 4 ila 7 döngü/saniye arasındaki bir sıklığa sahiptir. Normal olarak çocukların pariyetal ve temporal bölgelerinde gözlenmekle birlikte, bazı erişkinlerde düş kırıklığı ve yılgınlık gibi duygusal stres koşullarında da ortaya çıkabilirler.

Delta dalgaları EEG'nin 3.5 döngü/saniyeden az olan tüm dalgalarını içerir ve voltajları genellikle diğer beyin dalgalarının çoğuna göre iki ila dört kat yüksektir. Çok derin uykuda, çocuklukta ve ciddi beyin hastalığı olan kişilerde ortaya çıkarlar. Subkortikal kesiyle korteksi thalamustan ayrılan deney hayvanlarının kortekslerinde de oluşurlar. Dolayısıyla, delta dalgaları beynin daha aşağı bölgelerindeki aktivitelerden bağımsız olarak kortekste oluşabilirler²³ (Şekil 2).

2.2.3.2. EEG'de Görülen Anomaliler

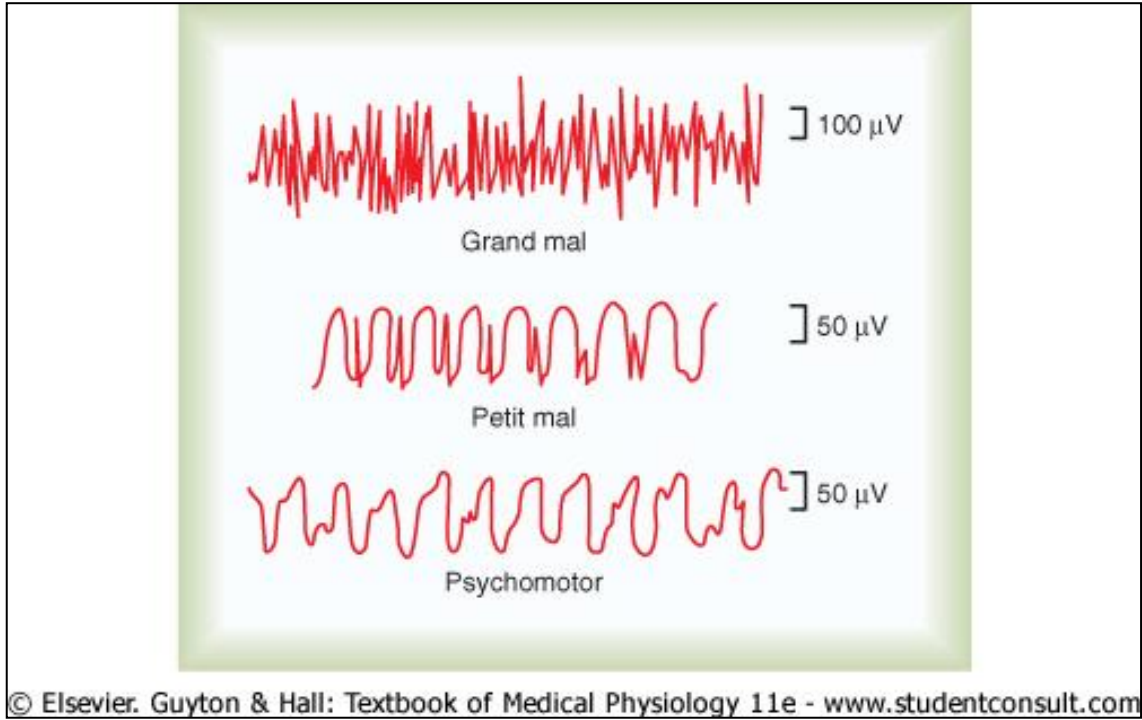
Epilepsi sıklıkla EEG anomalilerine neden olur. Epilepsinin konvülsiyonları parsiyel (fokal) veya genel olabilir.

Parsiyel nöbetlerin bir formu motor korteksten kaynaklanır ve karşı taraftaki kasların lokal kasılmaları ile sonuçlanır. **Karmaşık parsiyel nöbetler (psikomotor)** epilepsi de meydana gelebilir (Şekil 3). Limbik lobda meydana gelir. Yanılsamalar ve yarı amaçlı motor aktivite ile sonuçlanır²³⁻²⁴. Odaksal (fokal) nöbetler sırasında ve arasında saçlı deri kayıtlarında EEG diken dalgalar gösterebilir.

Nöbetlerin iki major tipi vardır. Grand mal ve petit mal nöbetler;

2.2.3.2.1. Grand mal epilepsi (tonik-klonik nöbetler): Grand mal epilepsi ya da tonik klonik nöbetler iki aşamada gerçekleşebilir. Nöbet başlamadan önce yorgunluk, baş ağrısı, baş dönmesi gibi belirtiler gözlenebilir. Nöbet sırasında ise ilk olarak tonik faz yani uzun süreli bilinç kaybı, kasların tonusunda bir artış, daha sonra ise klonik faz istemsiz hareketler görülür. EEG'de her tarafa yayılmış nöbet aktivitesi gösterir²³⁻²⁴ (Şekil 3).

2.2.3.2.2. Petit mal epilepsi (fokal nöbetler): Bu epilepsi, minor myoklonik kasılmalarla ve günde birkaç kere 5-10 saniyelik bilinç kaybıyla kendini gösteren, yaşa ve beynin gelişim aşamalarına bağlı olan bir epilepsi türüdür. Nöbet esnasında başın geriye düşmesi, göz küreleri ileri hareket etmesi gibi semptomlar görülür. Bilinç kaybı geçicidir ve EEG diken dalga aktivitesi gösterir²³⁻²⁴ (Şekil 3).



Şekil 3. Epilepsinin birkaç formunda EEG anomalileri A) Grand mal nöbet; B) Petit mal nöbet; C) Karmaşık fokal nöbetler (psikomotor epilepsi)²³

2.2.4. Antiepileptik İlaçlar

Epilepsi 19. yüzyıldan önce, Kutsal Hastalık olarak nitelendiriliyor ve doğüstü güçlerle tedavi edilebilceğine inanılıyordu. Ancak sonraki yıllarda epilepsiye karşı çeşitli antiepileptik ilaçlar geliştirilmiştir²⁵.

Uzun yıllardan beri epilepsi hastalarını tedavi etmede kullanılan antiepileptik ilaçların zaman içinde yan etki profilleri ve ilaçlar arasındaki etkileşimi daha iyi anlaşılmış ve etkileri tanımlanmıştır. Otuz yıl önce, geleneksel antiepileptik ajanlar kadar etkili ancak daha az yan etkiye sahip yeni nesil antiepileptik ilaçlar piyasaya çıkmıştır²⁶⁻²⁷ (Tablo 1).

Antiepileptik ilaçlardan biri olan sodyum fenitoin ilk olarak 1937'de epileptik nöbetlerin tedavisinde kullanılmıştır ve günümüzde birçok epileptik nöbet için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilacın etkilerinin ve yan etkilerinin nöronal temeli iyi anlaşılmıştır. Yan etkileri arasında vestibüloserebellar ve zihinsel düzensizlik, alerjik reaksiyonlar, polinöropatiler, kemik iliği depresyonu, dişeti hiperplazisi ve folik asit emiliminde azalma yer alır²⁸.

2.2.4.1. Antiepileptik İlaçların Farmakokinetiği

Antiepileptik ilaçların serum lipid seviyeleri üzerindeki etkisini araştıran birçok çalışma vardır²⁶. Antiepileptik ilaçlar karaciğerde p450 enzim sistemini indükleyerek hiperlipidemiye neden olabilir ve bu da bir hastayı ateroskleroza yatkın hale getirebilir. Antiepileptik ilaçların uzun süreli kullanımı, çeşitli olumsuz metabolik ve endokrin etkilere neden olabilir. Antiepileptik ilaçlar ayrıca bazı vitamin ve minerallerin seviyelerini de etkiler. Uzun süreli antiepileptik ilaç kullanımı, epilepsi hastalarının yaklaşık yarısında folat düzeylerini düşürerek folat eksikliği riskini artırır²⁷.

Yapılan çalışmalarda antiepileptik ilaç kullanan gebe kadınlarda lamotrijin ve levetirasetam hariç diğer ilaçların klirenslerinde önemli değişik gözlenmemiştir²⁹.

Antiepileptik ilaçların incelendiği bir çalışmada, valproik asit ve karbamazepin, levetirasetam ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer enzimlerinde göze çarpan bir artışa sebep olmadıkları gözlemlenmiştir. Tiroid hormonu ve HDL'de de bir etkileri görülmemiştir²⁷.

2.2.4.2. Antiepileptik İlaçların Kemik Yapısına Etkileri

Antiepileptik ilaçların kemiklerin yapısını etkilediğine dair çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada karaciğer enzimini indükleyen antiepileptik ilaçların, indüklemeyen ilaçlara göre kemik yapısını ve kırıkları daha çok etkilediği gözlemlenmiştir. Valproik asit, karbamazepin, okskarmazepin ve fenitoinin doza bağlı bir şekilde yapıyı etkilediği öne sürülmüştür³⁰.

Yapılan bir çalışmada (2018) yetişkin hastalarda, lamotrijin ve levetirasetamın monoterapi ve politerapi olarak kemik döngüsünün ve kemik mineral yoğunluğunun biyokimyasal belirteçleri üzerindeki etkisini belirlemişlerdir. Çalışma 4 gruba ayrılmış, iki gruba lamotrijin veya levetirasetam, diğer iki gruba valproat + lamotrijin veya

valproik asit + levetirasetam uygulanmıştır. Sonuçta levetirasetamın monoterapi veya politerapi olarak uygulandığında kemik üzerinde zararlı etkileri görülürken, lamotrijinde bu etki gözlenmemiştir³¹.

Yapılan başka bir çalışmada karbamazepin ve valproik asitte kemik mineral dansisitesinde düşüş gözlenirken, yeterli çalışma bulunmayan levetirasetam, okarbamazepin, topiramet, fenitoin, fenobarbitalde ise kemik mineral yoğunluğunda (BMD) düşüş gözlenmemiştir³².

El-Haggar ve ark. (2018) tarafından yayınlanan çalışmada lamotrijin ve levetirasetamın kemik dansisitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Levetirasetam alan epilepsili hastalarda kemik oluşum süreçlerinde yer alan serum alkalın fosfataz ve serum osteokalsin düzeylerinde düşüş gözlenirken, kemik erimesinde rol alan idrar dioksimipridinolin düzeyinde artış gözlenmiştir. Lamotrijinde bu etkiler gözlenmemiştir³¹.

Bir olgu sunumunda gebe bir kadının levetirasetam kullanımına bağı serum alkalın fosfataz düzeyinin yükseldiğı görülmüştür³³.

Tablo 2. Antiepileptik İlaçların Endikasyonları ve Yan Etkileri³⁴

Antiepileptik İlaçlar	Endikasyonları	Yan Etkileri
Fenitoin ve fosfenitoin	Jeneralize nöbetler, parsiyel nöbetler, status epilepticus	Nistagmus, diplopi ve ataksi, geveleyerek konuşma, bulanık görme, mental konfüzyon, hirsutizm, gingival hiperplazi
Valproik Asit	Parsiyel nöbetler ve jeneralize nöbetler (tonik-klonik ile birlikte olan absens nöbetler), myoklinik epilepsi Bipolar afektif bozukluk, migren profilaksisi	Gastrointestinal bozukluk ve saç dökülmesi Kilo alma, sedasyon, ataksi ve yüksek dozlarda ince tremor Fetal malfarmosyon: Spina bifida, orofasial ve kardiyovasküler anomaliler
Karbamazepin ve Oksarbamazepin	Parsiyel nöbetler ve jeneralize nöbetler, Trigeminal nevralji, bipolar afektif bozukluk	Diplopi ve ataksi, gastrointetibnal bozukluk. Yüksek dozlarda sedasyon
Etosüksimid	Absans nöbetin tedavisinde valproik asitten daha etkili	Gastrointestinal bozukluk, yorgunluk, baş dönmesi
Benzodiazepinler (Diazepam, lorazepam, klonazepam ve klorezapat)	Diazepam ve lorazepam status epilepticusun kısa süreli tedavisinde Klonazepam absens nöbetler; klorazepat kompleks parsiyel (psikomotor) nöbetlerin tedavisinde	Sedasyon
YENİ NESİL ANTİEPİLEPTİKLER		
Lamotrijin	Parsiyel nöbetlerde (monoterapi), absens nöbetler, myoklinik nöbetler, Lennox-Gastaut sendromu	Baş ağrısı, ataksi, baş dönmesi, nadiren çocuklarda alerjik reaksiyonlar
Gabapentin	Parsiyel ve jeneralize nöbetler, postherpetik nevralji, diyabetik periferik nöropati	Baş dönmesi, ataksi, tremor,
Pregabalin	Ek tedavi olarak parsiyel epilepsi, fibromiyalji, postherpetik nevralji, diyabetik periferik nöropati	Baş dönmesi, ağız kuruluğu, bulanık görme, kilo alımı
Topiramet	Migren tipi baş ağrısı, Lennox-Gastaut sendromu, Parsiyel ve jeneralize tonik klonik monoterapi veya politerapi olarak	Yorgunluk, sinirlilik, haıza bozukluğu
Tiagabin	Ek tedavi olarak parsiyel epilepsi	Baş dönmesi
Levetirasetam	Parsiyel ve Jeneralize tonik-klonik ve miyoklonik nöbetlerde ek tedavi	Baş Dönmesi
Lakosamid	Parsiyel nöbetlerde kombine tedavi	Diplopi, baş dönmesi, gastrointestinal bozukluklar, baş ağrısı
Ezogabin	Parsiyel nöbetlerde kombine tedavi	Bulanık görme, konfüzyon ve mesane disfonksiyon
Rufinamid	Lennox-Gastaut sendromu, fenitoin ve karbamazepine benzer etki	Kusma, diyare, sedasyon
Felbamet		Aplastik anemi, karaciğer yetmezliği ile şiddetli hepatit
Zonisamide		Uyuşukluk, konfüzyon, kızarıklık

2.2.5. Gebelikte Antiepileptik İlaç Kullanımı ve Etkileri

2.2.5.1. Deney Hayvanlarında Yapılan Çalışmalar

Zebrabalıklarında yapılan bir çalışmada antiepileptik ilaçların teratojenik ve antikonvülzan etkileri birlikte incelenmiştir. Buna göre fenitoin ve lamotrijinin teratojenik etkisinin az olduğu ve antikonvülzan etkisinin olduğu görülmüştür¹¹.

Bazı antiepileptik ilaçların teratojenik indekslerini karşılaştırmak için zebra balıklarında yapılan bir çalışmada valproik asidin teratojenik indeksi en yüksek bulunurken, etoksüksimid ve levetirasetamın en düşük olduğu bulunmuştur¹².

Hamile albino sıçanlarla yapılan bir çalışmada, levetirasetamın karaciğer ve böbrek üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçta sıçanların karaciğer ve böbreklerinde zararlı etkilere neden olduğu bulunmuştur. Kullanılması gereken durumlarda karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının sürekli olarak değerlendirilmesi ve levetirasetam toksisitesinin mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için daha fazla araştırma yapılması önerilmiştir³⁵.

Farklı dozlarda levetirasetam verilen gebe ratlarda yapılan bir çalışmada (2010), anomali oluşumu, motor ve kognitif fonksiyonlar incelenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırılan levetirasetam gruplarında lokomotor aktivite, bilişsel ya da fiziksel gelişimde önemli ölçüde bir değişiklik gözlenmemiştir¹⁰.

Antiepileptik ilaçlardan biri olan fenitoinin teratojenik etkisini inceleyen bir çalışmada (2009), tavuk embriyolarıyla nöral tüp defektlerinin gelişimi izlenmiştir. Terapötik ve düşük dozlarda teratojen bir etki göstermeyen fenitoin, yüksek dozlarda embriyolarda nöral tüp defekt oluşturmuştur²⁸.

