

175626

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA PRENATAL VE ERKEN
POSTNATAL DÖNEMDE VERİLEN
ANDROJENLERİN ERİŞKİN DÖNEMDE BEYİNDE
HİPOKAMPAL HÜCRE SAYISI VE PREOPTİK
ALAN MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. MAŞALLAH CANDEMİR

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. SERAP SEMİZ

2008 – DENİZLİ

İş bu çalışma, Jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr.Serap SEMİZ

Üye : Prof.Dr.Hacer ERGİN

Üye : Prof.Dr.İlknur KILIÇ

Üye : Doç.Dr.Dolunay GÜRSES

Üye : Doç.Dr.Ahmet AKÇAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

28/02/2008

Prof. Dr.C.Orhan KARA
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Dekan a.

TEŐEKKÜR

Asistanlığım süresince her konuda destek, anlayıő ve güveni ile pediatriyi bana sevdiren ve tez araőtırmamı birlikte yürüttüğüm, yardım ve zamanını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Serap SEMİZ, her zaman saygıyla anacağım hocalarım Prof. Dr. Hacer ERGİN'e, Prof. Dr. Aziz POLAT'a, Prof. Dr. İlknur KILIÇ'a, Doç. Dr. Dolunay GÜRSES'e, Doç. Dr. Ahmet AKÇAY'a, Yrd. Doç.Dr. Mine CİNBIŐ'e, tezimin yönlendirilmesinde sürekli desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Esat ADIGÜZEL'e, Histoloji Anabilim Dalı öğretim Üyesi Doç. Dr. Gülçin ABBAN'a, laboratuvar çalışmaları sırasında her aőamada yardımını aldığım Anatomi Anabilim Dalı Araőtırma Görevlisi Dr. Gökőin Nilüfer YONGUÇ DEMİRCİ'ye teőekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalıőmalarımnda yardımcı olan Deney Hayvanları Araőtırma Laboratuvarı ve Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı elemanlarına teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ

GENEL BİLGİLER

GONADAL STEROİD HORMONLAR

Gonadal steroid hormonların salınması ve kontrol mekanizmaları

Dişi cinsiyette gonadal steroid hormonların salınımı

Erkek cinsiyette gonadal steroid hormonların salınması ve hedef dokuya taşınması

Androjenlerin etki mekanizması

Androjen reseptörleri

Testosteron, testosteron esterleri ve testosteron propiyonat

GLİYAL FİBRİLAR ASİDİK PROTEİN

SIÇANLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Beyin

Hipokampus

Hipokampusun embriyolojik gelişimi

Anatomik özellikler

Hipokampusun histolojik yapısı

Stratum Poliforme

Stratum Piramidale

Stratum Molekölare

Stratum Radiatum

Hipokampusun fonksiyonları

Preoptik Alan (POA)

Kalp

Solunum sistemi

Normal kan değerleri

Wistar Albino cinsi sıçanlar

Sıçanlarda pubertal döngü

GEREÇ VE YÖNTEMLER

DENEY HAYVANLARI

DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Susam yağı ve testosteron propiyonat enjeksiyonu

ÇALIŞMA PLANI VE ÇALIŞMANIN SONLANDIRILMASI
TRANSKARDİYAK PERFÜZYONUN UYGULANMASI
KESİTLERİN ALINMASI VE DOKUNUN HAZIRLANMASI
KRESİL VİYOLE BOYAMA YÖNTEMİ
İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ
STEREOLOJİK YÖNTEMLER

Sistematik rastgele örnekleme stratejisi

Tarafsız sayım çerçevesi

Optik disektör

Optik parçalama (fraksiyonlama) yöntemi

OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNE GÖRE HÜCRE SAYIMI

Parçalayıcı örnekleme stratejisine uygun kesit alma ve kesit
örnekleme oranı (KeÖO)

Alan örnekleme oranı (AÖO)

Kesit kalınlığının ölçümü

Kalınlık örnekleme oranı (KaÖO)

Nükleus (hücre) sayımı

Toplam nöron sayısı

Hata KATSAYISI

POA'DAKİ ASTROSİT MORFOLOJİSİ

İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

BULGULAR

ÇALIŞMADA KULLANILAN SIÇANLARIN ÖZELLİKLERİ

HİPOKAMPUS PİRAMİDAL HÜCRE TABAKASI HÜCRE

SAYIM SONUÇLARI

GRUPLARIN SOL HİPOKAMPUS CA1, CA2, CA3 STRATUM

PİRAMİDALE ALANLARINDAKİ TOPLAM NÖRON

SAYISI ORTALAMALARI

GRUPLARIN HİPOKAMPUSLARINDAKİ PATOLOJİK

DEĞİŞİKLİKLER

GRUPLARIN POA'DAKİ ASTROSİT MORFOLOJİSİ

TARTIŞMA

SONUÇLAR

ÖZET

SUMMARY

KAYNAKLAR



TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo I	Çalışma grupları
Tablo II	Gebeliklerinin 16. gününden sonra testosteron propiyonat ve susam yağı verilen annelerin vücut ağırlıkları
Tablo III	Postnatal dönemde testosteron propiyonat ve susam yağı uygulanan sıçanların özellikleri
Tablo IV	Çalışma sonlandırıldığında deney gruplarını ortalama vücut ağırlıkları
Tablo V	TT grubu sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler
Tablo VI	TO grubu sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler
Tablo VII	OT grubu sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler
Tablo VIII	OOD grubu sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler
Tablo IX.	OOE grubu sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler
Tablo X	Grupların sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanları toplam nöron sayısı ortalamaları
Tablo XI	İkili karşılaştırmada kullanılan grupların istatistiksel p değerleri

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

- Şekil 1. Overlerde androjenlerden dişi gonadal steroidlerin üretimimin şematik gösterimi
- Şekil 2. Testislerde Leydig hücrelerinde erkek gonadal steroidlerin üretiminin şematik gösterimi
- Şekil 3. Testosteronun dihidrotestosterona dönüşümü ve hücresel etkileri
- Şekil 4. X kromozomu üzerindeki androjen reseptörü geni ve androjen reseptörünün organizasyonu
- Şekil 5. Çalışma planı
- Şekil 6. Transkardiyak perfüzyon işlemi sırasında kullanılan perfüzyon seti
- Şekil 7. Transkardiyak perfüzyon işlemi
- Şekil 8. Tarafsız sayım çerçevesi; devamlı çizgi yasak kenarı, kesikli çizgi serbest kenarı ifade eder. Koyu renkle boyanmış olan partiküller sayıma dahil edilirken diğerleri dahil edilmez
- Şekil 9. Çalışmada kullanılan tarafsız sayım çerçevesi ve ölçüleri
- Şekil 10. Çalışmada gruplarının sol hipokampus ortalama nöron sayıları
- Şekil 11. Gruplardan birer sıçana ait farklı büyütmelelerdeki hipokampus görünüşleri. Kesitler krezil viole boyası ile boyanmıştır. Yukarıdan aşağıya sıra ile TT, TO, OT, OOD, OOE grupları (GD: Gyrus dentatus, CA1, CA2, CA3: Hipokampusu ait stratum pyramidale'nin alt tabakaları)
- Şekil 12. TT grubunda preoptik alanda glial fibrilar asidik protein boyası ile astrosit morfolojisi
- Şekil 13. OOE grubunda preoptik alanda glial fibrilar asidik protein boyası ile astrosit morfolojisi

KISALTMALAR ÇİZELGESİ

POA	Preoptik alan
SSS	Santral sinir sistemi
GnRH	Gonadotropin-releasing hormon
LH	Lüteinize edici hormon
FSH	Folikül uyarıcı hormon
Camp	Siklik adenozin monofosfat
PKA	Protein kinaz A
ABP	Androjen bağlayıcı protein
DHT	Dihidrotestosteron
SHBG	Gonadal steroid bağlayıcı globulin
AR	Androjen reseptörü
DNA	Deoksiribonükleik asit
mRNA	Messenger ribonükleik asit
ARE	<i>Androjen responsive elements</i>
TP	Testosteron propiyonat
GFAP	Gliyal fibrilar asidik protein
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
CA1	Hipokampusun kuyruğa yakın kısmı
CA2	Hipokampusun gövde kısmı
CA3	Hipokampusun baş bölgesine yakın olan kısım
CA4	Hipokampusun baş bölgesi
EEG	Elektroensefalografi
İP	İntra peritoneal
SC	Subkutan
TT	Prenatal ve postnatal dönemde testosteron propiyonat uygulanan deney grubu
TO	Sadece prenatal dönemde testosteron propiyonat uygulanan deney grubu
OT	Sadece postnatal dönemde testosteron propiyonat uygulanan deney grubu

OOD	Dişi kontrol grubu
OOE	Erkek kontrol grubu
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
KeÖO	Kesit örnekleme oranı
AÖO	Alan örnekleme oranı
H	Disektör yüksekliği
KaÖO	Kalınlık örnekleme oranı
Q⁻	Disektör partikül sayısı
ΣQ⁻	Toplam disektör partikül sayısı
SDN	Seksüel dimorfik nükleus



GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişmekte olan beyin, embriyonik dönemden başlayıp postnatal döneme kadar uzanan kritik periyod boyunca gonadal steroidlere oldukça duyarlıdır (1). Santral sinir sisteminin gonadal steroidlere maruziyeti dimorfiktir. Neonatal dönemde testislerin aktivasyonu sonucu testosteron artarken dişi gonadal yapılar sessiz kalmaktadır. Bu dimorfik maruziyetin sonucu olarak oluşan beyin maskülinizasyonu erişkin yaşamdaki erkek cinse özgü fizyoloji ve davranıştan sorumludur. Steroidlerin indüklediği bu beyin farklılaşmasının hücrenel ve moleküler mekanizmaları çok az bilinmektedir (1-6).

Hipokampusun, öğrenme ve hafıza ile ilgili fonksiyonlarda rol aldığı ve hipokampal morfolojide cinsiyet farklılığının etkili olduğu bilinmektedir (6-8). Ancak mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Gelişimsel olarak gonadal steroidlere duyarlı olan bu bölgenin histolojik yapısının, özellikle prenatal dönemde uygulanan androjenler ile değiştirilebildiği ve buna paralel olarak erişkin dönemde hipokampal fonksiyonlarda değişimler izlendiği görülmüştür (3).

Cinse özgü fizyoloji ve davranış ile beyindeki morfolojik farklılıklar paraleldir. Son zamanlardaki çalışmalar preoptik alan (POA) üzerine yoğunlaşmaktadır (1). Yapısal ve fonksiyonel olarak hipotalamus ile devam eden POA, uyarıların hipotalamik nükleuslara iletilmesi ve buradan başka bölgelere aktarılmasından sorumludur (1). POA erkekte ve kadında cinse özgü davranış ile ilişkilidir ve morfolojik olarak her iki cinste farklıdır (1,2,4,5). POA'daki nöronların yapısı ve yoğunluğu bu farklılıkta önemlidir. Bu bölgedeki astrositlerin perinatal steroidlere duyarlı olduğu bilindiğinden son yıllarda çalışmalar bu bölgedeki nöronların karakteristiği ve astrosit morfolojisi üzerine olmaktadır (1). Bu çalışmalar ile yenidoğan dönemindeki etkilenme değerlendirilmiş olup, astrosit morfolojisinde bu değişikliklerin erişkin dönemde de devam ettiğine dair bilgi yoktur.

Bu çalışma; prenatal ve erken postnatal dönemde verilen androjenlerin, erişkin dönemde hipokampus piramidal hücre tabakasındaki hücre sayısı, POA'daki astrosit morfolojisi üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Beyin, periferik dokulardan salgılanan steroid hormonların hedef organlarından bir tanesidir. Beyin gelişimi, üreme, cinsel farklılaşma, algılama, hafıza ve davranış gibi birçok olay temelde steroid hormonların etkisi ile oluşmaktadır (9).

Gonadal steroid hormonların santral sinir sistemi (SSS)'nin büyüme, farklılaşma, normal fonksiyonları yerine getirme ve yaşlanma süreçleri üzerindeki etkileri iyi bilinmektedir. Gonadlardan salgılanan steroidler dolaşım yolu ile SSS'ne ulaşarak beyin fonksiyonlarını düzenler, cinsiyet farklılaşması ve cinse özgü davranışsal cevapların verilmesini etkiler. Gonadal steroidler aynı zamanda beynin olaylara cevabına, duysal bilgilerin depolanmasına ve düzenlenmesine de katkıda bulunur. Androjenler özellikle fetal/neonatal dönemde nöronal devrelerin olduğu "organizasyon/gelişim" sürecinde önemli nöroaktif rol oynar (10).

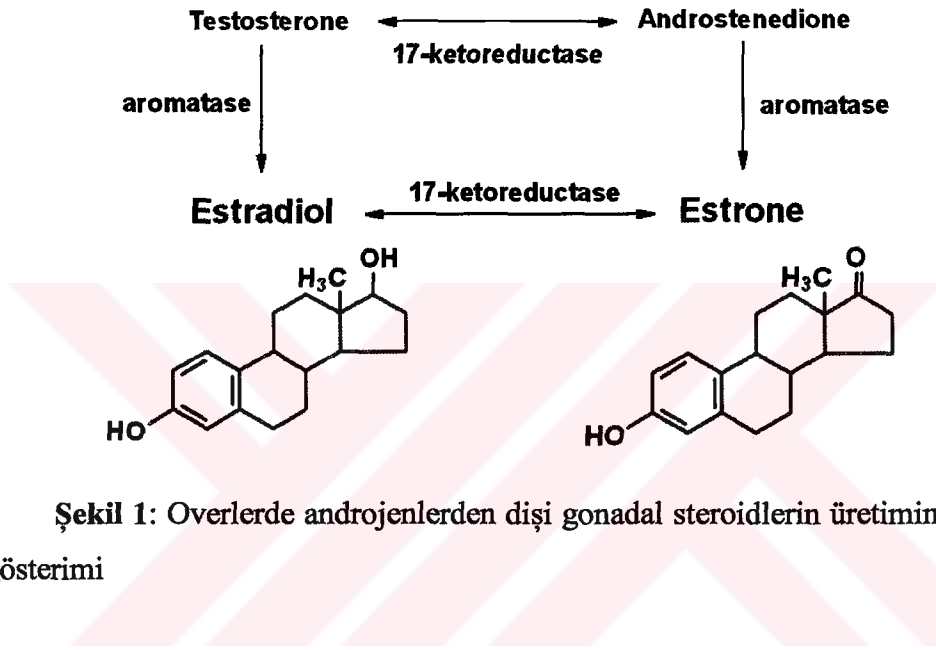
GONADAL STEROİD HORMONLAR

Gonadal steroid hormonların salınması ve kontrol mekanizmaları

Testis ve overlerde birçok gonadal steroid hormon üretilmekle birlikte bunların en önemlileri östrojen ve testosterondur. Bu gonadal hormonların sentezi hipotalamustan salgılanan gonadatropin-releasing hormon (GnRH)'nın ve hipofiz bezinden salgılanan lüteinizan hormon (LH) ve follikül stimüle edici hormon (FSH)'nin birlikte kontrol ettiği sistem tarafından düzenlenmektedir. Dolaşımdaki düşük gonadal hormon düzeyleri GnRH üzerindeki "negatif feed back" etkisini ortadan kaldırır ve dolaşımdaki FSH ile LH düzeylerinin artmasına neden olur. Artmış FSH ve LH düzeyleri gonadlarda sitokrom P450 sistemini aktive ederek protein kinaz A (PKA) ve siklik adenosin monofosfat (cAMP) yollarını aktive etmektedir. Cinsiyet hormonlarının üretildiği, dişi ve erkek gonadal dokularda gerçekleşen bu yollar sonucunda androjenler (androstenodion ve dihidroepiandrostenodion) üretilmektedir. Hem testisler hem de overler androjenleri testosterona çeviren 17- β hidroksi steroid dehidrogenaz enzimine sahiptirler (11).

Dişi cinsiyette gonadal steroid hormonların salınımı

Overlerde teka hücrelerine bağlanan LH burada cAMP ve PKA yolaklarını aktive ederek testosteron ve androstenedion sentezini uyarır. Burada bulunan aromataz enzim kompleksi ile bu iki molekül östrojene dönüştürülür. Şekil 1’de androjenlerden dişi gonadal steroidlerin sentezlendiği basamaklar gösterilmiştir (11).



