

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PERİNATAL KAFEİN UYGULAMASININ
YAVRU SIÇANLARIN BEYİN DOKUSUNDAKİ
SEKS STEROİT HORMONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Serkan KARAİSMAİLOĞLU

**Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2014**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PERİNATAL KAFEİN UYGULAMASININ
YAVRU SIÇANLARIN BEYİN DOKUSUNDAKİ
SEKS STEROİT HORMONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Serkan KARAİSMAİLOĞLU

**Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ayşen ERDEM**

ANKARA

2014

ONAY SAYFASI

Anabilim Dalı :FİZYOLOJİ
 Program :FİZYOLOJİ
 Tez Başlığı :PERİNATAL KAFEİN UYGULAMASININ YAVRU SIÇANLARIN
 BEYİN DOKUSUNDAKİ SEKS STEROİT HORMONLARI ÜZERİNE
 ETKİSİ
 Öğrenci Adı-Soyadı :Serkan Karaismailoğlu
 Savunma Sınavı Tarihi :29.12.2014

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

PROF. DR. AHMET ERGÜN

Ankara Üniversitesi

(İmza)

Tez danışmanı:

DOÇ. DR. AYŞEN ERDEM

Hacettepe Üniversitesi

(İmza)

Üye:

PROF. DR. ETHEM GELİR

Hacettepe Üniversitesi

(İmza)

Üye:

DOÇ. DR. MELTEM TUNCER

Hacettepe Üniversitesi

(İmza)

Üye:

DOÇ. DR. BİLGE PEHLİVANOĞLU

Hacettepe Üniversitesi

(İmza)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

(İmza)
 Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı, aşağıda geçen kişi ve kuruluşlara içtenlikle teşekkür eder.

Sayın Doç. Dr. Ayşen Erdem, tez danışmanım olarak çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde yol gösterici katkılarda bulunmuştur.

Sayın Doç. Dr. Meltem Tuncer ve Yrd. Doç. Dr. Sibel Bayrak deneylerin her aşamasında yer alarak katkıda bulunmuşlardır.

Sayın Prof. Dr. Eser Lay Ergün ve kimyager Gökhan Erdoğan çalışmanın Nükleer Tıp Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen kısımlarında her türlü desteği sağlamışlardır.

Sayın Doç. Dr. Çetin Kocaefe ve Arş. Gör. Dr. Uğur Akpulat bazı kimyasal maddelerin temininde yardımcı olarak katkıda bulunmuşlardır.

Sayın Arş. Gör. Eda Karaismailoğlu çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılmasında değerli katkılarda bulunmuştur.

Sayın Prof. Dr. Ersin Fadilloğlu laboratuvarındaki olanaklardan yararlanmamızda destek olmuştur.

Sayın Prof. Dr. Ethem Gelir, Doç. Dr. Bilge Pehlivanoğlu ve Doç. Dr. Murat Budak çalışma dönemi boyunca kıymetli fikirsel desteklerde bulunmuşlardır.

Sayın Prof. Dr. Dicle Balkancı bölümümüzün tüm olanaklarından yararlanmamızda her zaman destek olmuştur.

Tez çalışmalarım boyunca ailem, bölümdeki tüm hocalarım ve arkadaşlarım anlayış ve sabırla destek olmuşlardır.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen bir proje kapsamında gerçekleşmiştir. (Proje numarası: 011 D10 101 010)

ÖZET

Karaismailoğlu S. Perinatal Kafein Uygulamasının Yavru Sıçanların Beyin Dokusundaki Seks Steroit Hormonları Üzerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2014. Beyindeki cinsiyete bağlı anatomik, fizyolojik ve nörokimyasal farklılıkların birçoğu prenatal dönemde oluşmaktadır. Testosteron, östradiyol ve dihidrotestosteron erken gelişim döneminde beyindeki yapıların organizasyonundan ve seksüel farklılaşmasından sorumlu olan temel seks steroid hormonlarıdır. Kafein; kahve, çikolata, çeşitli içecekler ve çok sayıda tedavinin içeriğinde yer alan dünya çapında yüksek miktarda tüketilen psikoaktif bir ilaçtır. Nonselektif adenozin reseptör antagonisti özelliği gösterir ve nöroprotektif etkiye sahiptir. Seks steroid hormonların üretilmesinde kilit rollere sahip hipotalamus-hipofiz aksında, üreme organları ve adrenal bezlerde adenozin reseptörleri yer almaktadır. Adenozin reseptör antagonisti olan kafein bu reseptör ve yolakları etkileyebileceğinden çalışmamızda, hamile sıçanlara uygulanan kafeinin, fetüs veya yavruların beyindeki seks steroid hormonlarının seviyeleri üzerine yaptıkları etkilerin incelenmesi amaçlandı. Çalışmamızda düşük (0,3 g/L) ve yüksek doz (0,8 g/L) kafein sıçanlara, hamilelik ve emzirme dönemleri boyunca içme sularına karıştırılarak verildi. Hamileliğin 19. günündeki fetüslerin, yenidoğanların ve doğum sonrası 4. gündeki yavruların frontal korteks ve hipotalamuslarında testosteron, östradiyol ve dihidrotestosteron seviyeleri radioimmunoassay yöntemiyle ölçüldü. Ayrıca adrenal bez ağırlıkları, anogenital mesafe (fetüs ve yavrularda), gonad ağırlıkları ve serum serbest testosteron düzeyleri (yavrularda) incelendi. Sonuçlarımıza göre, düşük doz kafein (DK) uygulaması doğum sonrası 4. günde hem erkek hem de dişi yavruların ağırlıklarını ve erkeklerin anogenital indeksini artırdı. Yüksek doz kafein (YK) uygulaması ise erkek fetüslerde hamileliğin 19. gününde adrenal bez ağırlığını azalttı, dişi fetüslerin frontal korteksinde, yeni doğan erkeklerin ise hipotalamusunda doku testosteron seviyelerini artırdı. Sonuç olarak, perinatal dönemdeki kafein uygulamasının beyindeki seks steroidleri üzerine olan etkileri farklı kafein dozlarından etkilenmekte ve bu etki muhtemelen periferik steroid kaynaklardan bağımsız bir şekilde gerçekleşmektedir.

Anahtar Kelimeler: Beyin cinsiyeti, kafein, perinatal dönem, testosteron, östradiyol, dihidrotestosteron

Destekleyen Kurumlar: H. Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi (011 D10 101 010)

ABSTRACT

Karaismailoğlu S. The Effect of Perinatal Caffeine Administration on The Sex Steroid Hormones in The Brain of Offspring Rats. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Physiology Program, Doctoral Thesis, Ankara, 2014. Most of the anatomical, physiological and neurochemical gender-related differences in the brain occur prenatally. Testosterone, estradiol and dihydrotestosterone are the main sex steroid hormones responsible for the organization and sexual differentiation of brain structures during early development. Caffeine is a psychoactive substance widely consumed in the world via coffee, chocolate, beverages, food and some therapeutics. Caffeine is a nonselective adenosine antagonist having neuroprotective effects. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, gonads and adrenal cells, including adenosine receptors, have a key role in the synthesis of sex steroid hormones. Since caffeine might affect the metabolic pathways in these structures through adenosine receptor antagonism we aimed to investigate the possible modulatory effects of the mother's caffeine consumption (low or high dose) on sex steroid hormones of brain tissue in the fetuses or pups. In the present study, rats were treated either with low dose (0.3 g/L) or high dose (0.8 g/L) caffeine in their drinking water during their pregnancy and lactation period. Testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone levels in the frontal cortex and hypothalamus were measured by using radioimmunoassay method at embryonic day 19, neonatal day and postnatal day 4. Adrenal gland weights, anogenital distance (in fetuses and pups), gonad weights and serum free testosterone level (in pups) were also measured. Our findings showed that low dose caffeine administration increased body weights in both male and female rats and anogenital index in male rats at postnatal day 4. Furthermore, high dose caffeine administration decreased adrenal weight in male rats on embryonic day 19 and increased testosterone level in the frontal cortex of female fetuses and hypothalami of male newborn rats. In conclusion, the effects of caffeine administration on sex steroids in the brain tissue during the perinatal period are dose-related and these effects seem to be independent of the peripheral steroid sources.

Keywords: Brain gender, caffeine, perinatal period, testosterone, estradiol, dihydrotestosterone

Supported by: HÜBAB (011 D10 101 010)

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xi |
| TABLOLAR DİZİNİ | xiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. Beyinde Cinsiyete Bağlı Oluşan Farklılıklar | 2 |
| 2.2. Seks Steroit Hormonları ve Beyin Cinsiyeti İlişkisi | 9 |
| 2.3. Kafein | 12 |
| 2.4. Kafein ve Seks Steroit Hormonlarının İlişkisi | 13 |
| 2.5. Kafein ve Hamilelik | 16 |
| 2.6. Hipotez ve Amaç | 17 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 18 |
| 3.1. Deney Grupları | 18 |
| 3.2. Cerrahi İşlemler | 20 |
| 3.3. Genel Ölçümler | 20 |
| 3.4. Beyin Dokusunda RIA Ölçümleri | 21 |
| 3.5. Kullanılan Çözeltiler | 24 |
| 3.6. Hesaplamalar ve İstatistiksel Analiz | 25 |
| 3.7. Etik Kurul İzni | 25 |
| 4. BULGULAR | 26 |
| 4.1. Metabolik Bulgular | 26 |
| 4.2. Genel Bulgular | 29 |
| 4.3. Beyin Dokusundaki Seks Steroit Hormonlarına Ait Bulgular | 38 |

| | |
|-----------------------|----|
| 5. TARTIŞMA | 51 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 65 |
| KAYNAKLAR | 66 |
| EKLER | |
| EK 1. Etik Kurul İzni | |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---------------------------------|--|
| 5-HT _{1A} | Serotonin reseptörü |
| A ₁ | Adenozin reseptör alt tipi 1 |
| A _{2A} | Adenozin reseptör alt tipi 2A |
| A _{2B} | Adenozin reseptör alt tipi 2B |
| A ₃ | Adenozin reseptör alt tipi 3 |
| AC | Adenil siklaz |
| AGM | Anogenital Mesafe |
| Ca ⁺² | Kalsiyum |
| cAMP | Siklik adenozin monofosfat |
| cpm | <i>Counts per minute</i> |
| D0 | Yavruların doğdukları gün |
| D4 | Doğum sonrası 4. gün |
| DHT | Dihidrotestosteron |
| DK | Düşük Doz Kafein |
| EDTA | Etilendiamin tetraasetik asit |
| FSH | Folikül stimüle edici hormon |
| GABA | Gama amino bütirik asit |
| GnRH | Gonadotropin salıcı hormon |
| H19 | Hamileliğin 19. günü |
| hCG | İnsan koryonik gonadotropin |
| HCl | Hidroklorik asit |
| INAH | Anterior hipotalamusun interstisyel nükleusu |
| JAK | <i>Janus</i> kinaz |
| K ⁺ | Potasyum |
| KCl | Potasyum klorür |
| KH ₂ PO ₄ | Mono Potasyum Fosfat |
| KO | Kontrol |
| LH | Lüteinize edici hormon |
| Log | Logaritmik |
| M | Molar |
| mg | Miligram |

| | |
|----------------------------------|--|
| mM | Milimolar |
| MRI | Manyetik rezonans görüntüleme |
| Na ₂ HPO ₄ | Sodyum hidrojen fosfat |
| NaCl | Sodyum klorür |
| NSB | <i>Non-Specific Binding</i> |
| ort | Ortalama |
| P | İstatistiksel anlamlılık değeri |
| PBS | Fosfat tampon çözeltisi |
| PET | Pozitron emisyon tomografisi |
| pg | Pikogram |
| PKA | Protein kinaz A |
| PKC | Protein kinaz C |
| RIA | Radioimmunoassay |
| SCN | Suprakiasmatik nükleus |
| SDN POA | Preoptik alandaki seksüel dimorfik nükleus |
| SH | Standart hata |
| STBN | Stria terminalisin bed nükleusu |
| YK | Yüksek doz kafein |
| µg | Mikrogram |
| µL | Mikrolitre |

ŞEKİLLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| 2.1. Erkek ve dişi ötücü kuşların beyindeki farklılıklar | 3 |
| 2.2. İnsan beyninin yandan görünüşü | 5 |
| 2.3. Kolesterolde sentezlenen steroid hormonlarının sentez ve dönüşüm basamakları | 11 |
| 2.4. Adenozin reseptörleri ve rol aldığı hücre içi yollar | 13 |
| 3.1. Sperm pozitif çıkan dişi sıçanların vajinal yıkama ile alınan içeriğindeki spermelerin mikroskop görüntüsü | 18 |
| 3.2. Doz, yaş ve cinsiyete göre oluşturulan deney gruplarının özet gösterimi | 19 |
| 4.1. Sıçanların hamilelik döneminin ilk 18 günü boyunca üç günlük dönemlerde tükettikleri sıvıların günlük ortalama değerleri | 27 |
| 4.2. Doğum sonrası 4. gündeki erkek ve dişi yavruların vücut ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması | 29 |
| 4.3. D0 ve D4 günlerindeki erkek ve dişi yavrulara ait serum serbest testosteron değerleri | 30 |
| 4.4. D0 ve D4 günlerindeki yavruların gruplara göre serum serbest testosteron değerleri | 31 |
| 4.5. Kontrol ve kafein gruplarındaki fetüs/yavruların vücut ağırlığına göre oranlanmış adrenal bez ağırlıklarının zamana göre değişimi | 33 |
| 4.6. Hamileliğin 19. günündeki fetüslerde vücut ağırlığına göre oranlanmış adrenal bez ağırlıkları | 34 |
| 4.7. D0 ve D4 günlerindeki erkek yavru sıçanların vücut ağırlığına göre oranlanmış testis ağırlıklarının gruplara-zamana göre değişimi | 35 |
| 4.8. D0 ve D4 günlerindeki dişi yavru sıçanların vücut ağırlığına göre oranlanmış ovaryum ağırlıklarının gruplara-zamana göre değişimi | 35 |
| 4.9. Erkek fetüs/yavruların oranlanmış anogenital indekslerinin zamana göre değişimi | 36 |
| 4.10. Dişi fetüs/yavruların oranlanmış anogenital indekslerinin zamana göre değişimi | 37 |
| 4.11. Erkek fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki testosteron seviyeleri | 38 |

| | |
|--|----|
| 4.12. Dişi fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki testosteron seviyeleri | 39 |
| 4.13. Erkek fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki östradiyol seviyeleri | 39 |
| 4.14. Dişi fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki östradiyol seviyeleri | 40 |
| 4.15. Erkek fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki dihidrotestosteron (DHT) seviyeleri | 41 |
| 4.16. Dişi fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki dihidrotestosteron (DHT) seviyeleri | 41 |
| 4.17. Frontal korteks ve hipotalamustaki testosteron seviyelerinin zamana göre değişimi | 42 |
| 4.18. Frontal korteks ve hipotalamustaki östradiyol seviyelerinin zamana göre değişimi | 43 |
| 4.19. Frontal korteks ve hipotalamustaki dihidrotestosteron (DHT) seviyelerinin zamana göre değişimi | 45 |
| 4.20. Fetüs ve yavru sıçanlarda kafein uygulamasının frontal korteks ve hipotalamustaki testosteron seviyeleri üzerine etkisi | 46 |
| 4.21. Fetüs ve yavru sıçanlarda kafein uygulamasının frontal korteks ve hipotalamustaki östradiyol seviyeleri üzerine etkisi | 47 |
| 4.22. Fetüs ve yavru sıçanlarda kafein uygulamasının frontal korteks ve hipotalamustaki dihidrotestosteron (DHT) seviyeleri üzerine etkisi | 48 |
| 4.23. Frontal kortekste testosteron, östradiyol ve dihidrotestosteron (DHT) seviyelerinin cinsiyete göre karşılaştırılması | 49 |
| 4.24. Hipotalamustaki testosteron, östradiyol ve dihidrotestosteron (DHT) seviyelerinin cinsiyete göre karşılaştırılması | 50 |

TABLOLAR

| | Sayfa |
|---|-------|
| 4.1. Hamile sıçanlara ait genel metabolik değerler | 26 |
| 4.2. Annelere ait fetüs ve yavru sıçan sayıları | 27 |
| 4.3. H19, D0 ve D4 günlerindeki fetüs/yavruların vücut ağırlıkları | 28 |
| 4.4. Annelerin serum serbest testosteron ve kortizol düzeyleri | 29 |
| 4.5. D0 ve D4 günlerindeki yavruların serum serbest testosteron düzeyleri | 30 |
| 4.6. Annelerin adrenal bez ağırlıkları ve tüm vücut ağırlığına göre yüzdeleri | 32 |
| 4.7. Fetüs ve yavruların adrenal bez ağırlıkları ve tüm vücut ağırlığına göre yüzdeleri | 32 |

1. GİRİŞ

Kadın ve erkek beyni arasında, gerek yapısal gerek davranışsal olarak ortaya çıkan birçok anatomik, fizyolojik ve nörokimyasal farklılıklar bulunmaktadır. Beyindeki bu temel farklılıkların oluşmasındaki ana nedenin, prenatal dönemdeki seks steroid hormonlarının, fetüs beyni üzerine yaptıkları etkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Testosteron, östradiyol ve dihidrotestosteron prenatal dönemde beyindeki organizasyonların farklılaşmasından başlıca sorumlu olan önemli seks steroid hormonlardır. Prenatal dönemde, anne ve plasenta kaynaklı östrojen dolaşımında bağlayıcı bir protein tarafından bağlı olarak taşındığından, beyin üzerine olan asıl etkinin testosteron ve diğer androjenler sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Erkek fetüste bu hormonların asıl kaynağı testisler olmakla beraber, her iki cinsiyette fetal adrenal bezler, maternal adrenal bezler, ovaryum ve yağ dokusu da androjen kaynağı olarak görev yapar.

Kahve, çikolata, çeşitli içecekler ve çok sayıda tedavinin içeriğinde yer alan kafein dünya çapında yüksek miktarda tüketilen psikoaktif bir ilaçtır. Nonselektif adenzin antagonisti özelliği gösterir ve nöroprotektif etkiye sahiptir. Hamile kadınların yaklaşık %60'ı kafein içerikli içecekler tüketmektedirler. Fetüs üzerinde kafein etkilerini çalışmak iki temel sebep nedeniyle önemlidir. Birincisi, kafein hem kan-beyin bariyerini hem de plasenta bariyerini geçebilmektedir. İkincisi, kafeinin fetüsteki yarılanma ömrü, enzimatik aktivitelerin düşük olması ve kafeinle ilgili metabolik yolların immatür olması nedeniyle, doğum sonrasına göre daha uzundur.

Seks steroid hormonlarının üretilmesinde kilit rollere sahip hipotalamus-hipofiz aksında, üreme organları ve adrenal bezlerde adenzin reseptörleri bulunmaktadır. Bu nedenle, adenzin antagonisti olan kafein bu reseptör ve yolları etkileyerek, prenatal dönemdeki seks steroid hormonlarının üretilmesinde, dolayısıyla da beyin cinsiyetinin düzenlenmesinde değişikliklere neden olabileceğinden hipotezimizi "hamile sıçanlara perinatal dönemde verilen kafein, fetüs ve yavru sıçanların beyin dokusundaki seks steroid hormonlarının düzeyini etkiler" olarak kurduk. Bu çalışmada hamile sıçanlarda gerçekleştirilen düşük ve yüksek doz kafein uygulamalarının, fetüs ve yavruların beynindeki seks steroid hormonlarının seviyeleri üzerine yaptıkları etkileri incelemeyi amaçladık.

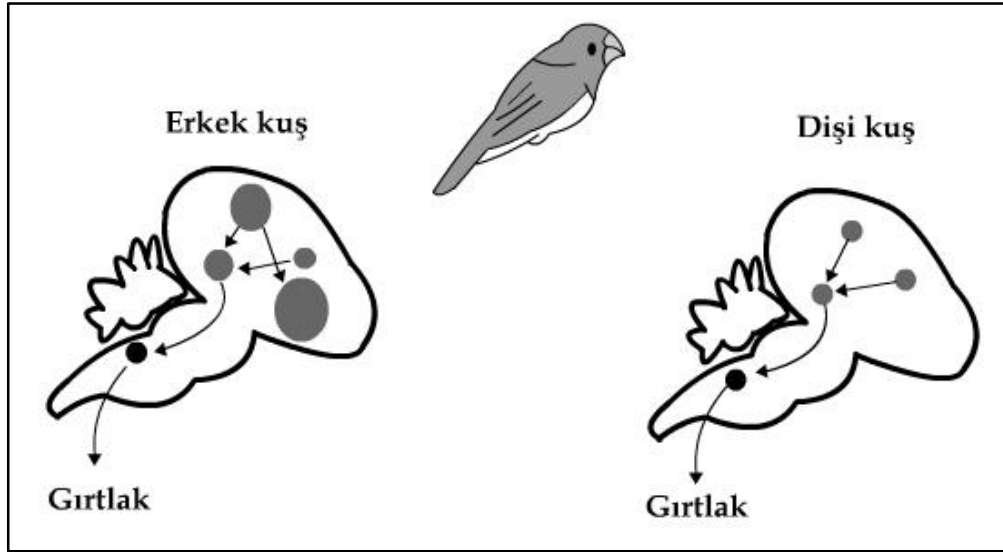
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyinde Cinsiyete Bağlı Oluşan Farklılıklar

Kadın ve erkek arasında birçok anatomik ve fizyolojik fark bulunmakta olup, bu farklılıklar genelde seksüel dimorfizm olarak ifade edilmektedir. Yunanca *dimorphos*'tan (iki formlu) gelen dimorfizm, tek bir tür için iki farklı yapının varlığını ifade etmektedir. En belirgin olarak üreme sistemlerinin arasındaki farklarda kendini gösteren seksüel dimorfizm merkezi sinir sisteminde de gerek yapısal gerekse de davranışsal olarak ortaya çıkmaktadır (108). Kadın ve erkek beyinde görülen bu farklılıkların çoğu prenatal dönemde meydana gelmekte olup farkların oluşmasındaki temel neden olarak nöroendokrin sistem ve davranışların farklılaşmasında rol oynayan seks steroid hormonları gösterilmektedir. Bu hormonların erken gelişim döneminde meydana getirdiği etkiler ile oluşan cinsiyetler arasındaki yapısal ve davranışsal farklılıklar birçok türde çeşitlilik göstermektedir (75).

