

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

TESTOSTERON HORMONU UYGULANAN SIÇANLARDA
HİPOKAMPUS MORFOLOJİK YAPISININ
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Sedat MEYDAN

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. İlter KUŞ

ELAZIĞ
2008

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

.....

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ

.....

F.Ü. Tıp Fakültesi

Anatomi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İlter KUŞ

.....

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında yapmış olduğum tez çalışmama yön veren ve bu konuda yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. İlter KUŞ'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde bana olan desteklerini hiç bırakmayan annem, babam ve sevgili eşime, doğumu ile hayatımıza anlam kazandıran kızım Emine Aybüke'ye; tez çalışmamda yardım ve katkılarından dolayı hocalarım Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ, Doç. Dr. A. Oya SAĞIROĞLU, Doç. Dr. Murat ÖGETÜRK, Doç. Dr. Ahmet KAVAKLI'ya, mesai arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Ufuk TAŞ, Uzman. Dr. Evren KÖSE, Araş. Gör. Dr. Hilal IRMAK SAPMAZ, Araş. Gör. Dr. Serin AKBAYIR'a teşekkür ederim.

Biyokimyasal bulgularının değerlendirilmesinde emeği geçen Prof. Dr. Necip İLHAN, Yrd. Doç. Dr. Dilara KAMAN, Araş. Gör. Dr. Enver SANCAKDAR'a, immunohistokimyasal ve histolojik bulguların değerlendirilmesinde Yrd. Doç. Dr. Dürrin Özlem DABAK ve Araş. Gör. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, yapmış oldukları yardımlardan dolayı teşekkür ederim.

Tez projesi için gerekli olan finansman desteğini sağlayan FÜBAP'a teşekkür ederim.

ÖZET

Sıçanlar üzerinde gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmada, orşidektomi sonrası hipokampus'ta meydana gelen morfolojik değişiklikler araştırıldı. Aynı zamanda bu değişiklikler üzerine testosteron hormonunun koruyucu etkileri de incelendi.

Araştırmamızda, 230–250 gr ağırlığında toplam 21 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar üç eşit gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlar sham-orşidektomi grubu (kontrol) olarak kullanıldı. Grup II'ye ait deney hayvanlarına cerrahi olarak orşidektomi yapıldı. Grup III'e ise orşidektomi sonrası günlük dozu 0,5 mg/kg olan testosteron propionat 30 gün boyunca verildi. Deney süresi sonunda hayvanlar dekapite edildi ve hipokampus doku örnekleri çıkartıldı. Hipokampus dokularının bir kısmı süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) seviyelerinin belirlenmesi için kullanıldı. Geriye kalan hipokampus doku örnekleri, rutin histolojik işlemlerden geçirilerek ışık mikroskobu altında incelendi. Bununla birlikte dokular bax immün reaktivitesinin belirlenmesi için immunohistokimyasal olarak avidin-biyotin-peroksidaz yöntemi ile boyandı.

Orşidektomi yapılan sıçanlarda, hipokampus SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin kontrol grubuna göre azaldığı, MDA düzeylerinin de arttığı görüldü. Yine bu gruba ait doku örneklerinin ışık mikroskobik incelemelerinde, piknotik hücre sayıları ile bax immün reaktivitesinin kontrol grubuna göre önemli oranda arttığı tespit edildi. Orşidektomi sonrası testosteron verilen sıçanlarda ise, hipokampus SOD ve GSH-Px enzim aktivitesinin yükseldiği, MDA seviyelerinin de azaldığı görüldü. Ayrıca bu grupta, orşidektomiye bağlı olarak oluşan bax immün reaktivite artışının ve histopatolojik değişikliklerin gerilediği belirlendi.

Biyokimyasal, ışık mikroskobik ve immunohistokimyasal düzeylerde yapmış olduğumuz bu araştırma sonucunda, orşidektomiye bağlı olarak hipokampusta oluşan oksidatif doku hasarının ve morfolojik değişikliklerin testosteron hormonu ile baskılandığı ortaya kondu.

Anahtar kelimeler: Hipokampus, testosteron, orşidektomi, immunohistokimya, sıçan.

ABSTRACT

Immunohistochemical Investigation of Morphological Structure of Hippocampus in Testosterone Administrated Rats

In our study performed on rats, morphological changes in hippocampus were investigated after orchidectomy. In addition, the protective effects of testosterone were examined on these changes.

In our investigation, a total of 21 male Wistar-Albino rats weightness 230-250 g were used. Animals were divided into three equal groups. The rats of group I was used sham-orchidectomy (control). The animals of group II were operated orchidectomy. The rats of group III was administrated testosterone propionate, every day 0,5 mg/kg, for 30 days after orchidectomy. At the end of the study animals were decapitated and the hippocampus tissue specimens were removed. Some of the hippocampus tissues were used for determination of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) enzyme activities, and malondialdehyde (MDA) levels. The remaining hippocampus tissue specimens were stained with routine histological methods and examined under the light microscope. Additionally, the samples were immunohistochemically stained using avidin-biotin-peroxidase method for determination bax immunoreactivity.

The SOD and GSH-Px enzyme activities of hippocampus were decreased, and MDA levels were increased in rats orchidectomy were compared with the sham-control group. In the light microscopic evaluation tissue specimens of this group, significantly an increase were detected number of picnotic cells and bax immunoreactivity were compared with the sham-control group. However, an increase was observed in activities of SOD and GSH-Px enzymes and a decrease of MDA levels in animals of orchidectomy plus testosterone was observed. Furthermore, it was determined that increase of bax immunoreactivity and histopathological changes were regressed caused by orchidectomy in this group.

Results from this biochemical, light microscopic, and immunohistochemical study revealed that orchidectomy-induced oxidative tissue damage and morphological changes in the hippocampus were suppressed by testosterone.

Key words: Hippocampus, testosterone, orchidectomy, immunohistochemistry, rat.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipokampus	1
1.1.1. Embriyolojisi	1
1.1.2. Morfolojik Yapısı	1
1.1.3. Hipokampal Yollar	3
1.1.3.1. Afferent yollar	3
1.1.3.2. Efferent yollar	4
1.1.3.3. Papez Devresi	5
1.1.4. Fizyolojisi ve Kimyası	5
1.1.5. Fonksiyonları	6
1.1.6. Lezyonları	7
1.2. Testosteron Hormonu	9
1.2.1. Biyokimyası	9
1.2.2. Biyosentezi ve metabolizması	10
1.2.3. Fonksiyonları	13
1.2.4. Antioksidan Etkileri	16
1.3. Apoptosis	17
1.3.1. Apoptozisin homeostazis içindeki yeri	17
1.3.2. Apoptozisin patolojik süreçlerdeki rolü	17
1.3.3. Apoptotik süreçteki hücre ölümü aşamaları	18
1.3.3.1. Apoptozisin başlatılması	18
1.3.3.2. Hücre içi proteazların aktivasyonu	18
1.3.3.3. Hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler	19
1.3.3.4. Fagositoz	19
1.3.4. Apoptozis'in Regülasyonu	19
1.3.5. Apoptozis Hızının Bozulduğu Hastalıklar	20
1.3.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	20
1.4 İmmunohistokimya	21
1.4.1. Genel Bilgiler	21
1.4.2. İmmunohistokimyada Kullanılan Antikorlar	21

1.4.3. İmmunohistokimya Metodları	22
1.4.3.1. İmmunenzimatik Boyama Metodları	22
1.4.3.2. İmmunfluoresan Boyama Metodları	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	25
2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulamalar	25
2.2. Deney Hayvanlarının Bakımı	25
2.3. Histolojik Çalışma	26
2.4. İmmunohistokimyasal Çalışma	27
2.5. Biyokimyasal Ölçümler	29
2.6. İstatistiksel Analiz	30
3. Bulgular	31
3.1. Biyokimyasal Bulgular	31
3.2. Işık Mikroskopik Bulgular	33
3.3. İmmunohistokimyasal bulgular	36
4. TARTIŞMA	40
5. KAYNAKLAR	44
6. ÖZGEÇMİŞ	53

TABLO LİSTESİ

Tablo No:	Açıklama	Sayfa No:
Tablo 1	Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkihi.	26
Tablo 2	Histolojik takip serileri.	27
Tablo 3	İmmunohistokimyasal boyama prosedürleri.	28
Tablo 4	İmmunohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecesi.	28
Tablo 5	Gruplara ait hipokampus doku örneklerindeki SOD, GSH-Px ve MDA değerleri.	31
Tablo 6	Gruplara ait hipokampus CA1, CA2 ve CA3 alanlarını içeren piramidal hücre tabakasına ait piknotik hücre sayıları.	34

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No:	Açıklama	Sayfa No:
Şekil 1	Beynin iç oblik görünüşü.	2
Şekil 2	Koronal kesitte hipokampus'un yapısı.	4
Şekil 3	Papez devresi.	6
Şekil 4	Kolesterol yan zincir ayrılması.	9
Şekil 5	Testosteron hormonu.	10
Şekil 6	Testosteron hormonu ve metabolitlerinin biyosentezi.	11
Şekil 7	Erkeklerde hipotalamik-hipofizial-gonadal yol.	12
Şekil 8	Monoklonal antikorun yapısı.	22
Şekil 9	İmmünoenzim boyama metotları.	24
Şekil 10	Deney gruplarına ait SOD değerleri.	32
Şekil 11	Deney gruplarına ait GSH-Px değerleri.	32
Şekil 12	Deney gruplarına ait MDA değerleri.	33
Şekil 13	Deney gruplarına ait hipokampus CA1 alanında bulunan piknotik hücre sayısı.	34
Şekil 14	Deney gruplarına ait hipokampus CA2 alanında bulunan piknotik hücre sayısı.	35
Şekil 15	Deney gruplarına ait hipokampus CA3 alanında bulunan piknotik hücre sayısı.	35
Şekil 16	Kontrol grubuna ait hipokampus CA1 alanından normal bir görünüm.	36
Şekil 17	Orşidektomi grubuna ait hipokampus CA2 alanı incelendiğinde, çok sayıda piknotik hücre (→) görülmekte.	37
Şekil 18	Testosteron verilen gruba ait hipokampus CA2 alanı incelendiğinde, az sayıda piknotik hücre (→) görülmekte.	37

- Şekil 19** Kontrol grubuna ait hipokampus CA1 alanı incelendiğinde, immunohistokimyasal olarak Bax boyanmasının olmadığı görülmekte. 38
- Şekil 20** Orşidektomi grubuna ait hipokampus CA3 alanında şiddetli derecede (→) Bax boyanmasının olduğu görülmekte. 38
- Şekil 21** Testosteron verilen gruba ait hipokampus CA1 alanında minimal derecede (→) Bax boyanmasının olduğu görülmekte. 39

KISALTMALAR LİSTESİ

Kısaltma	Açıklama
<u>CA</u>	Cornu Ammonis
<u>ACTH</u>	Adrenokortikotropik Hormon
<u>p450_{sc}</u>	p-450 Yan Zincir Kırıcı Enzim
<u>3 β OHSD</u>	3 β Hidroksisteroid Dehidrogenaz
<u>17 β OHSD</u>	17 β Hidroksisteroid Dehidrogenaz
<u>DHT</u>	Dihidrotestosteron
<u>LH</u>	Lüteinizan Hormon
<u>FSH</u>	Foliküler Stimulan Hormon
<u>GnRH</u>	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
<u>ABC</u>	Avidin-Biyotin Kompleks Yöntemi
<u>HE</u>	Hemotoksilen-Eosin
<u>SOD</u>	Süperoksit Dismutaz
<u>GSH-Px</u>	Glutasyon Peroksidaz
<u>MDA</u>	Malondialdehit

1. GİRİŞ

1.1. Hipokampus

Dış yüzünün görünümü koç boynuzuna benzediği için önceleri cornu ammonis adı ile anılan bu oluşuma, deniz atına benzerliğinden dolayı hipokampus adı verilmiştir. Filogenetik olarak beyin en eski bölümlerinden biri olan hipokampus frontal kesitlerde C harfi şeklinde görülür (1-3).

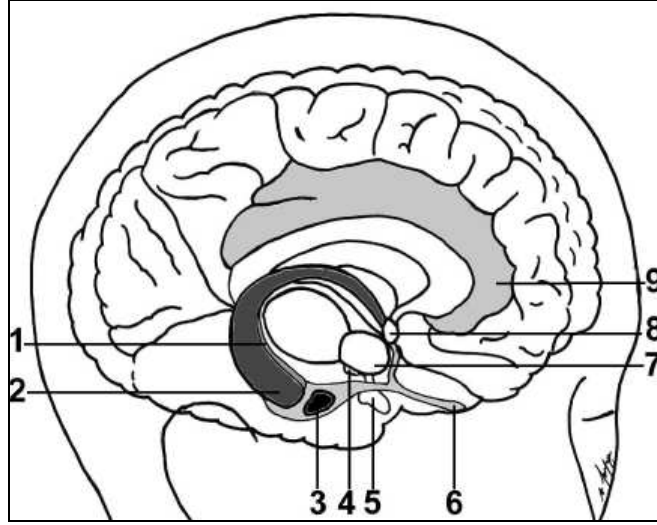
1.1.1. Embriyolojisi

Fissura choroidea kavsinin dış parçasından gelişen hipokampus'un gelişim süreci, bölgede bulunan öncü nöronların (nöral progenitörler) çoğalması ve göç etmesi ile başlar. Böylece hemisfer duvarı bir yandan kalınlaşırken, diğer yandan ventrikülün medial kenarına doğru bir çıkıntı yaparak hipokampus'u meydana getirir (1, 4-6).

1.1.2. Morfolojik Yapısı

Gri cevher tabakasından oluşan hipokampus, lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır. Uzunluğu yaklaşık 5-8 cm'dir (7). Pes hippocampi adı verilen geniş ön kısmında pençeye benzeyen 2 veya 3 yüzeysel çıkıntı bulunur. Bu çıkıntılara ise digitationes hippocampi adı verilir. Hipokampus'un konveks olan ventriküler yüzeyi kendi hücrelerinden gelen aksonların oluşturduğu alveus ile örtülüdür. Bu lifler medialde şerit şeklinde birbirine yaklaşıp fimbria hippocampi'yi oluşturur. Fimbria hippocampi'nin arka ucu alveus ile birlikte crus fornix'i meydana getirir. Ön ucu ise uncus gyri hippocampi'nin beyaz cevherinde sonlanır. Alveus'tan gelip fimbria'ya dahil olan lifler, fornix'in başlangıcını oluşturmaktadır (1-3, 7-10) (şekil 1).

Hipokampus, cornu ammonis'in baş harflerini temsilen CA olarak da tanımlanır. İçerdiği hücre farklılıklarından dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alana bölünmüştür. Bu alanlardan subiculum'a en yakın olanı CA1, gyrus dentatus'a en yakın olanı ise CA3'tür (2, 3, 11, 12). Gyrus dentatus'un bir parçası veya hilusu olarak adlandırılan CA4 alanı ise, CA3 alanı ile gyrus dentatus arasında bulunmaktadır. Fakat bu alan, içerdiği hücre yapısı ve bağlantı lifleri açısından CA3'ten farklı olmadığı için modern sınıflamadan çıkarılmıştır (11).



Şekil 1. Beynin iç oblik görünüşü. 1- gyrus dentatus, 2- hipokampus, 3- corpus amygdaloideum, 4- corpus mamillare, 5- hypophysis, 6- bulbus olfactoris, 7- hypothalamus, 8- comissura anterior, 9- gyrus cinguli (3).

CA3 alanında bulunan hücrelerin en önemli özelliği, dentat granüler hücrelerden gelen mossy lifleri'ni almasıdır. Buradaki piramidal hücrelerin boyutu diğer alanlardaki hücelere göre daha fazladır. Piramidal hücrelerin en yoğun olduğu alan ise CA2 alanıdır ve bu alanda mossy lifleri'nin kaybolduğu görülür. Supramamillar bölge ve hypothalamus'tan CA2 alanına yoğun lifler gelir. Hipokampus'un en karmaşık bölgesi CA1 alanıdır. Büyüklükleri birbirinden farklı piramidal hücrelerin bulunduğu bu alandaki nöronların %10'unu internöronlar oluşturur (2, 11).

Hipokampus histolojik olarak, ventriküler yüzeyden derine doğru yedi tabakadan oluşmaktadır (11) (Şekil 2):

1-Alveus hippocampi: Bu tabaka hipokampus'a ait piramidal hücre aksonları, afferent ve efferent lifler içerir (2, 3).

2-Stratum oriens: Bu tabakada internöronlar ile piramidal hücrelerin bazal dendritleri yerleşmiştir. Burada bulunan nöron aksonlarının çoğu alveus liflerine katılır. Diğer hücre aksonları ise en derinde yer alan moleküler tabakaya kadar uzanır (1, 11).

3-Stratum pyramidale: Piramidal ve Golgi Tip II hücrelerinin fazla bulunması bu tabaka için karakteristiktir. Hipokampus'a asıl şeklini veren bu tabakadaki piramidal hücrelerin dizilimidir. Bu hücrelerin tabanı hipokampus'un ventriküler yüzeyine doğru dönüktür. Bazı hücrelerin her iki kutbundan çıkan zengin pleksus ağı piramit görünümüne neden olur. Piramidal hücrelere ait aksonlar stratum oriens tabakasını geçerek alveus liflerine katılır. Bu hücrelerin bazal-apikal dendritleri de komşu tabakalara kadar uzanır (2, 13).

Piramidal tabakada, değişik yollar takip eden kısa aksonlu hücreler de mevcuttur. Bunlardan biri, hipokampus'un stratum oriens ve stratum pyramidale tabakaları arasındaki geçiş bölgesinde bulunan sepet hücreleridir. Bu hücreler hipokampus'un iç aktivitesini düzenler. Sepet hücrelerinin aksonları alveus hippocampi'ye uğramadan zıt yönde ilerler ve piramidal hücrelerin çevresinde yoğun bir ağ yapar. Daha sonra stratum radiatum'a geçer (2, 14).