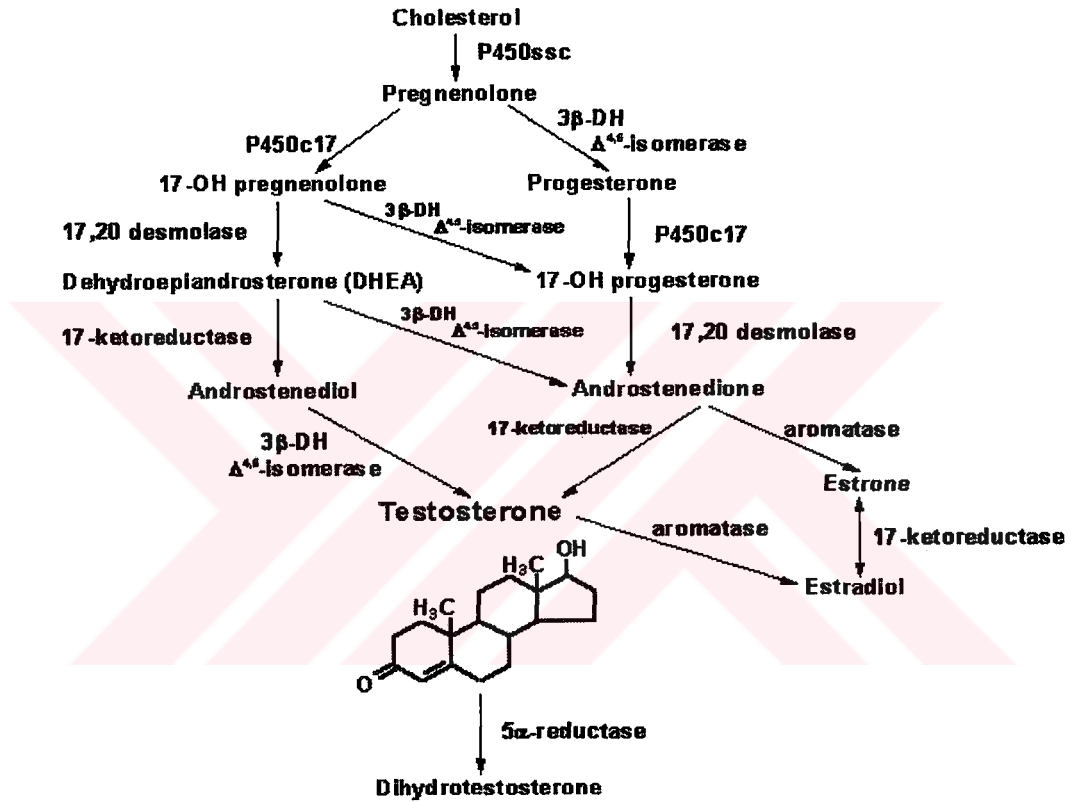
Şekil 1: Overlerde androjenlerden dişi gonadal steroidlerin üretimimin şematik gösterimi

Erkek cinsiyette gonadal steroid hormonların salınması ve hedef dokuya taşınması

Testis dokusunda Leyding hücrelerine bağlanan LH, bu hücrelerin temel üretimi olan testosteronun yapımına neden olur. Plazmaya salınan androjen burada androjen bağlayıcı protein (ABP) ile birlikte Sertoli hücrelerine ulaşır ve burada dihidrotestosteron (DHT)’a indirgenir (11).

Dolaşımdaki esas androjen testosterondur. Testosteron kanda sadece %2 oranında serbest formda bulunur. Bağlı olan kısmın, %60’ı steroid bağlayıcı globulin (SHBG; veya testosteron-östradiol bağlayıcı globulin, TeBG)’e, %40’ı ise serum albuminine, kortikosteroid bağlayıcı globuline (transkortin), progesteron bağlayıcı globuline ve alfa-asit glikoproteine bağlı durumda bulunur. Hedef dokuya ulaştığında testosteron SHBG’den ayrılır ve hücreye difüzyon ile girer. Göreceli

olarak düşük potense sahip olan testosteron çoğu zaman bir prohormon olarak tanımlanır. Organın özelliğine bağlı olarak testosteron hücre içerisinde DHT'na dönüşür (11,12). Dihidrotestosteron, testosteron ile karşılaştırıldığında 10 kat daha fazla potenttir (11,13). Kolesterolden androjen üretimindeki basamaklar, bu basamaklardaki enzimler Şekil 2'de şematize edilmiştir (11).

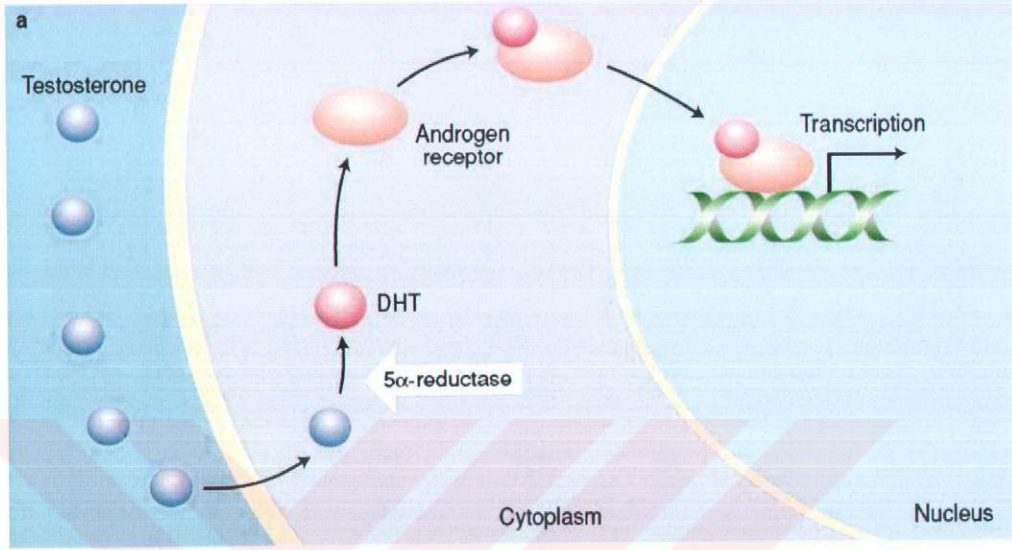


Şekil 2: Testislerde Leydig hücrelerinde erkek gonadal steroidlerinin sentezinin şematik gösterimi

Androjenlerin etki mekanizması

Androjenler, etkilerini tiroid hormonu, vitamin D, retinoid gibi diğer steroid hormonlara benzer şekilde hücre içerisindeki androjen reseptörü (AR) aracılığı ile gösterirler. Bu steroid hormonların her birinin kimyasal yapısı farklı olmakla birlikte, hepsinin ortak özelliği küçük hidrofobik moleküller olmalarıdır ve hücre membranını difüzyon yolu ile geçerek hücre içerisindeki reseptörleri aracılığı ile etki etmeleridir (14). Bu steroid hormonlar gibi androjenler de etkilerini gen ekspresyonunu

düzenleyerek ortaya çıkarılır; deoksiribonükleik asit (DNA)'teki spesifik bölgelere bağlanarak messenger ribonükleik asit (mRNA) sentezini başlatıp protein sentezini gerçekleştirirler (14) (Şekil 3).



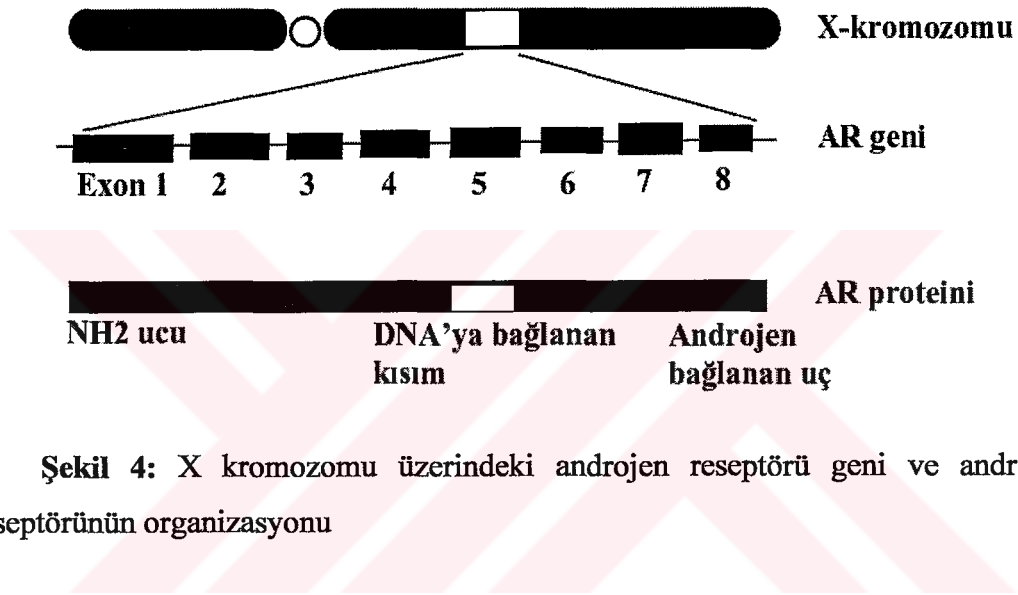
Şekil 3: Testosteronun, dihidrotestosterona dönüşümü ve hüresel etkileri

Androjen reseptörleri

Androjen reseptörleri, glikokortikoidler, mineralokortikoidler, tiroid hormonu, östrojen ve progesteron reseptörleri gibi steroid hormon reseptörleri ailesine aittir. Sitozolda serbest olarak inaktif durumda bulunan AR'leri hücre içine giren androjen ile bağlanarak nükleusa taşınır ve burada DNA'daki spesifik bölgelere bağlanır (9,13). AR bir yandan kendine spesifik geni aktive ederken diğer taraftan AR yapan geni de aktive eder (otoaktivasyon). Dolayısıyla, dokuda androjen seviyesi arttıkça AR düzeyi azalmaz sabit kalır (9,12,15).

Androjen reseptörünü kodlayan genler X kromozomu üzerine yerleşmiştir. Para sentromerik bölgede uzun kol üzerinde q11-q13 aralığında bulunur. Androjen reseptörünü kodlayan gen üzerinde 8 adet ekson vardır. Eksonlar, genin AR kısmını sentezleyen DNA bölgeleridir. Bunlardan mRNA transkripsiyonu yapılır, mRNA'lar sayesinde de aminoasitler (aa) birleştirilerek protein sentezi için translasyon gerçekleştirilir (12-26).

Androjen reseptörünün molekül ağırlığı yaklaşık 90 kb'dır ve içerdiği aa sayısı 917'dir. Reseptör temel olarak 3 kısımdan oluşmaktadır: 1) transkripsiyonu başlatan kısım (N-ucu): 1. ekson tarafından kodlanır, nükleustaki proteinlere ve genlerdeki regülatör ünitelere bağlanır; 2) DNA'ya bağlanan kısım: ekson 2 ve 3 tarafından kodlanır; 3) Androjen bağlanan kısım (C-ucu): 4-8. eksonlarca kodlanır (16) (Şekil 4).



Şekil 4: X kromozomu üzerindeki androjen reseptörü geni ve androjen reseptörünün organizasyonu

Androjen reseptörünün DNA'ya bağlanan kısmı tüm reseptörün %10'nunu oluşturur ve 72 aa'ten meydana gelmektedir. N-ucu ile androjen bağlayan kısım arasında lokalizedir. *Zinc finger* adı verilen parmak şeklinde iki lupdan oluşmaktadır ve bu luplar androjen geni üzerindeki spesifik bölgelere bağlanırlar (12). Androjen reseptörünün bağlandığı DNA kısmı androjenlere özel protein sentezi yaptırdığı için ayrıca *androjen responsive elements* (ARE) adını da alırlar. Androjen reseptörü DNA'ya birbirinin aynısı iki hormon-reseptör kompleksinden oluşan bir homodimerik yapıda bağlanır. Sitozolden nükleusa geçen reseptör-hormon kompleksi, DNA üzerinde kendine ait spesifik bölgeyi tanıyarak, parmaklı çıkıntılar aracılığı ile bağlanır. Androjenlerin reseptöre ya da DNA'ya bağlandığı sırada oluşan dimerler DNA üzerindeki ARE'lere bağlanırlar (17). Bu bağlanma sonucu oluşan

kompleks androjen bağımlı genlerde mRNA sentezini başlatır, mRNA translasyonunu takiben de androjen bağımlı proteinler yapılır (15).

Androjen reseptörünün androjen bağlayan kısmı C-karboksil ucudur ve tüm reseptörün yaklaşık üçte birini meydana getirir. Testosteron ya da DHT'nun bu bölgeye bağlanması ile reseptörün yapısı değişir ve ortaya çıkan yeni yapı gen transkripsiyonunun kontrollü uyarılmasından sorumludur. Testosteron reseptörden daha çabuk ayrıldığı için DHT reseptöre daha fazla affinite gösterir. Östradiol, progesteron ve androstenadion da bu reseptörlere testosterona göre daha düşük affinitede bağlanabilirler (17, 18). Sitozolde serbest olarak dolaşan AR'lerinin nükleusa girebilmeleri için androjen ile bağlanmaları gerekir; ancak nükleusa girdikten sonra reseptörün DNA'ya bağlanması için androjenlere gerek kalmaz (19).

Androjen reseptörünün transkripsiyondan sorumlu kısmı N-ucudur ve nükleusa bağlanmada önemlidir (20).

Testosteron, testosteron esterleri ve testosteron propiyonat

Testosteron, 19 karbonlu bir steroid olan androstenol türevidir. Açık adıyla 17 β -hidroksi-4 androsten-3-on'dur ve yukarıda bahsedilen basamaklar sonucu testislerde kolesterolden sentez edilir. Testosteronun etkisinin çok kısa süreli olmasından, absorpsiyonunun değişkenlik göstermesinden ve kısa aralıklarla uygulama gerektirmesinden dolayı ilaç olarak kullanımı uygun değildir. Flaster ya da jel şeklinde denenmiş formlarının olmasına rağmen, uzun etkileri nedeniyle testosteron esterleri günümüzde androjenik etki elde etmek için kullanılan preparatlardır. Testosteronun belirli yağ asitleri ile esterleşmesi sonucu oluşturulan bu preparatların molekül polariteleri daha düşük, yağda çözünürlükleri daha fazla ve molekül kütlesi testosterondan daha büyüktür. Oral kullanım için uygun olmayan bu preparatların yağdaki (pamuk tohumu yağı, mısır yağı, susam yağı) çözeltileri genellikle intramüsküler uygulanır ve uygulandıkları bölgeden yavaş emilerek uzun etki profili oluştururlar. Testosteron propiyonat (TP), testosteron fenilpropiyonat, testosteron spiyonat, testosteron enantat ve testosteron undekanoat ve bunların karışımları kullanılan testosteron esterleridir. Testosteron propiyonat, testosteronun diğer ester türevlerine göre etkisi 2-3 gün süren kısa etkili ester şeklindedir (21).

GLİAL FİBRİLER ASİDİK PROTEİN (GFAP):

Glial fibriler asidik protein, 50 kDa büyüklüğünde bir filamandır ve ilk olarak merkezi sinir sistemindeki astroglial hücrelerde tanımlanmıştır. Astrositler için ana ve spesifik intermediyal filaman olan GFAP, astrositlerde motilite ve morfoloji için temel bir maddedir. Astrosit uzantılarına yapısal stabilite sağlar (2,22). GFAP'ı göstermek amacıyla birçok antikör kullanılmış ve bu antikörler ile astrositlerde yoğun ve güçlü bir şekilde boyanma sağlanmıştır. Bu şekilde astrosit morfolojisi hakkında veriler elde edilmeye çalışılmıştır (2).

Glial fibriler asidik protein düzeyi gelişimsel ya da patolojik olabilen birçok olay ile düzenlenir. Beyin travması, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalık durumlarında GFAP ekspresyonunun birkaç kat arttığı gözlenmiştir (2,22). Estradiol, tiroid hormonları, glikokortikoidler gibi birçok hormon ve *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor-β* (TGF-β)'yı içeren çok sayıda büyüme faktörü GFAP ekspresyonunun düzenlenmesinde etkilidir (2, 23-26).

Östrojenin beynin birçok bölgesinde astroglial morfolojiyi etkilediği bilinmektedir. Yetişkin sıçanlarda arkuat nükleusta dolaşımdaki östrojen düzeyi ile astrosit morfolojisinde değişiklikler gösterilmiştir. Aynı şekilde yenidoğan sıçanlarda arkuat nükleusta astrositlerin erkeklerde dişilere oranla daha kompleks olduğu bunun da gonadal steroidlerle düzenlendiği gösterilmiştir (2,23,27). Testosteron ve östrojen benzer etkiye sahiptir. Bu etki, SSS'de testosteronun aromatizasyon yolu ile östrojene çevrilmesi ile olmaktadır (2).

Astroglial hücrelerden başka, GFAP immünoaktivitesi, olfaktör sistemin Schwann hücrelerinde gösterilmiştir. Periferal sinir sisteminde olduğu gibi birçok özel bölgede bulunur. Sıçan enterik gliya benzeri hücrelerinde tespit edilmiştir. Sinir sistemi haricinde GFAP immünoaktivitesi tükrük bezlerinde, lens epitelinde ve karaciğerde lokalize olabilir. (22,28).

SIÇANLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Sıçanlar, deneysel çalışmalarda en sık kullanılan hayvan türlerindedir. Enfeksiyonlara karşı sıçan fareye göre daha dirençlidir. Bu nedenle belirli

bakteriyolojik deneyler için daha az uygundur. Fakat boyutları nedeniyle cerrahi deneyler için daha çok tercih edilmektedir. Sıçanlar, bazı hormonların standardizasyonu için birçok farmakolojik deneylerde ve kanser araştırmalarında ideal bir in-vivo model oluştururlar (30).

Beyin

Doğumdan sonraki 15 gün içerisinde beyin ve vücut ağırlığı orantılı olarak artış göstermektedir. On beş günden sonra vücut ağırlığı artmaya devam ederken, beyin ağırlığındaki artış yavaşlamaktadır. Beynin boyutu yenidoğan sıçanlar arasında farklılık göstermektedir. Ortalama beyin ağırlıkları ve ortalama vücut ağırlıkları arasında korelasyon yoktur. Beyinde primer olarak su, protein ve lipid bulunmaktadır (31).

Hipokampus

Hipokampusun embriyolojik gelişimi

Serebral hemisfer duvarının diensefalon tavanına bitişik olduğu bölgede nöroblast gelişimi olmaz ve bu alan ince kalır. Bu bölgede, ikinci ayın ortalarında hemisferin duvarı üzerinde vasküler mezenşimle kaplı ependimal hücre tabakası oluşması ile koroid pleksus meydana gelir. Oluşan koroid pleksus, koroidal fissür olarak adlandırılan bir çizgiyi izleyerek lateral ventrikül içine girer. Bununla birlikte koroidal fissürün hemen üzerinde bulunan hemisfer duvarı kalınlaşır ve hipokampusu oluşturur. Hipokampus daha sonra kendi içinde katlanmış olarak lateral ventrikülün içine doğru genişler (32).