2.1.1. Hayvanlarda Erkek ve Dişi Beyni Arasındaki Farklılıklar:

Cinsiyetler arasında seks steroid hormonlarının etkisi nedeniyle merkezi sinir sisteminde hem yapısal hem de davranışsal olarak farklılıklar oluşmaktadır. Davranışsal farklılıkların çoğu üreme davranışları ile ilgiliyken bir kısmı bilişsel fonksiyonlarla ilgilidir ve türler arasında çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, kuşlarda böyle bir farklılık söz konusudur. Kanarya ve hint bülbülü gibi ötücü kuş türlerinde şarkı söyleme bir üreme davranışıdır ve dikkat çekmek için yapılır. Erkekler oldukça çeşitli ve karmaşık yapıda şarkılar üretebilirken, dişiler üretememektedir. Bunun nedeni, ötücü kuşların beyinde yer alan bir bölgenin erkek ve dişilerde birbirlerinden farklı olmasıdır. Ötücü kuşlarda şarkıların üretilmesi, beyinde yer alan ses kontrol alanı adlı bölgedeki nükleuslar tarafından düzenlenmektedir ve bu bölge, erkek kanarya ve hint bülbülünde dişilere göre yaklaşık 5 kat daha büyüktür (Şekil 2.1). Yani bu nükleuslar açısından seksüel dimorfizm söz konusudur. Nükleusların cinsiyetler arasında fark göstermesinin nedeni seks steroid hormonlarıdır. Örneğin, dişi kuşlara gelişim dönemlerinde testosteron uygulanırsa, ses kontrol bölgelerindeki nükleuslar büyümekte ve erkek kuşlar gibi şarkılar üretebilmektedirler (9, 108).



Şekil 2.1. Erkek ve dişi ötücü kuşların beyindeki farklılıklar. Beynin sagittal kesimi görülmektedir. Gri alanlar beyindeki ses kontrol bölgelerini temsil etmektedir. Arnold (9)'a göre modifiye edilmiştir.

Kemirgenlerde yapılan birçok çalışma erkek ve dişi beyni arasındaki farklılıkları daha net ortaya koymaktadır. Örneğin, Gorski ve diğ. (53) sıçanlarda yaptıkları bir araştırmada, hipotalamusun preoptik alanında cinsiyetler arasında fark gösteren bir nükleus keşfetmişlerdir. Preoptik alan erkeğin çiftleşme davranışının kontrolünde rol oynamaktadır ve cinsiyet farkının morfometrik olarak en belirgin görüldüğü kısımdır. Preoptik alandaki seksüel dimorfik nükleus (SDN POA) olarak adlandırdıkları bu nükleusun, erkek sıçanlarda dişilere göre 3-5 kat daha büyük olduğunu göstermişlerdir. Normal gelişim sırasında, yeni doğan dişi sıçanlarda SDN POA nöronal apoptoza uğramaktadır. Fakat erkek sıçanlarda prenatal testosteron, östradiyole dönüşerek, SDN POA nöronlarını apoptoza karşı korumakta ve bu nedenle SDN POA erkeklerde daha büyük kalmaktadır (70).

Sıçanların hipotalamusunda yer alan bir başka bölgede ise tam tersi bir durum söz konusudur. *Anteroventral periventriküler* nükleus olarak adlandırılan bir yapı, dişi sıçanlarda erkeklere göre yaklaşık 2 kat daha büyüktür. Bu bölgenin dişi sıçanlarda lüteinize edici hormonun (LH) salıverilmesindeki fazik sekresyonu kontrol ettiği düşünülmektedir. Ayrıca burada ovaryumdan salıverilen steroid hormonlarının etkileyeceği reseptörleri yüksek yoğunlukta eksprese eden nöronlar da bulunmaktadır (39, 119).

2.1.2. İnsanda Erkek ve Kadın Beyni Arasındaki Farklılıklar:

İnsan beyininde de seksüel dimorfizm söz konusudur. Ortalama erkek beyni kadın beyinine göre daha ağır ve geniştir. *İn vivo* görüntüleme ve otopsi çalışmaları erkek serebrumunun kadına göre yaklaşık % 8 – 10 daha büyük olduğunu göstermiştir. O nedenle beyindeki yapısal ve bölgesel farklılıkları incelemenden önce, serebrum boyutlarına göre bir oranlama yapılması, karşılaştırma yapabilmek için gereklidir. İnsan beyinine bölgesel olarak baktığımızda, kadınlar frontal ve medial paralimbik korteksler açısından daha geniş bir kortikal hacme sahipken, erkeklerde frontomedial korteks hacmi daha fazladır. Ayrıca kadınlarda superior temporal korteks daha büyüktür (52).

Frontal lobun ventral ve posterior bölgesinde Broca alanı bulunmaktadır. Bu bölge Wernicke alanından aldığı bilgiyi ses oluşumu için kalıp haline getirerek konuşmanın meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır. Herhangi bir nörolojik problemi bulunmayan 10 erkek ve 11 kadında yapılmış olan otopsi çalışmasında, stereolojik teknikler kullanılarak yapılan kesitlerde kadınlardaki Broca alanının erkeklerden yaklaşık %20 oranında daha büyük olduğu gösterilmiştir. Bu durum kadınların daha iyi bir dil yeteneğine sahip olabileceğini göstermektedir (58).

Erkek beyni kadın beyinine göre daha büyük sulkus hacmine ve daha fazla serebrospinal sıvıya sahiptir (57). Ayrıca beyindeki kan dolaşımı ile ilgili de fark söz konusudur. Kadınların hem dinlenme durumunda hem de bilişsel aktivite sırasında daha yüksek serebral kan akımına sahip oldukları gösterilmiştir (56). Yukarıda özetlenen farklılıklara ilaveten, gri-beyaz madde oranında, hipotalamusta, limbik sistem gibi beynimizin çeşitli bölgelerinde ve nörotransmitter sistemlerde seksüel dimorfizm görülmektedir.

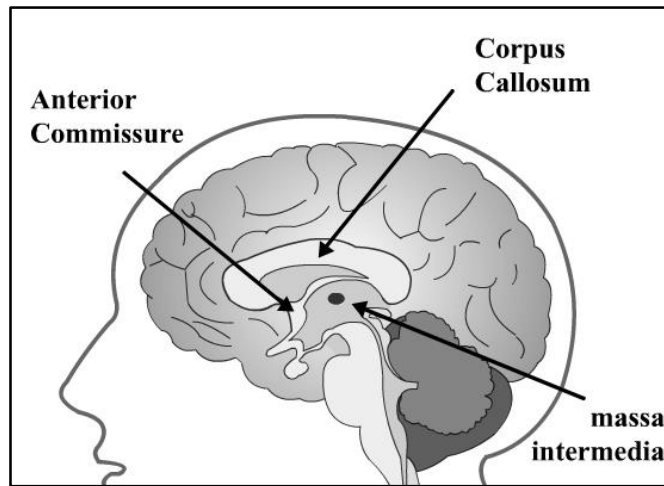
Gri-Beyaz Madde Oranı:

Merkezi sinir sisteminde sinir hücrelerinin gövdeleri ve dendritler gri maddeyi oluştururken, aksonlar beyaz maddeyi meydana getirmektedir. Gri ve beyaz maddeler açısından insanlarda cinsiyetler arası fark söz konusudur. Kortikal gri madde hacminin yüzdesi kadınlarda daha fazla iken, erkeklerde beyaz madde yüzdesi daha fazladır. Gri madde/beyaz madde oranı, kadınlarda frontal, temporal, pariyetal ve oksipital loblarda, cingulat girus ve insulada erkeklere göre daha yüksektir (36). Gur ve diğ.

(57)'nin yaptığı manyetik rezonans görüntülemesi (MRI) çalışmasında da (40 erkek, 40 kadın) benzer bir farklılık gösterilmiştir. Bu farklılığa ilaveten erkekte gri madde yüzdesi sol hemisferde sağa göre daha fazlayken beyaz madde açısından her iki hemisfer de simetrik. Kadınlarda ise herhangi bir asimetri söz konusu değildir. Ayrıca kadınlarda gri madde hacmi erkeklerden 1-2 yıl önce tepe noktasına ulaşmaktadır (109).

Corpus Callosum ve Anterior Commissure:

İnsan beyninin en belirgin yapılarından olan *corpus callosum* ve *anterior commissure* adlı bölgelerde (Şekil 2.2) cinsiyetler arası bir fark söz konusudur. Beynin orta hattında yer alan ve her iki hemisferi birbirine bağlayan sinir liflerinden meydana gelmiş olan *corpus callosum* genellikle kadınlarda daha büyüktür (65).



Şekil 2.2. İnsan beyninin yandan görünüşü; *corpus callosum*, *anterior commissure* ve *massa intermedia*. Purves (108)'e göre modifiye edilmiştir.

Her iki hemisfer arasındaki bağlantılar dâhil olmak üzere, lateral amigdala, *nükleus accumbens*, *endopiriform korteks* gibi önemli beyin bölgelerinin birbirleriyle olan bağlantılarını sağlayan *anterior commissure* adlı bölge kadınlarda daha büyüktür (73). İlginç bir biçimde heteroseksüel ve homoseksüel erkekler arasında da *corpus callosum*'un anatomisinde farklılıklar gösterilmiştir. Witelson ve diğ. (132) 12 homoseksüel ve 10 heteroseksüel sağlıklı erkekte yaptığı MRI çalışmasında, *corpus*

callosum 'un bilhassa *isthmus* kısmının homoseksüel erkeklerde daha büyük olduğunu göstermiştir.

Her iki taraftaki talamusu birbirine bağlayan *massa intermedia* adlı yapının ise erkeklerde görülme sıklığı %32 iken, kadınlardaki görülme sıklığı %22'dir. Yani bu yapının erkeklerde görülme sıklığı kadınlardakinden daha fazladır ve kadınlardaki *massa intermedia* erkeklerden daha geniştir (4). Tüm bunlar kadınların erkeklere göre daha iyi bir hemisferler arası organizasyona sahip olduğunu göstermesine rağmen *corpus callosum* ve *anterior commissure* yapıları ile ilgili farklı sonuçlar da bulunmaktadır (65).