4-Stratum lucidum: İçerdiği yosunsu (mossy) lifler CA3 alanında bulunan piramidal hücreler ile bağlantı sağlar. Bu tabaka, CA1 ve CA2 alanlarında bulunmaz (11).

5-Stratum radiatum: Piramidal tabakanın sınırından ışınsal olarak uzanan dallara sahip olan bu tabaka geniş bir ağ yapısındadır.

6-Stratum lacunosum: Area entorhinalis'ten (Brodmann 28 nolu alan) gelen önemli afferent lifler burada sonlanır.

7-Stratum moleculare: İnce sinir lifleri ve çok az sayıda nöron içerir.

Bazı yazarlar tarafından son 3 tabaka "stratum moleculare" adı altında tek bir tabaka olarak kabul edilir. Bazı kaynaklar ise son iki tabakayı "stratum lacunosum-moleculare" ismiyle inceler (1, 2, 8, 14).

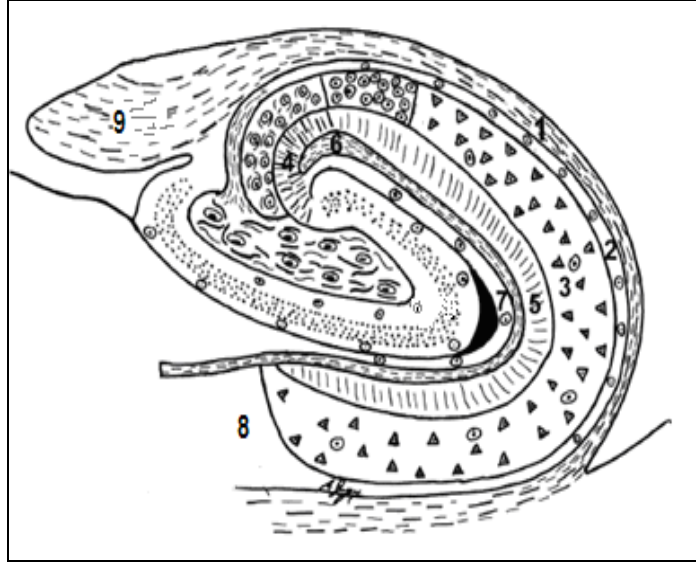
1.1.3. Hipokampal Yollar

1.1.3.1. Afferent yollar

Hipokampus'a ait afferent lifler tüm duyuşal uyarıları içerir. Örneğin Area entorhinalis'ten gelen duyular dört yolla hipokampus'a iletilir:

1-Perforant yollar: Entorhinal korteks'ten gelen aksonlar, subiculum boyunca gyrus dentatus'a ilerleyerek tüm hipokampus'a dağılır.

2-Yosunsu (mossy) lifler: Gyrus dentatus'tan CA3 alanına gider.



Şekil 2. Koronal kesitte hipokampus'un yapısı. Hipokampus: 1- alveus, 2- stratum oriens, 3- stratum pyramidalis, 4- stratum lucidum, 5- stratum radiatum, 6- stratum lacunosum, 7- stratum moleculare, 8- subiculum, 9- fimbria hippocampi (3).

3-Schaffer kollateralleri: Piramidal hücre lifleri olup CA3 ve CA2 alanlarından CA1 alanına doğru uzanır.

4-Alvear lifler: Subkortikal alanlardan gelen bu lifler alveus'tan hipokampus'a geçer. Hipokampus'un CA1 alanı ile subiculum'un iç tabakasına dağılır (1, 8, 15-17).

Gyrus parahippocampalis'ten uyarılar alan hipokampus, gelen bu uyarıları fornix yolu ile corpus mamillare, area septalis ve hypothalamus'un bazı çekirdeklerine gönderir (18). Ayrıca fornix aracılığı ile nuclei anteriores thalami, area hypothalamica posterior, corpus mamillare, area septalis, substantia innominata, area tegmentalis ventralis, nuclei raphe ve nucleus parabrachialis'ten hipokampus'a lifler gelir (1, 19).

1.1.3.2. Efferent yollar

Hipokampus'un en büyük efferent yolu fornix'tir. Hipokampus ve subiculum'dan başlayan miyelinli lifler, alveus'tan fimbria hippocampi'ye geçer. Sayıları 1.2-2.7 milyon arasında değişen bu lifler, splenium corporis callosi'nin altında crus fornicis; thalamus'un arkasında ise corpus fornicis olarak devam eder.

Her iki crus fornicis arasında çapraz yapan liflere commissura hippocampi adı verilir. Corpus fornicis'ten sonra columna fornicis olarak uzanan aksonlar, foramen interventriculare önünde kavis yaparak nuclei anteriores thalami ve nucleus dorsalis lateralis thalami'ye lifler verir. Bu liflere postcomissural lifler adı verilir. Buradan hypothalamus'a uzanan liflerin çoğu corpus mamillare ve nucleus ventromedialis hypothalamica'da sonlanır. Columna fornicis'ten commissura anterior'a ayrılan az sayıdaki fornix lifleri ise area septalis, substantia innominata ve area hypothalamica rostralis'e geçerler (1, 2, 4, 13).

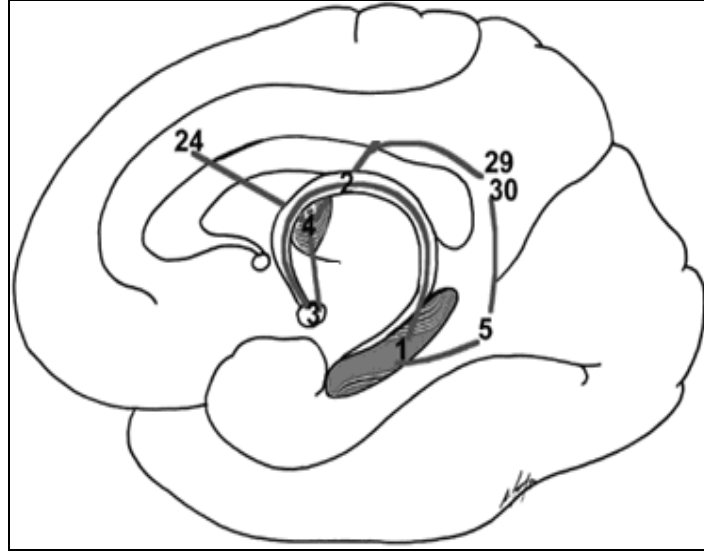
1.1.3.3. Papez Devresi

Papez Devresi hipokampus'un dış bağlantılarını ifade eder. Klasik Papez Devresi sırasıyla; hipokampus, fornix, corpus mamillare, tractus mamillothalamicus, nuclei anteriores thalami, gyrus cinguli, gyrus parahippocampalis ve hipokampus'a geri bağlantılar yapan nöronları kapsar (2, 18, 20). Papez Devresi içinde uyarıların, bilardo toplarının çarpması gibi, ardarda birbirlerini izlemesi, yaşadığımız bir duygunun giderek şiddetlenmesine ve iz bırakmasına neden olur. Duygusal tepkilerin olabilmesi için papez devresinin iyi çalışması gereklidir (2, 4, 20) (Şekil 3).

Her iki hipokampus, komissural yollar ile bağlantı içindedir. Dejenerasyon metoduyla yapılan çalışmalarda, hipokampus'tan neocortex'e doğrudan giden yollar saptanmıştır (2, 3).

1.1.4. Fizyolojisi ve Kimyası

Hipokampus'ta monoaminerjik, kolinerjik, GABAerjik afferentler bulunur. Örneğin; glutamat ve aspartat, hipokampus'tan en çok salgılanan eksitator transmitterler olarak bilinirler. Stratum oriens'te somatostatin-immunoreaktif ve glutamat dekarboksilaz (GAD)-immunoreaktif lifler, stratum lacunosum'da somatostatin-immunoreaktif lifler, stratum pyramidale'de glutamat dekarboksilaz (GAD)-immunoreaktif ve kolesistokinin (CCK)-immunoreaktif lifler, stratum radiatum'da ise glutamat dekarboksilaz (GAD)-immunoreaktif lifler yer alır. Bununla beraber hipokampus'un çoğu alanında vazoaktif intestinal polipeptid (VIP) ile CA3 alanına giden mossy liflerinde bir opioid peptid olan dinorfin yaygın olarak bulunur (2, 11).



Şekil 3. Papez devresi: Hipokampus’tan (1) çıkan lifler sırasıyla fornix (2), corpus mamillare (3), nuclei anteriores thalami (4), gyrus cinguli (Brodmann 24, 29, 30 alanları), gyrus parahippocampalis (5) yolunu izleyerek hipokampus’a geri dönerler (3).

Uykunun REM safhasında, hipokampus’a işaret eden serotonerjik raphe nukleusları aktiftir. Bu safhada yakın hafıza ile ilgili bilgiler sağlamlaştırılır. Derin uykuda yapılan neokortikal elektroensefalogram (EEG) kayıtları, düzenli ve senkronize ritim gösterir. Ancak hipokampal EEG kayıtları desenkronizedir. Uyanıklılık durumunda ise neokortikal kayıtlar desenkronize olmasına rağmen; hipokampus’un EEG kayıtları yavaş ve düzenli bir ritim gösterir. Hipokampus’ta görülen EEG dalgaları, ritmik sinüzoidal tipteki “teta dalgaları”dır. Bu durum yapının spontan aktivitesini ve bilincin değişik devreler ile ilişkili olduğunu göstermektedir (1, 13).

1.1.5. Fonksiyonları

Hipokampus’un karmaşık yapısı ve beyinde bulunan bir çok bölge ile yakın ilişki içinde olması hipokampus fonksiyonunun tanımını zorlaştırmaktadır (2, 9, 10, 21, 22).

1948 yılına kadar, hipokampus’un sadece koku ile ilgili olduğu bilinirdi (7). Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, hipokampus gelişiminin bulbus olfactorius gelişimine paralel olmadığı ve koku yollarının gelişmediği bazı insanlarda, hipokampus’un normal geliştiği gözlenmiştir (2, 8, 11).

Görme, işitme, koku, dokunma, iç organ duyuları gibi her türlü duyuşal uyarı, küçük bir alan dahi olsa, hipokampus'u aktive eder. Hipokampus ise hypothalamus, ventral thalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller gönderir. Böylece hipokampus, hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinden önce, limbik sistemi etkileyerek davranışların şekillenmesine neden olur (13). Bundan dolayı hipokampus'un, gelen duyuşal sinyalleri içerisinden geçiren ek bir kanal rolü oynadığı düşünülebilir (23).

Yeni bilgilerin depolanma kapasitesi olarak bilinen kısa süreli hafızanın, hipokampus ile yakından ilgisi bulunmaktadır (24, 25). Bu nedenle verbal veya sembolik uzun süreli anıların kalıcı olabilmesi için sağ ve sol hipokampus'a gereksinim vardır (2, 8, 13, 23). Ayrıca görsel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda sağ, sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda sol hipokampus bölgesi daha fazla aktivite göstermektedir. Bu bölgelerin lezyonlarında da ilgili hafızalarda kayıp gelişmektedir (26, 27).

Hipokampus ön bölgesinde östradiolü konsantre eden nöronların saptanması ve yapılan çalışmalarda hipokampus'un uyarılması ile ovulasyonda inhibisyonun oluşması, hipokampus'un endokrin fonksiyon üzerinde de etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca fornix'in kesilmesi sonucu adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımında bozukluk olduğu saptanmıştır (4).

Bunların yanı sıra hipokampus'un; cerebral korteks üzerine olan retiküler aktivitenin ayarlanması, heyecanın kontrolü ve iç organlara ait aktivitenin düzenlenmesi gibi fonksiyonları da bulunmaktadır (2, 3).

1.1.6. Lezyonları

Hipokampus'un değişik alanlarının uyarılması kızgınlık, sakinlik, aşırı seks güdüsü gibi davranış biçimlerinin görülmesine sebep olur. Hafif uyarılmasında ise, uyarım bittikten sonra bile saniyelerce süren bir epileptik nöbet görülür. Bu nöbetler sırasında birey bilinçlidir ve gerçek olmadığını bildiği koku, görme, işitme, dokunma ve benzeri tarzda hallusinasyonlar tanımlar (23, 28).

İnsanda hipokampus'u içine alacak şekilde lobus temporalis'in medial parçalarının iki taraflı çıkarılmasından sonra hafıza kaybına ilaveten, Klüver-Bucy Sendromu adı altında başka belirtiler de görülür. Bu belirtiler;

- Cins, tür, canlı, cansız ayırımı gözetmeksizin sıklıkla seksüel aktivitede artma,
- Görülen objelere anlam verememe,

- Yeni şeyleri hafızalarında tutamama ve yeni beceriler elde edememe,
- Korku ve kızgınlık duygusunun kaybolması,
- Uysallık,

-Yiyecekleri uzun süre koklayıp kontrol ettikten sonra yeme ve yiyecek olmayan cisimleri de yemeye çalışma gibi beslenme alışkanlıklarında değişiklikler ortaya çıkar (1-3, 28, 29).

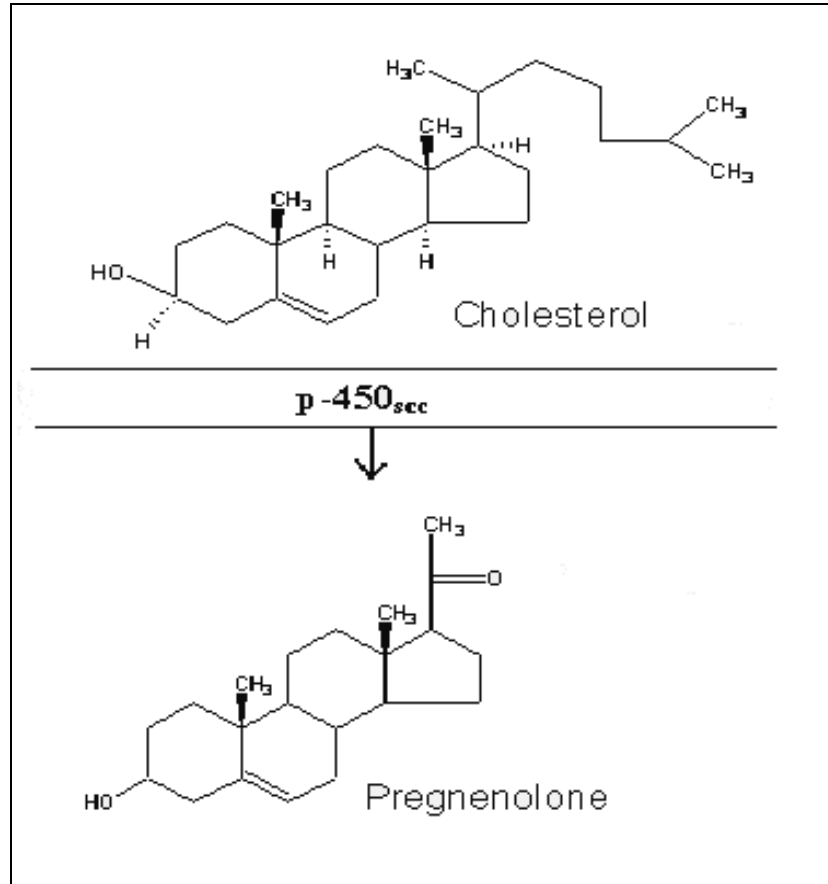
Kronik malnutrisyon, tiamin eksikliği, alkolizm, kanama, enfarktüs gibi nedenlerden sonra, hipokampus'ta çift taraflı lezyonlar ortaya çıkabilir. Bu lezyonlar sonucu yeni hatıralar kaydedilemez ve Korsakoff Sendromu (Dismnezik Sendrom) adı verilen bir amnezi durumu meydana gelir. Bu sendromdaki hastalar yeni öğrenilmiş becerileri uygulayamazlar. Fakat rahatsızlanmadan önce öğrendikleri karmaşık işleri başarabilirler. Ayrıca hastalar kendi geçmişi ile ilgili hayal veya konfüzyon tarzı saçma deneyimler anlatırlar ve buna kendileri de inanırlar. Bu duruma konfabulasyon adı verilmektedir (18, 28, 30, 31).

Hipokampus lezyonlarındaki davranış değişikliklerinin, kortikal ve duyuşal uyarılardan gelen bilginin kodlanamaması sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir (13).

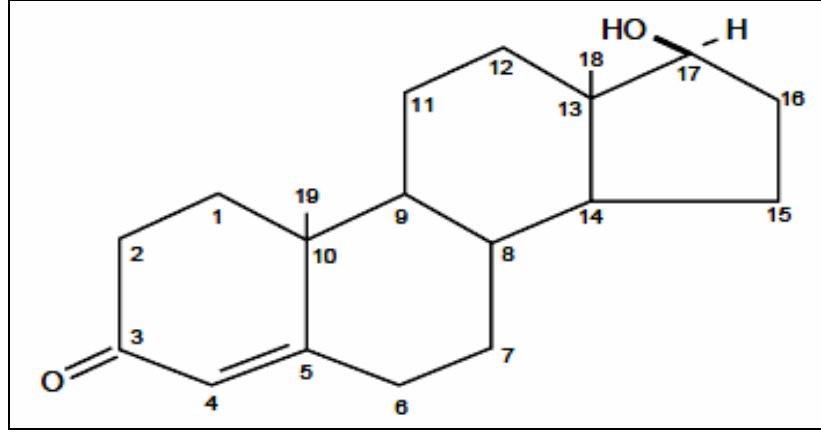
1.2. Testosteron Hormonu

1.2.1. Biyokimyası

Kimyasal formülü 17 β -Hidroksi-4-androsten-3-on olan testosteron, 19 karbonlu (19 C) ve steroid yapıda androjen bir hormondur. Ortasında 4 adet siklopentanoperhidropenantren çekirdek halkası bulunur. İlave karbonlar C₁₀, C₁₃ konumuna eklenmiştir (32). Lipofilik karakterde olan bu hormon androjen reseptörü olsun ya da olmasın organizmanın bütün hücrelerine rahatlıkla nüfuz edebilir (33). Testosteronun öncelikli prekürsörü 27 karbonlu (27 C) kolesteroldur. Kolesterolden öncelikle sitokrom p-450 yan zincir kırıcı enzim (p-450_{scc}) aracılığı ile pregnenolon oluşur. Pregnenolondan ise 5 ayrı enzim aracılığıyla [3 β hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β OHSD), Δ 5,4 izomeraz, 17 α hidroksilaz, C₁₇₋₂₀ liyaz, 17 β hidroksisteroid dehidrogenaz (17 β OHSD)] testosteron oluşmaktadır (32, 34, 35) (Şekil 4, 5, 6).