Anatomik zellikler

Hipokampus, temporal korteksin medial bölgesinin lateral ventrikülünün alt boynuzunun ventral yüzeyini oluşturmak üzere yukarı ve içeri doğru kıvrılmış ve uzamış parçasıdır. Hipokampusun bir ucu amigdalooid çekirdeklere bitişirken diğer kenarlarından biri temporal lobun ventromedial korteksini oluşturan parahipokampal girus ile kaynaşır. Hipokampus ve ona bağlı temporal lob yapıları; serebral korteks, hipotalamus, mamiler cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösterir. Hipokampal formasyon, dentat girus, hipokampus ve subikulumun oluşturduğu ve parahipokampus tarafından sarmalanan, kendi

çevresinde katlanmış bir primitif kortikal yapıdır. Hemen her türlü duysal deneyim, hipokampusun hiç olmazsa küçük bir bölümünü aktive eder. Buna karşılık hipokampus, özellikle en büyük çıkış yolu olan forniks yoluyla ön talamus, hipotalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller gönderir. Böylece hipokampus gelen duysal sinyalleri farklı amaçlar için uygun davranış reaksiyonlarının içerisinde geçiren ek bir kanal rolü oynar (33). Dentat girus ve hipokampusun üç tabakası, allokorteks histolojik özelliklerini gösterir (dendrit, piramidal hücre ve akson). Hipokampusun allokorteksinden, 6 tabakalı izokortekse uzanan tranzisyonel korteks (subikulum) bir mezokorteks olup dört-beş farklı kortikal tabakadan oluşur (34). Hipokampusun korteks bandı; genişliğine, hücre yoğunluğuna ve hücre büyüklüğüne göre dört bölgeye ayrılır. Kuyruk kısmı (CA1), kuyruğa yakın gövde kısmı (CA2), baş bölgesine yakın olan gövde kısmı (CA3) ve baş bölgesi (CA4) olarak isimlendirilir (35).

Hipokampusun histolojik yapısı

Hipokampus temelde üç tabakadan oluşur. Bunlar; stratum poliforme, stratum piramidale ve stratum molekülare olarak adlandırılır. Esas tabakalardaki hücrelerin dendrit ve aksonlarının farklı şekilde düzenlenmesiyle birçok sekonder tabaka da oluşmuştur (36). Hipokampusu meydana getiren tabakalar şunlardır;

1. Stratum oriens
2. Stratum piramidale
3. Stratum radiatum
4. Stratum lakunozum
5. Stratum molekülare

Stratum Poliforme

Hipokampusun en dış tabakası olup, stratum oriens olarak da adlandırılan bu tabaka, alveus ile stratum piramidale arasında bulunur. Poliforme tabakasında piramidal hücreler bulunmaz. Mikroskopik görünüm itibarıyla izokorteksin VI. tabakasını andırır. Stratum poliformenin dış zonundaki nöronların aksonları molekülare tabakaya ulaşır. İç zon nöronların aksonlarının bazıları alveusa, diğerleri ise piramidal tabakaya geçerler (37).

Stratum Piramidale

Bu tabakada karakteristik olarak çok sayıda piramidal hücreler ve Golgi tip II hücreleri bulunur. Piramidal hücrelerin bazal ve apikal dendritleri komşu tabakalara, aksonları ise stratum orienssten geçerek alveusa girer. Stratum oriens ile stratum piramidale arasındaki geçiş zonunda bulunan sepet hücreleri, piramidal hücre gövdelerinin çevresinde yoğun pleksus yaptıktan sonra stratum radiatum'a geçerler (38). Piramidal hücrelerin aksonları geriye dönebilen kollateraller verebilirler. Bunların çoğu stratum radiatum'a geçmekle birlikte bazıları da stratum oriense geçerek oradan da fornix yoluyla hipokampusu terkedebilirler (36, 39).

Stratum Molekölare

Çok az sayıda nöron içeren bu bölge stratum radiatum, stratum molekölare ve stratum lakunozum olmak üzere üç alt bölgeye ayrılır.

Stratum Radiatum

Geniş bir ağ yapısına sahiptir ve bu tabakada, piramidal tabakanın sınırından ışınsal uzanan dallar bulunur. Stratum molekölare ve stratum lakunozumda diğer tabakalardan gelen zengin bir lif ağı içerir. Bu iki tabaka tek bir lamina olarak da kabul edilmektedir. Hipokampusu, entorinal alandan gelen afferent lifler bu iki tabakada sonlanır (36).

Hipokampusun fonksiyonları

Hipokampusun anatomik yapısının oldukça karmaşık olması ve beyindeki bir çok bölge ile bağlantılı olması, hipokampusun fonksiyonlarının anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (40). Diğer limbik yapılarda olduğu gibi, hipokampusun değişik alanlarının uyarılması da hiddet, edilgenlik, aşırı seks güdüsü gibi davranış biçimlerinin görülmesine sebep olur. Hipokampusun diğer bir özelliği de hiperekstabilitesidir. Örneğin, hafif elektriksel uyarılar hipokampus bölgesinde uyaran kesildikten sonra bile saniyeler süren lokal epileptik nöbetlere sebep olur. Bu da hipokampusun belki normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir. İnsan hipokampal nöbetler sırasında koku, görme, işitme, dokunma vb. hallüsinasyonlar içeren çeşitli psikomotor etkiler yaşar. Bilincini kaybetmemiş olsa ve yaşananların gerçek olmadığını bilse de bu hallüsinasyonlar önlenemez.

Hipokampusun bu hipereksitabilitesinin sebeplerinden biri, belki de hipokampus korteksin bazı alanlarının beynin diğer bölgeleri gibi altı tabakalı değil üç sinir hücresi tabakasından oluşmasıdır (33).

Hipokampusun elektroensefalografi (EEG) dalgaları ritmik sinüzoidal tipteki teta dalgalarıdır. Bu durum hipokampusun spontan aktivitesini ve bilincin devrelerle ilişkili olduğunu göstermektedir. Teta dalgalarının sadece dikkat ve uyanıklık ile ilgili değil, aynı zamanda fizyolojik fonksiyonla ilişkili olduğu bilinmektedir (37). Anestezi altındaki kedilerde yapılan çalışmalarda, hipokampusun uyarılması ile dikkatli bakış ve arayış hareketleri gözlenmiştir. Bu davranışların fiziksel işlemlere karşı duyarlı motor reaksiyonlar tarafından başlatıldığı kabul edilmektedir. Bilinci yerinde olan kedilerin hipokampusunda oluşturulan lokal uyarılar veya lokal lezyonlar sonunda gözlenen davranış değişiklikleri, psikomotor epilepside meydana gelenlerle benzerlik göstermektedir. Hipokampustan yayılan epileptiform aktivitenin limbik lobun diğer kısımlarına ve sonradan da izokortekse yayıldığı görülmüştür (40).

Hipokampusun hafıza ve özellikle yakın hafıza ile ilgili olduğuna dair bilgiler mevcuttur. Bazı kişilerde epilepsi tedavisi için hipokampuslar cerrahi olarak çıkartılmıştır. Bu insanlar önceden öğrenilmiş anılarını hatırlayabilmekte, ancak sözel sembollere dayanan yeni bir bilgi edinememektedirler. Saniyeler ile birkaç dakika süren uzun süreli bellek oluşturabilirler; ancak birkaç dakikadan fazla uzun süreli bellek oluşturma yetenekleri kısmen ya da tamamen yok olmuştur (anterograt amnezi). Hipokampusların harabiyeti eskiden öğrenilen anıların kaybına da neden olur (retrograt amnezi); ancak bu uzak geçmiş anılardan ziyade bir yıl önceki anılar için daha geçerlidir.

Hipokampusun kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe çevrilmesi güdüsünü sağladığı, yani hipokampusun yeni informasyonun kalıcı depolanmaya çevrilmesi gerçekleşinceye kadar zihnin onu tekrarlamasını gerektiren sinyal veya sinyaller ilettiği ileri sürülmüştür. Mekanizma ne olursa olsun hipokampus olmadan verbal ya da sembolik uzun süreli anıların kalıcı olması mümkün olmaz (33).

Preoptik Alan (POA)

Yapısal ve fonksiyonel olarak hipotalamus ile devam eden POA, embriyolojik ve anatomik tanımlamalara göre bağımsız bir bölge olarak sınıflandırılır ve iletilerin hipotalamik çekirdeklere gönderilmesinde ve taşınmasında görev alır. Preoptik alan erkek cinsiyete özgü ejakülasyon gibi çiftleşme davranışları ve dişi cinsiyete özgü yuva yapma, koruma gibi anne davranışlarının gösterilmesinde kritik rol oynayan nöral yapıdır (33,41). Bununla birlikte ovulatuvar LH dalgalanmaları ve lordozis davranışı gibi dişi cinsiyette görülen nöroendokrin olaylar POA ile ilişkilidir (42).

Fizyoloji ve davranışta cinsiyete özgü farklılıklar beyin morfolojik değişiklikleri ile koreledir. Bu konudaki araştırmalar POA üzerine yoğunlaşmış ve hormonal değişikliklerin, bu bölgedeki nöronal morfoloji ve yoğunlukta önemli olduğu gösterilmiştir (43,44). Karakteristik nöronal özelliklerin düzenlenmesini açıklayan bu çalışmaları POA'ndaki astrositlerde steroidlerce indüklenen değişikliklerin ortaya konması izlemiştir (2).

Kalp

Kalp kası perikard ile çevrili ve sternum ile bitişiktir. Her tarafından akciğerle çevrilmiştir. Kalp daha çok sol mediyan tarafta durmakta ve ventrolaterali göstermektedir (30).

Solunum sistemi

Solunum sistemi anterior ve posterior olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Anterior bölüm burun deliklerini, nazal kaviteleri ve nazofarinksi içerir. Burun delikleri, vestibüller ve oral kavite çok katlı skuamoz epitel ile döşenmiştir. Posterior bölüm larinks, trakea, bronş ve akciğerleri içerir. Larinks kıkırdak yapı ile çevrelenmiştir (31). Sıçanın trakeası genel olarak tavşaninkine benzemektedir. Yaklaşık 30 kıkırdak halkadan oluşmaktadır. Bu halkalar dorsoventralde biraz yassılaştırmıştır. Trakea epiteli iki katlı silyalı yassı epitelden oluşmaktadır. Trakea horizontal durumda duran sağ ve sol ana bronşa ayrılmaktadır. Sıçanın akciğeri solda bir, sağda dört loptan oluşmaktadır. Bu nedenle sağ akciğer sol akciğere göre daha büyüktür (30).

Normal kan değerleri

Yenidoğan normal bir sıçanda alyuvarların sayısı $3.6-5.6 \times 10^6$ alyuvar/mm³, trombositlerin sayısı $0.7-1.2 \times 10^6$ trombosit/mm³ civarındadır. İnsan kanında görülen akyuvar tiplerinin çoğunluğu sıçan kanında da görülmektedir. Lökositlerin sayısı ise $11.1-16.1 \times 10^3$ akyuvar/mm³ arasında değişmektedir (31).

Wistar Albino cinsi sıçanlar

Sakin karaktere sahip olup, orta derecede doğurgan ve enfeksiyonlara oldukça dirençli bir türdür. Daha az oranda spontan tümör geliştirirler. Kafaları geniş ve kulakları uzun olan bu sıçanların kuyrukları boylarından daha kısadır (31).

Sıçanlarda pubertal döngü

Sıçanlar puberteye ortalama 50-60. günlerde ulaşırlar, vajinal açıklık 35-90. günlerde, testislerin inişi ise 20-50. günlerde tamamlanır. Puberteye gelmiş bir sıçanda östrus siklusu yaklaşık 4-5 gündür ve östrus periodu yaklaşık 12 saat sürer. Gebelik süresi 21-23 gündür ve bir yılda 7-9 defa doğum yaparlar. Bir doğumdaki yavru sayısı 4-8 adettir. Yavrular 16. günden sonra yemleri yemeye başlarlar ve ortalama sütten kesilme zamanları 21 gündür (45).

GEREÇ VE YÖNTEM

DENEY HAYVANLARI

Çalışmanın deneysel bölümü Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Laboratuvarı'nda, histolojik çalışmalar ise Patoloji ve Anatomi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'ndan 06.07.2006 tarihinde Etik Kurul onayı alındı ve tüm çalışma süresince deney hayvanları çalışma etiğine uyuldu.

Çalışma için Wistar Albino cinsi (Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi) sıçanlar kullanıldı. Vajinal *smear* yöntemi ile östrus döneminde olan dişi sıçanlarda yığınlar oluşturan çekirdeksiz, poligonal şekilli süperfisial hücreler görüldükten sonra, 16 saat süre ile 3 dişi ile birlikte bir erkek sıçan aynı kafese konularak çiftleşmeye bırakıldı. Sonraki gün erkek sıçanlar ayrıldıktan sonra tüm dişi sıçanlardan vajinal *smear* yapılarak gebeliğin varlığı araştırıldı. Vajinal *smear*'de sperm saptanan dişi sıçanlar gebe olarak kabul edildi ve vajinal *smear*'ın pozitif saptandığı gün, gebeliğin 0. günü olarak kabul edilerek sıçanlar rastgele ayrılıp farklı kafeslere yerleştirildi. Tüm çalışma süresince sıçanlar altı plastik, üstü tel olan özel kafeslerde izlendi ve hayvanların tamamı çalışma boyunca oda ısısında (22 ± 2 °C), $\%50\pm 5$ nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan bir ortamda takip edildi.

DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Vajinal *smear* ile gebeliği tespit edilen dişi sıçanlar gebeliklerinin 16. gününde rastgele iki gruba ayrıldı. Birinci gruba 0.5 ml susam yağı içerisinde 1 mg TP intra peritoneal (İP), diğer gruba da eşit miktarda susam yağı enjeksiyonu yapıldı (46-48). Aynı uygulamaya doğumun gerçekleştiği güne kadar devam edildi. Doğum gerçekleştikten sonra tüm yenidoğan sıçanlarda cinsiyet tayini yapılarak yavrular dişi ve erkek olarak gruplandırıldı ve doğumun gerçekleştiği gün 0. gün olarak kabul edildi.

Annelerine gebelikte TP uygulanan dişi sıçanlar postnatal 0. günde kendi içinde iki gruba ayrıldı. Postnatal 0-3. günler arasında birinci gruba ense bölgesine

0.1 ml susam yağı içerisinde 100 µg TP subkutan (SC) uygulandı. Bu grup prenatal ve postnatal dönemde TP uygulanan birinci deney grubunu (TT) oluşturdu. Annelerine gebelikte TP uygulanan diğer dişi gruba ise sadece 0.1 ml susam yağı aynı günlerde ve aynı şekilde uygulandı ve bu grup ise sadece prenatal dönemde TP uygulanan ikinci grubu (TO) oluşturdu.

Annelerine gebelikte susam yağı uygulanan dişi yavrular postnatal 0. günde kendi içlerinde iki gruba ayrıldı. Birinci gruba postnatal 0-3. günler arasında 100 µg TP 0.1 ml susam yağı içerisinde ense bölgesine uygulandı ve bu grup sadece postnatal dönemde TP uygulanan üçüncü çalışma grubunu (OT) oluşturdu. Annelerine gebelikte susam yağı uygulanan diğer dişi gruba ise yine eşit miktarda susam yağı enjeksiyonu yapıldı ve bu grupta prenatal ve postnatal dönemde TP verilmeyen dördüncü çalışma grubu (OOD) yani dişi kontrol grubu olarak kabul edildi. Annelerine gebelikte susam yağı uygulanan erkek yavrulara önceki gruplarda olduğu gibi aynı günlerde, eşit miktarda susam yağı enjekte edilerek çalışmanın beşinci grubu (OOE) yani erkek kontrol grubu oluşturuldu. Her bir çalışma grubunda 6 hayvan alındı. Tüm deney grupları Tablo I'de özetlenmiştir.

Tablo I: Çalışma grupları

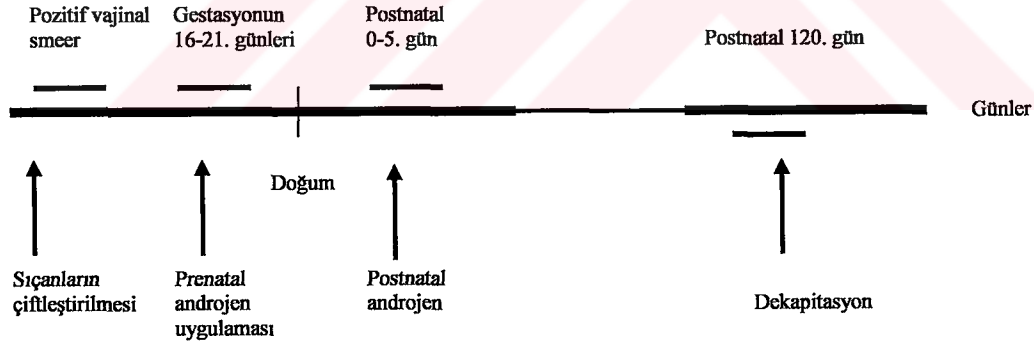
Grup no	Grup adı	Cinsiyet	Grubun oluşturulma şekli	Sayı
1	TT	Dişi	Prenatal ve postnatal dönemde testosteron propiyonat uygulanan	6
2	TO	Dişi	Sadece prenatal dönemde testosteron propiyonat uygulanan	6
3	OT	Dişi	Sadece postnatal dönemde testosteron propiyonat uygulanan	6
4	OOD	Dişi	Testosteron propiyonat uygulanmayan	6
5	OOE	Erkek	Testosteron propiyonat uygulanmayan	6

Susam yağı ve testosteron propiyonat enjeksiyonu

Gebe sıçanlara gebeliğin 16. gününden doğumun gerçekleştiği güne kadar her gün sabahları İP 1 mg TP (Testosterone propionate® ampül 50 mg) 0.5 ml susam yağı içerisinde uygulandı. Kontrol gruplarına ise sadece susam yağı aynı şekilde uygulandı. Yenidoğan sıçanlara ise 100 µg TP 0.1 ml susam yağı içerisinde ense bölgesine SC olarak uygulandı. Kontrol gruplarında ise aynı miktardaki susam yağı benzer şekilde uygulandı. Tüm enjeksiyonlardan sonra enjeksiyon bölgesi Betadine® ile temizlendi. Tüm sıçanlar yukarıda belirtilen standart laboratuvar koşullarında 120. güne kadar takip edildi.