Bu deneysel çalışmada, yeni nesil antiepileptik ilaç levetirasetam ile standart antiepileptik ilaç valproik asit, 360 fertil White-Leghorn tavuk yumurtasında (gebe kalmanın 0. günü) embriyonik gelişim incelenerek teratojenite açısından karşılaştırıldı. Sonuç olarak levetirasetamın ciddi gelişimsel anomalilere neden olabileceğini ve muhtemelen hamile kadınlarda kullanımının güvenli olmadığı sonucuna varılmıştır. Beklendiği gibi valproik asit, levetirasetama göre daha sık gelişimsel anormalliklere neden olmuş ve her iki ilaç kombinasyon halinde uygulandığında risk daha da arttığından, levetirasetam epilepsili gebelerde dikkatli kullanılmalıdır sonucuna varılmıştır⁷.

Çalışmada amaç (2012) levetirasetamın civciv embriyosu için 50 mg/kg dozundaki terapötik aralığında, makroskobik morfolojide nöral tüpün kapanmasını etkileyip etkilemediğini ve levetirasetam uygulanan embriyolarda histolojik düzeyde nöroglial zararlı etkilerinin olup olmadığını saptamaktır. Araştırmacılar çalışmalarında mikrosefalik fetüslerdeki nöral tüp kapanmasındaki gecikmenin morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel gelişimi bozduğunu bulmuştur⁸.

Özgür ve ark. (2015) 160 fertil nonpatojenik süper Nick cinsi yumurta ile bir deney panlamıştır. Gruplar 24 saatlik inkübasyon sonrası her birinde 40 yumurta olacak şekilde oluşturuldu. Levetirasetam, subblastodermik olarak uygulandı. Yumurtalar 24 saat daha inkübe edildi. Tüm yumurtalar 48. saatte açılarak, embriyolar morfolojik ve histopatolojik olarak değerlendirildi. Etkisini daha çok kalsiyum iyonu üzerinden gösteren levetirasetam, doz bağımlı olarak embriyolarda orta hat kapanma kusurlarına neden olmaktadır. Yapılacak daha ileri çalışmalarla, embriyonik hasarlanmanın mekanizması ile genetik ve çevresel etmenlere bağlı teratojen etkiler arasındaki mekanizmaları ortaya koymak gerekmektedir³⁶.

2.2.5.2. İnsanlarda Gebelik Döneminde Yapılan Çalışmalar

Epilepsi tedavisi gören gebe kadınlarda doğumsal anomaliyle ilgili ilk rapor 1960'lı yıllarda verilmiştir^{5,37-39}.

1993 yılında yayınlanan derlemede normal doğumlarda fetal anomalilerin görülme oranının %3 olduğu, antiepileptik ilaç kullanan gebelerde ise bu oranın iki kat arttığı belirtilmiştir. Aynı derlemede epilepsi tedavisi gören erkeklerin çocuklarında anomalilerin biraz artabileceği ile ilgili bazı raporların da olduğu ileri sürülmüştür. Düşükle ilgili antiepileptik ilaçların bir ilişkisi gösterilememiştir³⁷.

Epilepsi, doğurganlık çağındaki yaklaşık bir milyondan fazla kadını etkileyen yaygın ve sürekli bir hastalıktır. Gebe kadınlarda epilepsi prevalansının %0,3-0,5 (2019) olduğu tahmin edilmektedir⁴⁰.

Gebelerde erken evrelerde kullanılan antiepileptik ilaçlar fetüste malformasyonlara sebep olmaktadır. Bu ilaçlardan fenitoinin teratojen etkisi tam olarak bilinmemekle beraber, gebelerde kullanımı risklidir. Konjenital malformasyonların kromozomal anomaliler veya genlerdeki herhangi bir bozulmadan dolayı oluştuğu düşünülse de, çevresel etmenler de büyük rol oynamaktadır²⁸.

Antiepileptik ilaçlara bağılı ilk doğum defekti 1960 yılında rapor edilmiştir. Yapılan sonraki çalışmalarda antiepileptik ilaçların konjenital malformasyon oluşumunu 2-3 kat arttırdığı gözlenmiştir. Bununla beraber ilacın dozu arttırıldığında ya da politerapi tedavisi uygulandığında malformasyon riskinin daha da arttığı belirtilmiştir. Çeşitli hayvan ve insan çalışmalarında malformasyonlara ek olarak (Örn. Rahim içi valproata maruz kalma ile yaklaşık % 1.5 nöral tüp defekti riski), antiepileptik ilaçların kognitif bozuklukla sonuçlanan davranışsal problemler de sebep olabileceği endişesi dile getirilmiştir⁴¹⁻⁴⁴.

Son yıllarda, büyük ölçüde çoğul gebelik kayıtlarına dayanan antiepileptik ilaç kullanımıyla oluşan anomaliler ile ilgili bilgilerde belirgin bir artış olmuştur³⁸.

Tonik-klonik nöbetler için epilepsili anne adaylarının aldıkları antiepileptik ilaç fetüs üzerinde ciddi zararlara ve teratojenik etkilere neden olabilmektedir³⁹. Karbamazepin, gabapentin, lamotrijin, levetirasetam ve topiramet gibi antiepileptik ilaçlar genellikle gebelik sırasında jeneralize tonik-klonik nöbetlerden kaçınmak için kullanılır. Genel popülasyonla karşılaştırıldığında, in-utero antiepileptik ilaçlara maruz kalan çocuklarda majör malformasyonlar oranında 2-3 kat artış bulunmuştur. Majör malformasyonlar, organ oluşumu sırasında oluşan ve işlevetirasetam bozukluğuna veya ölüme yol açabilen yapısal bozukluklardır. En sık görülen malformasyonlar arasında nöral tüp defektleri, konjenital kalp hastalığı, orofasiyal yarıklar, intestinal atrezi ve ürogenital defektler yer almaktadır. Bu nedenle gebelik sırasında antiepileptik ilaçların reçete edilmesinin olumsuz etkileri, antiepileptik ilaçların embriyonik hücrelerdeki sito-veya genotoksisite mekanizmasının incelenmesini gerekli kılmaktadır⁴⁰.

Yapılan bir klinik çalışmada uzun salımlı formülasyonla levetirasetam kullanı alan gebe kadının epilepsi atakları ve ne kadar doz kullanılması gerektiği izlenmiştir. Advers etkiler ve majör konjenital anomaliler ne kadar azalmış olsa da, ataklara karşı verilen dozun yetersiz olduğu düşünülmüştür⁴¹.

Meador ve ark (2008)'nın yayınladığı makalede antiepileptik ilaçların oluşturduğu konjenital malformasyonlar karşılaştırıldığı ve politerapi uygulanan gebelerde monoterapiye göre anomalilerde artış gözlendiğini belirtmişlerdir. Gebelerde konjenital anomalilerin görülüş sıklığı karşılaştırıldığında valproik asitte ve fenitoinde fazla görülürken; lamotrijin, fenobarbital ve karbamazepinde daha az görülmüştür⁴².

Gebelik sırasında levetirasetam kullanan gebe kadınların bebeklerinde kognitif

gelişme geriliği gözlenmemiştir, bundan dolayı levetirasetamın gebelikte kullanılabilecek bir ilaç olduğu önerilmiştir⁴³.

Bir çalışmada epilepsi hastası olan gebelerde ilaç tedavisi alan ve almayan bireyler değerlendirilmiştir. Fetal malformasyonlara bakıldığında ilaç kullanan (özellikle valproik asit ve topiramat) ve kullanmayan gebelerde değerler birbirine yakın çıkmıştır. Ama nöbet kontrolü açısından ilaç kullanılması yararlı olacaktır⁴⁴.

Yayınlanan gözlemsel bir araştırmada (2009), 2004 yılından beri valproik asit, karbamazepin ve fenitoininin gebelerde reçetelendirilmesi azalırken, levetirasetamın arttığı görülmüştür. monotropi olarak lamotrijin ve levetirasetamın kullanılması yaygınlaşmıştır³⁸.

Yapılan çalışmalarda monoterapötik olarak kullanılan levetirasetamın gebelerde majör konjenital riski % 0.7'den düşük olduğu gözlenmiştir, politerapi olarak kullanıldığında ise bu riskin yükseldiği gözlenmiştir⁴⁵.

Epilepsi ve gebelerde lamotrijin, levetirasetam, karbamazepin ve okskarmazepinin majör konjenital riskinin düşük olduğunu, topiramat ve zonisamitte ise kayıt olmadığı için kesin bir şey söylenmemiştir⁴⁵.

2.2.6. Antiepileptik İlaçların Yan Etkisini Azaltmada Folik Asit, B12 Vitaminin Kullanımını

Merkezi sinir sistemi ağının normal çalışabilmesi için folik asit gerekli bir koenzimdir. Araştırmacılara göre antiepileptik ilaç alan hastalarda serum folik asit seviyesinin düştüğünü ve malformasyon riskinin arttığını ileri sürmüştür. Benzer şekilde, 1990 yılında folat eksikliği spina bifida, çatallanmış beyin ve anensefali gibi nöral tüp defektlerinin bir nedeni olarak tanımlanmıştır. Karbamazepin, gabapentin, lamotrijin, levetirasetam ve topiramatin fetüs üzerindeki klinik etkileri farklı çalışmalarda araştırılmıştır, ancak bunların gebelik sırasında fetüsün embriyonik hücrelerinde malformasyonlara ve teratojenik etkilere neden olma mekanizmalarına dair kanıt bulunamamıştır⁴⁰.

Uzun süreli antiepileptik ilaç uygulaması, serum B12 vitaminin ve folik asit düzeylerinin düşmesine sebep olur⁴⁶⁻⁴⁷.

Bu nedenle, nöral tüp defekti riskini azaltabilen folik asit takviyesi, doğurganlık çağındaki tüm kadınlar için gereklidir^{40,47}.

Folik asit, hidroksimetil ve formil gruplarının bir taşıyıcısıdır ve DNA oluşumu için gerekli olan pürin ve timin sentezinde yer alır. Homosisteinin metiyonine dönüşümü, metionin sentetaz enzimini gerektirir ve metil donörü olarak metiltetrahidrofolatı ve kofaktör olarak B12 vitaminini kullanır. Folik asit, hücrel büyüme ve kırmızı kan hücrelerinin olgunlaşmasını destekler ve folik asit eksikliği, azalmış büyüme ve megaloblastik anemi ile ilişkilidir⁴⁷.

Uzun süreli antiepileptik ilaç kullanımının (2008) folik asit ve B12 vitaminlerinin serumdaki konsantrasyonunu etkilediği gözlenmiştir. Uzun süreli okskarbamazepin, karbamazepin, valproat kullanan epilepsi hastalarında homosistein seviyesi yükselmekte, B12 ve folik asit seviyesi düşüş göstermektedir. Bundan dolayı hastalarda bu üç parametre takip edilmelidir⁴⁸.

2.3. Epilepsi Tedavisinde Kullanılan Levetirasetam

2.3.1. Etki Mekanizması

İkinci nesil bir antiepileptik ilaç olan levetirasetamın sinaptik vezikül 2A'yı (SV2A) bağladığı bilinmektedir ve SV2A'yı devre dışı bırakan fareler doğumdan hemen sonra nöbetler geçirir ve genellikle üç hafta içinde ölür. Fepi tavuğu yetişkinliğe kadar hayatta kalır ve levetirasetam'ı yanıt verir, bu da bu hayvanlarda SV2A'nın düşük seviyeli ifadesinin hayatta kalmaya izin vermek için yeterli olduğunu, ancak nöbetlere karşı koruma sağlamadığını düşündürür⁴⁵.

Antiepileptik ilaçlar, GABA_A iletiminin kolaylaştırarak, sodyum kanallarını inhibe ederek veya düşük voltajlı kalsiyum akımlarını modüle ederek epileptik nöbetlerin oluşumuna engel olurlar⁴⁹. İkinci nesil antiepileptik ilaçlardan biri olan levetirasetamın bu mekanizmalarla etkisini göstermediğini farklı yollarla konvülzanları inhibe ettiği ileri sürülmüştür⁴⁸. Bununla birlikte kesin bir yargıya varılamamış ve daha fazla çalışma yapılması gerektiği belirtilmiştir^{10,50}.

Lukyanetz ve ark(2002) levetirasetamın etkisini CA1 hipokampal nöronlarda bulunan N tipi Ca kanallarını inhibe ederek gösterdiğini savunmuşlardır. Levetirasetamın seçici olarak bu kanallara bağlandığını ve bu bilgiler doğrultusunda levetirasetama duyarlı N tipi bir kanalın olduğu düşünülmüştür⁴⁹.

Bunun yanı sıra farklı çalışmalarda levetirasetamın etki mekanizmasının SV2A oluşturduğu düşünülmüştür. SV2A, beyinde her yerde eksprese edilen sinaptik

veziküllerin bir transmembran proteinidir. Sinaptik vezikül glikoproteinleri 2 (SV2), nöronların ve endokrin hücrelerin salgı veziküllerinde bulunan bir protein ailesini oluşturan keratan sülfat proteoglikanlardır⁵⁰.

Portela ve ark (2000) SV2A'nın antral mukoza üzerinde bulunduğu ifade etmişlerdir⁵¹. Harada ve ark (2013)'nın yaptığı çalışmada antral mukoza üzerinde bulunan SV2A'nın Ca^{2+} ile indüklenen ekzositozun levetirasetamla beraber azaldığını göstermişlerdir⁵².

Lynch ve ark (2004) levetirasetamın SV2A'ya spesifik bağlandığını belirtmişlerdir⁵³.

Işığa duyarlı refleks epilepsi ile tetiklenen nöbetler tetiklediği nöbetler SV2A'nın ikinci intronunun (sinaptik vezikül glikoprotein 2A'yı kodlayan gen) alıcı bölgesindeki mutasyon sebebiyle olmaktadır. Bu nörolojik bozukluk otozomal resesif bir mutasyon olarak kalıtılmaktadır. Bu mutasyon, anormal bir ekleme splicing) olayına neden olur ve homozigot taşıyıcılarda SV2A mRNA seviyesini önemli ölçüde azaltır⁵⁴.

2.3.2. Farmakokinetik Özellikleri

1999'da yapılan bir çalışmada intraperitoneal olarak levetirasetam uygulanan ratlarda levetirasetamın periton boşluğunda ve BOS'ta görülme hızının yüksek olması sebebiyle kan beyin bariyerini rahatça geçebildiği sonucuna varılmıştır⁵⁵⁻⁵⁶.

Bir çalışmada (2007) epilepsili olan ve birçok ilaçla tedavi gören çocuklarda levetirasetamın diğer ilaçlarla ilişkisi gözlenmiştir ve levetirasetamın diğer ilaçların plazma konsantrasyonları etkilemediği görülmüştür⁵⁷.

Yapılan çalışmalarda levetirasetamın stereoselektif, geridönümlü bağlandığı gösterilmiştir. Sultiyamla karşılaştırılan levetirasetamın, sıçan beyinde nörotoksik etkisinin az, antikonvülsan etkisinin daha fazla olduğu gözlenmiştir⁵⁸.

Epilepsi için levetirasetam kullanan çocuklarda yapılan bir araştırmada (2009) ilacın farmakokinetiği belirlenmiş ve kiloya bağlı ilacın verilmesi desteklenmiştir⁵⁹.

Levetirasetamın yaklaşık olarak %66'sı böbreklerden metabolize olmadan atılır, %1'si ise feçesle itrah edilir⁶⁰.

Levetirasetam karaciğer enzimleri tarafından metabolize edilmemektedir. Absorpsiyonu hızlı ve yüksek oranda (%95) görülmektedir. Alındığından 24 saat sonra %66 oranında metabolize olmadan idrarla atılırken, %27 oranında inaktif metabolitiyle

atılır. Karaciğer enzimleriyle metaboliz edilmemesi ve plazma proteinlerine çok az (%10) bağlanmasından dolayı ilaç etkileşimi çok düşük seviyede görülmektedir⁶¹.