Şekil 4. Kolesterol yan zincir ayrılması (32) (Modifiye edilmiştir).



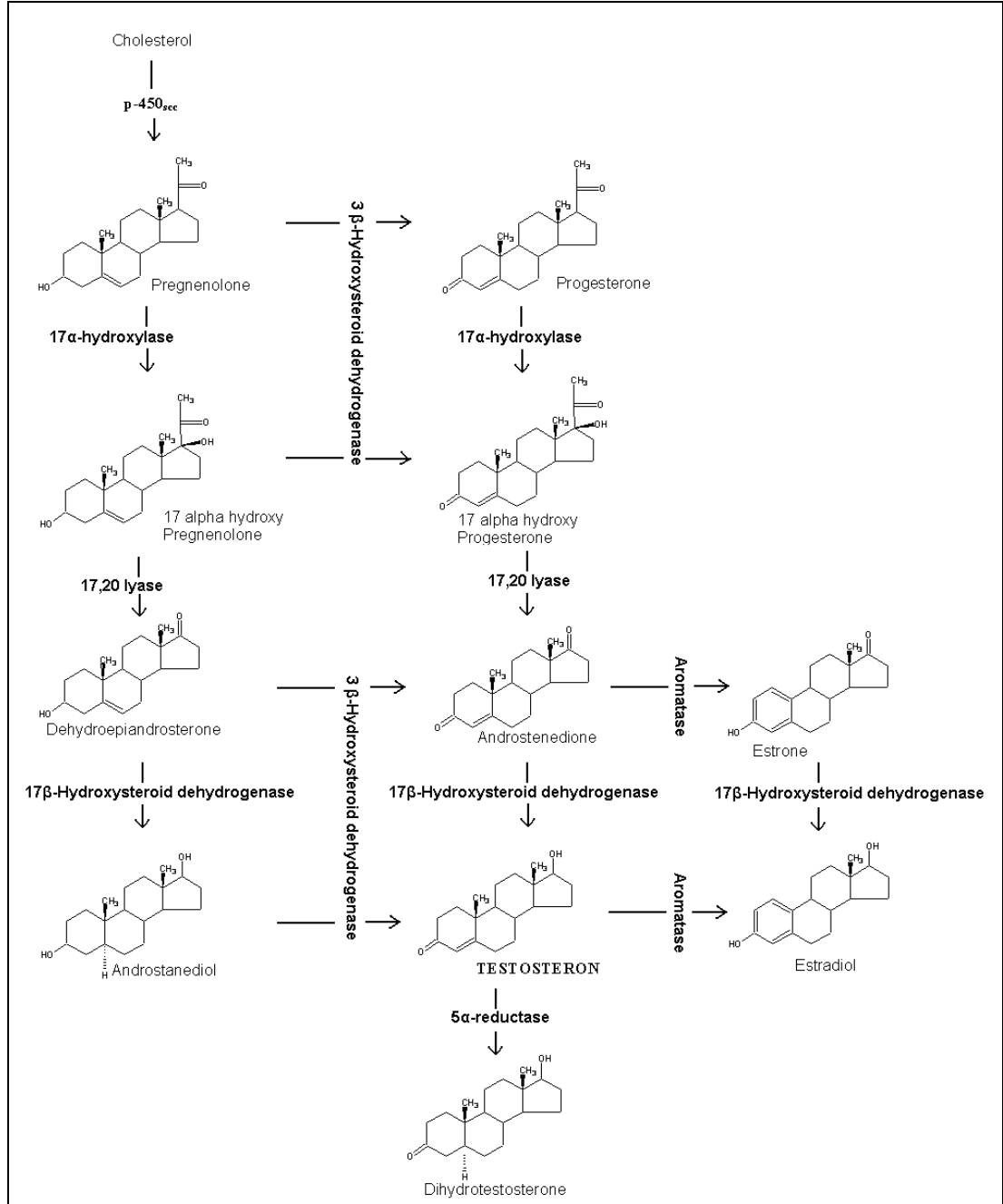
Şekil 5. Testosteron hormonu ($C_{19}H_{28}O_2$) (32).

1.2.2. Biyosentezi ve Metabolizması

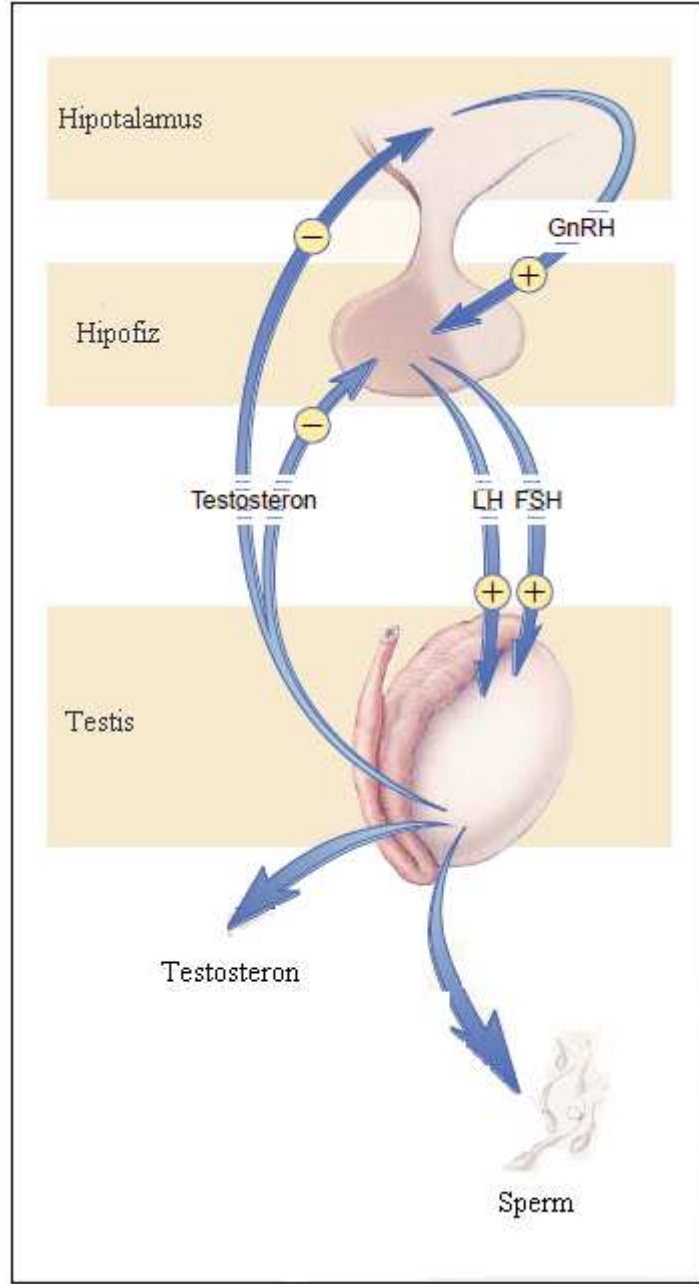
Testosteron testiküler dokuda yerleşmiş olan Leydig hücreleri tarafından üretilir. Bu hormonun sentezi ön hipofizden salgılanan Lüteinizan hormonun (LH) kontrolü altındadır. LH, Leydig hücrelerinin plazma membranlarındaki reseptörlere bağlanarak adenil siklazı aktive eder ve intrasellüler cAMP düzeyini artırır. Sonuç olarak cAMP artışı yolu ile testosteron üretimi uyarılır (23, 32, 35-37). Folliküler stimülan hormon (FSH) ise sertoli hücreleri tarafından üretilen androjen bağlayıcı protein sekresyonunu artırır. Bu protein testosteron ile bağlanarak tübül lümenine salgılanır. Lümeninde biriken testosteron spermatogenezi uyarıp spermatogenezin devamını sağlar (23, 34, 35, 37, 38). Ayrıca kan yolu ile taşınan testosteron erkek genital sistem bezlerine ve diğer birçok organa etki eder (34, 38). Testosteron hormonu negatif feed-back mekanizması ile GnRH (Gonadotropin salgılatıcı hormon) ve gonadotropinlerin (LH, FSH) sekretuar aktivitesini baskılar (32-35, 39) (Şekil 7).

Spermatik venlerdeki testosteron konsantrasyonu 40-50 $\mu\text{g/dl}$ 'dir. Plazmaya giren total testosteron miktarı ise 6-7 mg/gün'dür ve bu miktar testosteron hormonunun kan üretim oranı olarak değerlendirilir. Periferik olarak sentezlenen testosteron miktarı ise total plazma testosteron miktarının %5'inden daha az olacak şekilde hesaplanır. Metabolik klirensi 1000 L/24 saat olan hormonun plazma yarılanma ömrü 10-20 dakikadır. Prepubertal dönemde kan testosteron düzeyleri

düşüktür, 12-17 yaş grubu olan pubertal dönemde ise bu düzeyler artmaya başlar. Testosteronun yetişkin erkeklerdeki günlük ritmi sabahları artma, akşama doğru azalma yönündedir (34, 35).



Şekil 6. Testosteron hormonu ve metabolitlerinin biyosentezi (32) (Modifiye edilmiştir).



Şekil 7. Erkeklerde hipotalamik-hipofizial-gonadal yol. Negatif feed-back mekanizması (Artı işaretler uyarıcı, eksi işaretler inhibitör etki gösterir) (39) (Modifiye edilmiştir).

Karaciğerde üretilen β globulin, seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) veya testosteron östrojen bağlayıcı globulin (TEBG) olarak adlandırılır (32). Dolaşımdaki testosteronun %57'si SHBG'ye, %40'ı albumine (23, 32-35), %1'inden azı ise kortikosteroid bağlayıcı globulin'e (CBG, transkortin) bağlanır (34). Testosteronun geriye kalan %2'lik kısmı ise dolaşımda serbest formda bulunur ve

aktif olan kısımdır. SHBG'ye bağlanan testosteron, vücutta iki yol aracılığıyla metabolize olur. İlk yolda karaciğer dahil tüm dokularda aktivitesi az olan veya inaktif durumda olan 17 ketosteroidlere dönüştürülür. Oluşan 17 ketosteroid metabolitleri androsteron ve etiyokolanolon da karaciğerde glukoronat ve sülfat ile konjuge olduktan sonra idrarla atılır. Daha etkin olan II. yol ise primer olarak hedef dokularda meydana gelen ve aktif olan dihidrotestosteronun oluştuğu yoldur (23, 32, 34, 35). Bu primer dokular vesicula seminalis, prostat, dış genital organlar ve derinin bazı bölgeleridir. Diğer hedef dokular ise Wolf kanalı, spermatogonya, kaslar, kemikler, böbrekler ve beyindir (32).

Testosterondan 5 α redüktaz enzimi ile dihidrotestosteron hormonu oluşur (23, 32-36). İnsan testisi günde 50-100 $\mu\text{g/dl}$ dihidrotestosteron salgılamasına karşılık dihidrotestosteronun çoğu periferik dönüşümden elde edilir (32). Erişkin erkeklerde dihidrotestosteronun içeriği testosteronun 1/11'i kadar olup günde 611 ng/dl testosteroon karşılık yaklaşık 56 ng/dl dihidrotestosteron üretilmektedir (34, 35). Testosteronun ufak bir yüzdesi (%1-5) beyinde önemli bir reaksiyon olarak kabul edilen aromatisasyonla östradiole dönüşmektedir (32-34). Güçlü bir androjen olan androstenediol (%2 oranında) de testosterondan oluşur (32).

1.2.3. Fonksiyonları

Testosteron genel olarak, belirgin erkek karakterlerinin oluşumundan sorumludur. Larynx mukozasında hipertrofiye ve larynx genişlemesine sebep olarak, sesin tipik bas erkek sesi karakterini almasını sağlar. Vücut kıllarının büyümesine neden olur (23, 35). Testosteron proteinler üzerindeki genel anabolik etkisi ile kas, kemik, kemik iliği (eritropoez), immün sistem ve beyindeki metabolik olayları da düzenler (23, 35, 39). Bazal metabolizma hızını artırır. Tüm vücutta derinin kalınlaşmasını, derialtı dokusunun güçlenmesini ve yağ bezlerinin sekresyonunun artmasını sağlar. Kemik matriksinin total miktarını ve kalsiyum depolanmasını artırarak, kemiklerin dayanıklılığının artmasına neden olur (23). Testosteron gen regülasyonu, erkek tipi davranışla ilgili bazı kompleks fizyolojik olayları da etkilemektedir (32). Bunların dışında spermatogenezisin gerçekleşebilmesi için testosteroon gereksinim vardır (23, 40).

Puberta sonrası sekonder seks karakterlerinin ve seksüel organların gelişiminden sorumlu olan testosteron, erkeklerde libido, seksüel ilgi ve seksüel

aktivitenin artmasını sağlar. Ayrıca erkek aksesuar bezlerinin [prostat, glandula bulbourethralis (Cowper bezi) ve vesicula seminalis] fonksiyonlarını sürdürür (32, 34, 36, 39, 41).

Epididymis’de testosteron ve dihidrotestosteron hormonları yüksek düzeylerde bulunur. Bu düzeyler epididimal fonksiyon açısından önemlidir. Bazı epididimal proteinlerin sentezi androjenlere bağımlı olarak gerçekleşir. Yapılan araştırmalara göre androjen replasman tedavisi ile epididymis’de, sperm hareket ve fertilizasyon maturasyon aşamalarının devamı ve sperm depolama yeteneğinin düzeldiği görülmüştür (34).

Fetal hayatta testosteron, Wolf kanalından epididymis, vas deferens, vesicula seminalis ve ductus ejaculatorius gelişimini sağlar. Dihidrotestosteron ise penis, scrotum ve prostat oluşumunu indükler. Dihidrotestosteron yokluğunda labium majör, labium minör, klitoris ve vajinanın 2/3 alt bölümü gelişir (5, 23, 35, 36). Ayrıca erkek fetüste testislerin scrotuma inmesi için testosterona ihtiyaç vardır (23, 35).

2-14 yaşları arasında her iki cinsten hemogloblin düzeyi artar. Daha sonra, 20 yaşına kadar bu düzey erkeklerde artarken kızlarda azalır. Testosteron ve metabolitleri, hem eritropoietini artırır hem de doğrudan eritroid hücre yapımını uyarmaktadır. Klinefelter sendromu gibi testiküler hipogonadizm durumlarında görülen hafif anemi, testosteron tedavisi ile düzelir (39).

Testosteron beyindeki bazı metabolik olayları etkiler. Beyinde üreme, seksüel ve agresif davranışların düzenlenmesini sağlar. Ayrıca analjezik ve anksiyolitik etkilere sahip olan testosteron, ruh halini ve bilinci de etkiler (33, 42). Aromatase enzimi, öğrenme ve hafızada hayati yapılar olan hipokampus ve corpus amygdaloideum’da bulunur. Testosteron etkisini, bir östrojen veya bir androjen gibi gösterebilir. Böylece bilişsel aktivite üzerindeki testosteronun etkisini gösteren çalışmaların değerlendirilmesinde, önemli olan testosteronun, beyindeki bu hormonlara dönüşebileceğinin bilinmesidir. Yapılan deneylerde androjen miktarının azaltılmasıyla hipokampus’ta sinaptik dansitenin %40 oranında azaldığı gösterilmiştir. Testosteron replasmanı ile sinaptik dansitenin normale dönmesi testosteronun, hipokampus’un fonksiyonu ve fizyolojisini değiştirdiğini göstermektedir (33).

Nöroprotektif özelliklere sahip olan testosteron, merkezi sinir sistemi fonksiyonları için önemli bir role sahiptir. Santral sinir sistemi yaralanmalarını içeren nörodejenerasyonun farklı deneysel modellerinde testosteronun, nöronal ölümü engellediği bildirilmiştir. Nöronların korunmasını, farklılaşmasını, büyüme ve gelişimini sağlayan testosteron hormonunun salgılanmasındaki bozukluklar, nöral dokularda apoptozisin tetiklenmesine yol açmaktadır (42-44). İnsanda plazma testosteron seviyesinin azalması, nörodejeneratif hastalıkların gelişimi için bir risk faktörü olarak görülmektedir (42, 43). Beyin hasarı sonucu oluşan gliozisin ve astrosit çoğalmasının testosteron hormonu tarafından önlendiği bildirilmiştir (42, 45). Ayrıca testosteronun erkeklerde, uzaysal ve sözsöz (verbal) hafızadaki azalmayı önlediği belirtilmiştir (43, 46). Yapılan deneysel çalışmalarda testosteronun antiepileptik etkilere sahip olduğu ortaya konmuştur (47).

Testosteronun kalp üzerine koruyucu etkileri bulunduğunu belirten araştırmalar da mevcuttur (48). Yapılan anjiyografik çalışmalarda düşük testosteron seviyesi ile ateroskleroz plaklarındaki artışın paralel olarak seyrettiği görülmüştür (49, 50). Hipotestosteroneminin hipertansiyon, hiperkoagulasyon, hiperfibrinojenemi ve hiperinsülinemi gibi durumlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (50). Bununla birlikte testosteronun fibrinolitik aktiviteyi artırıp fibrinojeni azaltarak koroner arter hastalıklarını önlediği bildirilmektedir (51).