Hipotalamus ve Komşulukları:

İnsanda serebrum boyutlarına göre oranlandığında, erkeklerde hipotalamusun daha büyük olduğu gösterilmiştir (52). Bu hacim farkına ilaveten, sıçanlarda keşfedilmiş olan SDN POA benzeri bir nükleus insan hipotalamusunda da keşfedilmiştir. Anterior hipotalamus bölgesinde, *interstitial nuclei of the anterior hypothalamus* (INAH) olarak adlandırılan 4 çeşit nükleus bulunmuştur. Bu nükleuslar 1'den 4'e kadar numaralandırılmıştır (INAH 1-4). Yapılan çalışmalarda INAH-3'ün erkeklerde daha büyük olduğu ve daha fazla nöron içerdiği gösterilmiştir. Bu nedenle, bilhassa INAH-3'ün sıçanlardaki SDN POA'nın analogu olduğu düşünülmektedir (27). Yine ilginç bir biçimde homoseksüel ve biseksüel erkeklerdeki INAH-3'ün heteroseksüel erkeklere göre daha küçük olduğu gösterilmiştir (81).

Talamus, diensefalonda yer alan geniş nöron gruplarından oluşur ve duysal, motor ve limbik işlevlerde rol oynayan oldukça önemli bir yapıdır. Pozitron emisyon tomografisi (PET) yöntemi kullanılarak, 65'i kadın ve 55'i erkek olmak üzere toplamda 120 sağlıklı kişi üzerinde yapılan beyin görüntülemesi çalışmasında, talamik nükleusların kadınlarda erkeklere göre daha geniş olduğu gösterilmiştir (92).

Bazal gangliyonları oluşturan yapılardan biri olan kaudat nükleusun da kadınlarda daha geniş olduğu gösterilmiştir (44). Ayrıca hipotalamusun alt bölgesinde, optik kiazmanın üzerinde bulunan suprakiasmatik nükleus (SCN), retinadan direkt inputlar alıp sirkadiyan ritmin düzenlenmesinde rol almaktadır. Bu bölge büyüklükten ziyade şekil olarak fark göstermektedir. SCN kadınlarda ince uzun şekilli iken erkeklerde küresel şekildedir. Hacim, hücre sayısı ve hücre yoğunluğu arasında fark

yoktur. Bununla birlikte SCN'nin homoseksüel erkeklerde, normal erkeklere göre daha büyük olduğu ve daha fazla vazopressin nöronu içerdiği gösterilmiştir (121).

Stria Terminalisin Bed Nükleusu:

Stria terminalisin bed nükleusu (STBN) seksüel dimorfizmin belirgin olarak gösterildiği bir başka yapıdır. Bu bölgenin limbik, kortikal bölgeler ve hipotalamus-hipofiz aksı arasında bir bağlantı bölgesi olduğu ve davranış cevaplarının oluşmasında rol aldığı düşünülmektedir (87). STBN rodentlerin seksüel davranışlarında önemli rol oynamaktadır. STBN ile hipotalamus ve amigdala arasında karşılıklı bağlantılar yer almaktadır (137). Hines ve diğ. (62) sıçanlarda STBN'nin enkapsüle bölgesinin hacminin erkeklerde, dişilerden yaklaşık %97 daha büyük olduğunu göstermişlerdir. Benzer farklılık insanlarda da ortaya konmuştur. Yapılan bir çalışmada 26 erkek ve kadın incelenmiştir ve STBN'nin posteromedial bölgesinin hacminin erkeklerde kadınlardan yaklaşık 2,5 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu bölgenin saldırgan davranışta, seksüel davranışta ve gonadotropin sekresyonunda rol aldığından bahsedilmiştir (3). Zhou ve diğ. (137) ise seksüel davranış için önemli bir bölge olan STBN'nin merkezi bölgesinin erkeklerde daha büyük olduğunu göstermişlerdir. İlginç biçimde 6 adet transseksüel (erkekten-kadına transseksüel) kişide STBN'nin merkezi bölgesinin kadınlardaki ile benzer hacimde olduğu ortaya konmuştur.

Limbik Sistem:

Limbik sistemin en önemli yapılarından olan ve bilhassa emosyon, hafıza, depresyon ve öğrenme gibi olaylarda rol oynayan amigdala ve hipokampus yapılarında da seksüel dimorfizm söz konusudur. Yapılan çalışmalar amigdalanın erkeklerde daha büyük olduğunu göstermiştir. Caviness ve diğ. (29) 7-11 yaş aralığındaki 30 çocukta (15 kız, 15 erkek) yaptığı MRI çalışmasında, kızlardaki amigdalanın erkeklere göre daha küçük olduğunu göstermişlerdir. Yetişkinlerde yapılan başka bir MRI çalışmasında da bu bulgular desteklenmiştir (52). Amigdalanın tersine, hipokampus ise kadınlarda daha büyüktür. Sağlıklı bireylerde gerçekleştirilen MRI çalışmalarında (10 kadın 10 erkek) (44), (34 kadın, 35 erkek) (92) ve PET çalışmalarında (65 kadın, 55 erkek) hipokampusün kadınlarda erkeklerden daha büyük olduğu gösterilmiştir (92).

Nörotransmitter Sistem:

Beynimizdeki çeşitli nörotransmitter sistemlerde cinsiyete bağlı farklılıklar gösterilmiştir. Bilhassa dopaminerjik, serotonerjik ve kolinerjik sistemleri incelemek için yapılmış çeşitli araştırmalar mevcuttur. İlk olarak dopaminerjik sisteme bakarsak, bu sistemin vücudun motor hareketlerinin koordinasyonunda, ödüllendirme davranışında, bağımlılıkta ve birçok önemli olayda rol oynadığını görmekteyiz. Yapılan araştırmalar, kadınlarda dopaminerjik fonksiyonun daha gelişmiş olduğunu göstermiştir. Kadınlar erkeklere göre daha yüksek miktarda striatal presinaptik dopamin sentezine sahiptir. Ayrıca sinaptik dopamin ulaşılabilirliğini düzenleyen dopamin taşıyıcı aktivitesi kadınlarda daha yüksektir (36). Sıçanların gelişimi sırasında prefrontal kortekste, nükleus *accumbenste* ve striatumdaki dopamin reseptör yoğunluğunda farklılık oluşmaktadır. Erken gelişim döneminde erkek sıçanlar, dişilere göre daha fazla oranda reseptör artışı göstermektedirler (7). Riccardi ve diğ. (110) yaptığı PET çalışmasında (6 kadın, 7 erkek) kadınlarda amfetamin tarafından uyarılmış dopamin salınımının sağ *globus pallidus* ve sağ inferior frontal girusta erkeklere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu yüksek dopamin fonksiyonları, kadınların dopamin fonksiyonunda bozuklukların neden olduğu hastalıklardan (alkol bağımlılığı, şizofreni vs) daha iyi korunabilmesine neden olabilmektedir (36).

Serotonerjik fonksiyon kompleks duysal ve motor hareketlerin koordinasyonunda görev almaktadır ve bozukluğunda ruhsal problemler, yeme-uyku bozuklukları ve şizofreni ortaya çıkmaktadır. Serotonin ile ilgili seksüel dimorfizm çalışmaları 1960'larda hayvan modellerinde gösterilmeye başlanmıştır. Dişi sıçanların beyinde daha fazla serotonin metabolitine rastlanırken, insanda yapılan otopsi çalışmalarında da çeşitli farklılıklar ortaya konmuştur (74). Nishizawa ve diğ. (96) yaptığı PET çalışmasında (8 erkek, 7 kadın) serotoninin ortalama sentez hızının erkeklerde, kadınlardan yaklaşık %50 oranında daha yüksek olduğunu göstermiştir. Serotonin alt tip reseptörlerinden biri olan 5HT_{1A} otoreseptörleri, depresyon ve anksiyetede yer almakta olup birçok antidepresan ilacın temel bağlanma noktalarıdır. Bir başka PET çalışmasında 25 sağlıklı bireyde (12 kadın, 13 erkek) yapılan analizler, 5HT_{1A} reseptörüne bağlanma potansiyelinin beyin birçok bölgesi için (*dorsal rafe*, *anterior cingulat*, amigdala, medial ve orbital prefrontal korteks) kadınlarda daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (99).

Dopaminerjik ve serotonerjik sistemlere ilaveten diğerk nörotransmitter sistemlerde de farklılık gözükmektedir. Kolinerjik sistem hafıza ve bilişsel işlevlerde rol oynar. Kadınlarda kortikal muskarinik asetilkolin reseptör sayısı fazladır. GABAerjik (Gama amino bütirik asit) sistem ruh hali ve hafızanın düzenlenmesinde majör inhibitör sistemdir ve kortikal GABA seviyesi kadında daha yüksektir. Opioid sistem ağrı ve ödül mekanizmalarında rol oynamaktadır ve kadınlarda kortikal ve subkortikal bölgelerde daha yüksek bağlanma gösterilmiştir (36).

2.2. Seks Steroit Hormonları ve Beyin Cinsiyeti İlişkisi

Kadın ve erkek beyni arasındaki farkların oluşmasındaki temel nedenlerden biri olarak seks steroit hormonları gösterilmektedir. Hamilelik döneminde, fetüs ve anne kaynaklı maruz kalınan seks steroit hormonları, fetüs beyni üzerinde bir takım etkiler gerçekleştirerek her iki cinsiyet için de nöroendokrin sistem ve davranışların farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Özellikle testosteron, östradiyol ve dihidrotestosteron (DHT) seks steroit hormonlarının, beyindeki organizasyonların farklılaşmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (33, 71).

2.2.1. Seks Steroit Hormonlarının Yapımı:

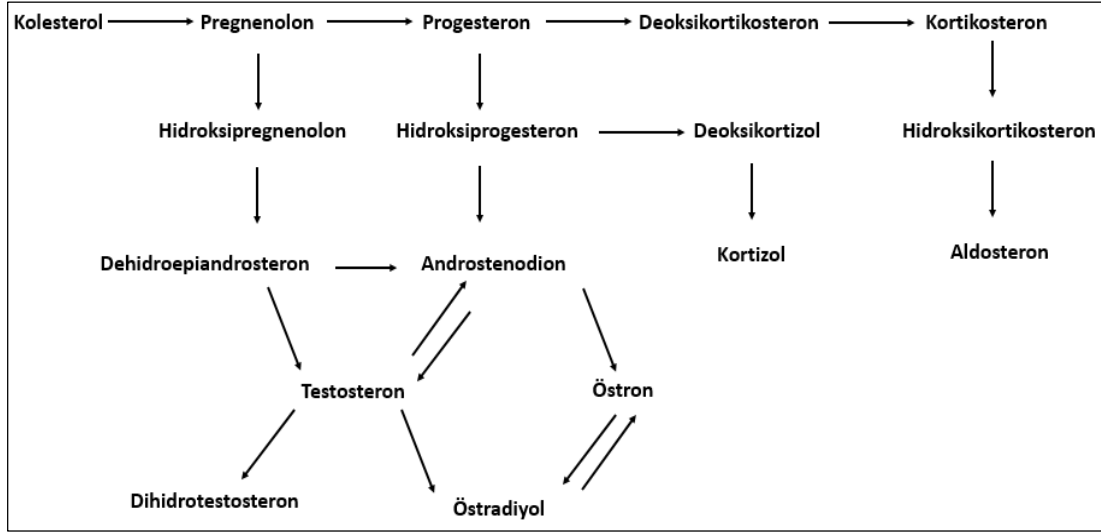
Her iki cinsiyetin embriyonal gelişimlerini incelediğimizde, erkekte tipik erkek gelişimini belirleyen Y kromozomu üzerindeki Sry genidir. Hamileliğin 7. haftası dolaylarında bu bölge aktifleşerek *testicular determining factor* sentezini başlatır ve bunun sonucunda da testislerin gelişmesi sağlanır. Testis gelişimi ile beraber, primordial gonadlarda Leydig hücreleri tarafından testosteron üretimi başlar (108). Cinsiyet farklılaşması için 8. ve 24. hafta aralığı önemli olarak gözükmele beraber bu haftalar dışında da farklılıklar oluşmaktadır. Erkek fetüslerde testosteron seviyesi başlangıçta plasental insan koryonik gonadotropin (hCG) tarafından artırılır, LH etkisiyle seviye yüksek kalır. LH ve hCG reseptörleri hamileliğin 10-12 haftasına kadar oluşmazlar. Daha önceki testosteron sekresyonu başka faktörler tarafından kontrol edilir. Cinsiyetler arasında testosteronun serum seviyeleri arasındaki maksimal fark ise 12. ve 18. haftalar arasında oluşmaktadır. Bunlara ilaveten fetüsler, maternal adrenal bezlerden, fetal adrenal bezlerden ve yağdan kaynaklanan bir miktar androjene de maruz kalmaktadırlar (66, 75).