Levetirasetamın plazma proteinlerine bağlanma oranının düşük olmasından (<10) ve karaciğerde CYP450 enzimleriyle metabolize edilmemesinden dolayı diğer ilaçlarla etkileşim riskinin düşük olduğu sonucuna varılmıştır⁶⁰.

Çocuklarda yapılan bir çalışmada levetirasetam klerensi, dağılım hacmi, vücut ağırlığı ile ilişkisine bakılmış ve hiçbir farmakokinetik etkileşim gözlenmemesine rağmen kiloya göre pediatrik dozaj belirlenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır⁶².

2.3.3. Endikasyonları ve Kullanım Dozları

Levetirasetam, geniş spektrumlu bir nöbet önleyici ajandır ve epilepsi için en sık reçete edilen antiepileptik ilaçlardan biridir³⁵. Nootropik bir ilaç olarak 1980 yılında sentez edilen levetirasetamın epilepsi tedavisinde kullanımı 1999 yılında FDA tarafından onaylanmıştır⁴³.

Parsiyel epilepside ek tedavi olarak kullanılan levetirasetam, Lennox - Gastaut sendromunda görülen jeneralize ve myoklinik nöbetlerde kullanımının olumlu sonuçlar aldığı belirtilmiştir⁴³.

2011 yılında yayınlanan bir makaleye göre levetirasetam, 4 yaş üstü çocuklarda ve yetişkinlerde sekonder jeneralize nöbetle seyreden parsiyel epilepside, juvenil myoklonik epilepsi tedavisi gören 12 yaş ve üzeri çocuklarda ve yetişkinlerde myoklonik nöbetlerde, idiyopatik jeneralize görülen çocuklarda ve primer jeneralize tonik-klonik görülen yetişkinlerde ek tedavi olarak kullanılmaktadır⁴³.

Yapılan bir çalışmada (2004), levetirasetamın etkisini 1000 – 3000 mg doz aralığında gösterdiğini, refraktör parsiyel epilepside ek tedavi olarak kullanıldığı gösterilmiştir⁶³. Yukarıdaki çalışmada ek tedavi olarak kullanılan levetirasetam, topiramet ve levetirasetamın incelendiği bir başka çalışmada (2007) her ikisinin de hem jeneralize hem de parsiyel epilepside etkili olduğu savunulmuştur^{9,64}.

Pirasetamın S enantiomeri olan levetirasetam ile yapılan bir çalışmada (2005), parsiyel ve jeneralize olan ya da olmayan nöbetlerin tedavisinde ek olarak 1000-3000 mg doz aralığının, idiyopatik jeneralize epilepsi tedavisinde güvenle kullanılabileceği ve vücut dokularında bulunan asetamid grubuna bağlanan bir enzimle %24 oranında metabolize edileceği saptanmıştır⁶⁵.

Genetiği değiştirilmiş epileptik sıçanlarda yapılan bir deneyde (2005), levetirasetamın kronik olarak kullanılması diken dalga epilepsi nöbetlerinde bir azalmaya yol açtığı ve kullanımı kesildiğinde nöbetlerin tekrar gözlemlendiği görülmüştür⁶⁶.

Diyabetik retinopati gelişen farelerde levetirasetamın nöroprotektif etkileri gözlemlenmiştir⁶⁷. Aynı zamanda intrakraniyal kanamalarda da nöroprotektif etkiler gözlemlenmiştir⁶⁸.

2020 yılında yayınlanan bir makalede levetirasetamın kullanım dozunun arttırılabileceği öne sürülmektedir. Çalışmada 6000 mg'a çıkılmış ve bir tehlike arz etmediği görülmüştür⁶⁹.

2006 yılında yapılan klinik bir çalışmada auralı migreni olan hastalarda profilaktik bir etki görülüşü gözlemlenmiştir⁷⁰. Migren tedavisi için yapılan çalışmada (2021) levetirasetamın migrenin sıklığını ve şiddetini azalttığı görülmüştür. Advers etkilerinin düşük olması ve tolerabilitesinin yüksek olması nedeniyle migren ağrısı çeken gebe kadınlar içinde kullanılabileceği belirtilmiştir⁷¹.

Hua-Yen et al (2021) migren hastalığında antiepileptik ilaçların yararlı olabileceği öngörüsüyle bir çalışma planlamıştır. Migren, 4-72 saat süren orta ila şiddetli tekrarlayan baş ağrısı ile karakterizedir. Kortikal hipereksitabilite, migren başlangıcında çok önemli bir rol oynayabilir. Bu nedenle levetirasetam gibi antieptik ilaçlar faydalı olabileceği için çalışmada oral olarak levetirasetam kullanılmıştır. Çalışmamız, oral levetirasetamın migren profilaksisi için umut verici bir terapötik seçenek olduğunu düşündürmüştür. Migren tedavisinde kullanılan valproik asit ve topiramet gibi antiepileptik ilaçların, teratojenite riskleri nedeniyle hamilelik sırasında önerilmemekte, hamile epilepsili kadınlarda levetirasetamın migren tedavisinde güvenli olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır⁷¹.

Bir çalışmada diyabetik retinopatili farelerde levetirasetamın nöroprotektif etkisine bakılmış, levetirasetamın diyabetik retinopatide potansiyel nöroprotektif ajan olabileceği ve bir anti-inflamatuar rolünün olabileceği ileri sürülmüştür⁷².

Leo ve arkadaşları (2019) WAG/Rij fareleri ile bir çalışma yapmıştır. WAG/Rij fareleri epileptogenez, yokluk epilepsisi ve depresif benzeri komorbiditenin doğrulanmış bir genetik hayvan modeli olarak kullanılmaktadır. Çeşitli antiepileptiklerin (etosüksimit, levetirasetam) antiepileptojenik etkilerinin 5 aydan uzun

sürmediği ve bu yüzden tedavinin daha uzun sürmesi gerektiği ileri sürülmüştür. Yapılan çalışmada WAG/Rij farelerinde daha erken bir müdahalenin (21 günden önce) kalıcı antiepileptojenik etkilere yol açabileceği ileri sürülmüştür. Araştırmacılar, epilepsi geliştirmeye genetik yatkınlığın belirlenmesi, epileptogenezi durdurmak için önleyici bir tedavi belirlemek veya bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür⁷³.

WAG/Ri genetiği değiştirilmiş bir aylık sıçanlarda yapılan çalışmada ise etosüksimid ve levetirasetam ile tedavi edilen ratlarda antiepileptik etkinin geçici olabileceği vurgulanmıştır⁷³.

Bir çalışmada, levetirasetamın sıçanlarda deneysel beyin iskemisine karşı kullanılıp kullanılamayacağı, anjiyogenezi artırıp artıramayacağı ve in vivo ve in vitro potansiyel mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. Levetirasetam tedavisinin, serebral iskemiden sonra anjiyogenezi ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklediği saptanmıştır. Ayrıca HSP70, VEGF ve HIF-1a'nın ekspresyonunu indüklemesinin yanı sıra, anti-inflamatuar ve antiapoptotik aktiviteler aracılık ediyor gibi görüldüğü belirtilmiştir. Levetirasetamın serebral iskemi reperfüzyonundan sonra nöral korumaya katkı sağlayabileceği ve olası mekanizmanın perforin salınımı olabileceği belirtilmiştir⁷⁴.

Toledo ve arkadaşları (2022)'de levetirasetam tedavisi gören epilepsili 151 hastada cinsiyet, yaş, renal fonksiyon ve çoklu ilaç kullanım etkisini değerlendirmek üzere araştırma yapmışlardır. Güçlü IEASM (enzim indükleyen nöbet önleyici ilaçlar), özellikle karbamazepin ile birlikte ilaç kullanımı, levetirasetam C/D (konsantrasyon/doz oranı) oranını önemli ölçüde azaltmıştır. Klinisyenler yardımcı ilacı dikkate almamış ve bu hastalara diğerlerine benzer dozlarda levetirasetam vermişler, bu da karbamazepin ile tedavi edilen hastalarda levetirasetam düzeylerinin %27,5 oranında daha düşük olmasına neden olmuştur. Klinisyenlerin çalışmalarında levetirasetam ile birlikte ilaç kullanımına ilişkin farkındalığın artması sağlanmıştır⁷⁵.

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada levetirasetam tedavisinin nöronal hücre ölümünü önemli ölçüde önlediğini, iskemi sonrası anjiyogenezi ve sinir sistemi fonksiyonunun iyileşmesini desteklediğini göstermiştir. Levetirasetam tarafından indüklenen nöroproteksiyon, iskemi tarafından indüklenen inflammatuar yanıtın baskılanması, VEGF, HIF-1a ve HSP70 ekspresyonunun arttırılması ve nöronal apoptozun azaltılması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmaları içerebilir⁷⁴.

2.3.4. Advers Etkileri

Epilepsi dahil olmak üzere birçok psikiyatrik hastalıkta kullanılan levetirasetamın bazı olgularda (2009) yan etki olarak psikoz yarattığı gözlenmiştir. Bu çalışmada iki vakada hastalara gösterdiği belirtilerden dolayı levetirasetam verilmiş ve verildiği süreçte psikozidik davranışlar gözlemlendiği kayda geçirilmiştir⁷⁶.

2.3.5. Kan Beyin Bariyeri

Ratlarda 2004 yılında yapılan bir çalışmada levetirasetamın kan beyin bariyerinde bulunan Para glikoprotein (P-gp) ve Çoklu İlaç Direnci ile İlişkili Protein (MRP)'lerine bağlanma durumları ve levetirasetamın bu iki taşıyıcıya da bağlanmadığı sonucuna varılmıştır⁷⁷.

Uygulamadan sonra levetirasetam hem serumda hem de ekstraselüler sıvıda hızlı görülür, bundan dolayı da kan beyin bariyerini hızlıca geçtiği saptanmıştır⁵⁶.

2.4. *Xenopus laevis*

2.4.1. *Xenopus laevis* Sistematığı

1803 yılında Daudin tarafından verilen isimle 'Le Crapaud Lisse'' ve latince Bufo laevis adını vermiştir (leavis yumuşak demektir). Yapılan taksonomi çalışmalarında bu kurbağanın ait olduğu ve memelilerinde dahil olduğu tetrapoda üst sınıfına ait olduğu ve pipidae familyasının bir elemanı olduğu bulunmuştur. Coğrafi dağılımı sahranın güneyinde tüm Afrika'dır⁷⁸.

2.4.2. *Xenopus laevis* Fizyolojisi

2.4.2.1. *Xenopus laevis*lerin Test Hayvanı Olarak Önemi

Xenopus laevis yumurtalarının ve embriyolarının büyük olması ve biyokimyasal olarak izlenebilmesi nedeniyle oogenez, fertilizasyonun mayotik ve mitotik hücre döngülerinin ve apoptozisin izlenmesinde çokça tercih edilen bir hayvan olmuştur⁷⁹.

Peki sadece Güney ve Orta Afrika'da doğal olarak bulunan bir tür nasıl bu kadar uluslararası bir öneme sahip oldu?

Gelişim biyologları bu soruyu rutin olarak *Xenopus*'u kullanmak için bir araya getirilen ana nedenleri listeleterek yanıtlar:

1. Tamamen suda yaşayan bir omurgalının laboratuvarda bakımının kolaylığı;
2. Hastalığa karşı olağanüstü direnç
3. Amfibiler arasında nispeten kısa olan bir yaşam döngüsü
4. Mikrocerrahi için uygun çok sayıda ve boyutta yumurta;
5. hepsinden önemlisi, diğer amfibilerin sınırlı üreme mevsimlerine kıyasla ticari hormon preparatlarına yıl boyunca üreme tepkisi⁸⁰
6. Laboratuvarda cansız yemle beslenebilmesi⁷⁸

2.4.2.2. *Xenopus laevis*lerin Temini

Ç.Ü Tıp fakültesi Fizyoloji Anabilim dalı 1993 yılında Amerika ve Çin'den ithal ettiği soybaşlarla işe başlamış, laboratuvara uyum (sıcaklık, nem, oksijen miktarı, yaşanılan mekan, olası hastalıkların tedavisi v.b) çalışmalarından sonra FETAX (Frog Embryos Teratogenesis Assay: *Xenopus*) testine başlamıştır. İlk yıllar doğal döllenme ile elde edilen embriyolarla çalışma yapılırken, 1996 yılından itibaren çalışmalarda invitro fertilizasyonla (IVF) elde edilen embriyolar kullanılmaya başlanmıştır³.

2.4.2.3. *Xenopus laevis*in Keşfi ve Yapılan Çeşitli Araştırmalar

*Xenopus*ların, amplexus, yumurta dökme ve iribaş gelişimi 1894 yılında Beddard tarafından Cap Town'dan elde edilen ve Londra'ya ithal edilen 6 örnekten sağlanmıştır. 1905 yılında Bles, Cap Town'da *Xenopus laevis* resmi adıyla döllenme ve erken gelişim dönemleriyle ilgili ilk eser verilmiştir⁷⁸.

1949'da yayınlanan makalede Pollack, *Xenopus laevis* kurbağalarının gebelik testi için kullanıldığını söylemiş ve gebelik şüphesi olan bir kadının idrarı kurbağaya enjekte edildiğinde yumurtlama gözleniyorsa hamile olduğu belirtilmiştir⁸¹.

Yayınlanan bir çalışmada *Xenopus laevis*'in omurilik, beyin ve optik nöronların rejenerasyonunun, memelilerde SSS'indeki yaralanmaların tedavisinde uygulanan yeni yaklaşımlar da nasıl katkı sağladığı tartışılmıştır⁸².

Xenopus laevis insan da kullanılan FSH, hCG ye cevap vermekte olup gebelik testinden kullanılmaya başlanmasından sonra giderek yaygınlaşan bir laboratuvar

hayvanı olmaya başlamıştır⁸³.

Laboratuarlarda çok kullanılan *Xenopus laevis* omurgalıların embriyogenezini incelemede kullanılan temel bir sistemdir. Omurgalılarda görülen embriyonik indüksiyon *Xenopus laevis* üzerinde araştırılmakta ve alınan sonuçlarda büyüme faktörlerinin bu oluşumda rol olduğunu göstermektedir. *Xenopus laevis*ten kolayca embriyo üretilebilir, omurgalılarda embriyo oluşumunun erken safhalarından itibaren görülebilir, transparan bir yapıdadır, yumurtalar büyüktür ve fiziksel olarak manipüle edilebilir⁸⁴.

2.4.3. FETAX Testi

Gelişimde toksik maddelerin belirlenmesini sağlayan FETAX testi hızlı bir testtir. Ayrıca test materyalleri arasındaki yapısal aktiviteyi ve biyoyararlanımı incelemek için de kullanılabilir.

FETAX'la alınan sonuçlar suda yaşayan organizmalar için suyun kalitesinin belirlenmesinde de önemli rol oynar⁸⁵.

FETAX testinin bazı özellikleri;

1. Hızlıdır, 96 saatte deney tamamlanabilir.
2. Yinelenebilir
3. Diğer metodlara göre ekonomik olarak daha uygundur
4. Bir erkek ve dişi kurbağadan oldukça fazla embriyo elde edilir.
5. Embriyolara verilen teratojenlerin dozu kolaylıkla kontrol edilir.
6. 96 saatte yapılan bu testte embriyolarda hareketlenmeler görülür. Bu hareketlenmelerle kasların ve sinirlerin işlevetirasetamselliği incelenebilir.
7. Bitiş noktalarının tanınması da kolaydır. Bitiş noktaları; mortalite, anatomik deformiteler, büyüme, ulaşılan gelişim aşması, motilite (davranış) ve pigmentasyondur
8. Dış döllenme olduğu için embriyolara teratojenlere doğrudan maruz bırakılabilir⁸⁶.
9. İstenildiği zaman insan hormonları verilip yumurta elde edilebilir⁷⁸.

Çeşitli gruplar tarafından yapılan çalışmalarda kısa süreli FETAX testi, kemirgenlerde elde edilen sonuçlarla %89 oranında uyumlu bulunmuştur⁸⁷.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Ergin *Xenopus laevis* Barındırılması

Çalışmada, 6 adet dişi, 6 adet erkek wild *Xenopus laevis* türü kurbağadan elde edilen toplam 720 (600 deney + 120 kontrol) embriyo kullanılmıştır.