Yaş artışı ve testosteron düşüklüğünün beraber olduğu durumlarda cesaretin azalması, depresif durum, irritabilite, anksiyete ve sinirlilik gibi psikolojik belirtilere ilave olarak motivasyonda azalma ve yorgunluk semptomları ortaya çıkmaktadır (52). Bu gibi durumlarda testosteron replasmanı, semptomları azaltarak kişinin kendini daha iyi hissetmesini sağlar. Depresyonlu hastalarda da testosteron düzeyleri sıklıkla düşük bulunmuştur (53). Ayrıca düşük testosteron seviyeli yaşlı erkeklerde eklem ve kas yakınmaları, terleme, sıcak basması, uyku ihtiyacında artış, uyku bozuklukları, kuvvette azalma ve kendini iyi hissetmeme gibi somato-vejetatif belirtiler ön plana çıkmaktadır. Bunlara hafıza ve konsantrasyon güçlüğü de eşlik eder. Vücuttaki yağ oranı artarak, kardiyovasküler hastalık riski fazlalaşır. Kemik kitlesindeki kayba bağlı olarak osteoporoz gelişimi de görülür (52, 54). Ereksiyonda zayıflama, orgazm olamama, ejakulat volümünde düşüklük ve libido azalması ortaya çıkan cinsel sistemdeki belirtilerdir (55).

1.2.4. Antioksidan Etkileri

Testosteronun hipokampus'ta, β amiloid toksisitesi ve oksidatif stresin yapmış olduğu nöron ölümünü azalttığı bildirilmiştir (47). Ayrıca, beyinde kronik etanol alımı ile oluşan n roflamentlerin kaybını önleyerek, etanolün indüklemiş olduğu oksidatif strese karşı koruyucu bir özellik göstermektedir (56). Oksidatif stresin neden olduğu hücre kaybı sırasında anahtar bir rol oynayan glutatyon peroksidaz, apoptozisin regülasyonunu sağlar. Testosteron ise hipokampus dokusunda glutatyon peroksidaz seviyesini artırarak oksidatif stresin neden olduğu hasarı azaltır (57). Katalaz enzimi reaktif oksijen türlerine karşı defansta, detoksife enzim olarak önemli bir rol oynar. 10^{-5} molar konsantrasyonda verilen testosteron, beynin bazı bölgelerinde katalaz aktivitesini artırarak bu defansa katkıda bulunur (58). Testosteron; prostat, pankreas gibi bazı dokularda oksidatif stres ile ilişkili olan superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz enzim seviyelerini de düzenler (59).

1.3. Apoptozis

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda fonksiyonel işlevi bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Embriyo döneminden itibaren başlar ve yaşam boyu devam eder (60). Apoptozis Yunanca'da apo:(ayrı) ve ptosis:(düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmuş yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir (61, 62). Çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlar sonucu ortaya çıkar. Embriyonal ve fetal gelişimde, yaşlılıkta, hormon azalmasına bağlı involüsyonda, hücrenin hasarlarında ve immün reaksiyonda oluşabilmektedir (61-64).

Apoptozis nekrozdan farklıdır. Homeostazı koruyan bir süreç olan apoptozis genlerle düzenlenir. RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyar. Nekroz ise inflamasyon yanıtının geliştiği patolojik hücre ölümüdür. Nekrozda ATP miktarı azalır, hücre homeostazı hızla bozulur (62).

1.3.1. Apoptozisin Homeostazis İçindeki Yeri

1. Metamorfoz veya yaşlanma sonucu fonksiyonlarını yitirmiş hücrelerin ortadan kaldırılması,
2. Endometrium, prostat ve meme dokusu hücrelerinde hormona bağımlı involüsyon,
3. Gastrointestinal sistem hücreleri veya deri gibi sürekli çoğalan hücre gruplarının azaltılması,
4. İmmün hücrelerinin seçimi.

1.3.2. Apoptozisin Patolojik Süreçlerdeki Rolü

1. Tümörün büyümesi ve regresyonunda hücre ölümü,
2. Hormona bağımlı dokularda patolojik atrofi,
3. Karaciğer, pankreas, tükürük bezi gibi parenkimatöz organlarda duktus tıkanmasına bağlı patolojik atrofi,
4. Sitotoksik T lenfositleri ile oluşturulan hücre ölümü,
5. HCV, Adenovirüs infeksiyonları gibi bazı viral hastalıklarda hücre ölümü,
6. Hipoksi, radyasyon gibi çeşitli zedeleyici etkenlerle oluşan hücre ölümü (60-62, 65).

Apoptotik süreç esnasında, hücrede bir çok morfolojik değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler; hücrelerin küçülmesi, büzülmesi, kromatin yoğunlaşması,

nüklear piknoz ve parçalanma, sitoplazmik tomurcuklanma ve apoptotik cisimciklerin oluşumu ile karakterizedir (60, 61, 63).

1.3.3. Apoptotik Süreçteki Hücre Ölümü Aşamaları

- Apoptozisin başlatılması,
- Hücre içi proteazların aktivasyonu,
- Hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler,
- Fagositoz (61, 64).

1.3.3.1. Apoptozisin Başlatılması

Hücre içi ve hücre dışından kaynaklanan sinyaller apoptotik süreçte etkili olur. Bu uyarılar sonucu hücrede, ilgili genetik mekanizma harekete geçer ve apoptozis başlar. Hücre içinden kaynaklanan sinyaller metabolizma ve siklus bozuklukları, hücre içi kalsiyum miktarının artışı, pH değişiklikleri gibi etkilidir. Ultraviyole ışınları, hipoksi, ısı değişiklikleri, viral ve bakteriyel hastalıklar, glukokortikoidler, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve toksik maddeler gibi hücre dışından gelen sinyaller de hücrede DNA hasarına yol açarak apoptozise neden olur (60-62, 64, 65).

1.3.3.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

Hücre içerisinde bulunan proteazlara kaspaz (caspase: cysteine containing aspartate specific proteases) adı verilir. Kaspazı aktive eden, hücre içi veya hücre dışı kaynaklı apoptotik sinyallerdir. Sayıları toplam 14 olan kaspazlar; Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 10), öldürücü kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) ve sitokin olgunlaşmasından sorumlu kaspazlar (kaspaz 1, 4, 5, 13) olarak üç sınıfa ayrılır (62, 63, 66, 67).

Apoptozisde önemli rol oynayan hücre içi organel mitokondridir. Sitotoksik ajanlar ve oksidatif hasar gibi hücre içi ve hücre dışı etkiler sonucu mitokondrial yol aktive olur. Böylece mitokondri membranlarından sitoplazmaya doğru sitokrom c salınır. Sitokrom c, bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'in (Apoptotic Protease Activating Factor 1) aktivatörüdür. Sitokrom c'nin Apaf-1'e tutunması prokaspaz-9'u aktive ederek "apoptozom" adı verilen kompleksin oluşmasına neden olur. Meydana gelen apoptozomlar ise, kaspazları aktive ederek apoptozise yol açar (61, 62, 65-69).

1.3.3.3. Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler

Kaspazların aktin proteinini yıkması sonucu hücre normal şeklini kaybeder. DNA endonükleaz'ın yıkılması DNA kırıklarına neden olur. Sonuçta hücre membranının yapısı bozulur (61, 62, 64, 68). Hücre su kaybederek büzülür ve yüzeyinde kraterler oluşur. Daha sonra küçük cisimciklere (apoptotik cisimcik) parçalanır. Bu cisimcikler membranla kaplı olup değişik sayıda nukleuslara sahiptir (61, 64).

1.3.3.4. Fagositoz

Oluşan apoptotik cisimcikler, çevredeki fagositler tarafından hızlıca ortadan kaldırılarak dokudan temizlenir. Apoptozis esnasında inflamasyon oluşmaz (60-65, 68).

1.3.4. Apoptozisin Regülasyonu

Hücrelerdeki apoptozisin düzenlenmesi mitokondri aktivasyonu ile sağlanmaktadır. Aktivasyona yol açan en önemli faktör, Bcl-2 molekülleri ailesidir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri bulunan bu moleküllerin mitokondri üzerindeki etkileri sonucu, ya sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi gerçekleşir (apoptozisin başlaması) ya da sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi baskılanır (apoptozisin inhibisyonu). Apoptozisi önleyen anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri; Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w, Boo, Mcl-1 iken, pro-apoptotik olanlar ise; Bax, Bak, Bok, Bad, Bim, Bik, Blk, Brk, Hrk, Bcl-X_s, Bid'dir (62-64, 67-69). Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge sitokrom c'nin salınmasını belirler. Bcl-2, Bax'ın mitokondrial membrana tutunmasını engelleyerek, sitoplazmaya olan sitokrom c salınımını inhibe eder ve apoptozis engellenir. Bax'ın mitokondrial membrana tutunduğu durumlarda, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı aktive olur ve apoptozis oluşur (62, 69).

Santral sinir sistemi hasarında apoptozisin ve nöronal yıkıma cevabın göstergesi, Bax, Bcl-2, p53 ve Fos proteinlerindeki değişikliklerdir. Bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranı hücrenin yaşayabilirlik durumu hakkında bilgi verir. Bax/Bcl-2 oranındaki değişiklikler apoptozisin seyrini belirler. Bu oranın artışı apoptozisin aktivasyonuna, azalışı ise apoptozisin inhibisyonuna neden olur. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir (69, 70).

1.3.5. Apoptozis Hızının Bozulduğu Hastalıklar

a. Nörodejeneratif hastalıklar: Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda, hücre ölümüne neden olan apoptozisin nasıl başladığı henüz bilinmemektedir. Apoptozis mekanizmasının aydınlatılması, bu hastalıkların tedavisi açısından yararlı olacaktır. Lenfoid hücreler ve periferik sinir sisteminde detaylı olarak çalışılan apoptozis mekanizması, santral sinir sistemi için karakteristik morfolojik değişimler ve gene bağımlı DNA fragmanları açısından uygun değildir. Bu yüzden santral sinir sistemindeki apoptozis mekanizmasının detaylı incelenmesi ve yeni modeller geliştirilmesi gereklidir (64, 71).

b. Malign hastalıklar: Hücre proliferasyonunun aşırı ve kontrolsüz olduğu bu hastalıklarda, hücreler zamanı gelince apoptozise gitmeden daha uzun süre yaşar. Bu hücreler, mutasyonların etkisiyle malign hücrelere dönüşebilir.

c. Viral enfeksiyonlar: Sitotoksik T-lenfositleri immun sistemin önemli bir komponentidir. Bu lenfositler apoptozisi indükleyerek virüsle enfekte olmuş hücreleri öldürür (64).

d. Sitokin yetersizliğine bağlı olarak T ve B-lenfositler apoptozise gidebilir. HIV enfeksiyonu sonucu $CD4^+$ T-lenfositler apoptozisle ölmektedirler (60).

1.3.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

1. Hücrenin morfolojik incelenmesi: Işık mikroskobu, elektron mikroskobu, faz kontrast mikroskobu, floresan mikroskobu / lazerli konfokal mikroskop.

2. İmmunohistokimyasal yöntemler.

3. Biyokimyasal yöntemler: Sitoplazmik biyokimyasal aktivasyonu tespit eden testler (kaspaz yıkım ürünleri, kaspaz aktivitesi).

4. İmmunolojik yöntemler: DNA kırılması gen analizi, DNA kırılmasının in situ olarak teşhisi (tek ve çift zincirli DNA boyayan antikolar).

5. Moleküler biyoloji yöntemleri: Mitokondrial fonksiyon bozukluğunu, kromatin ve çekirdeğin segmentasyona uğramasını tespit eden tetkikler kullanılır (61, 63, 64, 68).

1.4. İmmunohistokimya

1.4.1. Genel Bilgiler

İmmunohistokimya; temel olarak işaretlenmiş antikor ile antijen birleşmesi reaksiyonudur. Çok duyarlı ve özgün bir boyama yöntemidir. Hücre veya dokularda yer alan bir molekülün tespit edilmesi için bu moleküle karşı hazırlanan işaretli antikorların ışık veya elektron mikroskobu düzeyinde gösterilmesi esasına dayanır. Belirlenmesi çok zor olan protein ve enzim gibi yapılar, immunohistokimyasal teknikler sayesinde gösterilebilmektedir. Bu tekniğin dezavantajı kullanılan maddelerin kısa ömürlü olması ve saklama koşullarına dikkat edilmediği takdirde bozulmasıdır (72-74).

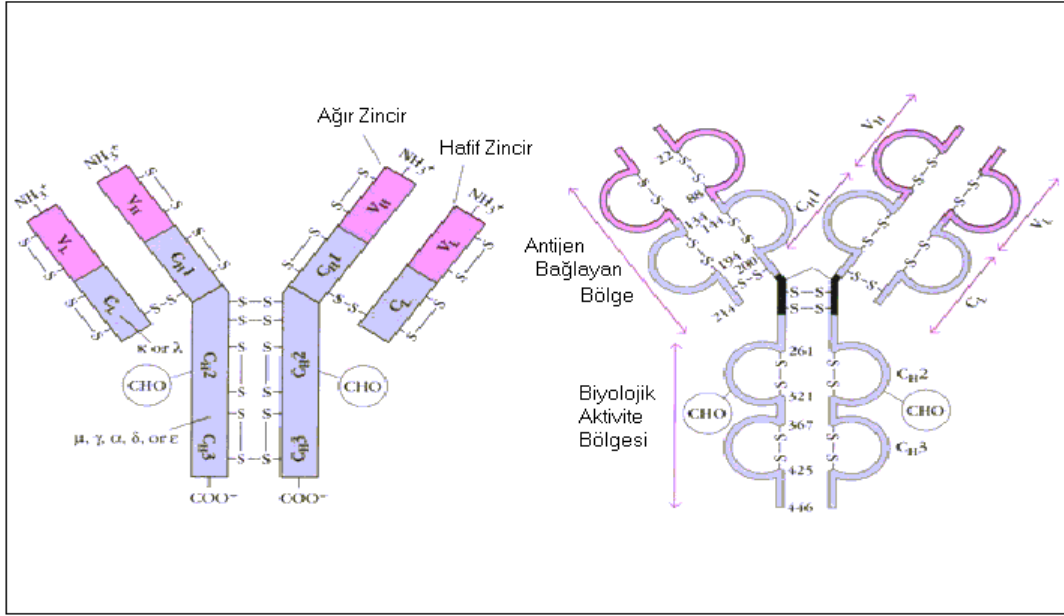
İmmunohistokimyasal çalışma, ilk olarak 1941 yılında floresan boyayla birleştirilmiş antijen-antikor kompleksinin dokuda gösterilmesiyle başlamıştır. Çok hassas olan bu yöntemde, doku ve hücre elemanlarının lokalizasyonu kolaylıkla yapılabilmektedir. Ancak spesifik olmayan zemin boyanması, çapraz reaksiyon gelişmesi, yalancı pozitiflik bu tekniğin uygulanmasında karşılaşılan zorluklardır (2, 74).

1.4.2. İmmunohistokimyada Kullanılan Antikorlar

İmmunohistokimyasal boyamanın temel elemanı olan antikor molekülü karmaşık bir yapıya sahiptir. Antikorlar “Y” harfi şeklinde iki zincirden oluşur. Y’nin kısa bacakları antijene bağlanırken, uzun bacağı ise komplemana bağlanır. Bu boyamada poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki tür antikor kullanılır (73-75).

Poliklonal antikorlar farklı hücreler tarafından üretilir ve bir antijen üzerinde farklı bölgelere bağlanır. Genellikle tavşanlardan elde edilir. Çok sayıda antikor içerdiklerinden dolayı, dokular için yeterince spesifik değildirler (73-75).

Monoklonal antikorlar belirli bir klona ait oldukları için antijen üzerindeki özel bir epitop ile reaksiyona girer. Sadece farelerden elde edilir. Poliklonal antikora göre avantajlı yönleri vardır. Bunlar; nonspesik antikorların bulunmayışı, yüksek homojenlik, parçalar ve bütün arasında varyasyonun olmamasıdır. Üretiminde karşılaşılan zorluklar, fiksasyon işleminde epitopun etkilenmesi, monoklonal antikorlar için dezavantajlardır (74, 75) (Şekil 8).



Şekil 8. Monoklonal antikorun yapısı.

1.4.3. İmmunohistokimya Metodları

İmmünoenzimatik ve immünfluoresan olmak üzere iki temel boyama metodu vardır.

1.4.3.1. İmmünoenzimatik Boyama Metodları

Bu yöntemde reaksiyon sonucunu görmek için işaretli enzimler kullanılır. Enzimlerin renklendirilmiş reaksiyon ürünleri, mikroskopta antijen-antikor kompleksinin immün reaksiyonu sonucu olarak gözlenir. Alkalen fosfatase, β -galaktozidaz, glikoz oksidaz, horse-radish peroksidase (HRP) en sık kullanılan enzimlerdir. Dokuda veya hücrede bulunan antijen konsantrasyonunun fazla olması, boyanmanın daha da koyu olmasına neden olur (73, 74).

Direkt ve indirekt olmak üzere başlıca iki immünoenzimatik boyama metodu vardır. Alınan dokunun özelliği, araştırmacının gereksinimi, duyarlılık derecesi, inkübasyon süresi ve maddi olanaklar tercih edilecek yöntemi belirleyen kriterlerdir (73).

1. Direkt Yöntem: Bu yöntemde, bir antijen doğrudan işaretli olan ilgili antikora bağlanır. Tek bir antikor kullanıldığı için çok düşük boyanmalar görülebilir. Kullanımı giderek azalmaktadır (73).