ÇALIŞMA PLANI ve ÇALIŞMANIN SONLANDIRILMASI

Yirmibir güne kadar standart laboratuvar ortamında anneleri ile aynı kafeslerde takip edilen yavru sıçanlar bu günden sonra annelerinden ayrılarak her deney grubu farklı kafeslerde olmak üzere takip edildi. Postnatal 120.gün genel anestezi altında, transkardiyak perfüzyon yöntemi uygulandıktan sonra dekapitasyon sonrası sakrifiye edildi. Şekil 5’de çalışma planı gösterilmiştir.

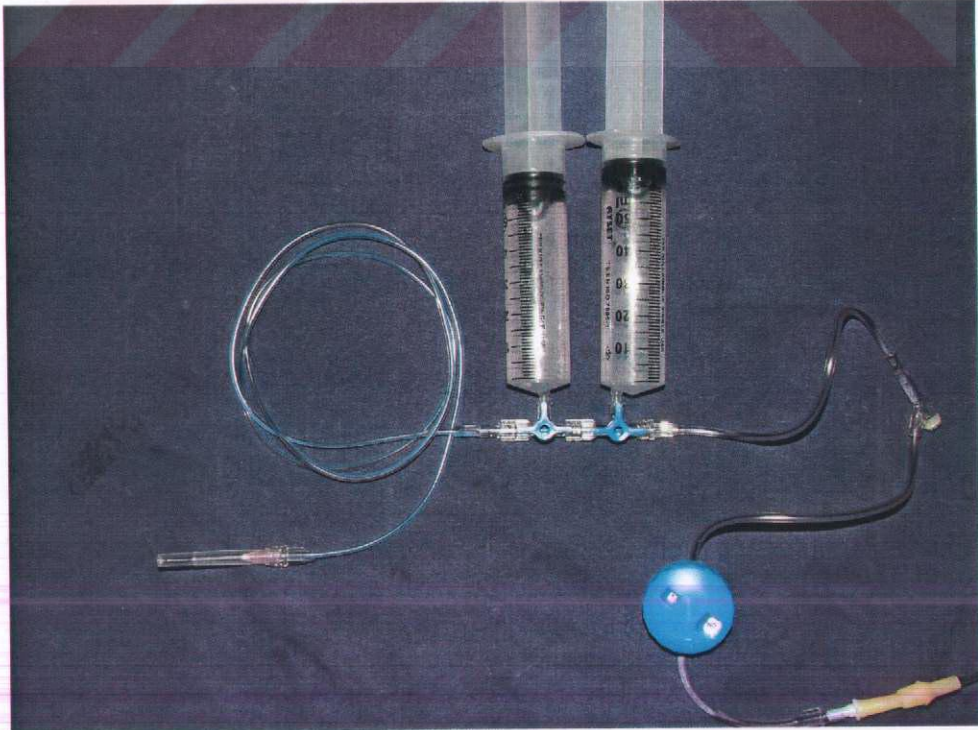


Şekil 5: Çalışma planı

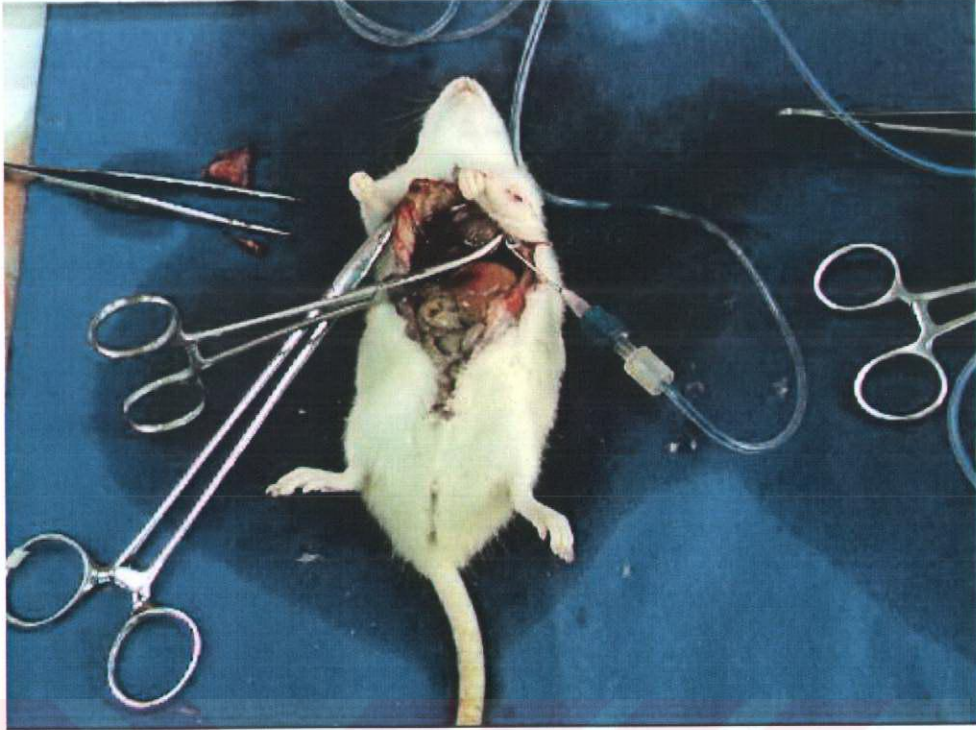
TRANSKARDİYAK PERFÜZYONUN UYGULANMASI

Deney hayvanlarına ketamin 90 mg/kg (Ketalar® 50 mg Ampül, Pfizer) ve ksilazin 10 mg/kg (Xylazin hydrochloride®, Rompun-Bayer) karışımı İP uygulanarak genel anestezi sağlandı. Anestezi altındaki denekler supin pozisyonda ameliyat masası üzerine sabitlendi. Cilt ve cilt altı dokular diseke edildikten sonra sternum orta hattan ikiye ayrılarak göğüs kafesi açıldı ve diyafram serbestleştirildi.

Kalp etraf dokulardan serbestleştirildikten sonra infüzyon setine bağlı durumda bulunan kör uçlu heparinize bir iğne ucu yardımı ile sol ventriküle girildi. Yaklaşık 3-4 mm ilerleme ile aorta'ya gelen iğne ucu burada kleplendi. Kalp atımları ile kanın set içine geldiği görüldükten sonra sağ atriyumya yaklaşık 1mm büyüklüğünde bir insizyon yapıldı. Yaklaşık 150 ml salin (%0.9 NaCl) 3-5 dakika içinde aortaya yerleştirilen kör uçlu iğne yardımı ile sistemik dolaşıma verilerek perfüzyon yapıldı. Verilen salin miktarına, sağ atriyumya sistemik dolaşımdan dönen ve buradan dışarıya akan kanın berraklaşmasına göre karar verildi. Perfüzyon sonrasında hava girişinin engellendiği infüzyon düzeneği yardımı ile sıçanlara 0,1 M Fosfat Buffer tamponu (PB, pH 7.4) içinde %4' lük paraformaldehid eriyiğinden 400 ml verildi. Tespit sıvısının ilk 200 ml'si salin ile aynı hızda (3 dakika), geri kalan 200 ml' si ise yaklaşık 2 saatte infüzyon şeklinde uygulandı. Perfüzyonun ardından servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Kafatası ince uçlu pens yardımı ile foramen magnumdan başlayarak öne doğru önce orta hatta sonra yanlara doğru açıldı. Beyin tabanında bulunan sinirler, önden arkaya doğru kesildikten sonra elde edilen beyinler 2 gece +4°C' de %30' luk sükröz solüsyonunda bekletildi. Şekil 6 ve 7'de transkardiyak perfüzyon sırasında çekilen resimler gösterilmiştir.



Şekil 6: Transkardiyak perfüzyon işlemi sırasında kullanılan perfüzyon seti



Şekil 7: Transkardiyak perfüzyon işlemi

KESİTLERİN ALINMASI VE DOKUNUN HAZIRLANMASI

Sükroz solüsyonunda bekletilen beyinler kriyostat aletinde (Lecia CM3050) - 50 C°'de hızlı dondurma işlemine tabi tutulduktan sonra taşıyıcı üzerine koronal şekilde yerleştirildi. Daha sonra kriyostat cihazı -(15-20) C°'ye ayarlanarak GFAP immunohistokimyasal boyası için beyin frontal bölgesinden başlayarak POA'na karşılık gelen bölgeden 50 µm kalınlığında kesitler sistematik rasgele örnekleme stratejisi ile kesilerek jelatin ile kaplanmış lamların üzerine numaralandırılarak alındı.

Beynin hipokampusu karşılık gelen bölgelerinden Kresil viole (cresyl violet) ile boyama için 100 µm kalınlığındaki kesitler, sistematik rasgele örnekleme stratejisi ile kesilerek statik lamlar üzerine numaralandırılarak alındı.

KRESİL VİYOLE BOYAMA YÖNTEMİ

Kesitler iki farklı ksilen solüsyonunda 5 dakika bekletildikten sonra sırası ile % 100, % 100, % 70 ve % 50' lik alkol karışımlarında 5'er dakika hidrate edildi. Çeşme suyuna batırılıp çıkarıldıktan sonra kesitler 5 dakika kresil viole boyasında bekletildi.

Kesitler çeşme suyunda yıkandıktan sonra sırası ile % 50, % 70, % 100 ve % 100' lük alkol karışımlarında geçirilerek dehidrate edildi. Son olarak iki farklı ksilen solüsyonunda 5'er dakika bekletilen kesitler uygun lamel ve yapıştırıcı ile kapatıldı. Kesitler ışık mikroskobu altında 4, 10, 40 ve 100'lük büyütmelemler kullanılarak incelendi. İnceleme sırasında kesitte tüm beyin dokusu mevcut olduğu için sağ veya sol hemisfer ayırımı yapılabildi. Tüm kesitlerde sol hemisferde Optik Parçalama Metodu kullanılarak hipokampusun pyramidal nöronlarının sayımı yapıldı.

İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ

Kriyostat aletinden alınan donmuş dokular % 100' lük üç tane aseton serisinde 10'ar dakika, sonrasında ise sırası % 96, % 96, % 80 ve % 80' lük alkol serisinde 5'er dakika bekletilerek tespit edildi. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) ile üç kez yıkandıktan sonra hidrojen peroksit ve metil alkol uygulaması yapıldı. PBS ile üç kez yıkama ve kurulama sonrası 'Blocking' solüsyonu damlatıldı ve kesitler 30 dakika süresince bu solüsyonda tutuldu. Daha sonra yıkama işlemi yapılmaksızın Primer Antikor uygulaması yapıldı ve kesitler bu antikor solüsyonunda bir gece +4 C°'de tutuldu. Sonraki gün oda ısısına getirilen kesitler PBS ile üç kez yıkayıp kurutulduktan sonra sekonder antikor damlatılarak 20 dakika beklendi. Tekrar PBS ile yıkama ve kurutma işlemi yapıldıktan sonra dokulara, enzim (30 dakika), kromojen (10 dakika) uygulandı ve tüm ara basamaklarda üç kez PBS ile yıkama sonrası kurulama işlemi uygulandı. Konjugat sonrası distile su ile yıkanan kesitler % 80, % 80, % 96, % 96'lık alkol serileri ve 5 dakikalık iki ksilen solüsyonundan geçirilerek lamel ve yapıştırıcı ile kapatıldı. Çalışmada, Santa Cruz Biotechnology® GFAP (2E1: cs-33673) immünhistokimyasal boya kiti kullanıldı. Tüm kesitlerde sol preoptik alandaki astrosit morfolojisi değerlendirildi.

STEREOLOJİK YÖNTEMLER

Temel olarak etkinlik, kesinlik ve güvenilirlik ilkelerini hedef alan stereoloji, uzayda üç boyutlu olarak gördüğümüz bir cismin hacim, yüzey alanı, sayı ve uzunluk gibi geometrik özellikleri hakkındaki sayısal verileri, laboratuvar ortamında iki boyutlu kesit düzlemlerini kullanarak saptamaya çalışan bir bilim dalıdır. Yirminci yüzyılın sonlarına doğru Sterio tarafından tanımlanan disektör yöntemi, stereoloji bilimine yeni bir boyut getirmiş ve bu alandaki laboratuvar çalışmalarına yeni bir

ivme kazandırmıştır. Temel ilkeleri etkinlik, güvenilirlik ve yansızlık olan stereolojik yöntemler, disektör yöntemi sayesinde önceki yöntemlere ek olarak mikroskobik çalışmalarda daha etkin ve yansız sayım yöntemi olmuştur. (49-51).

Stereolojik yöntemlerle beyindeki toplam nöron sayısı, sinaps yoğunluğu veya toplam beyin hacmi ölçülebildiği gibi, örneğin böbrekte korteks-medulla oranı, toplam glomerül sayısı, vücuttaki damarların toplam uzunlukları, ince bağırsakların toplam yüzey alanları vb. gibi hesaplamalar da yapılabilir (49-51).

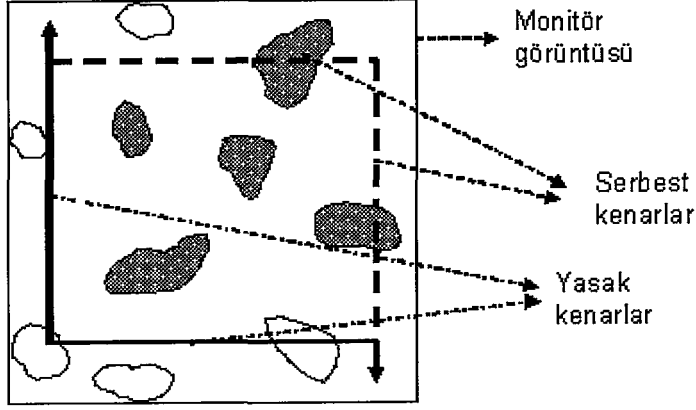
Sistematik rastgele örnekleme stratejisi

Stereolojik yöntemlerin temel ilkelerinden birisi sistematik rastgele örnekleme stratejisidir. Buna göre, ilgilenilen yapının tamamı iki aralık içindeki rastgele bir noktadan başlanarak örneklendirilir. Yöntemin sistematik olması örneklemin daha önceden belirlenen aralıklarla yapılması anlamına gelir. Rastgele olması ise, bu sistematik örneklemin belirlenen örnekleme aralığı içindeki rastgele bir sayı ile başlanmasıdır. Bu örnekleme biçiminin temel özelliği ilgilenilen yapının her noktasına eşit örnekleme şansı tanınmasıdır. Stereolojik bir çalışmanın tarafsız olması için sistematik rastgele örneklemin, gerekli tüm seviyelerde (organdan alınacak dilimlerde, dilimlerden alınacak bloklarda, bloklardan alınacak kesitlerde ve kesitlerde inceleme yapılacak alanlarda) uygulanması gerekir (52-54).