Kadınların gelişimini incelediğimiz zaman, fetal ovaryumların 7. hafta civarında farklılaşmaya başladığı görülür. Fetal ovaryumlar östrojen üretmektedirler. Fakat az miktarda östrojen ürettiklerinden dolayı fetüs gelişiminin son kısmına kadar inaktif oldukları düşünülmektedir. Ayrıca her iki cinsiyetteki fetüste, dolaşımda anne ve plasenta kaynaklı yüksek miktarda östrojen bulunmaktadır (66, 108). Normalde bu östrojenin beyne ulaşarak maskülinize edici etki göstermesi beklenebilir. Fakat dolaşımdaki östrojen, α -fetoprotein adı verilen bağlayıcı bir protein tarafından bağlanarak taşınmaktadır. Bu nedenle bağlı haldeki östrojen, beyin hücrelerine girememekte ve maskülinize edici etkisini gösterememektedir. Diğer taraftan, α -fetoprotein dolaşımdaki testosteron üzerine herhangi bir etkisi olduğu gösterilmemiştir (11, 33).

Fetal gelişim sırasında testosteron ve diğer androjenlerin bir kaynağı da fetal adrenal bezlerdir. Yani bu bezleri etkileyen durumlar da beyin cinsiyeti üzerine etki göstermektedir (örneğin konjenital adrenal hiperplazi). Ayrıca maternal ve fetal kortizol arasında doğrusal bir ilişki vardır. Sıçanlarda hamileliğin son haftasındaki (14-21 günler) maternal stres fetüsün dolaşımındaki fetal kortikosteron seviyesini artırmaktadır. Yetişkin insanda kortizol üretimi ve testosteron arasında ters bir ilişki vardır. İlginç bir şekilde yapılan bir çalışmada yetişkindekinin aksine fetal testosteron ve kortizol arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bunun nedeni olarak, fetal testosteronun bir kısmının adrenal bezlerden (kortizol gibi) kaynaklanıyor olması gösterilebilir. Yani sonuç olarak fetal kortizölü artıran faktörler testosteronu da artırabilir ve bu da daha çok bir maskülin bir profil ile ilgili olabilir (51, 63).

2.2.2. Seks Steroit Hormonlarının Etki Mekanizması:

Bütün seks steroid hormonları kolesterolden sentezlenmekte ve dolaşımla hedef bölgeye taşınarak etkisini göstermektedir. Şekil 2.3'de kolesterolden sentezlenen steroid hormonlarının sentez ve dönüşüm basamakları özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Kolesterolde sentezlenen steroid hormonlarının sentez ve dönüşüm basamakları (25).

Seks steroid hormonları dolaşım ile hedef bölgeye taşınarak etkisini göstermektedir. Erkek fetüslerde dolaşımdaki testosteron küçük yapısından dolayı kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebilmektedir. Lipofilik yapıda olduğundan hedef hücrenin zarını doğrudan geçer ve sitoplazma ya da nükleustaki reseptörüne bağlanır. Hücre içine giren testosteron, 5 α -redüktaz enzimi aracılığıyla 5 α -dihidrotestosterona (DHT) ya da aromataz enzimi aracılığıyla bir östrojen formu olan 17 β -östradiyole dönüştürülür (75, 79). Buradaki klasik görüş, beyindeki maskülinize edici etkinin asıl olarak aromataz aktivitesiyle gerçekleştiği şeklindedir. Yani ilginç bir şekilde, erkeklerde, testosteron son etkisini bir östrojen formuna dönüşerek östradiyol reseptörleri üzerinden gerçekleştirmektedir. Dolaşımdaki anne ve plasenta kaynaklı östrojenin, α -fetoprotein ile bağlı durumda olması, östrojenin etkisinin daha çok postnatal olduğunu, dolayısıyla prenatal dönemdeki asıl etkinin testosteron ve diğer androjenler sayesinde gerçekleştiğini düşündürmektedir. Yani feminizasyon sürecinin pasif bir şekilde gerçekleştiği varsayılmaktadır (11, 33). Diğer taraftan, DHT ve diğer androjenlerin de androjen reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirdiği bir takım etkiler gösterilmiştir. Bu nedenle son dönemlerde asıl belirleyici etkinin östrojen ve androjen reseptörlerin karşılıklı etkileşimlerinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (138).

Seks steroid hormonlarının asıl etkisinin gerçekleştiği dönemler türler arasında farklılık göstermektedir. Önceki bölümlerde insan için seks steroid hormonlarının gebeliğin hangi haftalarında önemli olduğu özetlenmişti. Diğer canlı türlerine baktığımızda, sıçanda primer kritik dönem, hamileliğin son haftasından doğum sonrası 10. güne kadar sürmekte iken Rhesus maymunlarında kritik periyot prenatal dönemde oluşmaktadır (64, 85).

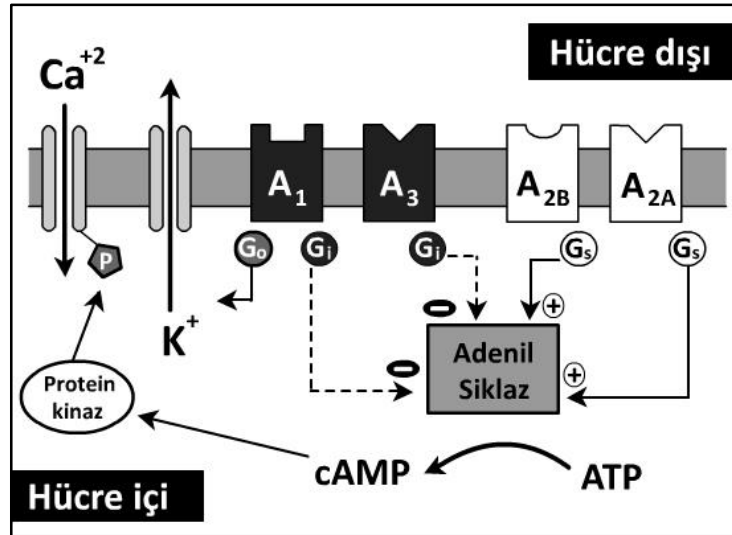
2.3. Kafein

Kafein; kahve, çikolata, çeşitli içecekler ve çok sayıda tedavinin içeriğinde yer alan dünya çapında yüksek miktarda tüketilen bir psikoaktif bir ilaçtır. Nonselektif adenzin antagonisti özelliği gösterir ve nöroprotektif etkiye sahiptir. Kafeinin neredeyse tamamı gastrointestinal sistemden emilir. Oral yolla alındıktan 15-120 dk sonra plazmada tepe noktasına ulaşır. Plazma yarılanma süresi 3-8 saat arası değişir (93). Kafeinin bazı metabolitleri de farmakolojik aktivasyona sahiptir. 1,3-dimetilksantin (teofilin) ve 1,7-dimetilksantin (paraksantin)'nin biyolojik olaylarda rol aldığı düşünülmektedir. Sıçanlarda teofilin seviyeleri yüksek olmasına rağmen plazmadaki asıl major metabolit paraksantindir. Teofilin, kafeine göre A_1 ve A_{2A} adenzin reseptörleri üzerinde 3-5 kat daha fazla inhibitör etki gösterebilmektedir. Paraksantin'in etkisi ise kafeine yakındır. (15, 48). İnsanlar ve rodentler arasında kafein metabolizması açısından farklılıklar görülmektedir. Sıçanlarda kafein %40 oranlarında trimetil türevlerine metabolize olurken bu oran insanda %6'dan daha azdır (8). Laboratuvar hayvanlarındaki kafein uygulamalarında verilen doza göre farklı yanıtlar oluşmaktadır (38). Örneğin düşük doz kafein, kokain ve amfetamin gibi psikomotor uyarıcı etki gösterir. Yüksek dozda ise anksiyete oluşumu gözlenir ve fensiklidin benzeri etki oluşturur (90).

2.3.1. Adenzin Reseptörleri:

Adenzinin A_1 , A_{2A} , A_{2B} ve A_3 olmak üzere 4 çeşit reseptörü vardır. A_1 ve A_3 reseptörleri G_i proteini aracılığıyla adenil siklaz (AC) enziminin inhibe etmektedir. Diğer taraftan A_{2A} ve A_{2B} G_s proteini aracılığıyla AC stimülasyonu gerçekleştirmektedir (98, 102, 136). A_3 ve A_{2B} reseptörleri metilksantinler tarafından az miktarlarda etkilendiğinden kafein ve teofilin asıl etkilerini A_1 ve A_{2A} reseptörleri

üzerinden gösterirler. A_1 reseptörlerin aktivasyonu adenil siklazı ve birkaç tip voltaj duyarlı kalsiyum (Ca^{+2}) kanalını inhibe ederken, birkaç tip potasyum (K^+) kanalı, fosfolipaz C ve fosfolipaz D'yi aktive etmektedir. A_{2A} reseptörü Gs proteini ile ilgili olduğundan aktivasyonu sonucu AC ve bazı voltaj duyarlı Ca^{+2} kanalların (özellikle de L-tip kalsiyum kanalları) aktivasyonu gerçekleşmektedir (46) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Adenozin reseptörleri ve rol aldığı hücre içi yolların bazıları. Fredholm (46)'a göre modifiye edilmiştir.

Kronik kafein ve teofilin uygulamasının adenozin reseptörlerinde up-regülasyona yol açtığı gösterilmiştir (77). Kafeinin adenozin reseptörlerine bağlanmasında alınan doz miktarı da önemli olmaktadır. Düşük doz kafein A_1 ve A_2 reseptörlerine bağlanabilirken, yüksek doz kafein A_{2B} reseptörüne bağlanabilmektedir. A_3 ise kafeine karşı duyarsızdır (46).