2. İndirekt Yöntem: Bu boyama metodunda, işaretlenmemiş primer antikor antijene bağlanır. İşaretlenmiş olan sekonder antikor, primer antikor-antijen kompleksini antijen olarak kabul eder ve bu komplekse bağlanır. Daha sonra bu ikili antikor yapısının üzerine substrat-kromojen solüsyonu ilave edilir. Primer antikor ve sekonder antikoru elde edildiği immunglobulin uyumlu olmalıdır. Doku ve antikor uyumsuzluğu, reaksiyonun gerçekleşmemesi, sonucu olumsuz şekilde etkiler (73, 74).

İndirekt yöntem, direkt yönteme göre daha fazla tercih edilir. Duyarlılığı daha fazladır. Birden fazla sekonder antikorla birleşmenin olabilmesi, indirekt yöntem için avantajdır. Kullanılan maddeye göre bu yöntem üçe ayrılır:

a- Avidin-Biyotin Yöntemi (ABC Metodu): Avidin, yumurta akından elde edilen bir glukoproteindir. Karaciğerde bulunan vitaminlerden olan biyotine karşı yüksek bir afinitesi vardır. ABC Metodu bu afiniteden yararlanılarak yapılan bir yöntemdir. Duyarlılığı diğer metodlara göre daha fazladır. Biyotinli sekonder antikoru üzerine peroksidaz enzimiyle işaretli avidin-biyotin kompleksi ilave edilir. Daha sonra substrat-kromojen solüsyonu eklenerek doku antijeni görünür hale getirilir (74, 76) (Şekil 9).

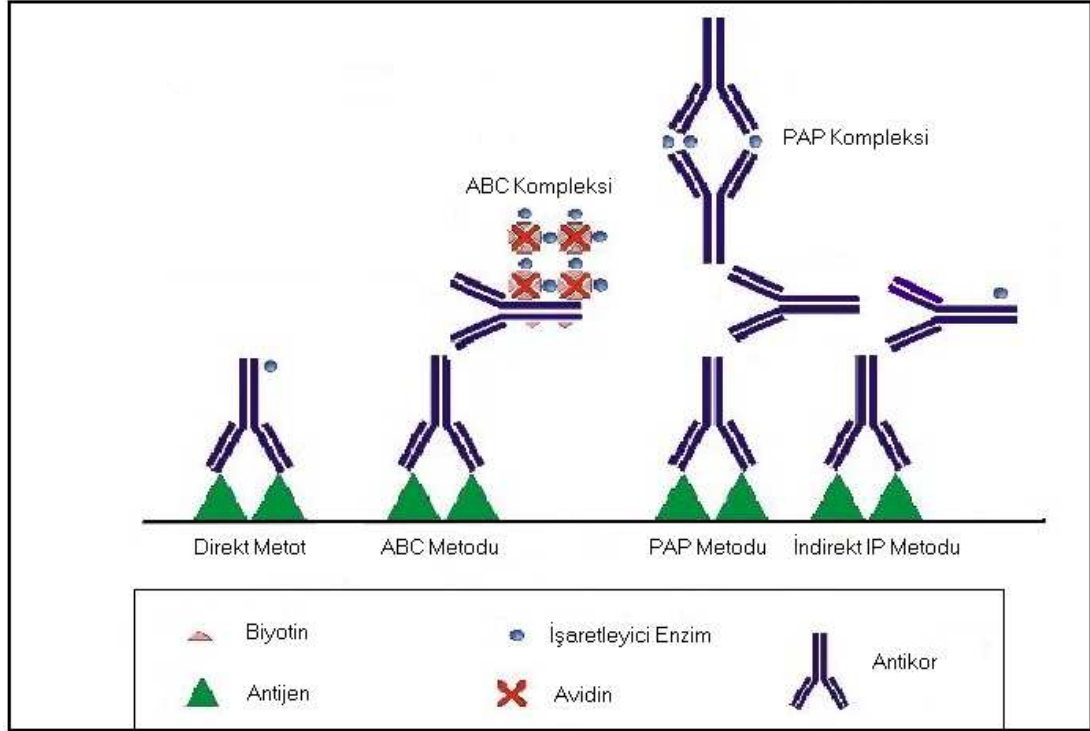
b- Enzim-Antienzim Kompleks Yöntemi (PAP Metodu): İşaretsiz antikor metodu olarak bilinen bu yöntemde, sekonder antikoru üzerine çözünebilirliği yüksek olan enzim-antienzim immun kompleksi ve substrat-kromojen solüsyonu ilave edilir. Enzim-antienzim kompleksleri peroksidaz-antiperoksidaz (PAP), alkalın fosfataz-antialkalın fosfataz (APAP), glikoz oksidaz-antiglikoz oksidaz (GAG) şeklinde olabilir. En sık peroksidaz-antiperoksidaz kompleksi kullanılır (73, 74) (Şekil 9).

c- İndirekt İmmunoperoksidaz Yöntemi: Doku antijenine bağlanmış olan primer antikor üzerine peroksidaz taşıyan sekonder antikor eklenir. Oluşan bu yapı üzerine substrat kromojen bileşiği ilave edilir (73, 74) (Şekil 9).

1.4.3.2. İmmunfluoresan Boyama Metodları

Bu yöntemde, antikora bağlamak için fluoresan bir madde (fluorokrom) kullanılır. Bu madde yüksek oranda kısa dalga ışınlarını absorbe edebilme özelliğine sahip olmalıdır. Fluorokrom için uygun filtreler kullanılır. Fluoresan mikroskop

altında ortaya çıkan mavi, yeşil ve kırmızı renklere göre değerlendirme yapılır (72, 74).



Şekil 9. İmmünoenzim boyama metotları (ABC Metodu, PAP Metodu ve İndirekt İP indirekt boyama metotlarındandır).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulamalar

Çalışmamızda Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin edilen erişkin, 230-250 gr ağırlığında, Wistar-Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar üç gruba ayrılarak uygulama başlatıldı.

Grup I. Kontrol (sham-orşidektomi) grubu (n=7): Bu gruba ait deney hayvanları rompun (5 mg/kg) ve ketamin (60 mg/kg) kombinasyonu ile genel anestezi altına alındı. Scrotum üzerindeki raphe scroti'ye bir ensizyon yapılarak testislere kadar bütün katmanlar geçildi. Daha sonra herhangi bir cerrahi işlem yapılmadan bölge tekrar kapatıldı.

Grup II. Orşidektomi grubu (n=7): Rompun/ketamin kombinasyonu ile genel anestezi altına alınan sıçanlara cerrahi olarak orşidektomi yapıldı.

Grup III. Orşidektomi + Testosteron propionat grubu (n=7): Bu gruba ait deney hayvanlarına genel anestezi altında cerrahi olarak orşidektomi yapıldı. Orşidektomiden iki hafta sonra her gün 0,1 ml susam yağı içinde 0,5 mg/kg dozunda subkutan testosteron propionat verildi. Uygulama dozuna 1 ay süreyle devam edildi.

Bir aylık deney süresi sonunda tüm sıçanlar dekapite edilerek öldürüldü. Hayvanlara ait hipokampus doku örnekleri çıkartılarak immunohistokimyasal ve biyokimyasal incelemeler için kullanıldı.

2.2. Deney Hayvanlarının Bakımı

Uygulama süresince sıçanlar oda sıcaklığında (22 ± 2 °C) ve %40-50 nem oranında tutuldu. Işık düzeni ise 12 saat gündüz, 12 saat gece olacak şekilde ayarlandı. Özel olarak yaptırılan kafeslerde beslenen sıçanlara yemler çelik kaplarda, su (çeşme suyu) cam biberonlarda verildi. Hayvan yemleri Yem Sanayii T.A.Ş. Elazığ Yem Fabrikasında hazırlandı (Tablo 1).

Tablo 1. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi (g/kg).

Buğday	150
Mısır	100
Arpa	270
Kepek	80
Soya	294
Balık Unu	80
Tuz	6
Kavimix VM 23-Z *	2
Methionin	2
DCP **	16

*1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0.8 mg K₃, 0.8 mg B₁, 2.4 mg B₂, 1.2 mg B₆, 0.006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3.2 mg Cal. D. Panth., 0.32 mg Folic acid, 0.02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0.8 mg I, 0.2 mg Co, 0.06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

**%18 fosfor, %25 kalsiyum, %0.2 flor'dan oluşur.

2.3. Histolojik Çalışma

Deney sonunda gruplarda bulunan tüm sıçanlar dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların beyinleri çıkarıldı. Alınan beyinler %10'luk formaldehit solusyonunda tespit edildi. Sol ve sağ beyin yarım küreleri 1-2 mm kalınlığında parçalara ayrıldı. Yıkama işlemi yapılan kesitler, histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 2). Histolojik takip sonrası dokular, parafin bloklara (Sigma–paraplast embedding media, Stenheim, Germany) gömüldü. Mikrotomda 5µm kalınlığında kesitler alınarak Hemotoksilen-Eosin (HE) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX-50 araştırma mikroskopunda incelendi. Önce küçük büyütme (X10 büyütme objektifinde) ile hipokampus incelendi. Sonra stereotaksik atlas yardımı ile kesit seviyeleri ve CA1, CA2, CA3 alanları tespit edildi. Daha sonra büyük büyütme alanında (X40 büyütme objektifinde) hipokampus'ta piramidal

hücre tabakası saptandı. Bu tabakada bulunan piknotik hücreler X40 büyütme objektifinde, Eyepieces graticule (1 mm² alanında 100 eşit parçadan oluşuyor) yardımı ile sayıldı.

Tablo 2. Histolojik takip serileri.

Sıra No	Kullanılan Madde	Kimyasal Bekletilme Süresi
1	%70 Alkol	2 saat
2	%80 Alkol	1.5 saat
3	%96 Alkol I	30 dakika
4	%96 Alkol II	30 dakika
5	%100 Alkol I	30 dakika
6	%100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	30 dakika
9	Xylol II	30 dakika
10	Yumuşak Parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak Parafin	1 saat
12	Y. Parafin + Sert Parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat

2.4. İmmunohistokimyasal Çalışma

Parafin bloklarda gömülü olan hipokampus dokularından 5µm kalınlıkta kesitler alınarak, poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine yerleştirildi. Daha sonra lamalar immunohistokimyasal olarak boyandı. İmmunohistokimyasal boyamada Avidin-biyotin-peroksidaz boyama yöntemi (*ABC Metodu*) kullanıldı. Primer antikor olarak Bax monoklonal IgG₁ kullanıldı (Tablo 3).

Bu işlemler sonunda boyanan hipokampus doku kesitleri, Olympus BX50 araştırma mikroskobu ile değerlendirildi. İmmunohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanma yoğunluğu ve şiddeti esas alındı. Bu gözlemler sayısal olarak 0'dan +6'ya kadar numaralandırıldı (Tablo 4).

Tablo 3. İmmunohistokimyasal boyama prosedürleri.

Sıra	İşlem	Süresi
1	Deparafinizasyon	1 saat
2	Distile su	5 dakika
3	Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)'de (pH: 7.6)	5 dakika
4	%3'lük H ₂ O ₂ 'de	5 dakika
5	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
6	Primer antikör (Bax) –oda ısısında	30 dakika
7	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
8	Sekonder antikör	30 dakika
9	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
10	Streptavidin peroksidaz	30 dakika
11	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
12	AEC Kromojen	10 dakika
13	Distile su	5 dakika
14	Zıt boya olarak Mayer's hematoxilen	1 dakika
15	Akarsuda	1 dakika
16	Kurulama	
17	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Tablo 4. İmmunohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecesi.

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Minimal
+2	Az
+3	Orta
+4	Çok
+5	Şiddetli
+6	Çok şiddetli

2.5. Biyokimyasal Ölçümler

Biyokimyasal analizler için alınan hipokampus doku örnekleri alüminyum folyoya sarılarak plastik kaplara konuldu. Kuru buzda dondurulan bu örnekler, -85°C derin dondurucuda (Nuair -85°C Ultralow Freezer-Japonya) biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana kadar saklandı. Derin dondurucudan çıkarılan hipokampus dokuları bir bistüri yardımıyla küçük parçalara bölündü ve cam tüplere aktarıldı.

Hipokampus dokularının üzerine soğuk 2 ml Tris-HCL tamponu eklendi (pH 7.4, 0.2 mM Tris-HCL tamponu; 0.2 mM olarak hazırlanan Tris solusyonu ve HCL solusyonu 50/39.9 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı). Tüm çalışmalarda bu tampon kullanıldı. Daha sonra dokular soğukluğu muhafaza edilerek homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 16000 rpm'de 2 dakika homojenize edildi. Homojenat üzerine 4 ml daha tampon ilave edildi ve 1 dakika süreyle tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenat 5000xg'de 1 saat (+4 °C'de) santrifüjlenerek süpernatant elde edildi ve analiz zamanına kadar (1 hafta) -40 °C'de bekletildi. Elde edilen süpernatanda, antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile oksidatif hasarın bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) değerleri spektrofotometrik olarak tayin edildi.

SOD tayini: Süperoksit dismutaz enzim değerleri Sun ve arkadaşlarının (77) modifiye ettiği metotla belirlendi. Bu metodun prensibi nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantinoksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Çalışmamızda SOD aktivitesi ünite/gram (U/g) doku proteini olarak ifade edildi.

GSH-Px tayini: Glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının (78) metoduna göre çalışıldı. GSH-Px, hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi, NADPH'nin NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplandı ve ünite/gram (U/g) doku proteini şeklinde belirtildi.

MDA tayini: Lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu uygulanarak yapıldı (79). Tiyoarbutirik asit ile 90-95 °C'de reaksiyona giren

malondialdehit, pembe renkli kromojen oluşturmaktadır. On beş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorbansları 532 nm’de spektrofotometrik olarak okundu. Sonuçlar nmol/g doku proteini olarak ifade edildi.

2.6. İstatistiksel Analiz

Biyokimyasal parametre (SOD, GSH-Px, MDA) sonuçları ile piknotik hücre sayılarının analizi için “SPSS 9.05 for windows” istatistik programı kullanıldı. Grupların değerleri “*Kruskal-Wallis Varyans Analizi*” ile karşılaştırıldı. Farkın hangi grup/gruplardan kaynaklandığını bulmak için “*Mann-Whitney U Testi*” uygulandı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma (Ss) şeklinde tabloya geçirildi.

3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal Bulgular

Sıçanlara ait hipokampus doku örneklerinde, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim değerleri ve malondialdehit (MDA) düzeyleri belirlendi.

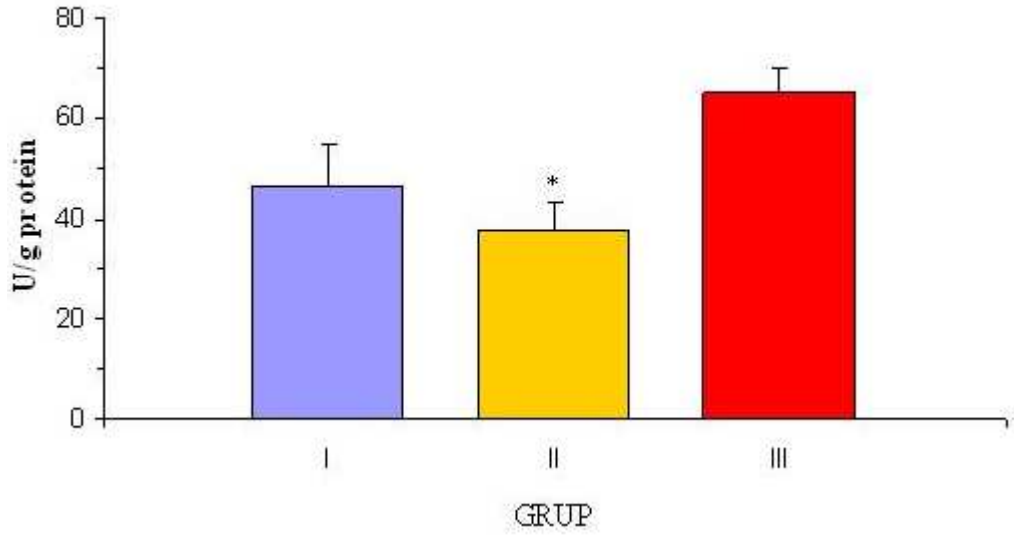
Orşidektomi grubuna ait hipokampus SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olduğu görüldü ($p<0.05$) (Tablo 5, Şekil 10, 11). Oksidatif hasarın bir göstergesi olan doku MDA değerlerinin ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, orşidektomili sıçanlarda anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi (Tablo 5, Şekil 12). Orşidektomi sonrası testosteron uygulanan gruba ait biyokimyasal veriler incelendiğinde ise, SOD ve GSH-Px seviyelerin yükseldiği, MDA değerlerinin de düştüğü ortaya kondu ($p<0.05$) (Tablo 5, Şekil 10-12).

Çalışmamızın biyokimyasal bulguları, orşidektomi sonrası hipokampus'ta antioksidan savunma sisteminin bozulduğunu ve oksidatif doku hasarının meydana geldiğini göstermiştir. Ayrıca, dışarıdan uygulanan testosteronun orşidektomiye bağlı olarak ortaya çıkan bu oksidatif hasarı önlediği tespit edilmiştir.