Şekil 4.A)Ergin erkek *Xenopus laevis* B)Ergin Dişi *Xenopus laevis*

*Xenopus laevis*ler camdan yapılmış (95x60x40 cm) boyutlarında akvaryumlarda barındırılmıştır. Akvaryum suyu 3-4 gün ağzı açık kaplarda dinlendirilmiştir.



Şekil 5.Ağzı açık kaplarda dinlendirilmiş su

*Xenopus laevis*ler haftada 2 kez tavuk ciğeri ile ad libidum beslenmiştir ve akvaryumlar beslenmeden sonra temizlenmiştir. Laboratuar sıcaklığı 23 ± 2 °C'de tutulmuştur ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periodu uygulanmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan kimyasal FETAX solüsyonu içinde çözdürülmüştür.

FETAX Solüsyonu

625 mg NaCl

96 mg NaHCO₃

30 mg KCl

25 mg CaCl₂

60 mg CaSO₄·2H₂O

75 mg MgSO₄

1000 mL deiyonize su (kullanılan kimyasal maddeler Sigma'dan sağlanmıştır).

İn vitro Fertilizasyon prosedüründe kullanılan hormonlar:

1. Meriofert 150 IU (İnsan menozpozal gonadotropini, FSH)
IBSA, İsviçre
2. Ovitrelle 250 mcg, 0.5 mL; 6500 IU; (koriogonadotropin alfa, hCG) Merck, İtalya

Çalışma kimyasalımız: LEVETAM (Levetirasetametam 500 mg/mL) Poliforma İlaç San., İstanbul

Ergin erkek *Xenopus laevis* için Anestezi maddesi:

Tricain: Ethyl-m-AminoBenzoate methanesulfonate salt Katalog no: 103106, Firma INC Biomedicals

3.3. FETAX Prosedürü

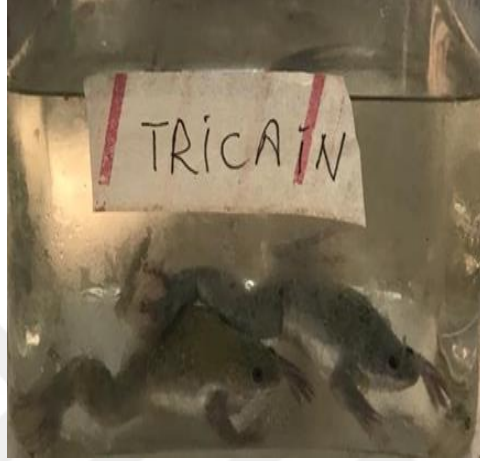
3.3.1. Embriyo Eldesi

İn vitro Fertilizasyon Prosedürü;

- a. FETAX 96 + 5 saat süren bir embriyoteratogenezis testidir. *Xenopus laevis* dişisine deney gününden 4 gün önce 35 IU FSH enjekte edilmiştir ve ayrı kaplara aktarılmıştır.
- b. Dört gün sonra aynı dişiye 600 IU hCG zerkedilmiştir.
- c. Gece 18°C'de tutulmuştur.

d. Ertesi sabah ergin *Xenopus* stan sağma yöntemi ile yumurta elde edilmiştir. Bu yöntemde hayvanın sırt kısmına hafifçe basınç uygulanmış ve yumurtaların petri kabına dökülmesi sağlanmıştır.

e. Erkek *Xenopus laevis* tricain (Ethyl-m-Amino Benzoate methane sulfonate salt) anestezi altında 10 dakika tutularak ldrlmştir.



şekil 6.Ergin erkek *Xenopus laevis*'in tricain anestezi

f. Testisler disseke edilerek soğutulmuş kap içerisindeki tris-fosfat solüsyonuna konulmuştur.



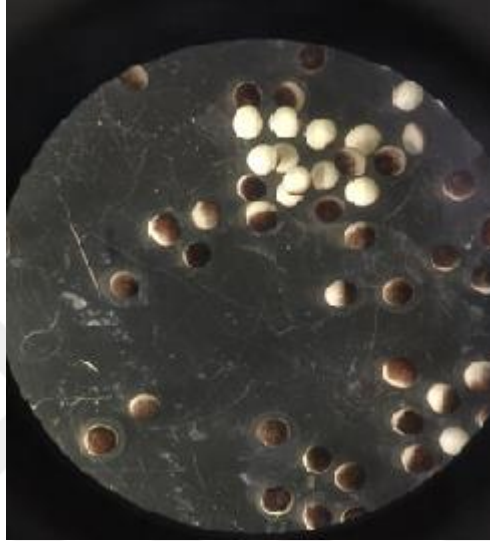
şekil 7. Disseke Edilen Testis (Tris-Fosfat çözeltisinde)

g. Yumurta sağımı bitince testisler FETAX solüsyonu içinde kıyılmıştır ve yumurta bu sperm süspansiyonu ile dllenmiştir.

h. Bu işlem sperm süspansiyonunun damla damla yumurta üzerine gklmesi ile

yapılmıştır.

1. 45 saniye sonra üzeri yeterli FETAX solüsyonu ile örtülmüştür.
- i. Bir saat sonra döllenmiş yumurtalar mikroskop altında soyulup yaklaşık 5 saat sonra (8-9. evrelerde, yani geç blastula ve erken gastrula aşamalarında) petri kutularına aktarılmıştır.



Şekil 8. Evre 8-9 aşamasındaki embriyolar

- j. Herbiri FETAX solüsyonu içinde çözündürülmüş levetirasetamın çeşitli konsantrasyonlarını (1.2; 12; 24; 48 µg/mL) içeren 50 mL'lik petri kaplarına 20 embriyo olacak şekilde hazırlanmıştır.
- k. Petri kapları örtülerek 23°C'lik inkübatöre konulmuştur.



Şekil 9. *Xenopus laevis* embriyolarının muhafaza edildiği inkübatör (23 °C ±1)

l. Her 24 saatte solüsyonlar değiştirildi, mikroskop altında embriyoların evreleri incelendi ve normal, anormal, ölüm oranları kaydedildi.



A) Yumurta Seçimi B) Mikroskop altında inceleme
Şekil 10.IVF sonrası bölünme evreleri ve embriyo seçimi

m. 96 saat sonunda final olarak embriyoların mikroskop (Olympus SZ61) altında boyları ölçülüp, normal anormal embriyolar fotoğraflandı.

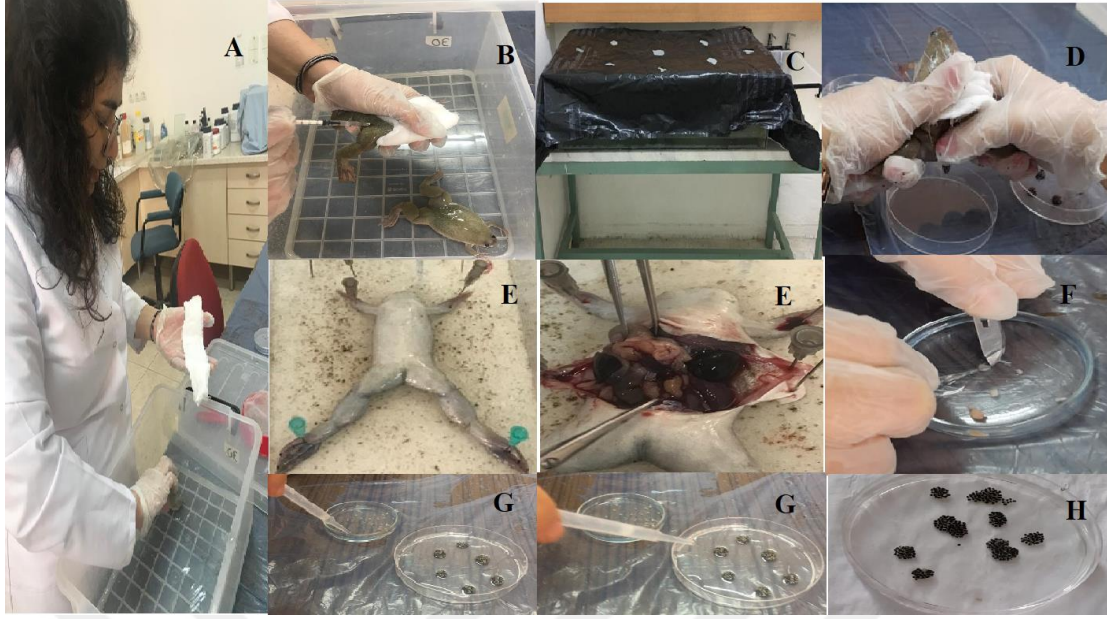
n. 10'ar embriyo erken gelişim dönemindeki gen ekspresyonlarını belirlemek için ependorfların içerisinde Tıbbi Biyoloji Anabilim dalına gönderildi.

o. Herbir gruptan 5'er embriyo histopatolojik inceleme için Patoloji Anabilim dalına gönderildi

ö. Geri kalan embriyolar %3'lük formaldehir içinde tespit edildi.

p. Herbir çalışma 2 seri halinde düzenlenmiş ve 3 kez aynı posedürler uygulanmış ve çalışma sonuçta ön hazırlık ve deney aşaması olarak toplamda 5 hafta sürmüştür.

r. **Ön hazırlık olarak** Xenopusların tanıtılması, solüsyon hazırlanması ve FETAX testinin nasıl yapıldığının öğretilmesi için Fizyoloji Anabilim Dalında 2 haftalık bir kurs düzenlenmiştir.



Şekil 11. IVF Protokolü A) Ergin Dişinin Tutulması B) Enjeksiyon C) Ergin Kurbağaların Karanlık Odada Muhafazası D) Ergin Dişiden Yumurta Dağması E) Testis Diseksiyonu F) Testislerin Kıyılması G) Sağılan Yumurtaların Sperm Süspansiyonu H) Döllenen Yumurtalar

3.4. mRNA Ekspresyonu

3.4.1. RNA İzolasyonu

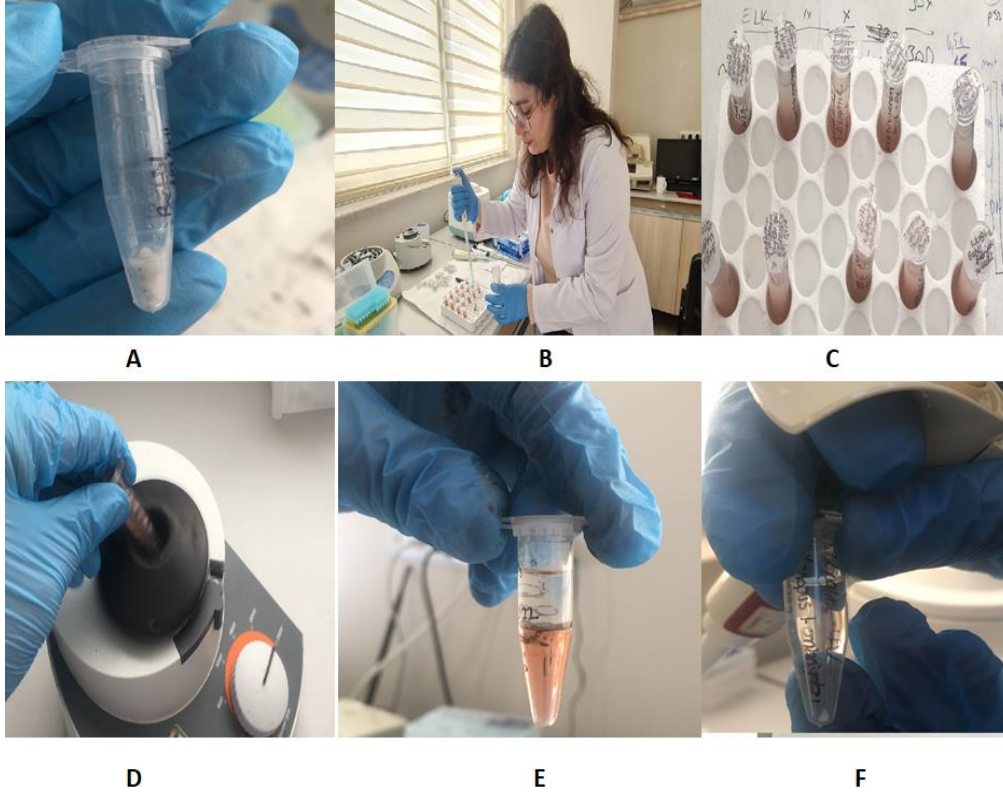
Örneklerden RNA izolasyonu TRIpure Total RNA Extraction Reagent kit prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirildi.

1. 30-100 µg örnek üzerine 1 mL TRIpure solüsyonu eklenerek vorteks yapılmış ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
2. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyondan sonra örnek üzerine 200 µL kloroform eklenmiş ve vorteks üzerinde 15 saniye karışması sağlanmış ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
3. İnkübasyon sonunda örnek +10°C'de 12000 rpm 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında ependorfta 3 faz gözlenmiş, en üstte saydam olarak görülen RNA yeni bir ependorfa aktarılmıştır.
4. RNA üzerine eşit hacimde isopropanol ekleniş, 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
5. İnkübasyon sonunda örnek +4°C'de 12000 rpm 10 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrası RNA, pelet halinde ependorf duvarında görülmektedir.
7. Süpernatant uzaklaştırılarak RNA peleti üzerine 1 mL %75 Etanol-DEPC su

eklenmiş, birkaç defa alt üst edilerek yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra +4°C 12000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

8. Santrifüj sonrasında supernatant uzaklaştırılarak oda sıcaklığında 2-3 dakika kurumaya bırakılmıştır.

9. Süre sonunda pelet miktarına göre DEPC’li su eklenerek, örnek -80°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.



Şekil 12. mRNA Ekspresyon Düzeyi Analizi A)-80 °C’de Bulunan Embriyolar Vorteksle Santrifüj Edilmesi B) İnkübasyondan Sonra Kloroform Eklenmesi C) Kloroform Eklenmesiyle Oluşan Görünüm D) Kloroform Vorteksle Santrifüj Edilmesi E) Fazların Ayrılması F) Santrifüj Sonrası RNA Elde Edilmesi

3.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzole edilen RNA’ların abm’si OneScript® cDNA Synthesis Kit’i kullanılarak RNA’dan kantitatif RT-PZR için standart prosedür uygulanarak cDNA sentezi yapıldı.

Revers transkripsiyon (RT) kit bileşenleri buz üzerinde çözdürüldükten sonra RT master mixi yine buz üzerinde hazırlandı.

Tablo 3. cDNA revers reaksiyonun hazırlanması

RT Master Mix	Kullanılan miktar
5X RT Buffer	4.0 µL
Dntp	1.0 µL
Primer	1.0 µL
OneScript® Plus RTase	1.0 µL
Total RNA	0.5 µg
Nükleaz İçermeyen Su	20 µL tamamlanacak şekilde

Tablo 4. RT-PCR Analizinde Sıcaklık ve Zaman Ayarı

	1. Aşama	2. Aşama	3. Aşama
Sıcaklık	25 °C	55 °C	85 °C
Zaman	10 dakika	15 dakika	5 dakika

3.4.3. Real Time PCR

İlgili genlerin mRNA ekspresyonlarının belirlenmesi için, Bio Rad DX Real-Time Systems cihazında EnTurbo SYBER Green PCR SuperMix kiti kullanılmıştır.