Tarafsız sayım çerçevesi

Gundersen tarafından, stereolojik yöntemlerin tarafsızlık ve doğruluk ilkelerine uyan, bir tarafsız sayım çerçevesi ve sayım kuralı geliştirilmiştir. Kesitler mikroskopta incelenirken örneklenen alanda, görüntü alanına bütün halde giren yapılarla birlikte kısmen giren yapıların da değerlendirilip değerlendirilmeyeceği sorunu ortadan kalkmıştır. Böylece objelerin olduğundan daha fazla sayılmasının önüne geçilmiştir. Çerçeve, sol kenarının üst kenara temasından itibaren yukarı tarafa, alt kenarının ise sağ kenara teması hizasından aşağı yöne doğru devam eden sonsuz uzantılar içerir. Sayım sırasında, sol ve alt kenarlar ile bunların uzantılarına değen yapılar dikkate alınmazlar (yasak kenarlar). Çerçevenin tamamen içinde olan yapılar ile serbest kenarlar olarak tanımlanan sağ ve üst kenarlara değerek kısmen çerçeve içerisinde yer alan yapılar sayılır. Sayım yapılırken bu kuralın

uygulanabilmesi için çerçevenin, görüntü alanından küçük olması gerekir. Çerçeve dikdörtgen ya da kare şeklinde olabilir (52). (Şekil 8)



Şekil 8: Tarafsız sayım çerçevesi; devamlı çizgi yasak kenarı, kesikli çizgi serbest kenarı ifade eder. Koyu renkle boyanmış olan partiküller sayıma dahil edilirken diğerleri dahil edilmez

Optik disektör

Disektör prensibi ilk defa 1984 yılında Sterio tarafından, optik disektör ise 1986'da Gundersen tarafından tanımlanmıştır (52). Bu yöntem şeffaf, kalın histolojik kesitlerden sanal olarak optik kesitler elde etmek ve bu kesitlerde partikül sayımı yapması temeline dayanır. Stereolojik sayım yöntemi uygulamalarını kolaylaştıran özelliklere sahiptir. Tek kesitte çalışmaya ve daha az kesit alınmasına olanak sağladığı için işlem hızını artırır. Ayrıca partiküllerin daha detaylı görülmesini, çok yoğun yerleşimli partiküllerin kolaylıkla sayılmasını sağlar. Optik disektör yönteminde alınacak kesit kalınlığı, sayılan en uzun partikülden daha büyük olmalıdır. Genellikle 20 μm ve üstündeki değerler alınır. Sayısal açıklığı 1,35-1,40 olan büyük objektifler kullanıldığında, kesitin üst yüzeyinden alt yüzeyine doğru birbirini takip eden optik kesitler olduğu görülür. Bu kesitlerde, iki boyutlu sayım çerçevesinin sanal olarak üç boyuta aktarılması ile mikroskop ya da monitör görüntüsü kullanılarak partikül sayımı yapılabilir. Sayım yapılırken mikrovida hareket ettirilerek görüntünün ilk netleştiği yüzey (alt ve üst yüzey) belirlenir. Daha sonra görüntünün netliği kayboluncaya kadar kesitin içinde ilerlenir ve kesitin diğer yüzeyine ulaşılır. Bu sırada görüntü alanına giren partiküller sayım kuralı

doğrultusunda sayılır. Sayımda kullanılan hesaplamalar için kesit kalınlığının bilinmesi gerekir. Kesit kalınlığını ölçmek için mikrokator gibi aletler geliştirilmiştir. Mikrokator, mikroskop tablasının hareketlerini ölçerek z eksenindeki derinlik boyutunu belirler ve böylece optik olarak düzlemler boyunca kesitin içinde ne kadar ilerleme yapıldığını tespit eder. Kesit kalınlığının hesaplanmasında kullanılan diğer bir yöntem ise mikrovidanın kalibre edilmesi yöntemidir (55). Kesitin kesilme yüzeyindeki fiziksel bozukluk nedeni ile oluşabilecek artefaktlardan etkilenmemek ve sayılan bir nöronun tekrar sayılmasını engellemek için kesitin alt ve üst yüzeyinden belli bir mesafe (3-5 μm) belirlenmesi ve bu yüzeylerde partikül sayımı yapılmaması gerekir. Bu mesafelere alt ve üst güvenlik kuşağı denir. Partikül sayımı yalnızca bu iki güvenlik kuşağı arasında kalan h yüksekliğinde yapılır. Bu şekilde gerçekleştirilen bir sayım, o disektör hacmi içerisinde bulunan partikül sayısını verecektir. Sonuç olarak toplam disektör partikül sayısı, toplam disektör hacmine bölündüğünde, birim hacimde bulunan partikül sayısı (sayısal yoğunluk N) elde edilir. Toplam partikül sayısını hesaplamak için, sayısal yoğunluk değeri ile yapının toplam hacmi çarpılır (52,54,56,57).

Optik parçalama (fraksiyonlama) yöntemi

Sistematik rastgele örneklemenin bir başka şekli olan optik fraksiyonlama, toplam obje sayısının hesaplanmasında yeni bir yöntemdir. Referans hacminin kısımlara bölünerek örneklenmesidir. İlgilenilen hacimde sistematik rastgele örnekleme ile örneklenmiş belli bir parçada yani fraksiyonda, disektörle sayım yapılır. Bu uygulamada üç boyutlu bir sayım yöntemi olan optik disektör ve optik parçalama ile örnekleme yöntemi birlikte kullanılır. Uygulama kolaylığı nedeni ile en çok tercih edilen partikül örnekleme yöntemlerindedir. Dokulardaki şekil değişikliklerinden, fiksasyon, takip, gömme, kesit alma, boyama gibi histolojik işlemler nedeni ile oluşabilecek büzüşme veya şişme gibi etkilerden bağımsız olarak kullanılabilmesi önemli özelliğidir. Bu nedenle dondurma yöntemi, parafin ve plastik gömme teknikleri için uygundur. Ayrıca yapılardaki partiküllerin şekli, büyüklüğü ve yönelimlerinden (çapraz, oblik vb) etkilenmez, partikül sayımı yanı sıra partikül çapı, yüzey alanı ve hacim hesaplamaları için de kullanılmaktadır (52,54,56,57). Bu yöntemde de, diğer parçalama yöntemlerinde olduğu gibi doku, kesit ve kesit alanı seviyelerinde örnekleme yapılır. Böylece sayım için yapının küçük bir parçası

örneklenmiş olur. Önemli olan bu örneklenen bölgenin, ilgilenilen yapıdaki oranının bilinmesidir. Örneklenen kısımdan elde edilen partikül sayısı, bu parçanın ana yapılarla oranları ile çarpılırsa toplam partikül sayısına ulaşılmış olur (54,57).

OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNE GÖRE HÜCRE SAYIMI

Parçalayıcı örnekleme stratejisine uygun kesit alma ve kesit örnekleme oranı (KeÖO)

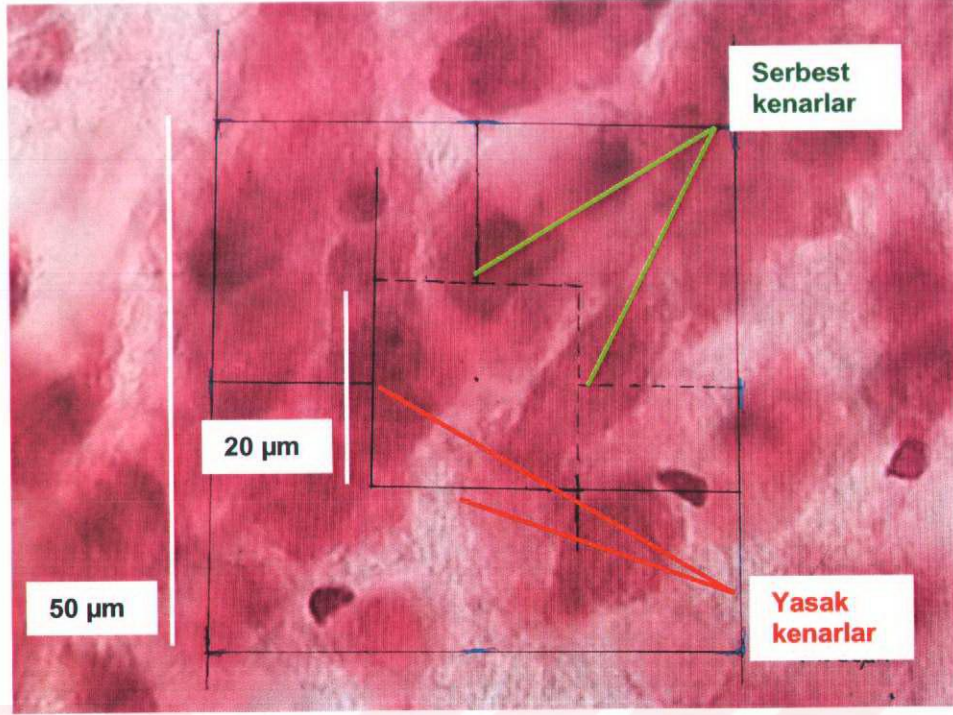
-50 °C’de hızlı dondurma işlemi ile doku fiksasyonu sağlandıktan sonra kesitlerin daha iyi alınması amacıyla kriyostat -15 °C’ye ayarlandı. Her sıçan beyninden, POA’na karşılık gelen bölgelerden 50 µm, hipokampus karşılık genel bölgelerden ise 100 µm kalınlığında ve sistematik rastgele örnekleme yöntemine uygun kesitler alındı. Bu işlem, alınan ilk kesitten sonra sırayla bir kesit alınıp bir kesit atılması şeklinde gerçekleştirildi. Kesit alma işlemine beyin dokusunun sonuna kadar devam edildi ve böylece her sıçan beyninden POA için 6-8 kesit, hipokampus için 18-20 kesit alınmış oldu. Boyanan kesitler içerisinde hipokampus ait olanlar ayrıldıktan sonra, her sıçan için ilk kesitten itibaren bir kesit atılıp bir kesitte sayım yapıldı. Böylece optik parçalama yöntemine göre toplam hücre sayısını hesaplamada gerekli parametrelerden biri olan, kesit örnekleme oranı belirlenmiş oldu (KeÖO=1/4) (53,54,56).

Alan örnekleme oranı (AÖO)

Toplam hücre sayısını hesaplamak için gerekli bir başka parametre AÖO’dur. Stereolojik çalışmalar yapılırken sistematik rastgele örnekleme göre seçilen kesitlerde, ilgilenilen bölgenin alanı mikroskopta belirli aralılarla x ve y ekseninde boyunca taranır. Böylece “x.y adımlama alanı” tanımlanmış olur. Hücre sayımı ise her adımlama alanının daha önceden belirlenen bir bölümünde, yani tarafsız sayım çerçevesi alanının x, y adımlama alanına oranlanması ile örnekleme oranı belirlenir (54).

Çalışmamızda monitör üzerinde x, y adımlama alanını belirlemek için Adıgüzel ve arkadaşlarının (58) Thoma lamı kalibrasyon yöntemiyle oluşturdukları, üzerinde tarafsız sayım çerçevesi de çizili olan asetat kullanılmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar mikroskopta bir Thoma lamının çizgileri arasında X100 büyütmede

belirlemişler (Thoma lamının çizgileri arasındaki mesafe 0.05 mm) ve görüntüyü, mikroskoba monte edilmiş video kamera ile bir monitöre aktarmışlardır. Böylece asetat üzerine çizilen, çizgiler arası 50 µm (0.05 mm) olan bir kare elde etmişlerdir. Bu kare şeklindeki lamın ortasına gerekli kalibrasyonu yaparak, kenarları 20 µm olacak şekilde tarafsız sayım çerçevesini çizmişlerdir. Çerçevenin birbirine dik sol ve alt kenarlarını yasak kenarlar, diğer iki kenarı ise serbest kenar olarak belirlemişlerdir (58). Çalışmamızda kullanılan tarafsız sayım çerçevesi ve ölçüleri Şekil 9'da gösterilmiştir. Tarafsız sayım çerçevesinin kenar uzunlukları eşit ve 20 µm olup, tarafsız sayım çerçevesinin alanı 400 µm²'dir. Çalışmamızda bu asetatın hazırlandığı mikroskop (Olympus CX31) ve mikroskoba monte edilmiş video kamera (Exwave HAD Color Video Camera SSc-DC88P) ile monitör (Sony LCD monitör LMD-2010) kullanılmıştır. Kesitler, mikroskoba yerleştirilip hipokampus bölgesi X4 büyütmede bulunduktan sonra mikroskop objektifi X100 (sayısal açıklık 1.25) büyütme getirilmiştir. Görüntü kalibrasyonu sağlandıktan sonra, mikroskoptaki kesit görüntüsünde x ekseninde 500 µm ve y ekseninde 50 µm aralılarla adımlama yapılmıştır. Böylece bu eksenlerdeki adımlama alanı Alan (x,y adımlama) = 500 µm X 50 µm = 25 000 µm² olarak hesaplanmıştır. Daha sonra tarafsız sayım çerçevesinin alanı x,y adımlama alanına oranlanarak, alan örnekleme oranı hesaplanmıştır. Buna göre AÖO = 400 µm² / 25 000 µm² = 4/250 olarak bulunmuştur.



Şekil 9: Çalışmada kullanılan tarafsız sayım çerçevesi ve ölçüleri

Kesit kalınlığının ölçümü

Çalışmamızda kesit kalınlığının ölçülmesi için Korkmaz ve Tümkaya tarafından (54) geliştirilen, mikrovida kalibrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile ışık mikroskopunda, mikroskobun mikrovidası döndürülerek kesit içinde optik düzlemler boyunca ilerlerken, ilk netleşen görüntü ile son netleşen görüntü arasında kalan mesafenin mikrovidadan okunması ile kesit kalınlığı ölçülebilmektedir. Çalışmamızda, z ekseninde mikrovidadaki 1 derecelik hareket 0,5 μm'ye karşılık gelmektedir. Mikroskobun mikrovidası döndürülerek kesit içerisinde optik olarak işaretlenmiş ve ilk netleşen görüntü ile en son gözlenen net görüntü arasında kalan mesafe yani kesit kalınlığı (t) belirlenmiştir. Tüm kesitlerin kesit kalınlıkları bu şekilde bulunarak ardından her sıçan için ortalama kesit kalınlığı (t_{ort}) hesaplanmıştır.

Kesit kalınlığının tespitinden sonra 5 μm üstten, 5 μm alttan olmak üzere 10 μm'lik bir güvenlik kuşağı bırakılmıştır. Kesit kalınlığından güvenlik kuşağı çıkartılarak, her kesit için disektör yüksekliği (h) belirlenmiştir. Tüm kesitlerin diseksiyon yükseklikleri bulunarak her sıçan için ortalama disektör yüksekliği (h_{ort}) hesaplanmıştır.

Kalınlık örnekleme oranı (KaÖO)

Kalınlık örnekleme oranı, her sıçan için ayrı ayrı ortalama disektör yüksekliği ortalama kesit kalınlığına (t_{ort}) bölünerek hesaplanmıştır ($KaÖO = h_{ort} / t_{ort}$).

Nükleus (hücre) sayımı

Çalışmamızda hipokampus CA1, CA2 ve CA3 stratum piramidale tabakasında bulunan hücrelerin nükleusları sayılmıştır. Her hücrenin tek nükleusu olduğu için, hesaplamalarda nükleus sayıları hücre sayısı olarak alındı. Piramidal tabakada, piramidal hücreler ile birlikte yaklaşık %1 gibi düşük bir oranda sepet hücreleri de bulunmaktadır. Sepet hücrelerin nükleusları, piramidal hücre tabakasındaki hücrelerin nükleuslarına benzer. Bu yüzden, toplam nöron sayısı, bu hücreleri de kapsayacak şekilde hesaplandı. Bu hücrelerin sayıma dahil edilmesi yapılan çalışmayı etkilememektedir (54).

Mikroskoba yerleştirilen kesitte hipokampus, mikroskop üzerinde X4 büyütmede belirlendikten sonra görüntü X100 büyütme getirilmiştir. Hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidal tabakası belirlenmiştir. “x” ve “y” ekseninde daha önce tanımlanan adımlamalara uygun şekilde, belirlenen kesit kalınlığı içerisinde, optik disektör sayım kurallarına göre sayım işlemine başlanmıştır. Optik disektör yüksekliği boyunca, yalnızca tarafsız sayım çerçevesinin içinde yer alan yapılar veya serbest kenarlarla kesişen nükleuslar sayılmıştır. Yasak kenarlarla veya bunların uzantıları ile kesişen nükleuslar ise sayım dışı bırakılmıştır. Güvenlik kuşağı içinde herhangi bir nükleus görüntüye girse bile sayıma dahil edilmemiştir. Her kesit için sayılan nöron sayısı (Q ; disektör partikül sayısı) kaydedilmiştir. Bunların toplanması ile her sıçan için sayılan nöron sayısı (ΣQ ; toplam disektör partikül sayısı) bulunmuştur.

Toplam nöron sayısı

Tüm bu işlemlerden sonra elde edilen parametreler aşağıdaki formüle uygun olarak yerleştirilmiştir. Her sıçan için hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale bölgesindeki toplam nöron sayıları hesaplanmıştır.

$$N(\text{toplam}) = (\Sigma Q) \times (1/ KeÖO) \times (1/ AÖO) \times (1/ KaÖO) \quad (54)$$

Hata katsayısı

Örnekleme planının yeterliliği her sıçana ait hata katsayısı hesaplanarak kontrol edilmektedir. Hata katsayısı hesaplanırken, her bir sıçan için sayılan kesit sayıları ve bir kesit için sayılan disektör partikül sayıları (Q) kullanıldı (14). Hata katsayısının %10'un altında çıkması çalışmanın örnekleme planının yeterli ve çalışmanın güvenilir olduğunun bir göstergesidir.

POA'daki ASTROSİT MORFOLOJİSİ

Sistemik rastgele örnekleme stratejisine göre, POA'na karşılık gelen beyin alanlarından (Paxinos, interaural 9.600mm-interaural 7.8mm, figüre 28-43) alınan kesitler GFAP boyası ile boyandıktan sonra, ışık mikroskobu ile X100 büyütmede incelendi. Tüm gruplarda her bir sıçandan elde edilen 5 kesitteki sol POA sınırları belirlendi. Her kesitte 4 tane olmak üzere bir sıçan için toplam 20 tane astrosit görüntüsü mikroskoba monte edilmiş video kamera aracılığı ile kayıt edildi. Sol POA'da astrositlerin boyanmadığı kesitlerde sağ POA sınırları belirlenip buradaki astrositler değerlendirmeye alındı. Elde edilen astrositlerde soma büyüklüğü, primer dallanma sayısı, sekonder dallanma sayısı, primer dallanma ortalama uzunlukları, sekonder dallanma ortalama uzunlukları karşılaştırıldı.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistik analiz için "SPSS for Windows" istatistik programının 10.0 versiyonu kullanılmıştır. Grupların ortalama toplam nöron sayıları arasındaki farklılık "Mann-Whitney U" testi ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR

ÇALIŞMADA KULLANILAN SIÇANLARIN ÖZELLİKLERİ

Gebeliklerinin 16. gününden sonra TP verilen annelerin ortalama vücut ağırlığı 290 gram ve susam yağı verilen annelerin vücut ağırlıkları 284 gram olarak saptandı ve ilaç uygulamaları sırasında sıçanların vücut ağırlıkları arasında bir fark saptanmadı. (Tablo II).