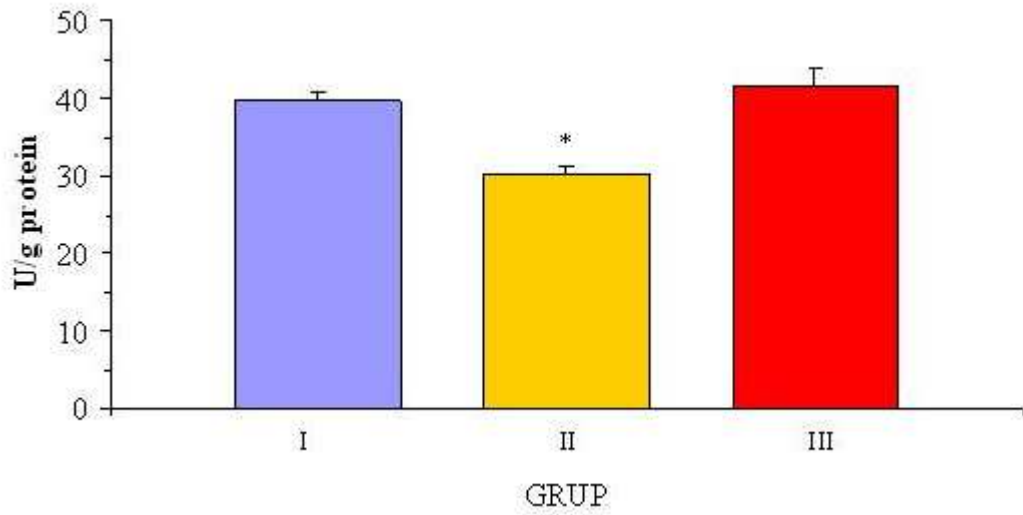
Tablo 5. Gruplara ait hipokampus doku örneklerindeki SOD, GSH-Px ve MDA değerleri (n=7).

GRUPLAR	SOD (U/g protein)	GSH-Px (U/g protein)	MDA (nmol/g protein)
KONTROL	46,50±8,06	39,62±1,29	14,45±1,72
ORŞİDEKTOMİ	37,79±5,40*	30,30±0,83*	21,52±0,69*
ORŞİDEKTOMİ+ TESTOSTERON	65,21±4,71	41,67±2,04	18,62±2,27

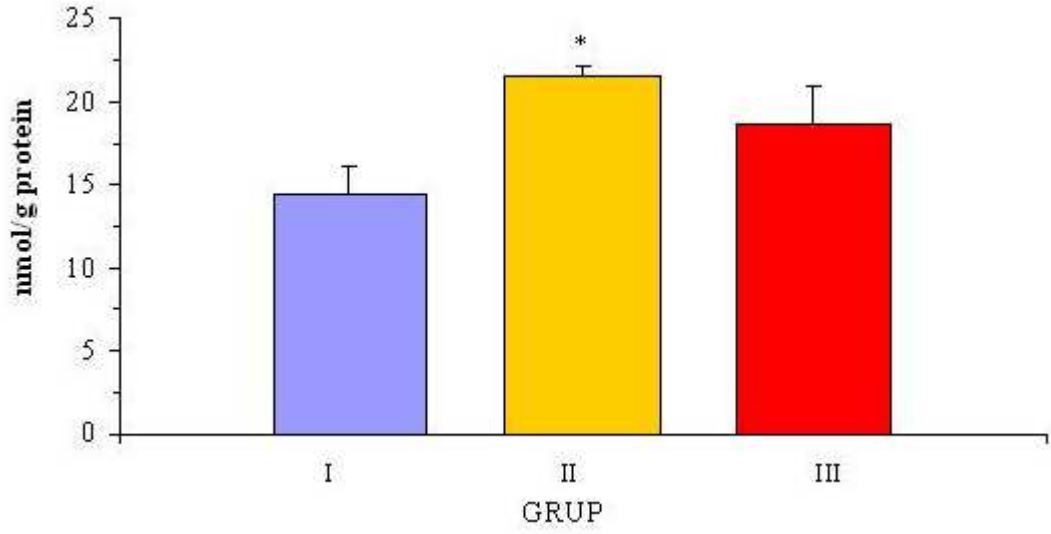
Değerler ortalama $\pm$ Ss şeklinde verilmiştir. * $p<0.05$ (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



Şekil 10. Deney gruplarına ait SOD değerleri (U/g protein). * $p < 0.05$ (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



Şekil 11. Deney gruplarına ait GSH-Px değerleri (U/g protein). * $p < 0.05$ (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



Şekil 12. Deney gruplarına ait MDA değerleri (nmol/g protein). * $p<0.05$ (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).

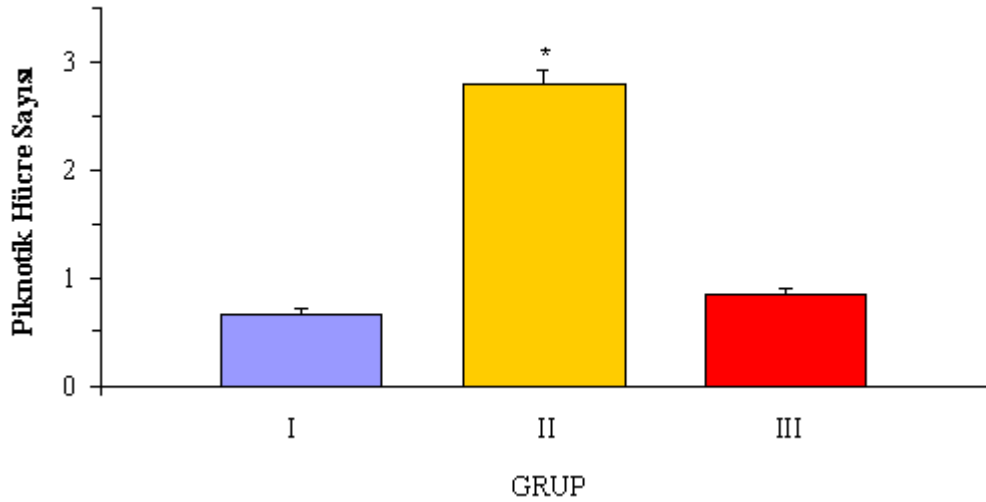
3.2. Işık Mikroskopik Bulgular

Hematoksilen-Eosin ile boyanan preparatlarda hipokampus'un piramidal hücre tabakası X40 büyütmede eyepieces graticule alanında incelendi. Bu alana düşen piknotik hücrelerin ortalamaları alındı. Orşidektomili sıçanlara ait hipokampus doku preparatları incelendiğinde, piknotik hücre sayısının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu görüldü ($p<0.05$) (Tablo 6, Şekil 13-17). Orşidektominin yanı sıra testosteron verilen grupta ise, piknotik hücre sayısının orşidektomili hayvanlara göre azaldığı tespit edildi (Tablo 6, Şekil 13-15, 18).

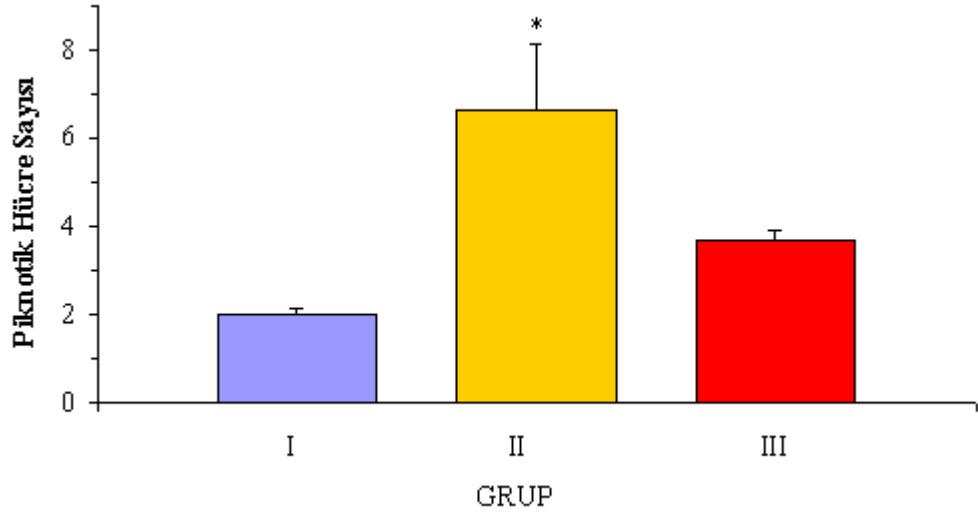
Tablo 6. Gruplara ait hipokampus CA1, CA2 ve CA3 alanlarını içeren piramidal hücre tabakasına ait piknotik hücre sayıları (n=7).

GRUPLAR	CA1	CA2	CA3
KONTROL	0,66±0,02	2,0±0,11	3,50±0,9
ORŞİDEKTOMİ	2,81±0,12*	6,65±1,46*	8,05±1,55*
ORŞİDEKTOMİ+ TESTOSTERON	0,85±0,06	3,71±0,17	4,57±1,25

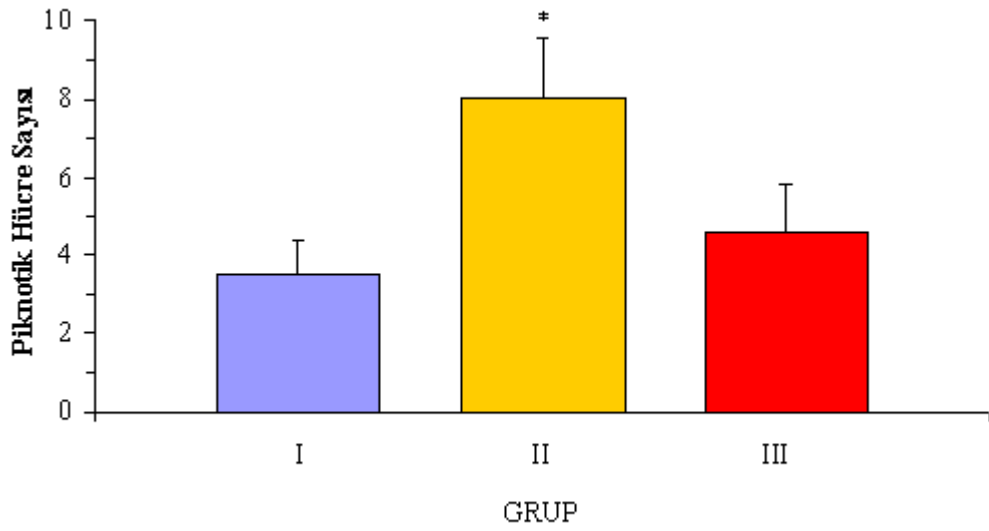
Değerler ortalama $\pm$ Ss şeklinde verilmiştir. *p<0.05 (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



Şekil 13. Deney gruplarına ait hipokampus CA1 alanında bulunan piknotik hücre sayısı. *p<0.05 (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



Şekil 14. Deney gruplarına ait hipokampus CA2 alanında bulunan piknotik hücre sayısı. * $p<0.05$ (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



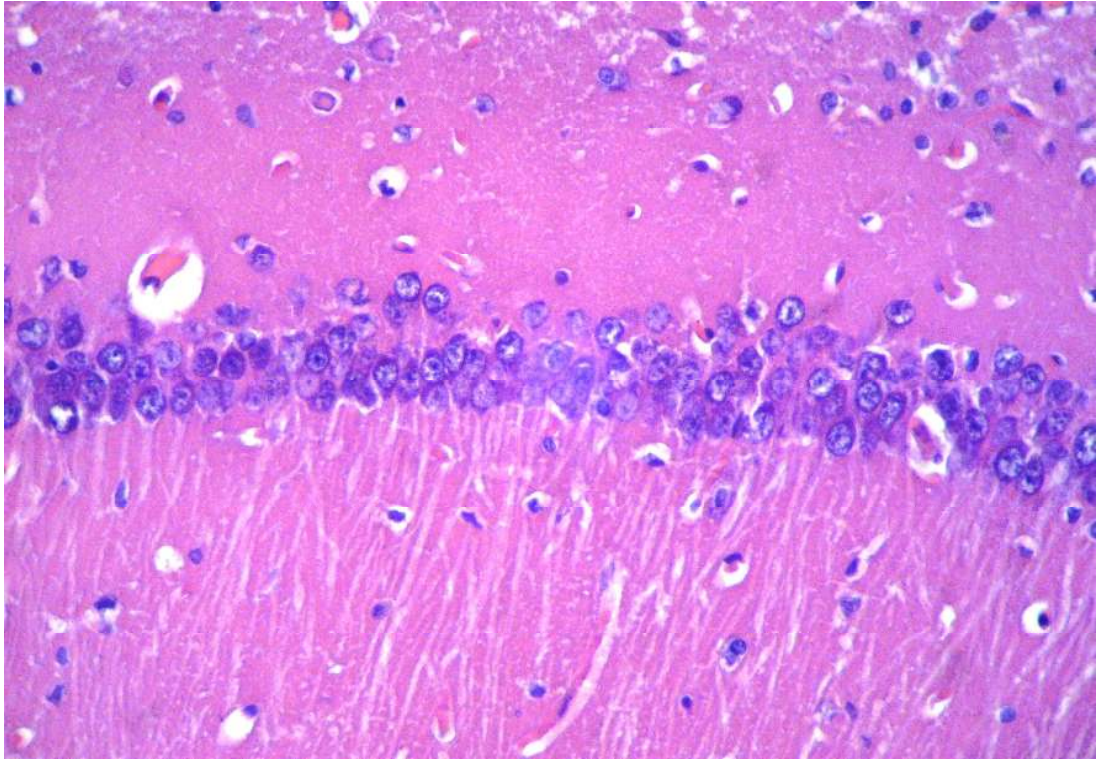
Şekil 15. Deney gruplarına ait hipokampus CA3 alanında bulunan piknotik hücre sayısı. * $p<0.05$ (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).

3.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

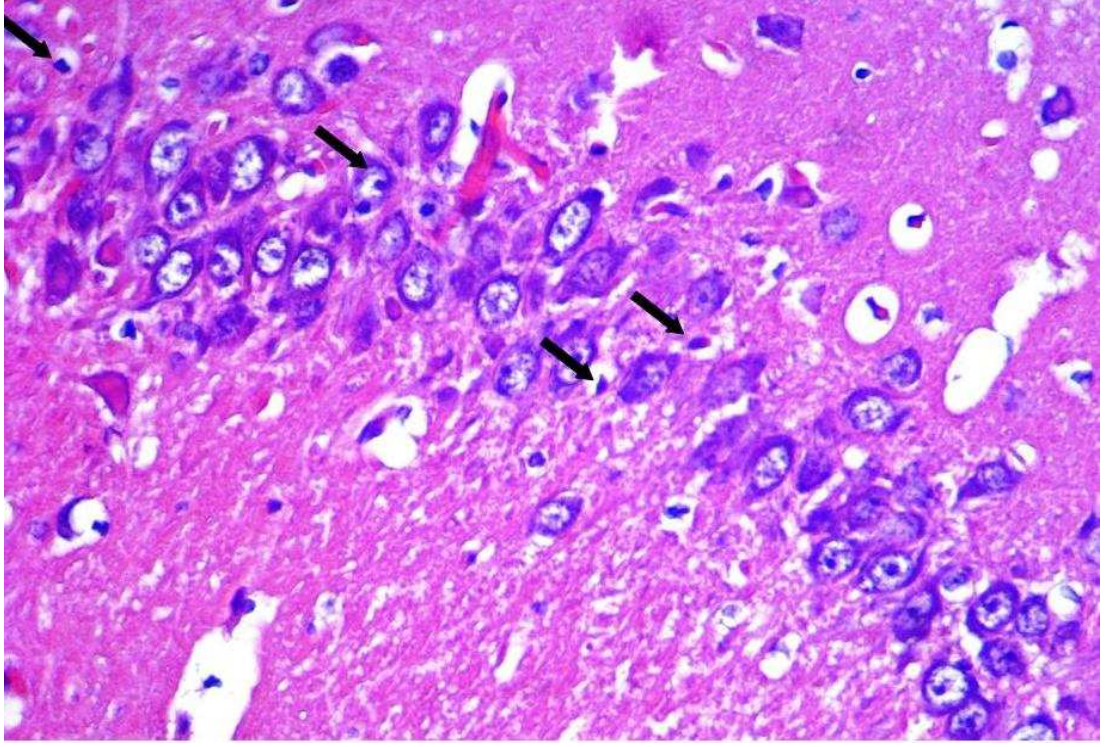
Gruplarda bulunan sıçanlara ait hipokampus doku kesitlerinde immunohistokimyasal Bax boyaması yapıldı. Bax proteini dokuda görünür hale getirilerek incelendi. Bu boyamada saptanan reaksiyonun yoğunluğuna göre değerlendirme yapılarak dokuda meydana gelen apoptozis belirlendi.

Kontrol grubuna ait hipokampus doku örnekleri incelendiğinde, herhangi bir Bax boyanmasının olmadığı (0) gözlemlendi (Şekil 19). Orşidektomi yapılan sıçanlarda ise hipokampus yapısında şiddetli bir şekilde immunohistokimyasal Bax boyanmasının olduğu (+5) tespit edildi (Şekil 20). Orşidektomi sonrası testosteron verilen grupta ise hipokampus'taki Bax boyanmasının minimal derecede olduğu (+1) gözlemlendi (Şekil 21).