Tablo 5. Real-Time PCR için kullanılacak primerlerin çizelgesi

Gen	Primer Dizisi
GAPDH	F:5'-GCTCCTCTCGCAAAGGTCAT-3' R:5'-GGGCCATCCACTGTCTTCTG-3'
PAX6	F: 5'-GGAATTACACAGTCCCTGGG-3' R: 5'-CCGAGAAATGTGCGAGGG-3'
HSP70	F:5'-CATTGACCTCGGCACTACCT-3' R:5'-CGATCAGTCTCTTGGCATCA-3'
ESR1	F:5'-ACCCAAATGAACTGCTTAACCA-3' R:5'-GGAGTCAGAGACACTGGGAATATATG-3'
MYF5	F:5'-CAACTCCACTGAGCATCTTTCTAAG-3' R:5'-CGTCTTCATCCGATTCTTCAAGGTC-3'
BMP4	F:5'-CCTCAGCAGCATTCCA-3' R: 5'-TCCGGTGGAAACCCTCATCC-3'

Real Time PCR karışımı Tablo 5’teki gibi hazırlanmıştır. Bio Rad DX Real-Time Systems Real time- PCR cihazında program Tablo 5’teki gibi ayarlanmıştır.

Tablo 6. Real Time RT-PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyon karışım bileşenleri	1X (20 µl)
RealQ Plus 2x Master Mix	10 µl
Primer F	0.4 µl
Primer R	0.4 µl
cDNA örneği	2.0 µl
RNAaz- içermeyen su	7.2 µl

Tablo 7. Bio Rad DX Real-time System as real-time RT-PCR için kullanılan ısı döngüsü

	Isı Döngüsü Koşulları	
Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (dd: ss)
Hold	95	00:30
Döngü (40 Döngü)	95	00:05
	60	00:30
	72	00:30

3.5. Histopatolojik Analiz

Xenopus leavis embriyosu ile tespit ve takip işlemi sonrasında, parafin bloklar oluşturuldu. Parafin bloklardan hazırlanan histolojik kesitler, hematoksilen eozin (H&E) boyası ile boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirildi (x40,x100 büyütme).

3.6. Veri Analizi

3.6.1. RT-PCR Veri Analizi

Gruplararası çoklu karşılaştırma için Dunnet testi (kontrole göre karşılaştırma) ve Tukey testi yapıldı. Normal dağılmayan verilerin karşılaştırması Kruskal Wallis, gruplar arası ise Benferroni düzeltmeli Mann -Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar %95’lik güven aralığında, anlamlılık ise $p<0.05$ olarak değerlendirildi. Veriler SPSS 16.0 programı ile yapıldı. Ortalama ve standart hata olarak analiz edildi. RT-PCR genleri 3 kez tekrarlanması tüm grafikler sigma plot 10.0 programı kullanılarak yazıldı.

3.6.2. Normal Anormal Ölüm Oranları ile Boy Uzunluğu Analizi

Veri analizi IBM SPSS 20.0 yazılım paketi (2010) kullanıldı. Gruplar arasındaki farkları karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA testi yapıldı. Çoklu karşılaştırmalarda varyans homojenliği Tamhane testi ile kontrol edildi. Normal, anormal ve ölü yüzdelerini karşılaştırmak için Ki-kare testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi tüm testlerde $p \leq 0.05$ olarak belirlendi.

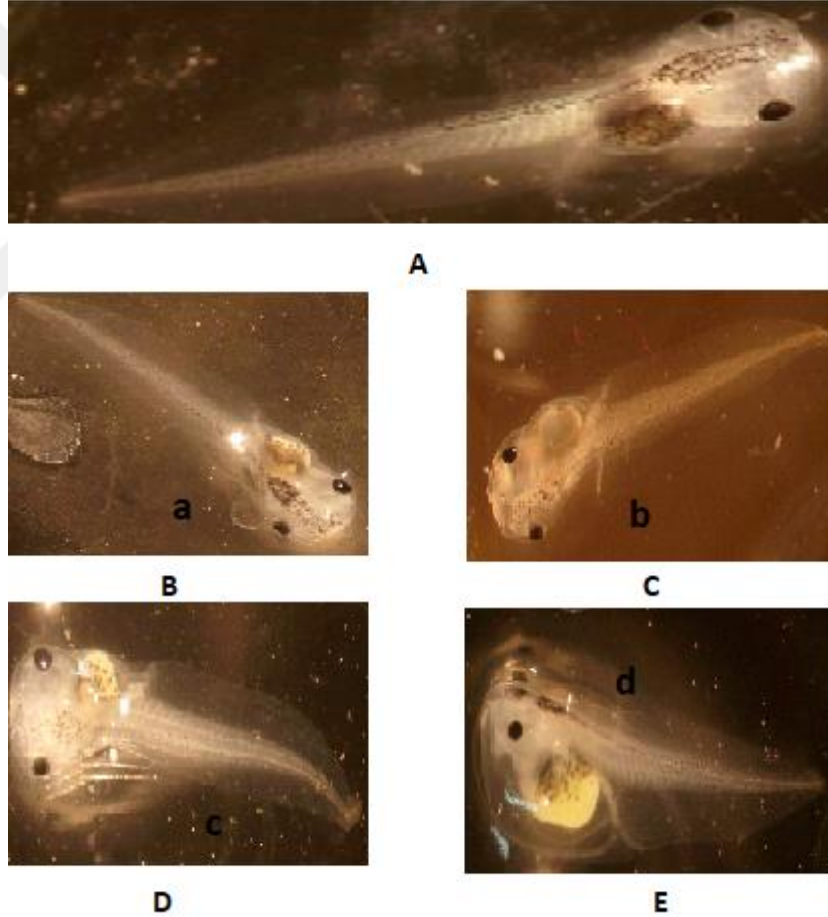


4. BULGULAR

4.1. *Xenopus laevis* Embriyolarının Normal Anormal Ölüm Oranları

Tablo 8. FETAX Testi ile Levetirasetam Uygulanan Gruplarda Normal Anormal ve Ölüm Oranları
($p < 0.01$)

Konsantrasyon	Normal (%)	Anormal (%)	Ölüm (%)	N	p
Kontrol	119 (%99.2)	1 (%0.8)	0 (%0)	120 (%100)	Ref
1.2 µg/mL	119 (%99.2)	1 (%0.8)	0 (%0)	120 (%100)	1
12 µg/mL	119 (%99.2)	1 (%0.8)	0 (%0)	120 (%100)	1
24 µg/mL	115 (%95.8)	1 (%0.8)	4 (%3.3)	120 (%100)	1
48 µg/mL	115 (%95.8)	3 (%2.5)	2 (%1.7)	120 (%100)	0.368

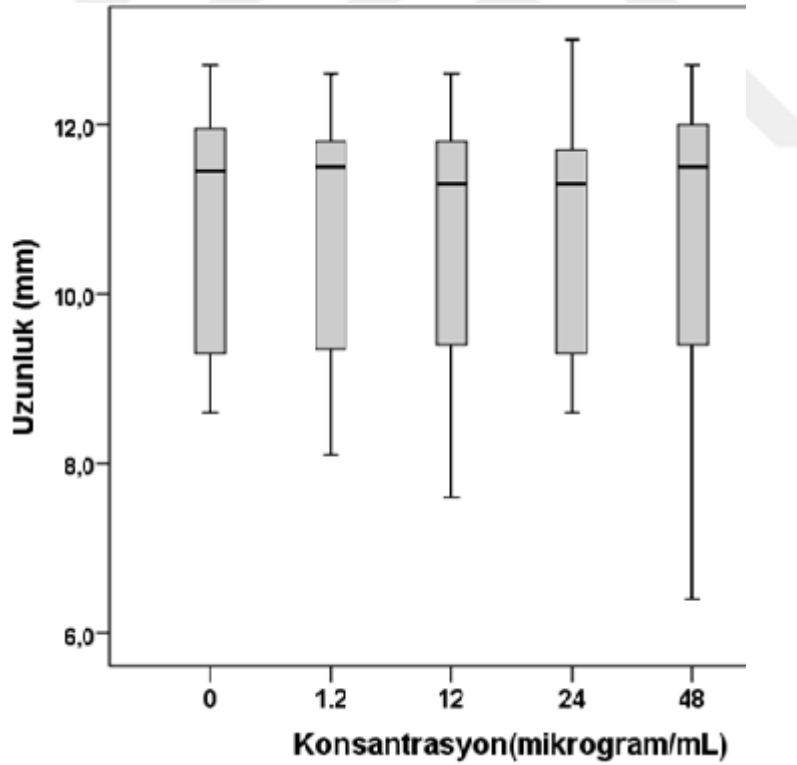


Şekil 13. Levetirasetam Uygulanan *Xenopus laevis* Embriyolarında Gözlenen Anomaliler A) Kontrol B) 1.2 µg/mL Levetirasetam Uygulanan Embriyo C) 12 µg/mL Levetirasetam Uygulanan Embriyo D) 24 µg/mL Levetirasetam Uygulanan Embriyo E) 48 µg/mL Levetirasetam Uygulanan Embriyo, a: Hipopigmentasyon b: Kıruk Kuyruk, c: Ödem, d: Mikrocefali, e: Bül

Çalışmada levetirasetam uygulanan embriyolarda göze çarpan her konsantrasyonda embriyolardaki hipopigmentasyonu. Ayrıca kırık kuyruk, ödem, mikrosefali az da olsa gözlenmiştir.

Xenopus laevis embriyoları levetirasetamın çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında 1.2 µg/mL’de normal anormal ölüm oranları sırasıyla (%); 99.2, 0.8, 0 ; 12 µg/mL’de 99.2, 0.8, 0 ; 24 µg/mL 95.8, 0.8 ,3.3 ; 48 µg/mL ise 95.8, 2.5, 1.7 olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda ise 1.2 ve 12 g/mL olduğu gibi 99.2, 0.8, 0 olarak saptanmıştır (Tablo 8, Şekil 13). Tablo 8’ye göre levetirasetamın teratojenik etkinliği doza bağlı olarak 24 µg/mL’den itibaren başlamıştır. Levetirasetamın kullanılan konsantrasyonları ile kontrol grubu arasında normal, anormal, ölüm oranlarında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır.

4.2. *Xenopus laevis* embriyolarının Boy Uzunluklarının Değerlendirilmesi



Şekil 14. *Xenopus laevis* embriyolarının boy uzunluklarının karşılaştırılması

Yapılan FETAX testinde 96 saat sonunda mikroskop altında boyları ölçülen embriyolarda kontrole göre aralarında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Kontrol ve deney grubu 1.2, 12, 24, 48 µg/mL konsantrasyonlarına maruz bırakılan embriyolarda mikroskop altında ölçülen uzunluklar analiz edildiği zaman gerek kontrolle deney grupları arasında gerekse de deney gruplarının kendi aralarında karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (**Şekil 14, Tablo 9**).

Tablo 9. Levettirasetamın Çeşitli Konsantrasyonlara Maruz Bırakılan Embriyolarda Boy Uzunluğu ve %95’lik Güvenirlik Aralığı

	Boy uzunluğu $\pm$ SD	%95 Güvenirlik Aralığı Min – Max	p
Kontrol	10.867 $\pm$ 1.3391	10.625 – 11.109	Ref
1.2 µg/mL	10.833 $\pm$ 1.2843	10.600 – 11.065	1
12 µg/mL	10.753 $\pm$ 1.2997	10.518 – 10.987	1
24 µg/mL	10.794 $\pm$ 1.2757	10.560 – 11.029	1
48 µg/mL	10.925 $\pm$ 1.3577	10.676 – 11.173	1

Xenopus laevis embriyolarının uzunluklarının standart deviasyonu ve %95 güvenilirlik aralığı (p>0.005)

Yapılan istatistiksel analize göre kontrol ile deney grupları arasında farklılık gözlenmemiştir.

4.3. Histopatolojik İnceleme

FETAX testiyle çeşitli levettirasetam konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Xenopus laevis* embriyosunda kontrol (**Şekil 15**), 12 µg/mL levettirasetam uygulanan

deney grubu (Şekil 16) ve 24 µg/mL levetirasetam uygulanan deney grubunda (Şekil 17) embriyoların dorsal kısmında beliren melanoforlar değerlendirilmiştir. Buna göre makroskopik değerlendirmede herhangi bir patolojik bulgu saptanmayan *Xenopus laevis* embriyosu, kontrol embriyonun dorsal kısmında görülen normal pigmentasyonun deney gruplarında azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 15. . Levettirasetam Uygulanan Deneylerde Kullanılan Kontrol Embriyosu (okla gösterilen siyah noktalar pigmentasyondur)



Şekil 16. 12 $\mu\text{g/mL}$ Levetirasetam Dozuna Maruz Bırakılan Embriyolarda Hipopigmentasyon (okla gösterilmiştir)



Şekil 17. 24 $\mu\text{g/mL}$ Levetirasetam Dozuna Maruz Bırakılan Embriyolarda Hipopigmentasyon (okla gösterilmiştir)

4.4. Gen analizi

96 saat süren FETAX testi sonunda 1.2, 12, 24, 48, 96 µg/mL konsantrasyonuna maruz bırakılan embriyoların erken gelişim döneminde mRNA ekspresyon oranı farklılığı kontrole göre değerlendirilmiştir. Tüm gruplar kendi kontrol grupları ile 1'e normalize edilmiştir

Kontrol grubuna kıyasla levetirasetamın 1.2, 12, 24, 48 µg/mL konsantrasyonlarına 96 saat muamele edilen grupta; PAX6 gen ifadesi, sırasıyla 1.12, 1.82, 1.55, 1.74 kat indüklendiği görülmüştür(p=0.728).

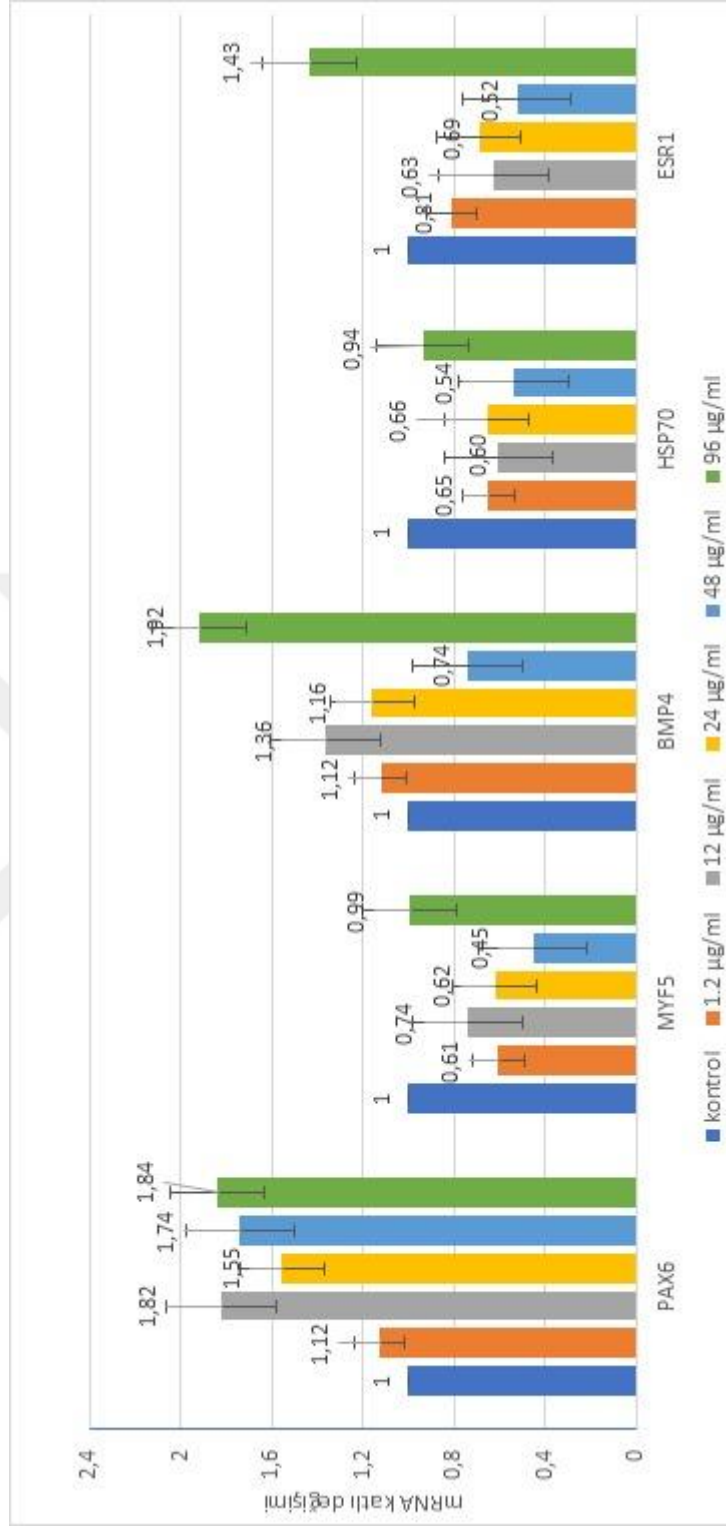
Kontrol grubuna kıyasla levetirasetamın 1.2, 12, 24, 48 µg/mL konsantrasyonlarına 96 saat muamele edilen grupta; MYF5 gen ifadesi sırasıyla 1.6, 1.3, 1.6, 2.2 kat baskılanmıştır (p=0.673).