Tablo II: Gebeliklerinin 16. gününden sonra TP ve susam yağı verilen annelerin vücut ağırlıkları

Uygulanan ilaç	Ortalama vücut ağırlığı (Gram)	Sayı (n)
TP	290 ± 12	6
Susam Yağı	284 ± 11	6

Vücut ağırlıkları ± standart deviasyon olarak verildi.

Deney grupları oluşturulurken prenatal dönemde annelerine TP ve susam yağı verilen sıçanların vücut ağırlıkları ortalaması sırası ile 7.8 gr ve 8.2 gr olarak saptandı (Tablo III). Başlangıçta her grupta 6 tane sıçan bulunurken takipte iki grupta birer sıçanın ölmesi, bir tanesinde perfüzyon sırasında yeterli fiksasyon sağlanamaması, diğer iki tanesinde ise kesit alma işlemi sırasında beyin dokusunun parçalanması nedeni ile verilerin değerlendirme aşamasında her gruptan toplam 5 sıçan değerlendirilebildi.

Tablo III: Postnatal dönemde TP ve susam yağı uygulanan sıçanların özellikleri

Uygulanan ilaç	Ortalama vücut ağırlığı (Gram)	Sayı (n)
TP	7.8 ± 0.2	12
Susam yağı	8.2 ± 0.8	16

Vücut ağırlıkları ± standart deviasyon olarak verildi.

Ortalama 120. günde çalışma sonlandırıldığında grupların ortalama vücut ağırlıkları Tablo IV 'te gösterilmiştir.

Tablo IV: Çalışma sonlandırıldığında deney gruplarının ortalama vücut ağırlıkları

Çalışma grupları	Ortalama vücut ağırlığı (Gram)	Sayı (n)
TT	196 ± 1.2	5
TO	182 ± 1.8	5
OT	198 ± 3.0	5
OOD	172 ± 2.1	5
OOE	202 ± 2.2	5

Vücut ağırlıkları ± standart deviasyon olarak verildi.

HİPOKAMPUS PİRAMİDAL HÜCRE TABAKASI HÜCRE SAYIM SONUÇLARI

TT grubu erişkin sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları ve elde edilen kesitlerde sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısının hesaplanmasında kullanılan parametreler Tablo V'te gösterilmiştir. Beş erişkin sıçanın değerlendirildiği grupta sıçanlardaki toplam nöron sayısı en yüksek 245 935, en düşük 125 145 olarak sayıldı.

Tablo V: TT grubu sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

PARAMETRELER	SIÇANLAR				
	1	2	3	4	5
Vücut ağırlığı	186.8	197.2	197.0	191.8	194.2
Q^-	412	510	522	811	780
1/KaÖÖ	1,21	1,19	1,25	1,21	1,19
t_{ort}	56,30	61,70	62,35	59,63	60,32
h_{ort}	46,30	51,70	52,35	49,63	50,32
HK	0,020	0,010	0,015	0,023	0,013
1/AÖÖ	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5

n 125 145 151 980 164 299 245 935 232 635
Vücut ağırlığı: Gram, Disektör sayısı: Q^- , Ortalama kesit kalınlığı: t_{ort} (μm), 1/Kalınlık örnekleme oranı: 1/KaÖÖ, Disektör yüksekliği: h_{ort} (μm), Hata katsayısı: HK, 1/Alan örnekleme oranı: 1/AÖÖ, n: Toplam nöron sayısı.

TO grubu erişkin sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısının hesaplanmasında kullanılan parametreler Tablo VI'de gösterilmiştir. Beş erişkin sıçanın değerlendirildiği TO grubunda, sıçanlardaki toplam nöron sayısı en yüksek 206 615, en düşük 162 838 olarak sayıldı.

Tablo VI: TO grubu sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

PARAMETRELER	SIÇANLAR				
	1	2	3	4	5
Vücut ağırlığı	183.8	180.2	189.6	179.3	183.0
Q ⁻	635	687	485	570	540
1/KaÖÖ	1,188	1,203	1,343	1,204	1,216
t _{ort}	63,03	59,16	29,8	59,10	58,88
h _{ort}	53,03	48,16	19,8	49,10	48,88
HK	0,0184	0,0121	0,027	0,0097	0,0111
1/AÖÖ	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
n	188 595	206 615	162 838	171 570	164 160

Vücut ağırlığı: Gram, Disektör sayısı: Q⁻, Ortalama kesit kalınlığı: t_{ort} (µm), 1/Kalınlık örnekleme oranı: 1/KaÖÖ, Disektör yüksekliği: h_{ort} (µm), Hata katsayısı: HK, 1/Alan örnekleme oranı: 1/AÖÖ, n: Toplam nöron sayısı.

OT grubu erişkin sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısının hesaplanmasında kullanılan parametreler Tablo VII’de gösterilmiştir. Beş erişkin sıçanın değerlendirildiği TO grubunda, sıçanlardaki toplam nöron sayısı en yüksek 194 628, en düşük 139 293 olarak sayıldı.

Tablo VII: OT grubu sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

PARAMETRELER	SIÇANLAR				
	1	2	3	4	5
Vücut ağırlığı	198.1	182.8	179.4	174.4	180.1
Q ⁻	469	562	512	544	662
1/KaÖÖ	1,188	1,224	1,211	1,115	1,176
t _{ort}	57,42	54,88	59,78	62,60	61,53
h _{ort}	47,42	44,88	49,78	52,60	51,53
HK	0,0145	0,0173	0,015	0,06	0,0113
1/AÖÖ	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
n	139 293	171 972	164 456	154 566	194 628

Vücut ağırlığı: Gram, Disektör sayısı: Q⁻, Ortalama kesit kalınlığı: t_{ort} (µm), 1/Kalınlık örnekleme oranı: 1/KaÖÖ, Disektör yüksekliği: h_{ort} (µm), Hata katsayısı: HK, 1/Alan örnekleme oranı: 1/AÖÖ, n: Toplam nöron sayısı.

OOD grubu erişkin sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısının hesaplanmasında kullanılan parametreler Tablo VIII'de gösterilmiştir. Beş erişkin sıçanın değerlendirildiği OOD grubunda, sıçanlardaki toplam nöron sayısı en yüksek 166 702, en düşük 137 042 olarak sayıldı.

Tablo VIII: OOD grubu sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

PARAMETRELER	SIÇANLAR				
	1	2	3	4	5
Vücut ağırlığı	170.2	183.2	176.4	177.0	180.1
Q^-	462	477	558	489	500
1/KaÖÖ	1,001	1,195	1,192	1,121	1,1905
t_{ort}	60,56	61,21	61,21	59,76	58,28
h_{ort}	50,56	51,21	51,21	49,76	48,28
HK	0.0159	0.0155	0,0108	0,0128	0,0104
1/AÖÖ	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
n	139 177	142 503	166 702	137 042	148 812

Vücut ağırlığı: Gram, Disektör sayısı: Q^- , Ortalama kesit kalınlığı: t_{ort} (μm), 1/Kalınlık örnekleme oranı: 1/KaÖÖ, Disektör yüksekliği: h_{ort} (μm), Hata katsayısı: HK, 1/Alan örnekleme oranı: 1/AÖÖ, n: Toplam nöron sayısı.

OOE grubu erişkin sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısının hesaplanmasında kullanılan parametreler Tablo IX'da gösterilmiştir. Beş erişkin sıçanın değerlendirildiği OOE grubunda, sıçanlardaki toplam nöron sayısı en yüksek 194 176, en düşük 166 420 olarak sayıldı.

Tablo IX: OOE grubu sıçanların 120 günlük iken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

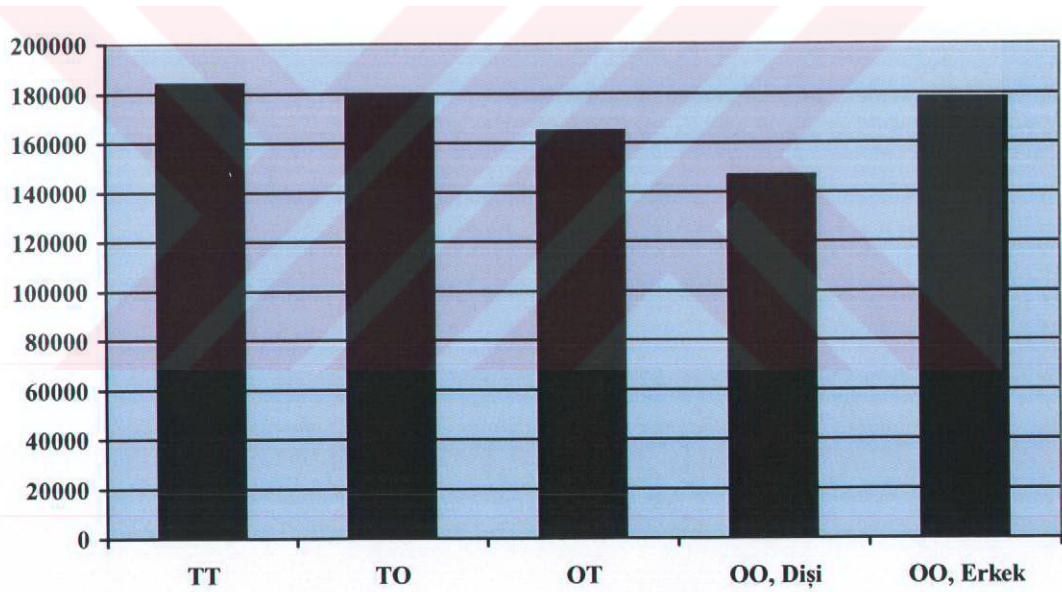
PARAMETRELER	SIÇANLAR				
	1	2	3	4	5
Vücut ağırlığı	204.2	200.1	189.8	197.8	194.3
Q ⁻	656	582	530	599	583
1/KaÖO	1,184	1,212	1,256	1,199	1,119
t _{ort}	64,24	56,96	58,93	60,88	62,22
h _{ort}	54,24	46,96	48,93	50,88	52,22
HK	0,0228	0,0256	0,0261	0,0144	0,0068
1/AÖO	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
n	194 176	176 346	166 420	179 550	173 442

Vücut ağırlığı: Gram, Disektör sayısı: Q⁻, Ortalama kesit kalınlığı: t_{ort} (µm), 1/Kalınlık örnekleme oranı: 1/KaÖO, Disektör yüksekliği: h_{ort} (µm), Hata katsayısı: HK, 1/Alan örnekleme oranı: 1/AÖO, n: Toplam nöron sayısı.

GRUPLARIN SOL HİPOKAMPUS CA1, CA2, CA3 STRATUM PİRAMİDALE ALANLARINDAKİ TOPLAM NÖRON SAYISI ORTALAMALARI

TT grubunda toplam nöron sayısı ortalaması $183\ 999 \pm 52\ 627$, TO grubunda toplam nöron sayısı ortalaması $178\ 755 \pm 18\ 647$, OT grubunda toplam nöron sayısı ortalaması $164\ 983 \pm 20\ 593$, OOD grubunda toplam nöron sayısı ortalaması $146\ 847 \pm 11\ 957$, OOE grubunda toplam nöron sayısı ortalaması ise $177\ 986 \pm 10\ 267$ olarak saptandı.

OOD grubunun toplam nöron sayısı ortalaması, OOE grubunun toplam nöron sayısına ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulundu ($p=0,016$).



Şekil 10: Çalışma gruplarının sol hipokampus ortalama nöron sayıları

Tablo X: Grupların sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanları toplam nöron sayısı ortalamaları

Gruplar	Ortalama Toplam Nöron Sayıları
TT	183 999 ± 52 627
TO	178 755 ± 18 647
OT	164 983 ± 20 593
OOD	146 847 ± 11 957
OOE	177 986 ± 10 267

Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak verildi.

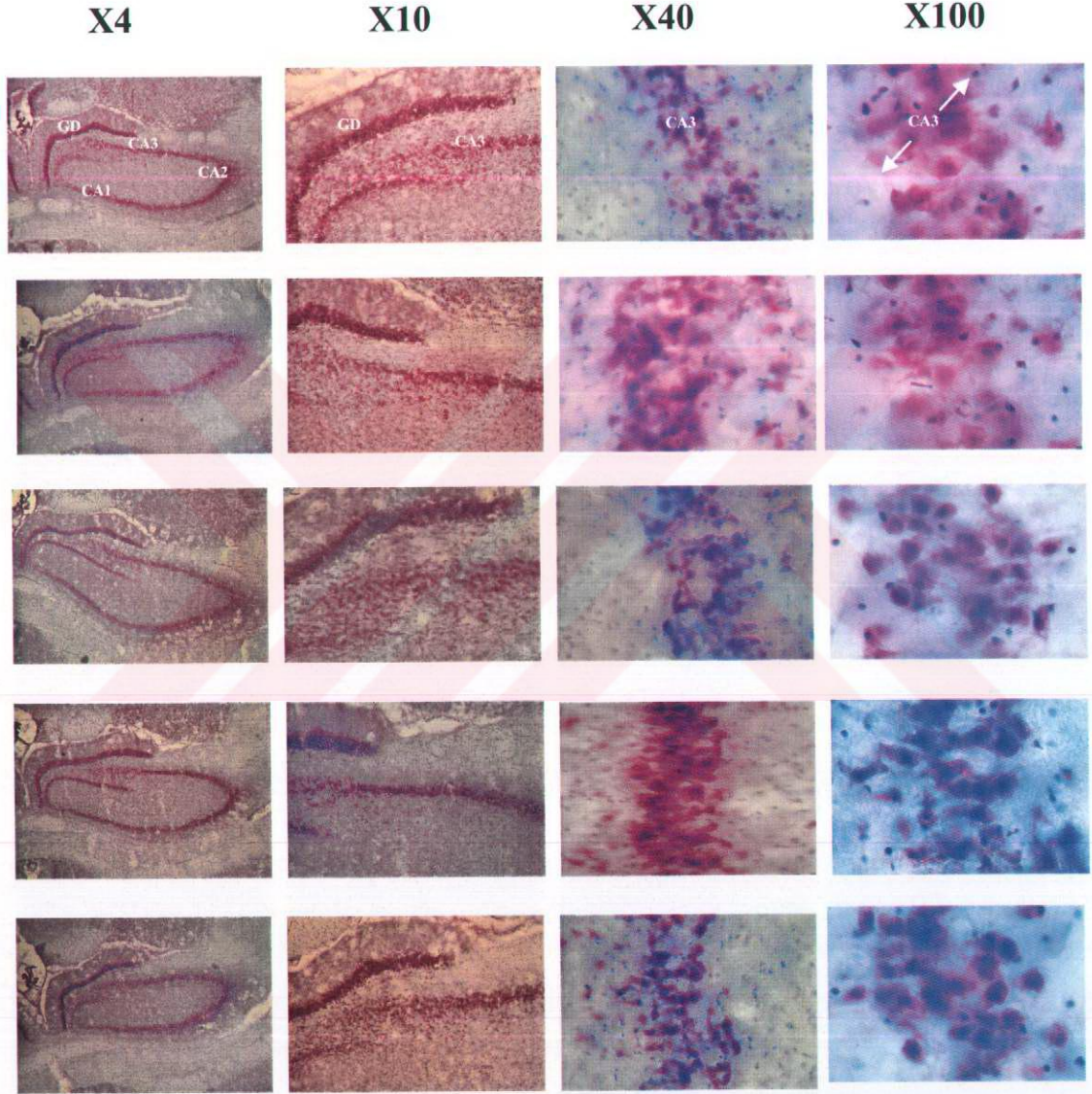
Tablo XI: İkili karşılaştırmada kullanılan grupların istatistiksel p değerleri

İkili Karşılaştırılan Gruplar	p değerleri
TT / OT	1,00
TT / TO	1,00
TT / OOD	0,03*
TT / OOE	0,69
OOE / OOD	0,016*

* Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi (Karşılaştırmada "Mann-Whitney U" testi kullanıldı).

GRUPLARIN HİPOKAMPUSLARINDAKİ PATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Mikroskopun X4 büyütmesinde ve daha büyük büyütmelerde tüm çalışma gruplarının, sol hipokampus CA1, CA2, CA3 piramidal hücre tabakası (Şekil 11).