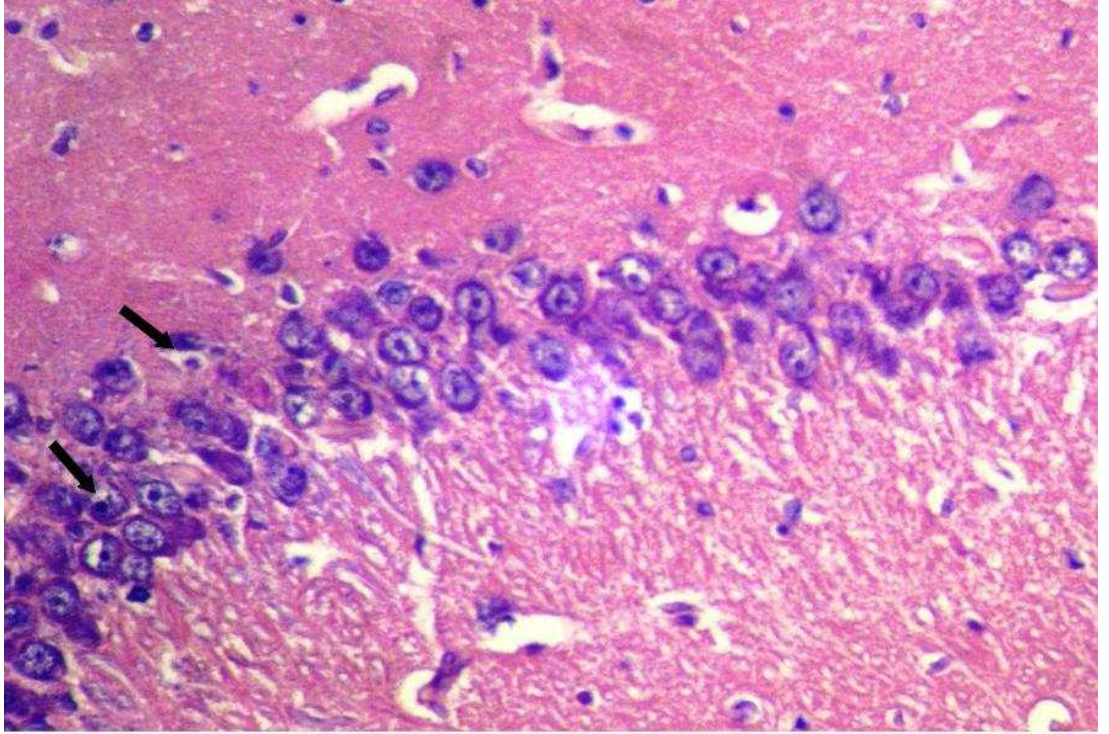
Mikroskopik düzeyde elde ettiğimiz bu sonuçlar, orşidektominin hipokampus'ta apoptozise yol açtığını ve meydana gelen apoptotik değişikliklerin testosteron uygulamasıyla gerilediğini göstermiştir.



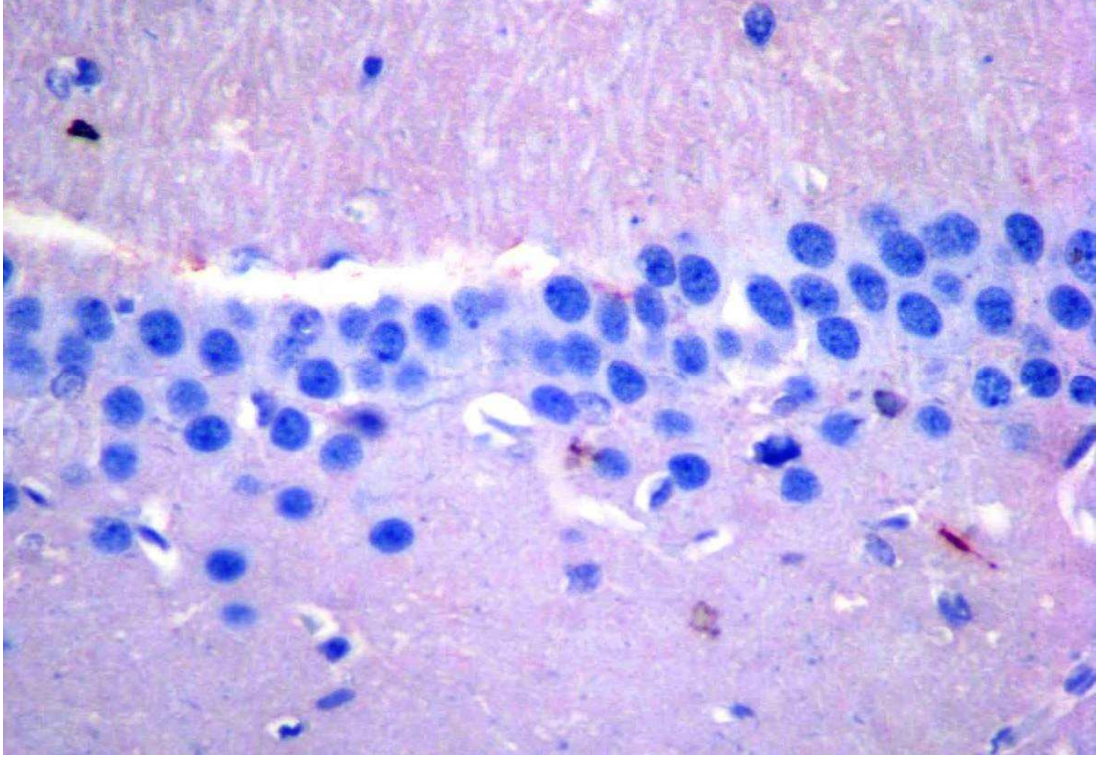
Şekil 16. Kontrol grubuna ait hipokampus CA1 alanından normal bir görünüm (Hematoxylen-Eosin X40).



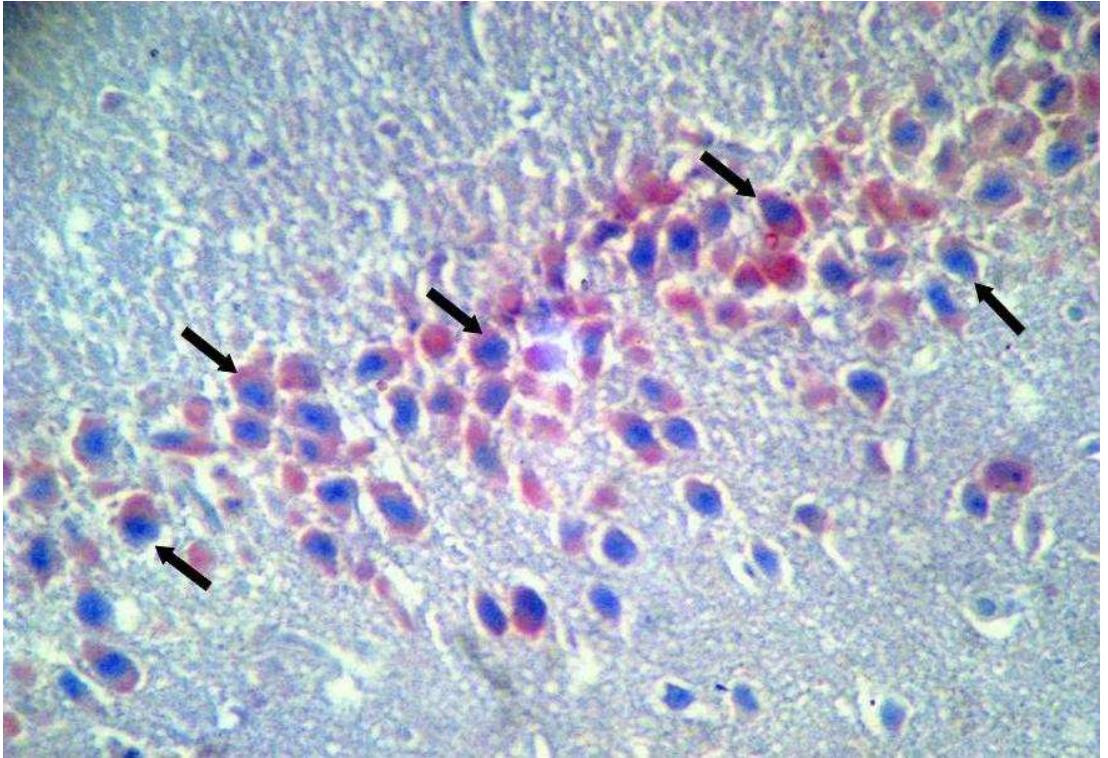
Şekil 17. Orşidektomi grubuna ait hipokampus CA2 alanı incelendiğinde, çok sayıda piknotik hücre (→) görülmekte (Hematoxylen-Eosin X40).



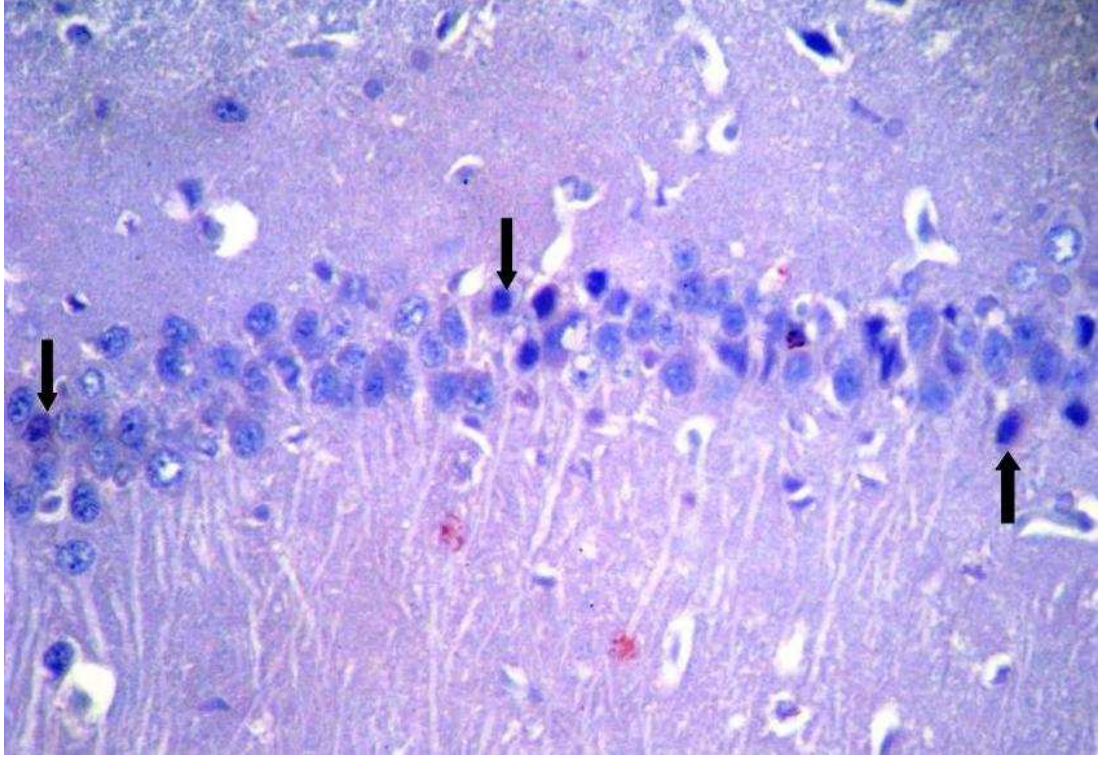
Şekil 18. Testosteron verilen gruba ait hipokampus CA2 alanı incelendiğinde, az sayıda piknotik hücre (→) görülmekte (Hematoxylen-Eosin X40).



Şekil 19. Kontrol grubuna ait hipokampus CA1 alanı incelendiğinde, immunohistokimyasal olarak Bax boyanmasının olmadığı görülmekte. X40.



Şekil 20. Orşidektomi grubuna ait hipokampus CA3 alanında şiddetli derecede (→) Bax boyanmasının olduğu görülmekte. X40.



Şekil 21. Testosteron verilen gruba ait hipokampus CA1 alanında minimal derecede (→) Bax boyanmasının olduğu görülmekte. X40.

4. TARTIŞMA

Erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmada, orşidektomi sonrası hipokampus morfolojik yapısında meydana gelen değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine dışarıdan uygulanan testosteron hormonunun etkileri incelendi. Çalışma öncesi yaptığımız literatür taramalarında bu konu ile ilgili araştırmaların yetersiz olduğu görüldü. Bu nedenle çalışmamızda, immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak, testosteronun hipokampus üzerindeki etkileri özellikle apoptozis yönüyle incelendi. Ayrıca hipokampus doku örnekleri biyokimyasal düzeyde de değerlendirilerek yapılan diğer çalışmalarla beraber karşılaştırıldı.

Normal fizyolojik şartlar veya herhangi bir patolojik süreç sonucu oluşan oksidatif strese karşı canlılarda antioksidan savunma sistemi koruyucu bir rol alır. Hücresel düzeyde etkili olan bu sistemde süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler bulunmaktadır (80).

Yapmış olduğumuz bu araştırmada, orşidektomi sonrası hipokampus doku örneklerindeki SOD ve GSH-Px enzim seviyelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ortaya konmuştur. SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde tespit ettiğimiz bu azalma ise orşidektomi sonrası dokuda antioksidan savunma mekanizmasının bozulduğunu ve oksidatif hasarın oluştuğunu göstermektedir.

Oksidatif strese bağlı olarak oluşan hasarın diğer bir göstergesi de malondialdehit (MDA) seviyesidir. MDA lipid peroksidasyonu sonucu oluşan bir üründür (81). Yaptığımız çalışmada da, orşidektomi yapılan grupta hipokampus MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. MDA düzeyindeki bu artış, orşidektominin lipid peroksidasyon sonucu dokuda oksidatif hasara yol açtığını ortaya koymaktadır.

Son zamanlarda sıçanlar üzerinde yapılmış araştırmalarda gonadektominin, hem antioksidan enzim seviyelerini azalttığı hem de dokularda apoptotik süreci başlatarak hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Klapcinska ve ark'nın periferik dokularda yapmış olduğu çalışmada, gonadektomi sonrası antioksidan savunma sisteminin negatif yönde etkilendiği, antioksidan enzim (SOD, GSH-Px) seviyelerinin azaldığı, lipid peroksidasyon düzeyinin ise arttığı gösterilmiştir (82).

Nöral dokular üzerinde yapılan araştırmalarda ise gonadektomi sonrası antioksidan savunma sisteminin bozulduğu, nöronların sinaptik yoğunluğunun azaldığı ve apoptozis ile hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (83-85). Yapmış olduğumuz araştırmada da, bu sonuçlara benzer veriler elde edilmiştir. İmmunohistokimyasal incelemelerimizde, orşidektomi sonrası hipokampus hücre sitoplazmalarında şiddetli derecede Bax boyanmasının gerçekleşmiş olması orşidektomi sonrası hipokampus'ta apoptozisin meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, ışık mikroskopik incelemelerimizde, hipokampus'un piramidal hücre tabakasında kontrol grubuna oranla daha fazla sayıda piknotik hücrelerin varlığı tespit edilmiştir.

Testosteron hormonu testis interstisyel dokusunda bulunan Leydig hücreleri tarafından salgılanır. Genel olarak, sekonder seks karakterlerinin oluşumundan sorumludur. Ayrıca seksüel gelişim ve davranışlar için gerekli olan organizasyonda rol alır. Nöron koruyucu özelliklere sahip olan testosteron hormonunun aynı zamanda, antioksidan etkileri de bulunmaktadır. Antioksidan savunma sisteminde bulunan enzim seviyelerini düzenlediğı birçok araştırmada gösterilmiştir. Değışik dokular üzerinde yapılan bu araştırmalar, testosteronun antioksidan özelliğı ile oksidatif stres sonucu oluşan doku hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu bildirmektedir. Nöral dokular üzerinde yapılan çalışmalarda, testosteronun antioksidan özelliğı gösterilmiştir. Dışarıdan uygulanan testosteronun doku SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde artışa, MDA seviyelerinde ise azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (86-88).

Yukarıdaki araştırmalara paralel olarak, nöral dokularda oksidatif strese neden olan bazı toksik maddelerin oluşturduğu hasara karşı, testosteronun koruyucu özelliğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Sıçanlarda etanol maruziyetine bağı olarak cerebellum'da oluşan oksidatif hasar ve doku MDA artışının testosteron uygulamasıyla gerilediğı bildirilmiştir. Bununla birlikte aynı dokuda kronik etanol alımının neden olduğu nöroflament kaybının da bu hormon tarafından önlendiğı belirtilmiştir (56). Deneysel olarak yapılan bir diğerk araştırmada da, testosteronun hipokampus GSH-Px aktivitesini arttırdığı ifade edilmiştir (57). Sıçanlar üzerinde yapılan diğerk bir çalışmada ise pankreas hücrelerinde streptozisin uygulamasına bağı olarak meydana gelen apoptozisin testosteron uygulaması ile önlendiğı gösterilmiştir (59).

Yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular ile daha önce gerçekleştirilmiş olan benzer çalışmaların sonuçları arasında bir uyum gözlenmektedir. Araştırmamızda, testosteronun hipokampus dokusunda orşidektomi sonrası düşen SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerini arttırdığı, yükselen MDA seviyesini ise azalttığı ve antioksidan etki gösterdiği ortaya konmuştur.

Yapılan çoğu çalışmada testosteronun nöron fonksiyonları için hayati bir rol oynadığı, normal konsantrasyonlarda (nanomolar düzey) nöronların korunmasını, farklılaşmasını, büyüme ve gelişimini sağladığı vurgulanmıştır (43, 89, 90). Bununla beraber Estrada ve ark'nın yapmış olduğu çalışmada yüksek konsantrasyonlarda (1-10 mikromolar düzey) zararlı etkilere sahip olduğu ve apoptotik süreci başlattığı bildirilmiştir (44). Moleküler seviyelerdeki testosteronun, rat kortikal nöronlarında sinir büyüme faktör reseptörlerinde artışa, Alzheimer hastalığında görülen amiloid beta peptid seviyesinde azalışa neden olduğu gösterilmiştir (91). Bu yüzden düşük düzeylerde, yaşla beraber insanlarda Alzheimer hastalığına yatkınlığın artmasından sorumlu olabileceği belirtilmiştir (43, 92). Bunlara ilave olarak depresyon, anksiyete ve hafıza kaybı gibi durumlarla ilişkili olduğu söylenmiştir. Düşük düzeylerle ilişkili apoptozisin, normal dozunda verilen testosteron replasmanı ile önlendiği, bunlara bağlı semptomların azaldığı görülmüştür (43).