Kontrol grubuna kıyasla levetirasetamın çeşitli konsantrasyonlarına 96 saat muamele edilen grupta; BMP4 gen ifadesi 1.2, 12, 24, 48 µg/mL konsantrasyonunda sırasıyla 1.12, 1.36, ve 1.16 kat indüklenirken, 48 µg/mL 1.3 oranında baskılanmıştır (p=0.543).

Kontrol grubuna kıyasla levetirasetam'ın 1.2, 12, 24, 48 µg/mL konsantrasyonlarına 96 saat muamele edilen grupta; HSP70 gen ifadesi sırasıyla 1.5, 1.6, 1.5 ve 1.8 kat baskılanmıştır (p=0.681).

Kontrol grubuna kıyasla levetirasetamın 1.2, 12, 24, 48 µg/mL konsantrasyonlarına 96 saat muamele edilen grupta; ESR1 gen ifadesi sırasıyla 1.2, 1.6, 1.4, 1.9 oranında baskılanma görülmüştür (p=0.536).

Sonuç olarak erken gelişim döneminde, önemli olan Pax6 (Aniridia Tip II protein Geni), Myf5 (Miyojenik faktör 5 Geni), Bmp4 (Kemik Morfojenik Protein 4 Geni), Hsp70 (70 Kilodaltonluk Isı şok Protein Geni), Esr1 (Östrojen Reseptör Alfa Geni) gen ifadelerinde kontrol ile aralarında istatistiksel anlamlılık bulunmamakla beraber değişim eğilimi gösterdiği saptanmıştır (**Şekil 18**).



Şekil 18. LEV uygulanan *Xenopus laevis* embriyosunda erken gelişim dönemindeki genlerin ekspresyonu

5. TARTIŞMA

Çalışmamız levetirasetamın teratojenik ve toksik etkilerinin biyolojik bir model olarak kullanılan *Xenopus laevis* embriyosunda FETAX ile değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Epilepsiye ilişkin klinik gözlem ve bilgiler oldukça eskiye dayanmaktadır⁸⁸. Çok eski uygarlıkların belgelenmiş kanıtlarına göre, hastalığı taşıyan talihsiz ruhların bazı zamanlarda "doğaüstü" güçlerin etkisinde olabileceğine inanılmıştır. Daha sonraki yıllarda bu hastalığın sinir sistemini etkilediğini belirten sonuçlar paylaşılmıştır⁸⁹ ve epilepsi tekrar tanımlanmıştır. Bu tanıma göre epilepsinin beyindeki stabil seyirde gözlenen elektriksel aktivitenin değişmesiyle aniden ortaya çıkan nörolojik bir hastalık olduğu sonucuna varmışlardır⁹⁰.

Her yaş aralığında görülebilmesi, idiyopatik ya da bazı hastalıkların semptomu olarak ortaya çıkması, farklı şiddetlerde ve belirtilerde birçok çeşidinin olması epilepsiyi kompleksleştirmektedir⁸⁸.

Levetirasetam pirasetamın S-enantiomeridir ve piyasaya nootropik bir ilaç olarak sürülmek istenmiştir. Yapılan çalışmalarda levetirasetamın epilepsiye etkisi gözlemlenmiş, antikonvülsan bir ilaç olarak FDA'dan onay almıştır⁹¹.

5.1. Levetirasetamın Teratojenitesi

Birçok gebe kadında da görülen epilepsi, antiepileptik ilaçlarla tedavi edilmektedir. Genel olarak gebelik kategorisinde C ve D grubunda olan antiepileptik ilaçların⁹² teratojenik etkisini gözlemleyebilmek için birçok klinik ve hayvan çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında farklı sonuçlar elde edildiği için kesin bir yargıya varılamamıştır^{7,9,28,41,90-91,93-94}.

2003'te yapılan (Isoherranen ve ark.) bir çalışmada, pirasetamı, levetirasetamı ve levetirasetamın metabolitinin antikonvülsan ve teratojenik etkisini fareler üzerinde karşılaştıran bir çalışma yayınlamışlardır. Buna göre levetirasetamın antikonvülsan etkisi metabolitinden ve pirasetam oldukça yüksek ve teratojenik etki riski düşük bulunmuştur⁹¹.

Tavuk embriyolarında yapılan bir çalışmada (2011) levetirasetam ile valproik asitin teratojenik etkileri incelenmiştir. Valproik asitte daha fazla olmakla beraber iki ilacın da konjenital malformasyon oluşturduğu gözlenmiştir. Çalışma sonucunda levetirasetamın gebelerde kullanımının sakıncalı olduğu ve dikkatli kullanılması gerektiği savunulmuştur⁷. Güvenç ve ark.'larının (2013) yaptığı farklı bir çalışmada ise levetirasetamın tavuk embriyolarında herhangi bir nöral tüp defekti oluşturduğu gözlenmemiş ve gebelerde kullanılabileceği belirtilmiştir⁹.

Yaptığımız çalışmada FETAX testiyle değerlendirilen *Xenopus laevis* embriyolarında kontrolde %0.8, tüm uygulanan konsantrasyonlarda ise %1.45 oranında anomali saptanmıştır ve kontrolle karşılaştırıldığında anomali oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanamamıştır. Sonuçlara baktığımızda teratojenik etkisi olmadığını belirtilen çalışmalarla uyumlu görülmektedir (**Tablo 8, Şekil 13**). Mikroskopla yaptığımız gözlemlerde az sayıda anomali ve bu anomalilerin oluşma nedenleri şu şekildedir: 3 adet ödem, 2 kırık kuyruk, 2 mikrosefali, 1 bül oluşumu ve hemen hemen tüm konsantrasyonlarda hipopigmentasyon oluşumu görülmüştür. Anormal pigmentasyon hücresel düzeydeki harabiyetin ortaya çıkarması için belirlenmiş olan bitim noktasıdır (Dumot 1983). Dışardan alınan ve embriyonun maruz kaldığı kimyasalların sinir sistemini etkileyip hasar oluşturmasıyla embriyolarda mikrosefali görülür⁹⁵ (Waddington,1956). İribaşlarda farklı bir anomali olarak kırık kuyruk oluşumu görülebilir. Dorsoventral veya horizontal alanda, kuyruk boyunca kırıklar bir veya birden fazla şekilde oluşabilir⁹⁶. Zaman zaman embriyoların gastrulasyon hareketlerinin kısıtlanmasıyla ödem gelişebilir. Ödemler son derece şişkin olup, içleri sıvı ile doludur. Rastladığımız diğer bir anomali de büldür. Bül, bazı bölgelerde epidermis ve mezoderm tabakasının birbiriyle girmesi sonucu oluşan vakuollü hücrelerdir⁹⁶.

Levetirasetamın etkisini sıçan embriyolarında gözleyebilmek için El-Shorbagy ve Hamdi (2016)'nin yaptığı çalışmada gebe sıçanlara iki farklı dozda levetirasetam uygulanmıştır. Daha sonra gebe sıçanlardan alınan embriyolarda karaciğer ve beyin dokularında birçok hasar tespit edilmiştir⁹⁰. Genetiği değiştirilmiş sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada ise (Kantarcı ve ark, 2022) gebe sıçanlar tek doz levetirasetama maruz bırakılmış ve embriyoların alveollerinde, Bowman kapsüllerinde ve beynin korteks tabakasında birçok hasar gözlemlenmiştir⁹⁷.

Yaptığımız çalışmada elde edilen histopatolojik analizlere göre embriyoların oluşan dokularında %1.4 oranında anomali saptanmış, %98.6 embriyoda ise herhangi bir hasar gözlenememiştir (**Şekil 15-17**).

Antiepileptik ilaçlarla ilgili birçok klinik çalışma yapılmış ve bu klinik çalışmalar doğrultusunda antiepileptik ilaçların dikkatli kullanılması gerektiğinin altı çizilmiştir. Bazı antiepileptik ilaçların embriyoya etkisi tam olarak söylenmese de, epileptik nöbetlerin fetüs üzerindeki olumsuz etkileri bilinmektedir. Tomson ve ark. (2019) yayınladığı bir makaleye göre epilepsi teşhisi konulup herhangi bir ilaçla tedavi olmayan annenin bebeğiyle karşılaştırıldığı zaman, epilepsi teşhisi konulup topiramata tedavi olan annenin bebeğinde mikrosefali görülme riski daha az olduğu gözlenmiştir⁹⁴.

Monoterapi ile tedavi gören kadınlarda politerapiye göre daha az anomali görüleceği savunulsa da, sadece topiramata tedavi edilen hastaların bebeklerinde yarık damak ve yarık dudak gibi birçok anomali gözlenmiştir⁹⁴. Bununla beraber levetirasetamla monoterapi görenlerde, majör konjenital malformasyon oranının düşük olduğu belirtilmiştir⁴¹. Levetirasetamın gebe kadınlarda kullanımı yaygınlaşmış, reçetelendirilmesi artmıştır. Valproik asidin ise birçok malformasyona neden olduğu görülmüş ve kullanımı kısıtlanmıştır⁹⁴.

Levetirasetamla tedavi gören gebe kadınlarda üçüncü trimester döneminin gelmesiyle beraber ilacın farmakokinetiğinde farklılıklar gözlenmiş, renal kan akışının ve metabolizmasının artmasıyla beraber konsantrasyonunda %60 oranında düşüş gözlenmiştir⁴¹.

Levetirasetamın epilepsi dışında farklı hastalıklara etkisini araştırmak için birçok çalışmalar yapılmış ve birçoğundan olumlu sonuçlar alınmıştır. Bunlardan birisinde Imai ve ark (2019) levetirasetamın serabral iskemi de koruyucu etkisine bakmıştır. Çalışma sonucunda iki intrakraniyal kanama modelinde nöral hücre ölümünü azaltıp, ilgili sinyal yollarını düzenleyerek nöronları oluşan hasara karşı koruyan levetirasetamın intrakraniyal kanamadan sonra kullanılabilecek bir ilaç olduğu savunulmuştur⁹⁸.

5.2 Levetirasetam ile Hipopigmentasyon İlişkisi

Hiperpigmentasyon, deride farklı bölgelerde aşırı renklenmeyi ifade etmektedir ve kullanılan ilaçların bazılarında bu durum advers etki olarak karşımıza çıkabilir. Antiepileptik ilaç kullanan hastaların birkaçında bu olgu gözlenmiş ve rapor edilmiştir.

Algahtani ve ark (2017)'ın yayınladığı olgu sunumunda 55 yaşında epilepsili bir kadının karbamazepine ek olarak levetirasetama başlamasıyla derisinde yer yer hiperpigmente alanlar görülmeye başlanmıştır. Görülen hiperpigmentasyon melanin miktarının artmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Melaninin dermis tabakası yerine bazal tabaka üzerinde yoğunlaşması ya da klerensinin azalması gibi durumlar ilaçlarla ilişkili olabilir⁹⁹.

Lorio ve ark (2007) yayınladığı bir makalede antiepileptik ilaçların advers etkileri üzerinde durmuşlardır. Çalışmalarında fenobarbital, lamotrijin, karbamazepin ve fenitoin gibi antiepileptik ilaçların Steven Johnson sendromu veya toksik epidermal nekroz olmak üzere birçok deri hastalığına yol açtığını belirtmişlerdir¹⁰⁰.

Alvestad ve ark (2007) yayınladığı çalışmada kutanöz advers reaksiyonların ilaçlarda bulunan aromatik halkadan dolayı oluştuğunu savunmuşlardır. Levetirasetam, valproik asit, topiramet gibi aromatik halkası olmayan antiepileptik ilaçların deride döküntü gibi deri hastalıklarını oluşturmadığını, fakat aromatik halkası bulunan karbamazepin, fenitoin, lamotrijin gibi ilaçların oluşturma insidansının daha yüksek olduğunu savunmuşlardır.

Kadınlarda erkeklere göre daha fazla kutanöz advers etkiler oluştuğunu gözlemlemişlerdir¹⁰¹.

Bir olgu sunumunda (Talaschian ve ark, 2020) 32 yaşında 7 yıldır epilepsi tedavisi gören kadının son 7 aydır karbamazepin kullanmasıyla cildinde hiperpigmente lezyonlar oluştuğu gözlenmiş ve karbamazepinin kesilmesiyle bu durumun iki hafta içinde düzeldiği görülmüştür¹⁰². Farklı olgu sunumlarında da levetirasetama bağlı hiperpigmentasyon durumları bildirilmiştir¹⁰³⁻¹⁰⁴.

Deneylerimizde kontrol grubuyla karşılaştırdığımız levetirasetam uygulanan gruplarda pigmentasyonu az olan embriyolar çokça görülmüştür.

Kontrollerde de hipopigmentasyonlu embriyolar görülse de ilaçlı gruplarda bu durum daha fazla gözlenmektedir. Ancak kontrole karşılaştırıldığında levetirasetam uygulanan gruplardaki embriyolarda bariz şekilde hipopigmentasyon olduğu

saptanmıştır (**Şekil 15-17**). Yaptığımız literatür çalışmasına göre az görülen bir yan etki olarak levetirasetam uygulanan kadınların derisinde hiperpigmentasyon gözlemlendiği ve kullanımı bitirilince etkinin ortadan kalktığı bildirilmiştir^{99,103-104}.

Laboratuvarımızda albino ve Wild tipi ergin *Xenopus laevis* vardır ve birkaç nesilde bir 2 wild ergin embriyodan %1 oranında albino bireyler yetişmektedir. Dolayısıyla literatürle zıtlık oluşturan bu durum için laboratuvarımızda kesin yargıya varılamamıştır.

5.3. Levetirasetamın boy uzunluğuna etkisi

1982 yılında yapılan bir çalışmada karbamazepin ve fenobarbitoin uygulanan epilepsili gebe hastada fetal ortalama baş çevresi boyu kontrole göre karbamazepinde 7 mm($p<0.01$)-ve fenobarbitoin de 6 mm daha az ($p<0.05$) olmuştur. Araştırmacılar ortalama baş çevresi farklılığını, çeşitli potansiyel karıştırıcı maternal faktörlerle veya gebelik ve doğum sırasındaki nöbetler veya komplikasyonlarla açıklanamadığını belirtmişlerdir¹⁰⁵.

Çalışma wistar türü albino sıçanda yapılmış, Fenitoin uygulanan gebe ratlardan elde edilen fetuslarda boy ve ağırlık ölçülmüştür. Kontrole karşılaştırılan fetuslarda %14 daha kısa ve %13 daha az ağırlık gözlemlenmiştir. Ayrıca fetüslerde kafa kemiklerinin ossifikasyonunun ileri derecede bozulduğu diseksiyon mikroskobu ve inceleme ile gözlemlendi. Araştırmacılar Bu çalışma ile fenitoinin gebelik sırasında intraperitoneal kullanımının sıçan fetüslerinde daha düşük dozlarda bile farklı iskelet malformasyonlarına neden olabileceğini belgelemiştir¹⁰⁶.