2.4. Kafein ve Seks Steroit Hormonlarının İlişkisi

Kafein etkisini adenozin reseptörleri aracılığıyla göstermektedir. Bu reseptörler seks steroid hormonlarının üretilmesi ve düzenlenmesinde rol alan testis, ovaryum, adrenal bezler ve hipotalamus-hipofiz aksı gibi yapılar üzerinde yer almaktadır. Kafein alımının, seks steroid hormonları üzerine olan etkileri hakkında çeşitli insan çalışmaları olmakla beraber, sonuçlar tutarlılık göstermemektedir. Örneğin, yapılan epidemiyolojik çalışmalardan birinde, postmenapozal kadınlarda

kafein alımı sonucu plazma östrojen seviyelerinde artış, serbest testosteron seviyelerinde ise azalma meydana geldiği gösterilmiştir (43). Diğer taraftan yapılan benzer bir epidemiyolojik çalışmada ise, postmenapozal kadınlarda kafein alımı ile plazma testosteron ve östradiol seviyeleri arasında bir ilişki bulunamamıştır (54). Hayvanlarda yapılan çalışmalara baktığımızda, sıçanlarda kafeinin akut uygulaması sonucu testosteronun plazma seviyesinin arttığı gösterilmiştir (104). Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada kronik kola tüketimi sonucu alınan kafeinin, testosteron ve östradiyol seviyelerini artırdığı ortaya konulmuştur (30). Sarobo ve diğ. (115)'nin yaptığı çalışmada kafein alımının plazma testosteron ve DHT seviyelerini artırdığı gösterilmiştir.

2.4.1. Testisler ve Adenozin Reseptörleri İlişkisi:

İlk kez Murphy (91) tarafından sıçan testislerinde adenozin reseptörlerin varlığı gösterilmiştir. Monaco ve Conti (88) ise A_1 adenozin reseptörlerin seminiferöz tübülde yer alan Sertoli hücrelerinde bulunduğunu göstermiştir. Sıçan testisinde yüksek miktarda A_3 adenozin reseptör ekspresyonu gösterilmiştir. A_3 reseptörleri daha çok germ hücrelerinde lokalize olmaktadır (112, 136). Sertoli hücreleri ve germ hücreleri arasında resiprokal bir ilişki öne sürülmüştür. Bu modele göre germ hücreleri tarafından üretilen adenozin, sertoli hücreleri üzerindeki inhibitör adenozin reseptörlerini aktive etmektedir. Bu durum ise folikül stimüle edici hormon (FSH) aracılığıyla oluşmuş cevapların inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu bağlamda adenozinin etkisi germ hücrelerin fonksiyonu ile yakından ilgili olabilir (34). Sıçan testislerinde adenozin reseptörlerinin fizyolojik rollerini indirekt olarak ortaya koyan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin bu reseptörlerin kafein ile bloklanması sperm motilitesini, metabolizmasını ve ovuma penetre kabiliyetini değiştirmektedir. Yüksek miktarda metilksantin, testiküler atrofiye neden olmaktadır. Sertoli hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda, A_1 reseptörlerin aktivasyonu FSH aracılı cAMP üretimini ve androjenden östrojene aromatisasyonu inhibe etmektedir (16, 34, 80). Ayrıca farenin leydig hücrelerinde *cordycepin* adlı bir adenozin analogu kullanılarak uyarılan testosteron salımı, A_1 , A_{2A} ve A_3 reseptörlerinin seçici antagonistleri kullanıldığında baskılanmıştır. A_{2B} reseptör antagonistinin testosteron salımı üzerine

etkili olmadığı bu çalışmada en fazla baskılama A_3 reseptör antagonisti tarafından gerçekleştirilmiştir (80).

2.4.2. Adrenal Bezler ve Adenozin Reseptörleri İlişkisi:

Genel olarak adrenal hücrelerden kortikosteron üretimi protein kinaz A (PKA) ve protein kinaz C (PKC) sistemleri tarafından kontrol edilmektedir (50). Adenozinin, sıçan adrenokortikal hücrelerinde kortikosteron üretimini stimüle ettiği gösterilmiştir. Kortikosteron üretimini %30 oranında artırdığı ortaya konulmuştur (35). Yapılan bir çalışmada sıçan adrenal fasikülata hücrelerinde, A_2 reseptör aracılı kortikosteron üretimi ilk kez gösterilmiştir. Bu çalışmada A_{2A} ve A_{2B} reseptör antagonisti kullanıldığında adenozinin stimüle ettiği steroidogenezde azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Adrenal hücrelerden kortikosteron üretimi A_{2A} reseptörü ve JAK_2 sinyal yolağı ile olmaktadır. JAK_2 yolağının sadece adenozin tarafından stimüle edilen steroidogenezin yarısından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sonuçta adenozin tarafından stimüle edilen steroidogenezde asıl sorumlu isoformun PKC ile ilgili olduğu düşünülmektedir (31, 32). Kafeinin adrenal bezler üzerine olan etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, yapılan bir çalışmada kafeinin gerek dinlenme gerekse de stres durumunda kortizol ve epinefrin seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (2). Başka bir çalışmada ise, kafeinin mental stress durumunda kadınlarda kortizol seviyelerini artırdığı bulunmuştur. (84). Ayrıca kafein alımı hamile kadınlarda tükrükteki kortizol seviyesini düşürürken, hamile olmayan kadınlarda anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir (125).

2.4.3. Ovaryum ve Adenozin Reseptörleri İlişkisi:

Adenozin, korpus luteumun LH üzerine olan cevabını module etmektedir. Ayrıca prostoglandin $F2\alpha$ 'nın luteolitik etkisi üzerinde önemlidir (14). Adenozinin, granüloza hücrelerinde FSH'nin etkisini module ettiği gösterilmiştir. Adenozin, granüloza ve luteal hücreler için 2 şekilde etki göstermektedir. İlkinde hücre içi metabolizma için substrat görevi görürken ikincisinde A_2 reseptör agonisti olarak etki etmektedir. (18). Adenozin sıçanlarda ovaryum membranındaki A_2 tip reseptörler aracılığıyla adenilat siklaz aktivitesini stimüle ettiği gösterilmiştir (17). Ayrıca insan

plasentasında adenozin reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Bu reseptörlerin yüksek ve düşük affiniteli tipleri de bulunmaktadır (117).

2.4.4. Hipotalamus-Hipofiz Aksı ve Adenozin Reseptörleri İlişkisi:

Kafeinin insan ve hayvanlarda glukokortikoid seviyesini artırdığı gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, kişilere uyku sırasında enjekte edilen kafeinin plazma kortizol seviyesini artırdığı gösterilmiştir (82). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise akut kafein uygulamasının plazma kortikosteron seviyesini artırdığı ortaya konmuştur (95). Hipotalamusta bulunan paraventriküler nükleus hipofiz-adrenokortikal sistemi kontrol etmektedir. Kafeinin bu etkisi muhtemelen, paraventriküler nükleustaki adenozin reseptörleri üzerinde meydana gelen merkezi antagonistik etki ile oluşmuş olabilir. (100).

2.5. Kafein ve Hamilelik

Düşük ve normal dozlarda (50-300 mg, yaklaşık 1-3 fincan kahveye denk gelmektedir) kafein insanda merkezi stimülasyon gerçekleştirir. Yani iyi hissetme, uyanıklık, enerji ve konsantrasyon olma yeteneğini artırır. Yüksek dozlarda ise (300-800 mg) anksiyete, sinirlilik ve insomnia gibi çeşitli negatif hisler oluşmasına neden olmaktadır (94). Bir fincan kahve, çay ya da kola 100-300 mg kafein içermektedir. Hamile kadınların yaklaşık %60'ı kafein içerikli içecekler tüketmektedirler. Hamile rodentlere kafein uygulaması yapıldığında fetal kafein seviyesi annedeki seviyenin %90'ı kadardır. Fetal kafeinin kleransı annede gözlenenden daha uzundur ve yarı ömrü 12-24 saat sürmektedir (26). Fetüs üzerinde kafein etkilerini çalışmak 2 temel sebep nedeniyle önemlidir. Birincisi kafein hem kan-beyin bariyerini hem de plasenta bariyerini geçebilmektedir. Yani hamile hayvanların içme suyuna karıştırılan kafein fetüs tarafından absorbe edilebilmektedir (72). İkincisi kafeinin yarılanma ömrü yaşa bağlıdır. Fetüsteki yarılanma ömrü enzimatik aktivitelerin düşük olması ve kafein ile ilgili metabolik yolların immatür olması nedeniyle yeni doğanlara göre daha uzundur. Buna ek olarak hamileliğin son ayında kafeinin yıkılma hızı azalma eğilimi gösterir (93).

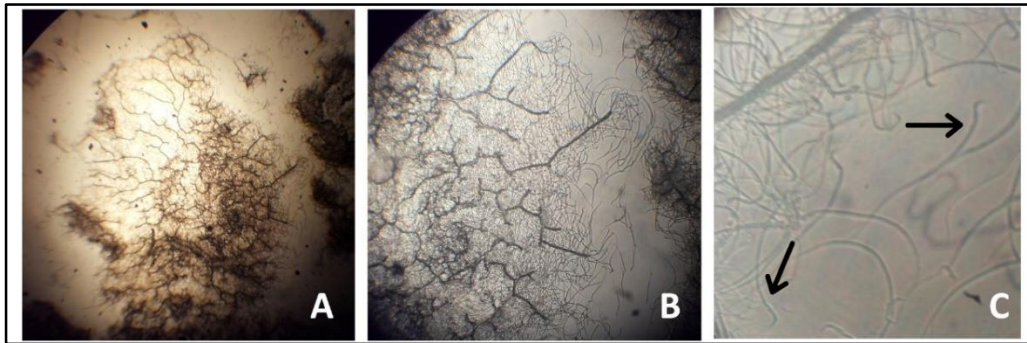
2.6. Hipotez ve Amaç

Seks steroid hormonlarının üretilmesinde kilit rollere sahip hipotalamus-hipofiz aksı, testisler, ovaryum ve adrenal bezlerde adenozin reseptörlerinin bulunması ve antagonist özellikteki kafeinin bu reseptör ve yolları etkilemesi, fetal dönemdeki seks steroid hormonlarının üretilmesinde ve dolayısıyla beyin cinsiyetinin düzenlenmesinde etkili olabileceğinden hipotezimizi “hamile sıçanlara perinatal dönemde verilen kafein, fetüs ve yavru sıçanların beyin dokusundaki seks steroid hormonlarının düzeyini etkiler” olarak kurduk. Bu doğrultuda, hamile sıçanlara perinatal dönemde verilen kafeinin;

- a- Anne ve yavrularda adrenal bez, yavrularda gonad ağırlıkları, fetüs/ yavrularda anogenital mesafe üzerine etkilerini,
- b- Serum serbest testosteron düzeyi üzerine etkisini,
- c- Erkek ve dişi fetüs/yavrularda beyin dokusundaki seks steroid hormonları üzerine etkilerini göstermeyi amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 220-290 gram ağırlıkta, yetişkin ve daha önce hiç çiftleşmemiş Wistar soyu dişi sıçanlar kullanıldı. Her kafeste 2 erkek ve 3 dişi olacak şekilde, dişi sıçanlar çiftleşmeleri için erkek sıçanların yanına konuldu. Dişi sıçanlarda ertesi sabah vajinal yıkama ile alınan içerik mikroskop altında incelenerek sperm kontrolü yapıldı (Şekil 3.1). Sperm pozitif çıkan sıçanlar, o gün hamileliğin birinci günü kabul edilip, tartıldıktan sonra tek olarak yeni bir kafese konuldu. Sperm negatif çıkan sıçanlar ise ertesi gün tekrar sperm kontrolü yapılmak üzere alındığı kafese geri bırakıldı. Yapılan kontrollerde 5 gün boyunca sperm rastlanmayan dişiler grup dışı bırakıldı. Tüm sıçanlar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminde, sıcaklığı ve bağıl nemi sabit, havalandırma kontrollü hazırlık odalarında; 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Deneysel çalışmalar Helsinki Deklarasyonu'na ve Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü (USA NIH) tarafından bildirilen Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına ve Bakımına İlişkin Rehber'e uygun olarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Sperm pozitif çıkan dişi sıçanların vajinal yıkama ile alınan içeriğindeki spermelerin mikroskop görüntüsü. **A:** x4 objektif **B:** x10 objektif **C:** x40 objektif. Her üç görüntüde de fotoğraf makinesinin objektifi görüntüyü 1,5 kat oranında büyötmek için kullanıldı.