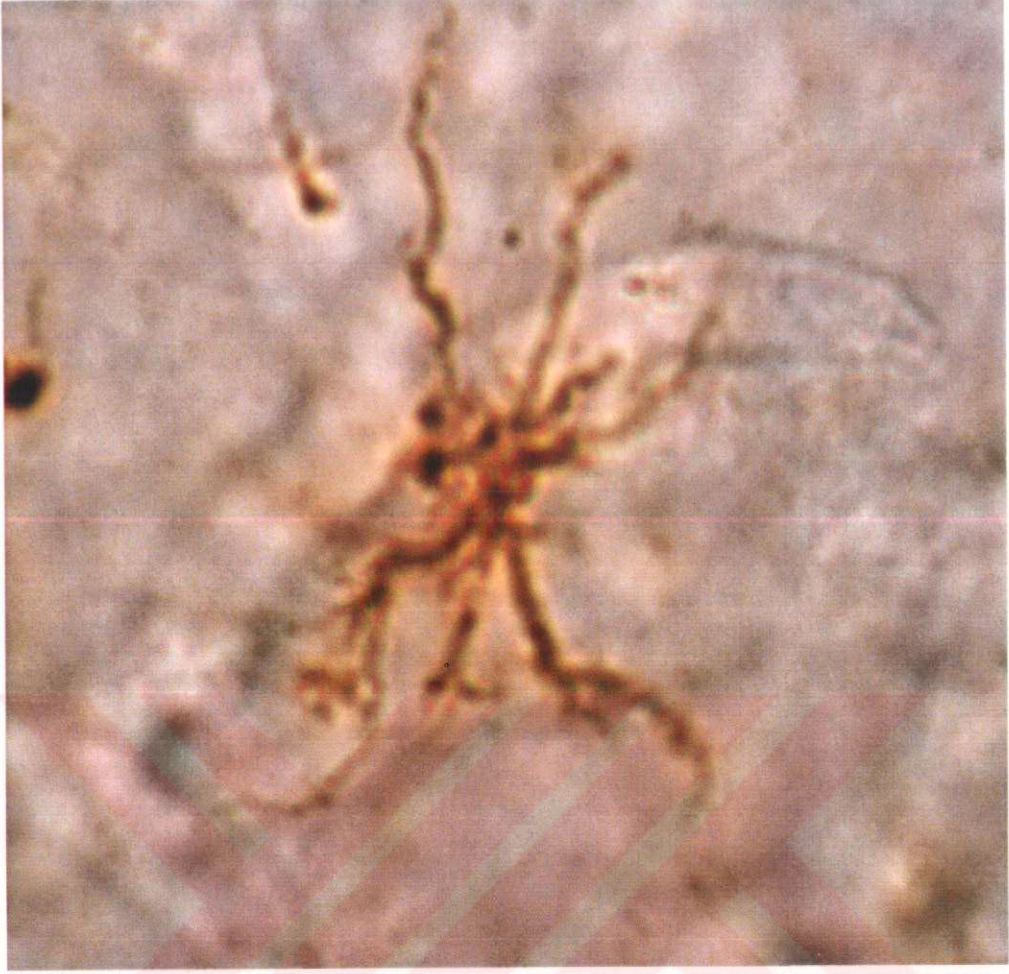
Şekil 11: Gruplardan birer sıçana ait farklı büyütmelelerdeki hipokampus görünüşleri. Kesitler krezil viole boyası ile boyanmıştır. Yukarıdan aşağıya sıra ile TT, TO, OT, OOD, OOE grupları. (GD: Gyrus dentatus, CA1, CA2, CA3: Hipokampusa ait stratum pyramidale'nin alt tabakaları)

GRUPLARIN POA'daki ASTROSİT MORFOLOJİSİ

GFAP boyası ile prenatal ve postnatal dönemde TP alan grupta ve sadece postnatal dönemde TP alan grupta iki, erkek kontrol grubunda ise bir kesitte boyanma sağlanabildi. Prenatal ve postnatal TP alan grupta astrosit primer ve sekonder dallanma sayısı sadece postnatal dönemde TP alan ve hiç TP almayan erkek grubuna göre daha fazla idi. Bu gruplardaki diğer sıçanlarda ve diğer üç grupta POA'da astrositlerde boyanma elde edilemediği için istatistiksel değerlendirme yapılamadı.



Şekil 12: TT grubunda preoptik alanda glial fibriler asidik protein boyası ile astrosit morfolojisi



Şekil 13: OOE grubunda preoptik alanda glial fibriler asidik protein boyası ile astrosit morfolojisi

TARTIŞMA

Memelilerde cinsel farklılaşma, gestasyonun kritik dönemi boyunca fetüsün hormonların etkisi altında kalması ile gerçekleşmektedir. Bu durum, birbirini izleyen bir dizi olaylar sonucunda meydana gelmektedir. Bu olaylar; fertilizasyon sırasında kromozomal ve genetik yapının belirlenmesi, genetik yapıya bağlı olarak bu döneme kadar bipotansiyel olan gonadlardan over ya da testislerin gelişmesi ile gonadal yapının belirlenmesi ve oluşan bu gonadal farklılaşmaya bağlı olarak iç ve dış genital yapıların cinse özgü özellikler kazanması ve böylece fenotipin belirlenmesini içermektedir. Bahsedilen bu basamaklarda androjenler önemli rol oynamaktadır. Bipotansiyel gonadlarda Wolf yapılarının devam etmesi testosteron ve dihidrotestosteron varlığına bağlıdır. Bu farklılaşma sürecinde testisler gelişmezse ve ortamda androjenler bulunmaz ise overler gelişir ve dişi fenotip kazanılır (43).

Cinsel farklılaşma sırasında genetik ve gonadal yapı dişi yönde farklılaştığı halde, ortamda bulunan androjenler dişi yapılarda bulunan androjen reseptörleri yolu ile etki oluşturmaktadır. Bu dönemde androjenlere maruz kalan dişi fetüste kuşkulu genital yapı ortaya çıkmaktadır (43).

Cinsel farklılaşma hayatın diğer dönemlerinde psikoseksüel farklılaşma ile devam etmektedir. Psikoseksüel farklılaşma dört sınıfa ayrılabilir. Bunlar; cinsel kimlik ya da kişinin kendisini kadın ya da erkek olarak tanımlaması, cinsel rol, cinsel yönelim yani eş seçimi, bilişsel farklılıklar olarak sıralanmaktadır. Bu süreçlerin herbirisine androjenler çeşitli derecelerde etki etmektedir. Prenatal ve erken postnatal dönemde testosteronun beyin belirli bölgelerine olan etkisi bu farklılaşmanın temelini oluşturmaktadır (43).

Gelişim süreci boyunca gonadal hormonların etkileri sonucu beyinde cinsel farklılaşma olmakta, bu etkilenme ile cinsel yönelim ortaya çıkmaktadır. Gonadal hormonlarının tetiklediği beyindeki bu cinsel farklılaşmanın mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, bu etkilenmenin üç kritik dönem boyunca olduğu düşünülmektedir. Bu dönem, genital organların şekillendiği erken gestasyonel dönem, perinatal dönem ve puberte dönemlerini kapsamaktadır (58). Çalışmamızda

prenatal ve erken postnatal dönemi kapsayan perinatal dönem süresince uygulanan andojenlerin hipokampus piramidal hücre sayısına etkisi ve POA'daki astrosit morfolojisi üzerine olan etkisi değerlendirildi.

Memeliler, hayatın erken dönemlerinde testiküler hormonlara maruz kalmadıkları sürece dişi üreme fonksiyonları ve davranışı gösterme eğilimindedirler (59). Bu durum beynin cinsel farklılaşmasında “organizasyon-aktivasyon hipotezi” temelinde olur. Bu görüşe göre esas olan beynin gelişim sürecinde iki kritik dönem boyunca gonadal hormonlara maruz kalmasıdır. Beynin perinatal dönem boyunca göreceli olarak kısa bir süreliğine gonadal hormonların etkisinde kalması ile “organizasyon” etkisi ortaya çıkar. Bu etki ile beyinde morfolojik, fonksiyonel ve davranışsal değişiklikler oluşur. Meydana gelen bu değişiklikler, uzun dönem boyunca devam etmektedir. Gelişim süreci içerisinde devam eden hormonal maruziyet sonucunda ise “aktivasyon” etkisi ortaya çıkar ki bu dönemde beyinde bahsedilen morfolojik, fonksiyonel ve davranışsal değişiklikler daha kısa sürelidir ve geri dönüşümlü değişikliklerdir (2, 59).

Sıçanlarda, erkek cinsiyette testiküler testosteron üretim süreci prenatal 18. günden doğuma kadar devam eder ve bu dönem over kaynaklı hormonların sessiz kaldığı bir dönemdir. Bu süreçte salgılanan testosteronun beyinde androjen reseptörlerini etkilemesi sonucu cinsel farklılaşmanın bazı komponentlerinin ortaya çıktığı düşünülmektedir (3). Ancak bu farklılaşmada testosteronun tek başına etkisini ayırt etmek güçtür. Beyinde cinsiyet bakımından dimorfik olan birçok bölgede bulunan aromataz enzimi ile testosteron östrojene dönüştürülmekte ve meydana gelen östrojenin bu nükleuslarda iki cins arasındaki völüm değişikliklerinin ortaya çıkmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (3, 59-65).

Gonadal hormonların tetiklediği beynin farklılaşma süreci içinde hipokampal yapılar etkilenen bölgelerden bir tanesidir. Androjenlerin hipokampus üzerinde güçlü nöroprotektif ve homeostatik etkilerinin olduğu bilinmektedir ve yapılan deneysel çalışmalarda hipokampusun dimorfik olduğu saptanmıştır (3). Literatürde hipokampal yapıların erkek sıçanlarda maskülinizan yapıda olduğu, bir anti androjen olan flutaminin erkek sıçanlara uygulanması ile erkek sıçanlardaki maskülinizan

paternin engellendiği gösterilmiştir (3,66,67). Isgor ve arkadaşları (3) tarafından yapılan bir çalışmada, prenatal dönemde andojen uygulaması ile hipokampus CA1 ve CA3 piramidal hücre tabakasının volümünün ve bu bölgedeki hücre gövdelerinin büyüklüğünün arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada herhangi bir hormonal tedavi verilmeyen erkek ve dişi sıçanlarda CA1 ve CA3 bölgelerinde piramidal hücre total nöron sayısının benzer olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda herhangi bir hormonal tedavi verilmeyen dişi ve erkek kontrol grupları karşılaştırıldığında erkek cinsiyette hipokampal total nöron sayısının dişi kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görüldü ($p=0.016$).

Hipokampus, erkeklerde androjen reseptörü açısından oldukça zengin bir bölgedir ve beynin bu bölgesi testosteron için hedef organ durumundadır. Özellikle hipokampus CA1 bölgesindeki piramidal nöronlar androjen reseptörlerinin bulunduğu primer bölgedir. Bu bölge aynı zamanda testosterondan östradiole dönüşümü sağlayan aromataz enzimini de düşük düzeyde içermektedir. Morfolojik çalışmalar hipokampusun bu yapılarının, testosteron ve östrojenin ortak etkisi sonucu şekillendiğini göstermektedir (68-69). Farelerde testosteronun hipokampus volümü üzerine pozitif etkisi gösterilmiştir (66,67). MacLusky ve arkadaşları (70), androjenlerin hipokampus CA1 bölgesindeki sinaps sayısı üzerinde etkili olduğunu, kastrasyon ile sinaps sayısının azaltılabileceği ve testosteron tedavisi ile de sinaps sayısının arttırılabileceğini bildirmişlerdir. Isgor ve arkadaşları (3) ise dişi sıçanlara prenatal dönemde uygulanan testosteron ve östradiol benzoatın, hipokampal CA1 bölgesinde volüm açısından maskülinizan patern oluşturduğunu göstermişlerdir. Aynı etkiyi dihidrotestosteron ile elde edemeyen araştırmacılar, bu durumun aromatzasyon etkisinden dolayı olabileceğini savunmuşlardır. Aynı çalışmada testosteron, östradiol ve dihidrotestosteronun total hücre sayısını değiştirmediği saptanmıştır. Çalışmamızda da prenatal dönemde dişi sıçanlara uyguladığımız testosteronun hipokampus CA1, CA2, CA3 bölgelerinde piramidal tabakadaki toplam nöron sayısını arttırdığını gördük, ancak literatür ile paralel şekilde dişi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hücre sayısında anlamlı artış olmamasına karşın daha önceki çalışmalarda piramidal tabaka volümünün testosteron uygulaması ile artmış olması metod ile ilişkili olabilir. Hücre sayımı yapılırken sadece soma görülebilmekte ve hücrenin sadece soma kısmı

sayılabilmektedir. Oysaki aynı alan volüm açısından değerlendirildiğinde soma dışında kalan diğer yapılar da sonuca katkıda bulunabilmektedir.

Prenatal dönemde olduğu gibi postnatal dönemde de beyin gonadal hormonların etkisi altındadır. Sıçanlarda doğumdan sonraki ilk 10 gün bu süreçteki en kritik dönemdir (70). Bu dönemde, erkek cinsiyetin kastre edilmesi durumunda etkinin kaybolduğu, dişi cinse testosteronun uygulaması ile de hipokampal yapılar üzerinde maskülinizan etki olduğu bilinmektedir (71). Bu hormonal değişiklikler sonucu hipokampus morfolojisinde meydana gelen değişikliklerin, hipokampus fonksiyonlarına da yansıdığı, morfolojik değişiklikler ile davranış modellerinde elde edilen sonuçların korele olduğu görülmüştür (71). Çalışmamızda, prenatal dönemde dişi sıçanlara testosteron uygulaması ile hipokampal hücre sayısının dişi kontrol grubuna göre arttığı, sadece prenatal androjen uygulamasının ya da sadece postnatal androjen uygulamasının piramidal tabaka hücre sayısını bir miktar arttırdığı görüldü. Tek başına prenatal androjenin yine tek başına uygulanan postnatal androjenden daha etkili olduğu saptandı. Ancak ikili karşılaştırmalarda bu gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Hem prenatal hem postnatal dönemde androjen uygulaması ile tek başına prenatal ya da tek başına postnatal androjen uygulamasının piramidal hücre tabakasındaki total hücre sayısı üzerindeki artıştan daha anlamlı olduğu görüldü.

Dişi cinsiyette östrojen, hipokampusta sinaps yoğunluğunu belirlemede potent bir düzenleyici olarak görev alır (72). Sıçanlarda overlerin çıkarılması hipokampusun CA1 bölgesindeki sinaps sayısını %20-%30 oranında azaltmaktadır ve overiektomi yapılmış sıçanlara 72 saat süresince uygulanan östrojen ile bu etki geri döndürülebilmektedir. Postnatal dönemde uygulanan östrojen ile hipokampusun üzerinde oluşturulabilen bu etkiler benzer şekilde prenatal östrojen uygulaması ile de deneysel olarak oluşturulabilmektedir. Prenatal dönemde uygulanan östrojen ile CA1 bölgesinde piramidal hücre tabakası volümü ve bu bölgedeki hücre gövdelerinin büyüklüğünün arttığı gösterilmiştir (3).

Sıçanlara östrojenin prenatal dönemde uygulanması ile hipokampusta elde edilen morfolojik değişiklikler aynı dönemde testosteron uygulaması ile de elde edilebilmektedir. Östrojen ve testosteronun beyin üzerinde oluşturduğu bu etkinin

her iki cinste benzer ya da farklı mekanizmalar ile meydana geldiği konusu tartışmalıdır. Erkek cinsiyette testosteronun androjen reseptörleri yolu ile bu etkiyi oluşturduğu, dişilerde ise östrojenin östrojen reseptörü aracılığı ile bu etkileri oluşturduğu düşünülebilir. Ancak testosteron ile elde edilen etkilerin, dihidrotestosteron ile elde edilememesi, testosteronun aromatzasyon yolu ile östrojene dönüşerek etkide bulunduğunu düşündürmektedir. Beyinde cinsiyet bakımından dimorfik olan birçok bölgede yeteri miktarda aromataz enzimi bulunmaktadır. Aromataz enzimi testosteronun östradiole dönüşümünde görev almaktadır ve ortaya çıkan östradiolün, östrojen reseptörlerine yüksek düzeyde affinitesi vardır. Erkek gonadlarda salgılanan testosterondan, cinsiyet açısından dimorfik olan bu bölgelerde lokal olarak aromataz enzimi ile oluşan östradiol, beynin bu nükleuslarında iki cins arasındaki volüm değişikliklerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (3, 59-65). Çalışmamızda erkek kontrol grubu dışındaki tüm gruplar dişi sıçanlardan oluşmakta idi ve hormon tedavisi verilen tüm gruplarda testosteron propiyonat kullanıldı. Bu dişi sıçanlarda testosteronun hipokampus üzerinde oluşturduğu etkinin, beyinde testosteronun aromatzasyon yolu ile östrojene dönüşerek yapması muhtemeldir. Aynı çalışma gruplarında testosteron yerine dihidrotestosteron kullanılsaydı sonuçlar farklı olabilirdi. Çünkü daha önce yapılan çalışmalarda dihidrotestosteronun CA1 üzerine etkisiz bulunduğu CA3 üzerinde ise etkili bulunduğu gösterilmişti; bunun nedeni ise tek başına hipokampusun farklı bölgelerinde reseptör yoğunluğunun farklı olması ile açıklanamamıştır (3). Hipokampusun bu iki bölgesi arasındaki farklılığın nedeni aromatzasyon bir androjen olan dihidrotestosteronun östrojene dönüştürülemediği ile açıklanabilir.

Hipokampusun öğrenme ve bellek gibi birçok fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Her iki cinste morfolojik olarak farklılıklar gösteren bu bölgenin fonksiyon olarak da dimorfik olduğu bilinmektedir. Deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan davranış çalışmalarında hiç bir hormonal tedavi verilmeyen erkek ve dişi gruplar karşılaştırıldığında her iki cinste test performanslarının farklı olduğu görülmüştür (3,67). Gerek prenatal gerekse de postnatal dönemde uygulanan androjenlerin hipokampusun değişik bölgeleri üzerine mazkulinize edici etkisi bilindiğine göre oluşan morfolojik farklılıklar davranışlara ne ölçüde yansımaktadır. Androjen uygulaması ile hipokampus CA1 bölgesinde oluşturulan volüm değişikliği

ile yapılan davranış testlerinde de aynı gruplarda maskülinizan patern saptanmıştır (3, 58). Bizim çalışmamızda prenatal ve postnatal testosteronun hipokampus total hücre sayısını etkilediği saptandı ancak bu değişikliklerin hipokampal fonksiyonlarla ilişkisi değerlendirilmedi.