Elgndy ve ark.(2016) yılında, çocuk doğurma çağındaki epilepsili kadınlara giderek daha fazla ikinci kuşak antiepileptik ilaçlar reçete edildiğini ancak konjenital malformasyonlarına ilişkin verilerin eksik olduğunu bildirerek sıçanlarda çalışma planlamışlardır. Çalışmada lamotrijin ve levetirasetam uygulanan albino sıçanlarda fetusların sayıları, boyları, gros anomalileri ve iskelet anomalileri kaydedildi. Kontrole göre ağırlıklarının daha az olduğu kemik deformiteleri, vertebra, arka bacak anomalileri, kafatası anomalileri lamotrijin grubunda levetirasetama göre daha fazla bulunmuştur. Baş boyun uzunlukları kontrole göre azdı, levetirasetam daha az teratojeniktir¹⁰⁷.

Yaptığımız çalışmada levetirasetam uygulanan gruplarda kontrole göre boyca uzama istatistiksel olarak anlamlı değildir (**Tablo 9, Şekil 14**). Sonuçlarımız diğer antiepileptik ilaçlarla karşılaştırıldığında daha az teratojenitesi olması açısından uyumlu görünmektedir (**Tablo 8, Şekil 13**).

5.4. Erken gelişim döneminde embriyolardaki gen ekspresyonu ifadesi

Çalışmamızda *Xenopus laevis* embriyolarının erken gelişim döneminde önemli genlerden HSP70, BMP4, MYF5, PAX6, ESR1 genlerine bakılmıştır. Bazı konsantrasyonlarda gen ifadesinin baskılandığını bazı konsantrasyonlarda indüklendiği saptanmıştır. Ancak kontrole göre yapılan karşılaştırmalarda anlamlılık gösterilmemiştir ($p>0.05$).

Genin ifade edilmesi, normal hücresel yapı ve işlevetirasetami sürdürmek için hayati önem taşır ve aynı zamanda farklılaşma ve morfogenez gibi gelişimsel değişikliklerin temelidir. Gen ekspresyonunu düzenleme yeteneği, hücrelerin normal işleyişleri veya hayatta kalmaları için ihtiyaç duyulduğunda fonksiyonel bir protein vermelerine izin verir.

Bu süreçteki aksaklıklar hücreye zarar vermekte ve kanser dahil birçok hastalığın gelişmesine yol açabilmektedir.

Çalışmamızda birçok canlıda hücre büyümesi ve canlılığın devamı için kritik bir öneme sahip olan *Hsp70*(ısı-şok proteini) gen ifadesi tüm konsantrasyonlarda azalmıştır.

Kemik ve kıkırdak gelişiminde rol oynayan *BMP4* gen ifadesi düşük konsantrasyonlarda baskılanırken yüksek konsantrasyonlarda indüklenmiştir.

Kas farklılaşması veya miyogenezini özellikle iskelet kası gelişimini düzenlemede anahtar rolü olan *MYF5* gen ifadesi tüm konsantrasyonlarda baskılanmıştır.

Dokuya özgü transkripsiyon faktörlerini kodlayan bir gen ailesi olan *PAX6* gen bozuklukları göz ve göz çevresinde bozukluklara neden olmaktadır. Çalışmamızda *PAX6* gen ifadesi tüm gruplarda indüklenmiştir.

Presegmental somitlerin düzenli oluşumu kontrol eden *ESR1* geni ifadesi tüm konsantrasyonlarda baskılanmıştır¹⁰⁸.

Gen ifadesinin baskılanmasında, çoğu zaman, DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonu, gen susturmada birlikte çalışır. İkisinin kombinasyonu, DNA'nın daha yoğun bir şekilde paketlenmesi için bir sinyal olup gen ekspresyonu ifadesini azaltır¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

Gen ekspresyonu ifadesinin indüklenmesi, hücre içindeki moleküller, baskın olumsuz etkilere ve haployetmezliğine neden olan mutasyonlar, çevre hücrelerden ve çevreden gelen sinyal molekülleri ve epistasis dahil olmak üzere çok sayıda faktörden etkilenir. Hücre içindeki çeşitli moleküller, gen ekspresyonunu modüle eder. Haployetmezliği, bir genin bir çift alelinden bir alelin inaktivasyonu nedeniyle anormal bir fenotip oluşumudur. Epistasis ise, bir allel genin başka bir allel genin etkisini engellemesine denir. Çalışmamızda az sayıda anomali görülmesi erken gelişim dönemindeki gen ifadelerinde baskılama ve indükleme olmasına rağmen fenotipe yansımadağını göstermektedir¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

5.5. Levetirasetamın olası zararlı etkisini önlemede folik asit ve vitamin B12

Fenitoinin teratojenik etkilerini incelemek amacıyla yapılan çalışmada (Temiz ve ark), tavuk embriyoları farklı dozlarda fenitoinle muamele edilmiştir. Doza bağlı olmaksızın her grupta konjenital malformasyonların oluştuğu gözlenmiştir. Oluşan nöral tüp defektlerinin folik asit eksikliğiyle bir bağlantısı olduğu savunulmuştur²⁸.

Aslan K ve ark (2008)'larının yaptığı klinik çalışmada uzun süreli antiepileptik ilaç kullanımının folik asit ve vit B12 metabolizması üzerindeki etkisi konusunda bir fikir birliği olmadığı sonucuna varmışlardır ⁴⁶.

İnsan embriyonik kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada (Kardosst at al,2019) antiepileptik ilaçların özellikle levetirasetam ve topiramatin DNA hasarlarına yol açtığı görülmüştür. Antiepileptik ilaçların yanında folik asit verilen gruplarda DNA hasarlarının önemli ölçüde düşüş gösterdiği gözlemlenmiştir¹¹¹.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışma nootropik olarak kullanılmak üzere sentezlenen levetirasetamın antiepileptik ilaçlar arasındaki yerini irdelemek üzere FETAX testi ile *Xenopus leavis* embriyolarında teratojenik etkisini incelemeyi amaçlamıştır.

1. Birçok makaleyle uyumlu olarak çalışma sonucumuzda levetirasetamın teratojenitesinin az olduğu saptandı.
2. Çalışmamızda levetirasetamla muamele edilen gruplarımızda hipopigmentasyonlu embriyolar görülmüştür. Yayınlanan birkaç olgu sunumunda levetirasetam kullanan kişilerde yan etki olarak hiperpigmentasyon görülmesi, çalışmamızla uyumlu değildir. Bu yüzden konu ile ilgili kesin kanaate varılamamıştır.
3. Çalışmamızda konsantrasyonlar artırılabilir.
4. Gen ifadesi artan gruplarda Western Blot analizi ile sonuç teyit edilmelidir.
5. Çalışmalarda SV2A (proje bütçemiz yetmediğinden dolayı analiz edemediğimiz) proteinine bağlanarak etkisini gösterdiği düşünülen levetirasetamın erken gelişim genlerini mutasyona uğratması ile olumsuz yan etkilere neden olabileceği belirtilen literatürlerde de bahsedildiği için SV2A geni detaylıca çalışılmalıdır.
6. Yaptığımız literatür çalışmasında beyindeki SV2A yolunun rolünün, büyük bir filogenetik mesafeye rağmen kuşlar ve memeliler arasında korunduğunu göstermektedir. Fepi tavuğu modeli çalışması, kemirgenlerde uyarılmış epilepsi modelleriyle karşılaştırıldığında, refleks epilepsinin fizyopatolojisinin daha ileri çalışmaları için özellikle yararlı görünmektedir.

Sonuç olarak SV2A, insanlarda hem mono- hem de poligenik jeneralize epilepsiler bağlamında analiz için çok çekici bir aday gen olduğu ileri sürülmüştür

KAYNAKLAR

1. **DeSesso JM.** The arrogance of teratology: A brief chronology of attitudes throughout history. *Birth Defects Research*. **2019**; 111(3): 123-141.
2. **Vargesson N.** Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today*. **2015**;105(2):140-56.
3. **Boğa Pekmezekmek A.** Nikel, Magnezyum, Kobalt, Kadmiyum, Çinko Klorür'ün Teratojenik; Embriyotoksik Etkilerinin FETAX Testi Kullanılarak Etkilerinin Arşatırılması. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2004**.
4. Pregnancy Medications. 2022 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; **2023**.
5. **Mullers-Kupper M.** Embryopathy during pregnancy caused by taking anticonvulsants. *Acta Paedopsychiatr*, **1994**; 30: 401-405.
6. **Beghi E.** The epidemiology of epilepsy. *Neuroepidemiology*, **2020**;54(2): 185-191.
7. **Tureci E, Asan Z, Eser M, Tanriverdi T, Alkan F, Erdinler P.** The effects of valproic acid and levetiracetam on chicken embryos. *Journal of Clinical Neuroscience*, **2011**;18(6): 816-820.
8. **Özer FD, Demirel A, Yılmaz Dilsiz Ö, Aydın M, Özdemir N, Uyanıkgil Y, Baka M.** Effects of Levetiracetam on neural tube development and closure of the chick embryos in ovo. *Child's Nervous System*, **2012**;28: 969-976.
9. **Krishna K, Raut AL, Gohel KH, Dave P.** Levetiracetam. *The Journal of the Association of Physicians of India*, **2011**; 59: 656-658.
10. **Ozyurek H, Bozkurt A, Bilge S, Ciftcioglu E, Ilkaya F, Bas DB.** Effect of prenatal levetiracetam exposure on motor and cognitive functions of rat offspring. *Brain and Development*, **2010**; 32(5): 396-403.
11. **Martinez CS, Feas DA, Siri M, Igartúa DE, Chiaramoni NS, Alonso SDV, Prieto MJ.** In vivo study of teratogenic and anticonvulsant effects of antiepileptics drugs in zebrafish embryo and larvae. *Neurotoxicology and teratology*, **2018**; 66: 17-24.
12. **Lee SH, Kang JW, Lin T, Lee JE, Jin DI.** Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model. *BioMed research international*, **2013**. Biomed Res Int. 2013;2013:726478.
13. **O.Özdemir.** Türk Farmakoloji Derneği E- Bülteni. Erişim: [Http://www.tfd.org.tr/Sites/Default/Files/Klasor/Dosyalar/Ebultenler/114_2012_4_0.Pdf](http://www.tfd.org.tr/Sites/Default/Files/Klasor/Dosyalar/Ebultenler/114_2012_4_0.Pdf). 01.07.2012. Erişim Tarihi: 30.06.2023 .
14. **Kayaalp SO.** Antiepileptik İlaçlar. Kayaalp SO, Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13. Basım, Ankara; Ertem Basım Ltd. Şirketi, **2012**: 917-934.
15. **Pirkner E H.** Epilepsy in the light of history. *Annals of Medical History*, **1929**; 1(4): 453.
16. **Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A.** Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy & behavior*, **2010**; 17(1): 103-108.
17. **Labat R.** Traité akkadien de diagnostics et pronostics médicaux. *Paris/ Leiden: Académie Internationale d'Histoire des Sciences/Brill*, **1951**; 80–1:188–99.

18. **Von Storch TC.** An essay on the history of epilepsy. *Annals of medical history*, **1930**;2(6): 614.
19. **Travers RF.** Limbic epilepsy. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **1991**; 84(8): 454-456.
20. **Diamantis A, Sidiropoulou K, Magiorkinis E.** Epilepsy during the Middle Ages, the Renaissance and the Enlightenment. *Journal of neurology*, **2010**; 257(5): 691-698.
21. **O'Brien MD, Gilmour-White S.** Epilepsy and pregnancy. *BMJ: British Medical Journal*, **1993**;307(6902), 492.
22. **Çalış Ü,** Antiepileptik İlaçlar ; Farmasötik Kimya, 2. Baskı, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 331-352 (2004). Giriş tarihi 2 Mayıs 2023 Prof Dr. Ünsal Çalış
23. **Hall JE, Hall ME.** Guyton anı Hall Tıbbi Fizyoloji. 60 beyin etkinlik durumları – uyku, beyin dalgaları, epilepsi, psikozlar ve demans. Çağlayan Yeğen B, Tıbbi Fizyoloji. 14. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, **2021**: 757-760.
24. **Berne RM, Levetirasetamy MN.** Elektroensefalogram (EEG). Hall JM, Swiatecka-Urban A, izyoloji. 5. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitapevi; 2008:189-205.
25. **Rho JM, White HS.** Brief history of anti-seizure drug development. *Epilepsia open*, **2018**; 3; 114-119.
26. **Kurt S, Karaer H, Kaplan Y..** Epilepsili hastalarda karbamazepin ve okskarbazepin tedavisinin serum lipid düzeylerine etkisi. *Nöropsikiyatri Arşivi*, 2008; 45(2), 32-35.
27. **Büyüköl H, Güneş M.** The effects of antiepileptic medications on lipid profile, thyroid panel, and vitamin levetirasetamel. *Cureus*, **2020**: 12(10).
28. **Temiz C, Temiz P, Demirel A, Sayın M, Umur AS, Özer FD.** Effect of sodium phenytoin concentration on neural tube development in the early stages of chicken embryo development. *Journal of clinical neuroscience*, **2009**; 16(2): 307-311.
29. **Reisinger TL, Newman M, Loring DW, Pennell PB, Meador KJ.** Antiepileptic drug clearance and seizure frequency during pregnancy in women with epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, **2013**; 29(1): 13-18.
30. **Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L.** Fracture risk associated with use of antiepileptic drugs. *Epilepsia*, **2004**; 45(11): 1330-1337.
31. **El-Haggar SM, Mostafa TM, Allah HMS, Akef GH.** Levetirasetametiracetam and lamotrigine effects as mono-and polytherapy on bone mineral density in epileptic patients. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, **2018**; 76: 452-458.
32. **Vestergaard P.** Effects of antiepileptic drugs on bone health and growth potential in children with epilepsy. *Pediatric Drugs*, **2015**; 17(2): 141-150.
33. **Xiong N, Hou L, Lu N, Mohamed AA, Wang T, Huang Y.** Probable levetirasetametiracetam-related serum alkaline phosphatase elevation. *BMC neurology*, **2012**; 12(1): 1-5.
34. **Rosenfeld GC, Loose DS.** Antiepileptik İlaçlar. Barışkaner H, Farmakoloji, Altıncı Baskı, İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri, **2017**: 125-129.
35. **Sabbah WS, Hanafy SM, Arafa MAA.** Biochemical and histological study on the effect of levetirasetametiracetam on the liver and kidney of pregnant albino rats. *Folia Morphologica*, **2019**; 78(4): 809-817.