3.1. Deney Grupları

3.1.1 Kafein Dozajı:

Deney düzeneği kontrol (KO), düşük doz kafein (DK) ve yüksek doz kafein (YK) olmak üzere 3 gruptan oluşmaktadır. Sperm pozitif olarak belirlenen dişi sıçanlar

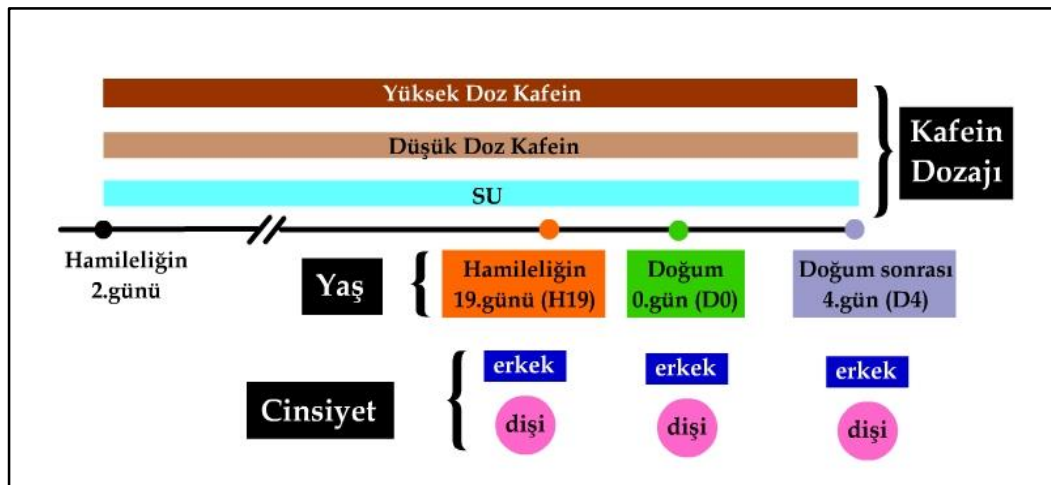
tartıldıktan sonra rastgele olarak 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna normal çeşme suyu verildi. Kafeinin sıçanlar üzerindeki etkisi dozaja bağlı olduğundan düşük ve yüksek doz kafein olmak üzere 2 kafein grubu oluşturuldu. Kafein (C0750, Sigma-Aldrich), içme suyuna karıştırılarak; DK grubu için 0,3 g/L, YK grubu için 0,8 g/L olacak şekilde hamileliğin ikinci gününden itibaren tüm hamilelik dönemi boyunca verildi (22, 77). Bütün gruplardaki sıçanlar standart yem ile beslendi. Tüm sıvı ve yem tüketimleri günlük olarak ölçüldü. Her gruptan rastgele seçilen 3 hamile sıçan, hamileliğin 10. gününde metabolik kafese konularak; 24 saatlik yem, sıvı tüketimi, idrar miktarı ve ağırlık farkları saptandı.

3.1.2 Yaş:

Gebelik süresi 21 – 23 gün olan sıçanlarda, steroid hormonlarının etkisi prenatal dönemin son haftası ve postnatal dönemin ilk haftası çok etkili olduğu için (64) her gruptaki fetüs/yavru sıçanlar 3 farklı zaman periyodunda incelendi. Buna göre fetüs/yavru sıçanlar hamileliğin 19. günü (H19), doğdukları gün (D0) ve doğum sonrası 4. günde (D4) incelendi.

3.1.3 Cinsiyet:

Fetüsler ve doğan yavruların anogenital mesafe (AGM)'leri ölçülerek erkek ve dişi olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Aşağıda şekil 3.2'de doz, yaş ve cinsiyete göre oluşturulan grupların özet gösterimi yer almaktadır.



Şekil 3.2: Doz, yaş ve cinsiyete göre oluşturulan deney gruplarının özet gösterimi.

3.2. Cerrahi İşlemler

3.2.1 Annede Yapılan Cerrahi İşlemler:

Eter anestezisi uygulanan anne sıçanlarda abdominal kesi ile karın bölgesi açıldı. Annenin serum serbest testosteron ve kortizol seviyelerini ölçmek için kardiyak ponksiyon ile kan örnekleri alındı. Ardından adrenal bezler çıkarılıp etrafındaki doku temizlendikten sonra tartıldı. H19 grubu annelerde, kan alma işlemini takiben uterus kesilerek fetüsler dışarı çıkarıldıktan sonra adrenal bezler çıkarıldı.

3.2.2 Fetüs ve Yavrularda Yapılan Cerrahi İşlemler:

Fetüs ve yavrular boyun bölgesinden kesilerek dekapite edildi. Torakal bölgelerinden toplanabilecek maksimum kan alınımını takiben, yavru ve fetüslerin karın bölgesi açılarak adrenal bezler ve gonadlar izole edildi. Çıkarılan adrenal bez ve gonadlar etrafındaki dokular temizlendikten sonra tartıldı. En son olarak hayvanların anogenital mesafeleri ölçülerek cinsiyetleri belirlendi.

Kan alma işlemi ile eş zamanlı olarak fetüs ve yavruların kafatasından çıkarılan beynin frontal korteks ve hipotalamus bölgeleri, buz üzerinde ve soğuk fosfat tampon çözeltisi (PBS) (*bakınız 3.5. Kullanılan Çözeltiler*) içerisinde izole edildi. İzole edilen dokular, kuru buz üzerinde bulunan 2-metil bütan sıvısı (*M32631 Sigma-Aldrich*) aracılığıyla hızla donduruldu. Ependorf tüp içerisinde hızla tartıldıktan sonra analiz edilene kadar -80°C 'de muhafaza edildi (6).

3.3. Genel Ölçümler

3.3.1 Kan ile Yapılan Ölçümler:

Anne ve yavrulardan toplanan kanlar santrifüj edildikten sonra serum kısmı ayrılarak, serbest testosteron ve kortizol analizleri yapılmaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi. Kan miktarının oldukça az olması nedeniyle hamileliğin 19. günündeki fetüslerin kan analizi yapılamadı. Serum kortizol ölçümleri Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Laboratuvarında (*DXI 800, Beckman Coulter*) tanı amaçlı kitler (*33600, Beckman Coulter*) kullanılarak yapıldı.

Serum serbest testosteron ölçümleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı Laboratuvar'ında, radioimmunoassay (RIA) yöntemi aracılığıyla, serbest testosteron-DSL4900 (*Beckman Coulter*) kiti kullanılarak ölçüldü. Ölçümler kitin belirttiği yönteme göre yapıldı. Kitin içinden çıkan antikor kaplı tüplere 50 µL kalibratör, kontrol ve ölçülecek doku örnekleri eklendi. Ardından her bir tüpe 200 µL *tracer* eklenerek vortekslendi. Toplam cpm (*counts per minute*) için bir tüpe sadece 200 µL *tracer* eklendi. Daha sonra tüplerin üzeri kapatılarak 37°C sabit sıcaklıkta 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonu takiben toplam cpm tüpü hariç geri kalan bütün tüplerin içeriği aspire edilerek boşaltıldı. Ardından tüplere 3 ml deiyonize su eklendi ve tüpler tekrar aspire edilerek boşaltıldı. En son olarak kalibratör, kontrol ve örneklerin hepsi gama sayacı aracılığıyla ölçüldü. Kullanılan kitin ölçüm aralığı (0,18 – 100) pg/ml hassasiyetindeydi.

3.3.2 Adrenal Bez ve Gonadlar İle Yapılan Ölçümler:

Anne, fetüs ve yavrulardan alınan adrenal bezler ve sadece yavrulardan alınan gonadların ağırlıkları ölçüldü. Elde edilen ağırlıklar gram vücut ağırlığı başına düşen miligram doku ağırlığı (mg/g) olarak ifade edildi. H19 grubundaki annelerde, cerrahi işlem öncesi hayvan tartıldığında fetüsler de tartılmış olduğundan H19 grubundaki annelerin ağırlığından toplam fetüs ağırlıkları çıkarıldı. Ardından adrenal bezler için gram vücut ağırlığı başına düşen miligram doku ağırlığı hesaplandı.

3.3.3 Anogenital Mesafeyle İlgili Yapılan Ölçümler:

AGM, anüsün kaudal kısmından genital tuberkülün başlangıç kısmına kadar olan mesafeyi kastetmektedir. AGM dijital kaliper aracılığıyla iki kere ölçüldü ve ortalamaları alındı. Ölçümlerin hassasiyeti 0,01 mm kadar olup bulunan değerler vücut ağırlığının küp kökü (mm/g^{-3}) ile standardize edilerek her bir hayvan için anogenital indeks oluşturuldu. Çünkü vücut ağırlığı kübik olarak artış gösterirken anogenital mesafe lineer bir artış göstermektedir (49).

3.4. Beyin Dokusunda RIA Ölçümleri

Beyin dokularının homojenizasyonu ve RIA analizleri için gerekli olan ekstraksiyon işlemleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Laboratuvar'larında, RIA ölçümlerinin hepsi ise Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirildi.

3.4.1 Homojenizasyon:

Frontal korteks ve hipotalamus dokularının bulunduğu ependorf tüpler -80°C soğutucudan çıkarılarak buz içine alındı. İçinde %0,1 proteaz inhibitör kokteyli (P8340; Sigma, St. Louis, MO) olan 500 μL soğuk lizis tampon (bakınız 3.5. Kullanılan Çözeltiler) dokunun üzerine eklenerek PRO200 homojenizatör (Pro Scientific, Oxford, CT, USA) aracılığıyla homojenizasyon gerçekleştirildi.