Testosteronun hafıza ve öğrenme üzerine olan etkileri konusunda yakın zamanda birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda hipokampus'un nöronal yapı ve fonksiyonunun testosteron ile değiştiği bildirilmiştir. Gonadektomi sonrası veya androjen miktarının azaltılmasıyla hipokampus CA1 bölgesinde bulunan nöronların sinaptik yoğunluğunda %40-50'ye kadar azalma olduğu tespit edilmiştir. Testosteron ve DHT'nun verilmesi ile bu seviyelerin normale döndüğü görülmüştür. Bu etkinin hipokampus'ta bulunan androjen reseptörleri aracılığı ile gerçekleştiği belirtilmiştir (33, 83, 84). Bu bilgilere uyumlu olarak Wallace ve ark'nın yapmış olduğu çalışmada, overektomi sonrası hafıza performansında önemli derecede azalma olduğu görülmüştür. Bu azalmanın prefrontal korteks ve hipokampus CA1 bölgesindeki piramidal hücrelerin dendritik uzantılarının yoğunluğunun azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hipokampus CA1 bölgesinde bulunan dendritik uzantılarının hafıza fonksiyonu ile ilgili olduğu ve bunlara bağlı olarak hafıza ile

ilgili beyin bölgelerindeki morfolojik değişiklikler sonucu bilişsel bozukluklar meydana geldiği ortaya konmuştur (93).

Barreto ve ark'ı yapmış oldukları çalışmada, testosteronun nöron koruyucu etkisinin bulunduğu mekanizmalar içinde gliosisin kontrolü olduğunu bildirmişlerdir. Beyin gelişimi sırasında testosteronun glial fibriller asidik protein (GFAP), immunreaktif astrosit ve astrogliaların farklılaşmasını etkilediğini, erişkin hipokampus dokusunda ise GFAP'ın baskılanmasını düzenlediğini belirtmişlerdir (42). Testosteron ve metaboliti olan DHT'nun hipokampus ve gyrus dentatus'ta nöroenezisi stimule ettiği (94), N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör bağlantılarını artırarak spinogenezi arttırdığı gösterilmiştir (95). Ayrıca testosteronun, calbindin-D_{28K} adı verilen kalsiyum bağlayıcı bir protein üzerinden nöron ölümünü önlediği belirtilmiştir. Calbindinin santral sinir sistemi gelişimi ve fonksiyonu için önemli olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra nöronlar içerisinde apoptozise karşı koruyucu mekanizma olarak özel bir fonksiyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Düşük seviyeleri Parkinson, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalarda testosteron ve DHT gibi androjenlerin, calbindin-D_{28K} seviyelerini düzenlediği ve buna bağlı olarak apoptozisin neden olduğu hücre ölümünü önlediği ortaya konmuştur (96-99).

Gerçekleştirmiş olduğumuz bu araştırmada, testosteron hormonunun antioksidan özelliği mikroskopik düzeyde de ortaya konmuştur. Yani, orşidektomi sonucu hipokampus'ta oluşan piknotik hücre artışının ve apoptozisin testosteron uygulamasıyla gerilediği tespit edilmiştir.

Biyokimyasal, ışık mikroskopik ve immunohistokimyasal düzeylerde yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda, orşidektomili sıçanlara ait hipokampus yapısında oksidatif doku hasarının ve apoptozisin meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca orşidektomiye bağlı olarak dokuda oluşan bu değişikliklerin dışarıdan uygulanan testosteron hormonu ile baskılandığı ve gerilediği tespit edilmiştir.

5. KAYNAKLAR

1. Barr ML, Klerman JA. The Human Nervous System. 5th edition. Philadelphia: JB Lippincott Comp, 1988: 266-9.
2. Songur A. Sıçanlarda Solunan Formaldehitin Postnatal Gelişim Sürecinde Formatio Hippocampi Üzerine Etkilerinin Morfolojik Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Bölümü, 2001.
3. Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. T Klin Tıp Bilimleri 2001;21:427-31.
4. Aktan ZA. Limbik sistem. Sendrom 1997;9:65-9.
5. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Başaklar C (Çeviren) s.262-356, Ankara, Palme Yayıncılık, 1993.
6. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. 6th edition, Philadelphia: WB Saunders Company, 1998: 477.
7. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. Baskı (2. Cilt), Ankara: Güneş Kitabevi, 2001: 318-93.
8. Carpenter MB, Sutin J. Human Neuroanatomy. 8th edition, Baltimore: Williams & Wilkins Pres, 1983: 237.
9. Nolte J. The Human Brain: An Introduction to Its Functional Anatomy. 2nd edition, Toronto: C V Mosby Company, 1988.
10. Türkoğlu AÖ. Formaldehitin Sıçan Hipokampusunda Meydana Getirdiği Değişiklikler ve Buna Kafeik Asit Fenetil Ester'in (CAPE) Etkisi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Bölümü, 2005.
11. Berry MM, Bannister LH, Standring SM. Nervous System. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ (editörs). Gray's Anatomy. 38th edition, New York. Churchill Livingstone, 1995:1124-6.
12. Mayer A. Historical Aspects of Cerebral Anatomy. 2nd edition, London: Oxford University Pres, 1971: 230.
13. Brodal H. Neurological Anatomy. 3th edition, Oxford: Oxford University Press, 1981.

14. Colonnier M: The structural design of the neocortex. Eccles JC (editor). The Brain and Conscious Experience. Berlin:Sprinter Verlag, 1966.
15. Bliss T, Lomo T. Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant pathways. J Physiol 1973;232:331-56.
16. Gaarskjaer FB. The hippocampal mossy fiber system of the rat studied with retrograde tracing techniques. Correlation between topographic organization and neurogenetic gradients. J Comp Neurology 1981; 203: 717-35.
17. Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG. Topographical organisation of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. J Neurosci 1989;9:216-28.
18. Noback CR, Demarest RJ. The Nervous System. 3th Edition. New York: Mc Graww-Hill Book Comp, 1986:265-6.
19. Steward O, Scoville SA. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. J Comp Neurology 1976;169:347-70.
20. Burt AM. Textbook of Neuroanatomy. 1st edition, Philadelphia: W B Saunders Company, 1993: 479.
21. Cooper LN. Distributed memory in the central nervous system: possible test of assumptions in visual cortex. Schmitt FO, Worden FG, Adelmar G, Dennis SG (editors), The Organisation of The Cerebral Cortex. 2nd edition, Cambrige. MIT Press, 1981:479-503.
22. Kandel ER. Cellular Insinghts into Behavior and Learning. In: The Harvey Lectures. New York: Academic Press Inc. 1979; 73: 19-92.
23. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. Çavuşoğlu H (Çeviren) s.757-1010-38, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1996.
24. Songur A, Akpolat N, Kus I, Ozen OA, Zararsiz I, Sarsilmaz M. The effects of the inhaled formaldehyde during the early postnatal period in the hippocampus of rats: a morphological and immunohistochemical study. Neurosci Res Commun 2003;33:168-78.

25. Green JD: The hippocampus. Field J (editor). Handbook of Physiology. Washington:American Physiolgical Society, 1960: 1373-89.
26. Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi. 2. Baskı, Ankara: METU Pres, 1999: 231.
27. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of Neural Science. 4th edition, New York: Mc Graww-Hill Comp, 2000: 1233.
28. Dere F. Nöroanatomi. 3. Baskı (3. Cilt), Adana: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000: 428.
29. Moss M, Mahut H, Zola MS. Concurrent discrimination learning of monkeys after hippocampal, entorhinal or fornix lesions. J Neurosci 1981;1:227-40.
30. Kocatürk U. Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü. 3. baskı, Ankara: Sevinç Matbaası, 1986: 627.
31. Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CJ, Plum F, Smith LH. Cecil Essentials of Medicine Türkçesi. Siva A (Çeviren) s.748-62, İstanbul, Yüce Yayınları A Ş, 1995.
32. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper'ın Biyokimyası. Menteş G, Ersöz B (Çeviren) s.628-51, İstanbul, Barış Kitabevi, 1993.
33. Janowsky JS. Thinking with your gonads: testosterone and cognition. Trends Cogn Sci 2006; 10: 77-82.
34. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ. Cambell Üroloji (2. cilt). Anafarta MK, Yaman MÖ. (Çeviren) s.2143-8-73, Ankara, Güneş kitabevi, 2005.
35. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Larry Jameson J. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri. Sağlıker Y (Çeviren) s.2143-8-2172-3, Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004.
36. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Payolojiye Giriş. Demir R (Çeviren) s. 445-50, Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
37. Junquera LC, Carnerio J, Kelley RO. Temel Histoloji. Aytekin Y. (Çeviren) s. 416-7, İstanbul, Barış Kitabevi, 1998.

38. Kuş I. Sıçanlarda Pineal Bez ile Testisler Arasındaki Fonksiyonel İlişkinin Morfolojik Olarak İncelenmesi. Doktora tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Bölümü, 1999.
39. Bagatell CJ, Bremner WJ. Androgens in men-uses and abuses. N Eng J Med 1996;334:707-14.
40. Kuş I, Sarsilmaz M, Ogetürk M, Yılmaz B, Keleştimur H, Oner H. Ultrastructural interrelationship between the pineal gland and the testis in the male rat. Arch Androl 2000;45:119-24.
41. Eroschenko VP. Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 9th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 283-4.
42. Barreto G, Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM and Garcia-Ovejero D. Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. Eur J Neurosci 2007;25:3039-46.
43. Hammond J, Le Q, Goodyer C, Gelfand M, Trifiro M, LeBlanc A. Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. J Neurochem 2001;77:1319-26.
44. Estrada M, Varshney A, Ehrlich BE. Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells. J Biol Chem 2006;281:25492-501.
45. Garcia-Estrada J, Del Rio JA, Luquin S, Soriano E, Garcia-Segura LM. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. Brain Res 1993;628:271-8.
46. Flood JF, Morley JE, Roberts E. Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. Proc Natl Acad Sci 1992;89:1567-71.
47. Rhodes ME, Frye CA. Androgens in the hippocampus can alter and be altered by ictal activity. Pharmacol Biochem Behav 2004;78:483-93.
48. Bain J. Andropause. Testosterone replacement therapy for aging men. Can Fam Physician 2001; 47: 91-7.

49. Chute CG, Baron JA, Plymate SR, Kiel DP, Pavia AT, Lozner EC, et al. Sex hormones and coronary artery disease. *Am J Med* 1987; 83:853-9.
50. English KM, Mandour O, Steeds RP, Diver MJ, Jones TH, Channer KS. Men with coronary artery disease have lower levels of testosterone than those with normal coronary angiograms. *Eur Heart J* 2000;21:890-4.
51. Glueck CJ, Glueck HI, Stroop D, Speirs J, Hamer T, Tracy T. Endogenous testosterone, fibrinolysis, and coronary heart disease risk in hyperlipidemic men. *J Lab Clin Med* 1993;122:412-20.
52. Aydos K. Yaşlanan erkekte androjen düşüklüğünün klinik önemi ve andropoz. *Türk Fertilite Dergisi*, 2002. (<http://www.androloji.org.tr/guvsbg/icerik.asp?lang=&action=single&id=110>)
53. Schweiger U, Deuschle M, Weber B, Korner A, Lammers CH, Schmider J, et al. Testosterone, gonadotropin, and cortisol secretion in male patients with major depression. *Psychosom Med* 1999; 61:292-6.
54. Comhaire FH. Andropause: hormone replacement therapy in the aging male. *Eur Urol* 2000; 38: 655-2.
55. Klepsch I, Maicanescu-Georgescu M, Marinescu L. Clinical and hormonal effects of testosterone undecyloate (TU) in male sexual impotence. *Endocrinologie* 1982;20:289-93.
56. Celec P, Jani P, Smrekova L, Mrlan A, Kudela M, Hodosy J, et al. Effects of anabolic steroids and antioxidant vitamins on ethanol-induced tissue injury. *Life Sci* 2003; 74:419–34.
57. Schmidt AJ, Krieg JC, Vedder H. Differential effects of glucocorticoids and gonadal steroids on glutathione levels in neuronal and glial cell systems. *J Neurosci Res* 2002;67:544–50.
58. Schmidt AJ, Krieg JC, Vedder H. Effects of steroid hormones on catalase activity in neuronal and glial cell systems. *Euro Neuropsychopharmacol* 2005;15:177– 83.

59. Morimoto S, Mendoza-Rodriguez CA, Hiriart M, Larrieta ME, Vital P, Cerbon MA. Protective effect of testosterone on early apoptotic damage induced by streptozotocin in rat pancreas. *J Endocrinol* 2005;187:217–24.
60. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001;2:91-95.
61. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;9:143-8.
62. Tomatır AG. Apoptoz: Programlı hücre ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri* 2003;23:499-508.
63. Ergin M, Alkan S. Apoptozis. *Arşiv* 2002;11:495-504.
64. Zararsız İ. Formaldehitin Sıçan Korteksindeki Prefrontal Alanlar Üzerine Olan Etkisinin İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi ve Buna Omega-3'ün Etkisi. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Bölümü, 2003.
65. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji. Çevikbaş U (Çeviren) s.26-188, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2003.
66. Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10: 649-55.
67. Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 2000;11:191-201.
68. Affor S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol* 2000;53:55-63.
69. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-911.
70. Lu J, Mochhala S, Kaur C, Ling EA. Changes in apoptosis-related protein (p53, Bax, Bcl-2 and Fos) expression with DNA fragmentation in the central nervous system in rats after closed head injury. *Neurosci Lett* 2000;290:89-92.
71. Okura Y, Tanaka R, Ono K, Yoshida S, Watanabe T. Analysis of neuronal death in the central nervous system using a new apoptosis model. *Neurosci Res* 1996;26:279-88.
72. Osborn M: Immunofluorescence microscopy of cells. Celis JE (editor). *Cell Biology: A laboratory handbook*. San Diego:Academic Pres, 1994: 347-55.

73. Polak JM, Noorden SV. An Introduction to Immunocytochemistry: Current Techniques and Problems. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks. London: Oxford University Press, 1987.
74. Demir R. Histolojik Boyama Teknikleri. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2001: 228-63-87.
75. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.
76. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-80.
77. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
78. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
79. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hidroxy-nonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.
80. Akyol Ö. Beyin Tümörlerinde Doku SOD, CAT ve GSH-Px Aktiviteleri. Uzmanlık tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, 1994.
81. Kamal AA, Gomaa A, El Khafif M, Hammad AS. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dust. *Environ Res* 1989;49:173-80.
82. Klapcinska B, Jagsz S, Sadowska-Krepa E, Gorski J, Kempa K, Langfort J. Effects of castration and testosterone replacement on the antioxidant defense system in rat left ventricle. *J Physiol Sci* 2008;58:173-7.
83. Leranth C, Petnehazy O, MacLusky NJ. Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J Neurosci* 2003;23:1588-92.
84. Sandstrom NJ, Kim JH, Wasserman MA. Testosterone modulates performance on a spatial working memory task in male rats. *Horm Behav* 2006;50:18-26.

85. Stoltzner SE, Berchtold NC, Cotman CW, Pike CJ. Estrogen regulates bcl-x expression in rat hippocampus. *Neuroreport* 2001;12:2797-800.
86. Shao C, Roberts KN, Markesbery WR, Scheff SW, Lovell MA. Oxidative stress in head trauma in aging. *Free Radical Biology & Medicine* 2006;41:77-85.
87. Huh K, Shin US, Choi JW, Lee SI. Effect of sex hormones on lipid peroxidation in rat liver. *Arch Pharm Res* 1994;17:109–114.
88. Guzman DC, Mejia GB, Vazquez IE, Garcia EH, Del Angel DS, Olguin HJ. Effect of testosterone and steroids homologues on indolamines and lipid peroxidation in rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94:369–73.
89. Rubinow DR, Schmidt PJ. Androgens, brain, and behavior. *Am J Psychiatry* 1996;153:974–84.
90. Matsumoto A, Arai Y, Urano A, Hyodo S. Androgen regulates gene expression of cytoskeletal proteins in adult rat motoneurons. *Horm Behav* 1994;28:357–66.
91. Gouras GK, Xu H, Gross RS, Greenfield JP, Hai B, Wang R, Greengard P. Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's β -amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:1202-5.
92. Molsa PK, Marttila RJ, Rinne UK. Epidemiology of dementia in a Finnish population. *Acta Neurol Scand* 1982;65:541-52.
93. Wallace M, Luine V, Arellanos A, Frankfurt M. Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. *Brain Research* 2006;1126:176-82.
94. Galea LAM, Spritzer MD, Barker JM, Pawluski JL. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus* 2006;16:225–32.
95. Romeo RD, Staub D, Jasnow AM, Karatsoreos IN, Thornton JE, McEwen BS. Dihydrotestosterone increases hippocampal N-methyl-D-aspartate binding but does not affect choline acetyltransferase cell number in the forebrain or choline transporter levels in the CA1 region of adult male rats. *Endocrinology* 2005;146:2091–7.

96. Stuart EB, Thompson JM, Rhee RW, Lephart ED. Steroid hormone influence on brain calbindin-D(28K) in male prepubertal and ovariectomized rats. *Dev Brain Res* 2001;129:125–33.
97. Watson MA, Taylor H, Lephart ED. Androgen-dependent modulation of calbindin-D_{28K} in hypothalamic tissue during prenatal development. *Neurosci Res* 1998;32:97–101.
98. Iacopino AM, Quintero EM, Miller EK. Calbindin-D_{28K} a potential neuroprotective protein. *Neurodegeneration* 1994;3:1–20.
99. Baimbridge KG, Celio MR, Roger JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 1992;15:303–8.

6. ÖZGEÇMİŞ

01.01.1979 tarihinde Elazığ ili Palu ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1997 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girdim. 2003 yılında aynı fakülteden mezun oldum. Elazığ ili Palu ilçesi Baltaşlı Sağlık Ocağı'nda 3 ay pratisyen hekim olarak çalıştım. 2004 Nisan TUS'unda başarılı olarak, Fırat Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım.

Evli bir çocuk sahibiyim.