36. **Özgür O, Armagan E, Bozkurt M, Eroğlu Ü, Kahiloğulları G, Unlu A.** The effect of levetirasetametiracetam on closure of the midline in early chicken embryos. *Turkish neurosurgery*, **2015**;25(5).
37. **O'Brien MD, Gimour White S.** Epilepsy and pregnancy. *BMJ: British Medical Journal*, **1993**; 307(6902): 492–495.
38. **Meador KJ, Penovich P, Baker GA, Pennell PB, Bromfield E, Pack A, NEAD Study Group.** Antiepileptic drug use in women of childbearing age. *Epilepsy & Behavior*, **2009**; 15(3): 339-343.
39. **Tomson T, Landmark CJ, Battino D.** Antiepileptic drug treatment in pregnancy: changes in drug disposition and their clinical implications. *Epilepsia*, **2013**;54(3): 405-414.
40. **Kardoost M, Hajizadeh-Saffar E, Ghorbanian MT, Ghezelayagh Z, Bagheri KP, Behdani M, Habibi-Anbouhi M.** Genotoxicity assessment of antiepileptic drugs (ANTIÉPILEPTİK İLAÇs) in human embryonic stem cells. *Epilepsy Research*, **2019**; 158: 106-232.
41. **Garrity LC, Turner M, Standridge SM.** Increased Levetirasetametiracetam Clearance Associated with a Breakthrough Seizure in a Pregnant Patient Receiving Once/Day Extended-Release Levetirasetametiracetam. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, **2014**; 34(7): e128-e132.
42. **Meador K, Reynolds MW, Crean S, Fahrbach K, Probst C.** Pregnancy outcomes in women with epilepsy: a systematic review and meta-analysis of published pregnancy registries and cohorts. *Epilepsy research*, **2008**; 81(1): 1-13.
43. **Shallcross R, Bromley R L, Irwin B, Bonnett LJ, Morrow J, Baker GA.** Child development following in utero exposure: levetirasetametiracetam vs sodium valproate. *Neurology*, **2011**; 76(4): 383-389.
44. **Vajda FJE, O'brien TJ, Graham J, Lander CM, Eadie MJ.** The outcomes of pregnancy in women with untreated epilepsy. *Seizure*, **2015**; 24, 77-81.
45. **Manford M.** Recent advances in epilepsy. *Journal of neurology*, **2017**;264(8): 1811-1824.
46. **Aslan K, Bozdemir H, Unsal C, Güvenc B.** The effect of antiepileptic drugs on vitamin B12 metabolism. *International Journal of Laboratory Hematology*, **2008**; 30(1): 26-35.
47. **Tamura T, Aiso K, Johnston E, Black L, Faught E.** Homocysteine, folic acid, vitamin B-12 and vitamin B-6 in patients receiving antiepileptic drug monotherapy. *Epilepsy Research*, **2000**; 40, 7-15.
48. **Bruno MK, Harden CL.** Epilepsy in pregnant women. *Current treatment options in neurology*, **2002**; 4, 31-40.
49. **Lukyanetz EA, Shkryl VM, Kostyuk PG.** Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam. *Epilepsia*, **2002**; 43(1): 9-18.
50. **Rossi R, Arjmand S, Bærentzen SL, Gjedde A, Landau AM.** Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A: Features and Functions. *Frontiers in Neuroscience*, **2022** :16.
51. **Portela-Gomes GM, Lukinius A, Grimelius L.** Synaptic vesicle protein 2, a new neuroendocrine cell marker. *The American journal of pathology*, **2000**; 157(4): 1299-1309.
52. **Tong X, Patsalos PN.** A microdialysis study of the novel antiepileptic drug levetirasetametiracetam: extracellular pharmacokinetics and effect on taurine in rat brain. *British journal of pharmacology*, **2001**; 133(6): 867-874.

53. **Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B.** The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2004**; 101(26): 9861-9866.
54. **Douaud M, Feve K, Pituello F, Gourichon D, Boitard S.** Epilepsy Caused by an Abnormal Alternative Splicing with Dosage Effect of the SV2A Gene in a Chicken Model. *PLoS ONE*, **2011**; 6(10): e26932
55. **Doheny HC, Ratnaraj N, Whittington MA, Jefferys JGR, Patsalos PN.** Blood and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the rat. *Epilepsy research*, **1999**; 34(2-3): 161-168.
56. **Harada S, Tanaka S, Takahashi Y, Matsumura H, Shimamoto C, Nakano T, ... Nakahari T.** Inhibition of Ca²⁺-regulated exocytosis by levetiracetam, a ligand for SV2A, in antral mucous cells of guinea pigs. *European journal of pharmacology*, **2013**; 721(1-3): 185-192.
57. **Otoul C, De Smedt H, Stockis A.** Lack of pharmacokinetic interaction of levetiracetam on carbamazepine, valproic acid, topiramate, and lamotrigine in children with epilepsy. *Epilepsia*, **2007**; 48(11): 2111-2115.
58. **Manthey D, Asimiadou S, Stefovskaja V, Kaindl A M, Fassbender J, Ikonomidou C, Bittigau P.** Sulthiame but not levetiracetam exerts neurotoxic effect in the developing rat brain. *Experimental neurology*, **2005**; 193(2): 497-503.
59. **Chhun S, Jullien V, Rey E, Dulac O, Chiron C, Pons G.** Population pharmacokinetics of levetiracetam and dosing recommendation in children with epilepsy. *Epilepsia*, **2009**; 50(5): 1150-1157.
60. **Güvenç Y, Dalgic A, Billur D, Karaoglu D, Aydin S, Daglioglu E, Belen D.** The effects of levetiracetam on neural tube development in the early stage of chick embryos. *Turkish neurosurgery*, **2013**;23(5).
61. **Patsalos PN.** Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics. *Pharmacology & therapeutics*, **2008**; 5 (2): 77-85.
62. **Chhun S, Jullien V, Rey E, Dulac O, Chiron C, Pons G.** Population pharmacokinetics of levetiracetam and dosing recommendation in children with epilepsy. *Epilepsia*, **2009**;50(5): 1150-1157.
63. **French JA, Kanner AM, Bautista J, Abou-Khalil B, Browne T, Harden CL, ... Glauser T A.** Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs II: Treatment of refractory epilepsy [RETIRED]: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology*, **2004**; 62(8): 1261-1273.
64. **Mula M, Trimble MR, Sander JW.** Are psychiatric adverse events of antiepileptic drugs a unique entity? A study on topiramate and levetiracetam. *Epilepsia*, **2007**; 48(12), 2322-2326.
65. **Grünwald R.** Levetiracetam in the treatment of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*, **2005**;46: 154-160.
66. **Dedeurwaerdere S, Boon P, De Smedt T, Claeys P, RAEÏt R, Bosman T., ... Vonck K.** Chronic levetiracetam treatment early in life decreases epileptiform events in young GAERS, but does not prevent the expression of spike and wave discharges during adulthood. *Seizure*, **2005**;14 (6): 403-411.

67. **Mohammad HM, Sami MM, Makary S, Toraih EA, Mohamed AO, El-Ghaiesh SH.** Neuroprotective effect of levetiracetam in mouse diabetic retinopathy: Effect on glucose transporter-1 and GAP43 expression. *Life sciences*, **2019**;232, 116588.
68. **Imai T, Sugiyama T, Iwata S, Nakamura S, Shimazawa M, Hara H.** Levetiracetam, an antiepileptic drug has neuroprotective effects on intracranial hemorrhage injury. *Neuroscience*, **2020**; 431: 25-33.
69. **Lamouret V, Kurth C, Intravooth T, Steinhoff BJ.** Is the anticonvulsant activity of levetiracetam dose-dependent?. *Seizure-European Journal of Epilepsy*, **2020**; 83: 197-202.
70. **Brighina F, Palermo A, Aloisio A, Francolini M, Giglia G, Fierro B.** Levetiracetam in the prophylaxis of migraine with aura: a 6-month open-label study. *Clinical neuropharmacology*, **2006**; 29(6): 338-342.
71. **Yen PH, Kuan YC, Tam KW, Chung CC, Hong CT, Huang YH.** Efficacy of levetiracetam for migraine prophylaxis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the Formosan Medical Association*, **2021**; 120(1), 755-764.
72. **Mohammad HM, Sami MM, Makary S, Toraih EA, Mohamed AO, El-Ghaiesh SH.** Neuroprotective effect of levetiracetam in mouse diabetic retinopathy: Effect on glucose transporter-1 and GAP43 expression. *Life sciences*, **2019**; 232: 116588.
73. **Leo A, De Caro C, Nesci V, Palma E, Tallarico M, Iannone M, Citraro R.** Antiepileptogenic effects of Ethosuximide and Levetiracetam in WAG/Rij rats are only temporary. *Pharmacological Reports*, **2019**; 71(5), 833-838.
74. **Yao X, Yang W, Ren Z, Zhang H, Shi D, Li Y, Ren K.** Neuroprotective and angiogenesis effects of levetiracetam following ischemic stroke in rats. *Frontiers in Pharmacology*, **2021**;12; 638209.
75. **de Toledo M, de la Fuente E, Ramos C, Ferreiros-Martinez R, Muro I, Viera Campos A , ... Ovejero-Benito MC.** Extensive pharmacokinetic variability of Levetiracetam.¿ Are doctors aware?. *Epilepsy Research*, **2022**;187: 107029.
76. **Erdoğan S, Aslan S, Yüksel N.** Levetirasetam Kullanımı ile İlişkili Psikotik Bozukluk: İki Olgu sunumu. *Klinik Psikofarmakoloji Bulteni*, **2009**; 19: 420-422
77. **Potschka H, Baltes S, Löscher W.** Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy research*, **2004**; 58(2-3): 85-91.
78. **Boğa A.** Dış Ortamda Yer Alan Çeşitli Kimyasal Kirliliklerin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisini FETAX Testinin Değeri. Master tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1996.
79. **Tokmakov AA, Awamura M, Sato KI.** Biochemical hallmarks of oxidative stress-induced overactivation of *Xenopus* eggs. *BioMed Research International*, **2019**; 7180540.
80. **Gurdon JB, Hopwood N.** The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology*, **2003**; 44(1): 43-50.
81. **Polack S S.** The *xenopus* pregnancy test. *Canadian Medical Association Journal*, **1949**; 60(2): 159.
82. **Lee-Liu D, Méndez-Olivos EE, Muñoz R, Larraín J.** The African clawed frog *Xenopus laevis*: a model organism to study regeneration of the central nervous system. *Neuroscience letters*, **2017**; 652: 82-93.

83. **Faber J, Nieuwkoop PD.** (Eds.). Normal table of *Xenopus Laevis* (Daudin): a systematical & chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. *Garland Science*, **2020**.
84. **Dawid IB, Sargent TD.** *Xenopus laevis* in developmental and molecular biology. *Science*, **1988**; 240(4858): 1443-1448.
85. American Society for Testing Materials (ASTM), 2004. Standart guide for conducting the frog embryo-teratogenesis assay—*Xenopus*, FETAX, E1439-98. In: ASTM Standards on Biological Effects and Environmental Fate, vol. 11.05. Philadelphia, pp. 447–457.
86. **Dumont JN, Schultz TW, Buchanan MV, Kao GL.** Frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX)—A short-term assay applicable to complex environmental mixtures. Waters MD, Sandhu SS, Lewtas J, Claxton L, Chernoff N, Nesnow S, In *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures III*. Baskı sayısı, Boston: Basımevi, **1983**: 393-405.
87. **Boğa A, Binokay S, Özgönen T.** Çevre Kirliliğini Saptamada Kullanılan Yöntemler ve FETAX (Frog Embryos Teratogenesis Assay: *Xenopus*) Testi. *Arşiv*, **2006**; 15-16.
88. **Duman T.** Epileptik Hastalarda Serum Çinko, Bakır ve Magnezyum Düzeylerinin Antiepileptik Tedavi Öncesi ve Sonrası Değerleri. Uzmanlık Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, **1991**.
89. **Moraes MFD, de Castro Medeiros D, Mourao FAG, Cancado SAV, Cota VR.** Epilepsy as a dynamical system, a most needed paradigm shift in epileptology. *Epilepsy & Behavior*, **2021**; 121: 106838.
90. **El-Shorbagy HM, Hamdi H.** Genotoxic and mutagenic studies of the antiepileptic drug levetiracetam in pregnant rats and their fetuses. *Int J Pharm Sci*, **2016**; 8(2): 82-88.
91. **Isoherranen N, Spiegelstein O, Bialer M, Zhang J, Merriweather M, Yagen B, ...Finnell RH.** Developmental outcome of levetiracetam, its major metabolite in humans, 2-pyrrolidinone n-butyric acid, and its enantiomer (r)- α -ethyl-oxo-pyrrolidine acetamide in a mouse model of teratogenicity. *Epilepsia*, **2003**; 44(10): 1280-1288.
92. **Iorio ML, Moretti U, Colcera S, Magro L, Meneghelli I, Motola D, ... & Velo GP.** (2007). Use and safety profile of antiepileptic drugs in Italy. *European journal of clinical pharmacology*, 63, 409-415.
93. **Kantarci BC, Sanli A, Gavas S, Toplu A, Asik ZNT, Cilingir-Kaya OT, Onat F.** Effects of in utero exposure to valproate or levetiracetam on the seizures and newborn histopathology of genetic absence epilepsy rats. *Neuroscience Letters*, **2022**; 776: 136574.
94. **Tomson T, Battino D, Bromley R, Kochen S, Meador K, Pennell P, Thomas SV.** Management of epilepsy in pregnancy: a report from the International League Against Epilepsy Task Force on Women and Pregnancy. *Epileptic Disorders*, **2019**; 21(6): 497-517.
95. **Waddington CH, Perry MM.** Teratogenic effects of trypan blue on amphibian embryos. *J Embryol Exp Morph*, **1956**; 4:110-119.
96. **Brown CL, Dumont JN.** Toxicity of selenium do developing *Xenopus laevis* Embryos. *J. Toxicology Environ Health*, **1979**; 5: 699-709.
97. **Kantarci BC, Sanli A, Gavas S, Toplu A, Asik ZNT, Cilingir-Kaya OT, Onat F.** Effects of in utero exposure to valproate or levetiracetam on the seizures and newborn histopathology of genetic absence epilepsy rats. *Neuroscience Letters*, **2022**; 776: 136574.

98. **Imai T, Sugiyama T, Iwata S, Nakamura S, Shimazawa M, Hara H.** Levetiracetam, an antiepileptic drug has neuroprotective effects on intracranial hemorrhage injury. *Neuroscience*, **2020**; 431: 25-33.
99. **Algahtani H,** Marghalani, S., Satti, M., & Shirah, B. Levetiracetam-induced skin hyperpigmentation: An extremely rare undesirable side effect. *Journal of Epilepsy Research*, **2017**;7(2):106.
100. **Iorio, M. L., Moretti, U., Colcera, S., Magro, L., Meneghelli, I., Motola, D., ... & Velo, G. P.** Use and safety profile of antiepileptic drugs in Italy. *European journal of clinical pharmacology*, **2007**; 63: 409-415.
101. **Alvestad, S., Lydersen, S., Brodtkorb, E.** Rash from antiepileptic drugs: influence by gender, age, and learning disability. *Epilepsia*, **2007**; 48(7), 1360-1365.
102. **Talaschian, M., Sadeghi, A., & Pakzad, S.** Carbamazepine and Hyperpigmentation in a Young Woman: A Case Report. *Case Reports in Clinical Practice*, **2020**; 5(3), 86-88.
103. **Prajith, V.** A 28 year-old male had Levetiracetam induced drug eruptions-Skin desquamation and hyperpigmentation. *Case Reports: Open Access*, **2021**;6, 1-4.
104. **Alnaaim, S.** Levetiracetam Induced Cutaneous Side Effects: Case Report. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, **2019**; 74(7), 1514-1515.
105. **Hiilesmaa VK, Teramo K, Granström ML, Bardy AH.** Fetal Head Growth Retardation Associated With Maternal Antiepileptic Drugs. *The Lancet*, **1982**; 318(8239): 165-167.
106. **Soysal H, Unur E, Düzler A , Karaca Ö, Ekinci N .** Effects of intraperitoneal administration of the phenytoin on the skeletal system of rat fetus. *Seizure*, **2011**; 20(3): 187-193)
107. **Elgndy IS, Ola G. Hagag, Shereen M.S. EL Kholy, Naglaa AS, Farag AM.** A Comparative Study Of The Teratogenic Effects Of Antiepileptic Drugs: Lamotrigine And Levetiracetam On Adult Albino Rats. *Egypt J. Forensic Sci. Appli. Toxicol.*, **2016**; Vol 16 (2) :suppl 2016.
108. **Pekmezekmek AB, Emre M, Erdogan S, Yilmaz B, Tunc E, Sertdemir Y, Emre Y.** Effects of high-molecular-weight polyvinyl chloride on *Xenopus laevis* adults and embryos: the mRNA expression profiles of Myf5, Esr1, Bmp4, Pax6, and Hsp70 genes during early embryonic development. *Environ Sci Pollut Res Int.*, **2022**; 29(10):14767-14779.
109. **Phillips T.** The role of methylation in gene expression. *Nature Education*, 2008; 1(1): 116.
110. **Prelich G.** Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*. **2012** Mar; 190(3):841-54.
111. **Kardoost M, Hajizadeh-Saffar E, Ghorbanian MT, Ghezelayagh Z, Bagheri KP, Behdani M, Habibi-Anbouhi M.** Genotoxicity assessment of antiepileptic drugs (AEI's) in human embryonic stem cells. *Epilepsy Research*, **2019**; 158: 106-232.