Gelişim süreci içerisinde beynin gonadal hormonların etkisinde kalan ve dimorfik yapılanma gösteren bir diğer kısmı da POA'dır. Temel olarak cinse özgü davranış ile ilişkilidir (1,5). Yetişkin sıçanlarda POA'daki seksüel dimorfik nükleus (SDN) erkek cinsiyette kadına göre daha büyüktür. Testosteron düzeyi ve SDN büyüklüğü ile cinse özgü davranışlar korelidir (72). Perinatal dönemde uygulanan steroidlerin bu bölgedeki nöronal morfoloji ve yoğunlukta önemli olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (43,44). Nöronal iletişimde önemli bir role sahip olan astrositler bu konudaki çalışmaların merkezindedir. Amateau ve arkadaşları (2) yenidoğan döneminde yavru sıçanlarda postnatal 1. günde erkek cinsiyette POA'daki astrositlerin primer dallanmalarının sayısının ve uzunluğunun dişi sıçanlardan daha fazla olduğunu ve bu farklılığın postnatal 3. günde de devam ettiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada erken postnatal dönemde yavru sıçanlara uygulanan testosteron ve oestradiol ile astrosit morfolojisinin değiştiği, ancak dihidrotestosteron uygulamasının etkisiz olduğu saptanmıştır. Biz çalışmamızda, postnatal dönemde uygulanan androjenler ile POA'da astrosit morfolojisinde meydana gelen değişikliklerin prenatal androjen uygulaması ile de meydana gelip gelmediği ve oluşabilecek bu değişikliklerin erişkin dönemde de devam edip etmediği sorularına yanıt bulmayı amaçlamıştık. Ancak tüm kesitlerde GFAP ile boyanma elde edilemediği için bu sorulara cevap alınamadı. Boyanmanın sağlandığı kesitlerde gözlemsel olarak astrositlerin dallanma sayısının prenatal ve postnatal testosteron alan grupta tedavi almayan erkek kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görüldü.

SONUÇLAR

Erkek cinsiyetteki sıçanlarda, dişi cinsiyetteki sıçanlara göre hipokampus piramidal hücre tabakasındaki total hücre sayısının daha fazla olduğu görüldü.

Prenatal ve erken postnatal dönemde androjen uygulaması ile erişkin dönemde hipokampus piramidal tabakadaki hücre sayısının değiştiği görüldü.

Prenatal dönemde testosteron propiyonat uygulamasının hipokampus piramidal tabaka hücre sayısı üzerindeki etkisi, postnatal dönemde testosteron propiyonat uygulamasından daha etkili olduğu görüldü.

Hipokampus piramidal hücre tabakasındaki hücre sayısı üzerinde en belirgin değişimin, hem prenatal hem de postnatal dönemde androjen uygulaması ile elde edildiği görüldü.

Glaial fibriler asidik protein immünohistokimyasal boyaması ile preoptik alanda tüm astrositlerin boyanmadığı görüldü.

Androjen uygulaması ile hipokampal hücre sayısında oluşturulan değişikliklerin hipokampal morfoloji ile korele olup olmadığının davranış çalışmaları ile birlikte değerlendirilmesine ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

ÖZET

Sıçanlarda prenatal ve erken postnatal dönemde verilen androjenlerin erişkin dönemde beyinde hipokampal hücre sayısı ve preoptik alan morfolojisi üzerine etkisi

Dr. Maşallah CANDEMİR

Hipokampusun, öğrenme ve hafıza ile ilgili fonksiyonlarda rol aldığı ve hipokampal morfolojide cinsiyet farklılığının etkili olduğu bilinmektedir. Ancak mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Gelişimsel olarak gonadal steroidlere duyarlı olan bu bölgenin histolojik yapısının, özellikle prenatal dönemde uygulanan androjenler ile farklılaştırılabildiği ve buna paralel olarak erişkin dönemde hipokampal fonksiyonlarda değişimler izlendiği görülmüştür.

Preoptik alan (POA), erkekte ve kadında cinse özgü davranış ile ilişkilidir ve morfolojik olarak her iki cinste farklıdır. Çalışmalar, bu bölgedeki nöronların karakteristiği ve astrosit morfolojisi üzerine yoğunlaşmıştır. Prenatal dönemde verilen androjenlerin POA büyüklüğünü arttırdığı ve erkek cinse ait davranışa neden olduğu bilinmektedir. Önceki çalışmalarda yenidoğan sıçanlara testosteron uygulaması ile POA'daki astrosit morfolojisinin değiştiği gözlenmiştir. Ancak bu değişikliğin erişkin dönemde de devam ettiği konusunda bilgi yoktur.

Bu çalışmada, sıçanlarda prenatal ve postnatal dönemde uygulanan testosteron propionatın (TP) erişkin dönem hipokampus piramidal hücre sayısı ve POA'da astrosit morfolojisi üzerindeki etkisi araştırıldı.

Çalışmada, Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Sadece gebelik döneminde annelerine TP uygulanarak oluşturulan prenatal androjen grubu, gebelikte annelerine ve doğduktan sonra ise yenidoğan döneminde TP uygulanarak oluşturulan prenatal ve postnatal androjen grubu, sadece postnatal dönemde TP uygulanarak oluşturulan postnatal androjen grubu olmak üzere 3 dişi grup ile birlikte, aynı dönemlerde susam yağı verilerek oluşturulan dişi ve erkek kontrol grubu kullanıldı. Sıçanlar, 120. günde genel anestezi altında intrakardiyak perfüzyon sonrası dekapitize edilerek beyinleri

ıkarıldı. Elde edilen kesitlerde *Cresyl violet* ile hipokampal piramidal tabakada hücre sayımı, glial fibriler asidik protein (GFAP) boyası ile preoptik alandaki astrosit morfolojisi incelendi.

Erkek kontrol grubunda hipokampal hücre sayısı dişi kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ($p=0.01$). Prenatal dönemde androjen verilen grupta hücre sayısı dişi kontrol grubuna göre yüksek saptandı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hem prenatal hem de postnatal TP uygulaması ile hücre sayısının, sadece prenatal, sadece postnatal, dişi ve erkek kontrol gruplarından daha yüksek olduğu; ancak bu farkın sadece dişi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.03$). Prenatal ve postnatal TP alan grupta astrosit primer ve sekonder dallanma sayısı sadece postnatal dönemde TP alan ve hiç TP almayan erkek grubuna göre daha fazla idi. Ancak, tüm kesitlerde boyanma sağlanamadığı için istatistiksel değerlendirme yapılamadı.

SUMMARY

Effect of prenatal and early postnatal androgens on adult hippocampal pyramidal neuron count and morphology of preoptic area in rat.

Dr. Maşallah CANDEMİR

Hippocampus is implicated on functions related to learning and memory and hippocampal morphology exhibit sexual differences. But mechanisms were not clearly exhibited. Hippocampus is developmentally sensitive to gonadal steroids assessed especially prenatal period and as a result histologic structure can be differentiated and hippocampal functions vary in adulthood with androgens.

Preoptic Area (POA) is the critical neural substrate underlying gender specific behaviors and morphologically different in male and female. Recent studies especially focused on neuron characteristics and morphology of astrocytes. It is known that androgens assessed in prenatal period enlarge POA volume and contribute to male specific behaviors. Although previous studies demonstrated that administration of testosterone to newborn rats change astrocyte morphology in PAO, there is no any information whether these differences continue in adulthood.

In our study we investigated the effects of testosterone propionate (TP) administered in prenatal and postnatal periods on pyramidal cell count of hippocampus and morphology of astrocyte in rats.

Wistar Albino rats were used in the study. Rats were assigned to one of 3 treatment regimes including prenatal androgen group (maternal TP assessed in pregnancy), prenatal and postnatal androgen group (maternal TP assessed in pregnancy and TP assessed in postnatal period), postnatal androgen group (TP assessed in postnatal period). Sesame oil was injected to male and female control group. In the 120th day of study all rats sacrificed by decapitation under general anesthesia after intracardiac perfusion and brains were removed. Acquired sections were exposed to cell count in hippocampal pyramidal layer with cresyl violet and

astrocyte morphology in POA visualized by glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunocytochemistry.

Hippocampal cell count was higher female control group than in the male control group ($p=0.01$). The cell count was higher in the prenatally androgen administered group than female control group but this difference was not statistically significant. The cell count in both prenatal and postnatal TP administered group was higher than only prenatal, only postnatal and male and female control groups but statistically difference was found only female control group ($p=0.03$). In prenatal and postnatal androgen group, primary and secondary astrocyte branching count was higher than that in both postnatal androgen and male control groups. No statistical study was done because most sections couldn't be visualized by GFAP immunocytochemistry.



KAYNAKLAR

1. Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. Sexual differentiation of the vertebrate brain. Principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19:323–362.
2. Amateau SK, Mc Carthy MM. Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area. *Journal of Neuroendocrinology* 2002; 14:904–910.
3. Isgor C, Sengelaub DR. Prenatal gonadal steroids affect adult spatial behavior, CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats. *Hormones and Behavior* 1998; 34:183–198.
4. Gorski, RA, Harlan, R. E, Jacobson CD, Shryne JE, and Southam AM. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J. Comp. Neurol* 1980; 193:529–539.
5. Numan M. The role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior in the rat. *Ann NY Acad Sci* 1986; 474:226–230.
6. Isgor C, Sengelaub DR. Effects of neonatal gonadal steroids on adult CA3 pyramidal neuron dendritic morphology and spatial memory in rats. *J Neurobiol* 2003; 55:179-190.
7. Numan M. The role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior in the rat. *Ann NY Acad Sci* 1986; 474:226–230.
8. Yıldırım M. Role of estrogen in hippocampal dendritic spine changes during pubertal, adult and aged female rats. *Doktora tezi*. 2005 Ankara.

9. Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of testicular function. In: Nieschlag E, Behre HM, eds. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. New York: Springer, 2000: 23.
10. Genazzani AR, Pluchino N, Freschi L, Ninni F, Luisi M. Androgens and the brain. *Maturitas* 200; 757:27–30.
11. The medical biochemistry page. AWARDS. <http://www.indstate.edu/thcme/mwking/home.html> adresinden 27.11.2007 tarihinde ulaşılmıştır.
12. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato C, et al: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83:835-839.
13. Moilanen AM, Karvonen U, Poukka H, et al. A testis-specific androgen receptor coregulator that belongs to a novel family of nuclear proteins. *J Biol Chem* 1999; 5: 3700-3704.
14. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* 1996; 3:87-94.
15. Aydos K. Androjen reseptörü ve infertilite. *İnfertilite* 2007; 25:226-229.
16. Choong CS, Wilson EM. Trinucleotide repeats in the human androgen receptor: a molecular basis for disease. *J Mol Endocrinol* 1998; 21:235-257.
17. Moilanen AM, Karvonen U, Poukka H, et al. A testis-specific androgen receptor coregulator that belongs to a novel family of nuclear proteins. *J Biol Chem* 1999; 5: 3700-3704.
18. MacLean HE, Warne GL, Zajac JD. Defects of androgen receptor function: from sex reversal to motor neurone disease. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 112: 133-141.

19. Paris F, Weinbauer GF, Blum V, Nieschlag E. The effect of androgens and antiandrogens on the immunohistochemical localization of the androgen receptor in accessory reproductive organs of male rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 48: 129-137.
20. Christensen LW, Nance DM, Gorski RA. Effects of hypothalamic and preoptic lesions on reproductive behavior in male rats. *Brain Res Bull* 1977; 2:137-141.
21. Kayaalp SO. Androjenler, anabolik steroidler ve anti androjenik ilaçlar. In: Kayaalp SO, eds. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Ankara: Hacettepe-Taş kitapçılık, 2001:1364-1378.
22. Temel S. Prenatal ve neonatal dönemlerde sıçan karaciğer yıldız hücrelerinin immunohistokimyasal olarak incelenmesi. Yüksek lisans tezi. 2004 Isparta.
23. Lima FR, Goncalves N, Gomes FC, de Freitas MS, Moura Neto V. Thyroid hormone action on astroglial cells from distinct brain regions during development. *Int J Dev Neurosci* 1998; 16: 19-27.
24. Maurel D, Sage D, Mekaouche M, Bosler O. Glucocorticoids up-regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the rat suprachiasmatic nucleus. *Glia* 2000; 29: 212-221.
25. Laping NJ, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I, Finch CE. Glial fibrillary acidic protein. Regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathol* 1994; 4: 259-275.
26. Garcia-Segura LM, Chowen JA, Parducz A, Naftolin F. Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 1994; 44: 279-307.

27. Wolf CJ, Hotchkiss A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray LE Jr. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. *Toxicol Sci.* 2002; 65:71-86.
28. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res* 2000; 25: 1439–1451.
29. Mong JA, Kurzweil RL, Davis AM, Rocca MS, McCarthy MM. Evidence for sexual differentiation of glia in rat brain. *Horm Behav* 1996; 30: 553–562.
30. Green EL. *Biology of Laboratory Mouse*. Philadelphia: The McGraw-Hill Companies. 1980.
31. Ozawa H. Steroid Hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J Nippon Med Sch* 2005; 72:316-325.
32. Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyoloji Ed. Başaklar AC. 7. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 1996, p.358-394.*
33. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji Ed. Çavuşoğlu H. 9. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp kitabevi, 1996, p. 715-759.*
34. Waxman SG. *Korelatif Nöroanatomi Ed. Yıldırım M. 24. Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 2002, p. 81-248.*
35. Cohen DH, Sherman SM. *The Nervous System Physiology Ed. Berne RM, Levy MN. 2nd edition, Toronto: St. Louis, 1983.*
36. Carpenter MB, Sutin J. *Human Neuroanatomy 8th edition, Baltimore: Williams and Wilkins Press, 1983.*

37. Totterdell S, Hayers L. Non-pyramidal hippocampal projection neurons: a light and electron microscopic study. *Journal of Neurocytology* 1987; 16: 477-485.
38. Raisman G, Cowan WM, Powell TPS. The extrinsic afferent, commissural and association fibers of the hippocampus. *Brain* 1965; 88: 963-966.
39. Brodal H. *Neurological Anatomy* 3rd Edition, Oxford: Oxford University Press, 1981,
40. Nolte J. *The Human Brain. An introduction to its functional anatomy.* 2nd Edition. C.V. Mosby Company, St. Louis, Toronto, 1988.
41. Dohler KD. The pre-and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *Int Rev Cytol* 1991; 131: 1-57.
42. Raisman G, Field PM. Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res* 1973; 54:1-29.
43. Pfaff DW. Morphological changes in the brains of adult male rats after neonatal castration. *J Endocrinol* 1966; 36: 415-416.
44. Neubauer K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein - a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *Hepatology* 1996; 24:719-730.
45. Gerall AA, Moltz H, Ward IL. *Sexual Differentiation. Handbook of Behavioral Neurobiology*, vol. 11. New York: Plenum Press, 1992.

46. Hsu HK, Yang RC, Shih HC, et al. Prenatal exposure of testosterone prevents SDN-POA neurons of postnatal male rats from apoptosis through NMDA receptor. *J Neurophysiol* 2001; 86:2374-2380.
47. Woodson JC, Balleine BW, Gorski RA. Sexual experience interacts with steroid exposure to shape the partner preferences of rats. *Horm Behav* 2002; 42:148-157.
48. Sharp PS, La Regina MC. *The laboratory rat*. Florida CRC Pres. 1998.
49. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy* 1984; 134:127-136.
50. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96:379-394.
51. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96:857-881.
52. Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy* 1987; 147:229-263.
53. West MJ, Siomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231:482-497.
54. Korkmaz A, Tumkaya L. Estimation of the section thickness and optical disector height with a simple calibration method. *Journal of Microscopy* 1997; 187:104-109.

55. West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology of Aging* 1993; 14:275-285.
56. Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJG. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *Journal of Microscopy* 2001; 204:232-246.
57. Adiguzel E, Duzcan SE, Akdogan I, Tufan AC. A simple low-cost method for two dimensional microscopic measuring and stepping on the microscopic plate. *Neuroanatomy* 2003; 2:6-8.
58. MacLusky NJ, Hajszan T, Prange-Kiel J, Leranth C. Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience* 2006;138:957-965.
59. Tonjes R, Docke F, Dorner G. Effects of neonatal intracerebral implantation of sex steroids on sexual behaviour, social play behaviour and gonadotrophin secretion. *Exp Clin Endocrinol* 1987; 90: 257–263.
60. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; 211: 1294–1302.
61. McEwen BS. Steroid hormones. Effect on brain development and function. *Horm Res* 1992; 37 (Suppl. 3): 1–10.
62. Arnold AP, Gorski RA. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1984; 7: 413– 442.
63. Chowen JA, Torres-Aleman I, Garcia-Segura LM. Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 1992; 56: 895–901.

64. McCarthy MM. Molecular aspects of sexual differentiation of the rodent brain. *Psychoneuroendocrinology* 1994; 19: 415–427.
65. Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. Gonadal steroids regulate spine synapse density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 1990; 10:1286–1291.
66. Lewis C, McEwen BS, Frankfurt M. Estrogen-induction of dendritic spines in ventromedial hypothalamus and hippocampus: effects of neonatal blockade and adult GDX. *Devl Brain Res* 1995; 87:91–95.
67. Swaab DF, Gooren LJ, Hofman MA. Gender and sexual orientation in relation to hypothalamic structures. *Horm Res* 1992 ;38:51-61.
68. Kerr JE, Allore RJ, Beck SG, Handa RJ. Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus. *Endocrinology* 1995; 136:3213–3221.
69. Meyer G, Ferres-Torres R, Mas M. The effects of puberty and castration on hippocampal dendritic spines of mice. A Golgi study. *Brain Res* 1978; 155:108–112.
70. MacLusky NJ, Hajszan T, Prange-Kiel J, Leranth C. Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience* 2006; 138:957-965.
71. Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 1990; 10:1286–1291.
72. Gorski RA, Harlan RE, Jacobson CD, Shryne JE, and Southam AM. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J. Comp. Neurol* 1980; 193:529–539.