3.4.2 Ekstraksiyon:

Homojenizasyon sonrası ependorf tüpler yaklaşık 10 saniye vorteks ile karıştırıldı. Homojenize edilmiş karışımın 350 μL 'si alınarak teflon kapaklı borosilikat cam tüpe aktarıldı. Üzerine homojenatın yaklaşık 10 katı olacak şekilde 4 ml di-etil eter (HPLC için özel; C25115 Lab-Scan) ilave edildi. Ardından yatay karıştırıcıda 45 dakika boyunca karıştırıldı. Daha sonra tüpler dikey konumda 15 dakika boyunca bekletilerek aköz ve organik fazın ayrılması sağlandı. Aköz faz dondurulduktan sonra organik fazdan 2,5 ml alınarak yeni bir tüpe aktarıldı. Nitrojen gazı aracılığıyla tüplerdeki eter buharlaştırıldı. Tüpün dibinde kalan ekstrakt daha sonra 750 μL çözücü tampon (IM1030, Beckman Coulter) içinde yeniden çözüldü. Elde edilen karışım 3 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde vortekslenerek karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 50 μL alınarak testosteron, 200 μL alınarak östradiyol ve 400 μL alınarak dihidrotestosteron ölçümleri RIA yöntemi aracılığıyla yapıldı.

3.4.3 Testosteronun RIA Analizi:

IM1030 (Beckman Coulter) çözücü tampon içerisindeki karışımdan alınan örnekler RIA yöntemi aracılığıyla, testosteron-IM1087 (Beckman Coulter) kiti kullanılarak ölçüldü. Ölçümler kitin belirttiği yöntemle yapıldı. Kitin içinden çıkan antikor kaplı tüplere 50 μL kalibratör ve ölçülecek doku örnekleri eklendi. Ardından her bir tüpe 500 μL tracer eklenerek vortekslendi. Toplam cpm için bir tüpe sadece 500 μL tracer eklendi. Daha sonra tüplerin üzeri kapatılarak 37°C sabit sıcaklıkta 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonu takiben toplam cpm tüpü

hariç geri kalan bütün tüplerin içeriği aspire edilerek boşaltıldı. En son olarak kalibratör ve örneklerin hepsi gama sayacı aracılığıyla ölçüldü. Kullanılan kitin ölçüm aralığı (0,04 – 20) ng/ml hassasiyetindeydi

3.4.4 Östradiyolun RIA Analizi:

IM1030 (*Beckman Coulter*) çözücü tampon içerisindeki karışımdan alınan örnekler RIA yöntemi aracılığıyla, ultra hassasiyetli östradiyol-DSL4800 (*Beckman Coulter*) kiti kullanılarak ölçüldü. Ölçümler kitin belirttiği yonteme göre yapıldı. Tek kullanımlık tüplerin dibine 200 µL kalibratör, kontrol ve ölçülecek doku örnekleri eklendi. NSB (*Non-Specific Binding*) tüpüne 300 µL miktarında 0 pg/ml östradiyol kalibratörü eklendi. Ardından NSB tüpü hariç diğer tüplere 100 µL antiserum eklenerek vortekslendi. Daha sonra tüplerin üzeri kapatılarak yaklaşık 25°C oda sıcaklığında 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonu takiben bütün tüplere 100 µL tracer eklenerek vortekslendi. Toplam cpm için bir tüpe sadece 100 µL tracer eklendi. Daha sonra tüplerin üzeri kapatılarak yaklaşık 25°C oda sıcaklığında 120 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonu takiben toplam cpm tüpü hariç geri kalan bütün tüplere 1 ml çöktürme reaktifi eklendi ve bütün tüpler vortekslendi. Ardından 17 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Bunu takiben toplam cpm tüpü hariç geri kalan bütün tüpler 17 dakika boyunca 3000 rpm hızda, soğutmalı olarak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplam cpm tüpü hariç geri kalan bütün tüplerin içeriği aspire edilerek boşaltıldı. En son olarak kalibratör, kontrol ve örneklerin hepsi gama sayacı aracılığıyla ölçüldü. Kullanılan kitin ölçüm aralığı (2,2 – 750) pg/ml hassasiyetindeydi.

3.4.5 Dihidrotestosteronun RIA Analizi:

RIA ile ölçüm yapılmadan önce DHT'ye özel olarak ölçümünün yapılabilmesi için farklı bir ekstraksiyon aşaması daha uygulandı. IM1030 (*Beckman Coulter*) çözücü tampon içerisindeki karışımdan ve DHT'nin kendi kontrol örneğinden 400 µL alınarak cam tüplere kondu. Ardından hem kontrol hem de ölçülecek karışımın üzerine 500 µL oksidasyon solüsyonu eklendi. Elde edilen karışımlar iyice vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra tüplerin üzerine 4 ml n-hekzan (*sıvı kromatografi için özel; MERCK*) ve etanol ekstraksiyon karışımı (%98

hekzan : %2 etanol) eklenerek tüm örnekler 1 dakika boyunca vortekslendi. Daha sonra tüplerin içine 50 µL DHT numune tamponu eklenerek ağızları kapatıldıktan sonra 3-4 defa çevirerek yavaşça karıştırıldı. Ardından organik tabakayı sıvı tabakadan ayırmak için 15 dakika 2-8 °C'de 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası organik tabakadan 1 ml çekilerek yeni temiz bir tüpe konuldu ve nitrojen gazı kullanılarak buharlaştırıldı. Geriye kalan kurutulmuş materyal 250 µL DHT sıfır kalibratörü içerisinde yeniden çözüldü. Elde edilen karışım 3 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde vortekslenerek karıştırıldı.

DHT çözücü tampon içerisindeki karışımdan alınan örnekler RIA yöntemi aracılığıyla dihidrotestosteron-DSL9600i (*Beckman Coulter*) kiti kullanılarak ölçüldü. Ölçümler kitin belirttiği yönteme göre yapıldı. Kitin içinden çıkan antikor kaplı tüplere 100 µL kalibratör, ekstrakte edilmiş kontrol ve ölçülecek doku örnekleri eklendi. Ardından her bir tüpe 500 µL tracer eklenerek vortekslendi. Toplam cpm için bir tüpe sadece 500 µL tracer eklendi. Daha sonra tüplerin üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 180 rpm ile hareket eden karıştırıcı üzerinde 120 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonu takiben toplam cpm tüpü hariç geri kalan bütün tüplerin içerisiği aspire edilerek boşaltıldı. Ardından tüplere 3 ml deiyonize su eklendi ve tüpler tekrar aspire edilerek boşaltıldı. En son olarak kalibratör, kontrol ve örneklerin hepsi gama sayacı aracılığıyla ölçüldü. Kullanılan kitin ölçüm aralığı (4,0–2500) pg/ml hassasiyetindeydi.

3.5. Kullanılan Çözeltiler

Stok çözeltiler için tüm test maddeleri distile su ile çözüldü. Aşağıda PBS ve lizis tampon hazırlanırken kullanılan materyal yer almaktadır.

Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) 1L (pH:7,4)

| | |
|--|--------------------|
| NaCl..... | (8,0 gr) (MERCK) |
| KCl..... | (0,2 gr) (MERCK) |
| Na ₂ HPO ₄ | (1,44 gr) (MERCK) |
| KH ₂ PO ₄ | (0,24 gr) (MERCK) |
| Distile Su..... | (1L'ye tamamlanır) |

Lizis Tampon

| | |
|--------------------------------|-----------------------|
| Tris HCl (pH:8.0)..... | (50 mM) (Sigma T1503) |
| NaCl..... | (150 mM) (MERCK) |
| EDTA | (1 mM) (Sigma E5134) |
| Sodyum deoksikolat | (% 0,25) (MERCK) |
| Nonidet P40..... | (% 1) (Fluka 56741) |
| Proteaz İnhibitör Kokteyl..... | (% 0,1) (Sigma P8340) |

3.6. Hesaplamalar ve İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde Windows için IBM SPSS 21.0 istatistik paket programı kullanıldı. Tüm veriler ortalama \pm standart hata (ort \pm SH) ile özetlendi. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz öncesinde tüm verilerde normallik varsayımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin logaritmik (Log) dönüşümleri yapılarak normal dağılması sağlandı (5).

Gruplar (KO, DK ve YK) arasındaki genel metabolik özellikler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunduğu ikişerli karşılaştırmalar Tukey testi ile yapıldı. Fetüs/yavru sıçan sayıları grup ve cinsiyete göre; gonad ağırlıkları ise grup ve zamana göre olmak üzere iki yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldı. Fetüs/yavru sıçanların vücut ağırlıkları, anogenital mesafeleri, serbest testosteron düzeyleri ve adrenal bez ağırlıkları grup, zaman ve cinsiyete göre olmak üzere üç yönlü varyans analizi karşılaştırıldı. Beyindeki seks steroid seviyelerinin karşılaştırılmasında tek etken (beyin bölgeleri) üzerinde tekrarlamaların olduğu üç yönlü (Grup x Cinsiyet x Zaman) varyans analizi kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunduğu ikişerli karşılaştırmalar Bonferroni testi ile yapıldı.

3.7. Etik Kurul İzni

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Nükleer Tıp Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 13 Ekim 2011 tarih ve 2011/62-7 sayılı kararı ile onay alındıktan sonra deneylere başlandı.

4-BULGULAR

4.1. Metabolik Bulgular

4.1.1. Anne Sıçanlara Ait Metabolik Bulgular:

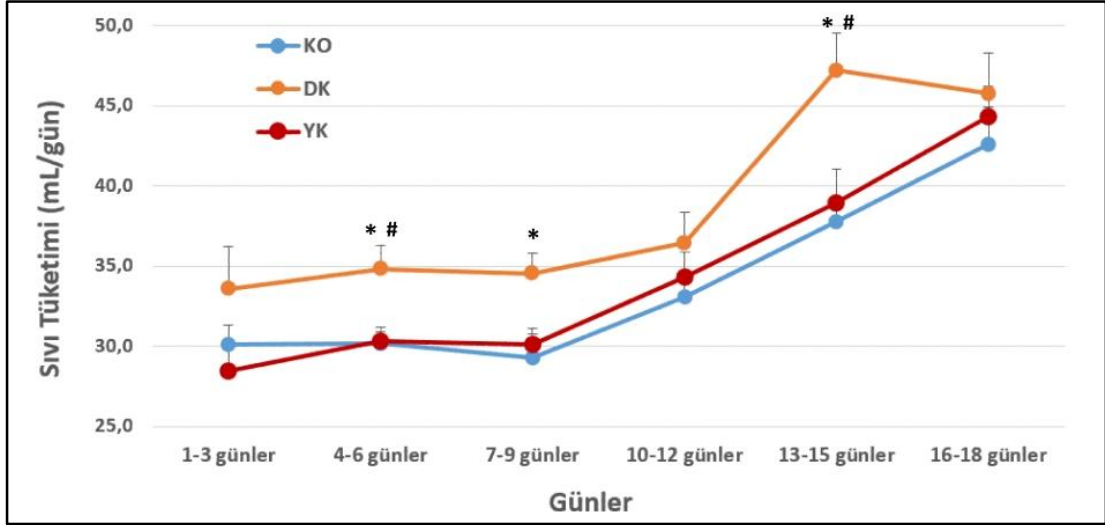
Sperm pozitif olarak belirlenen hamile sıçanların ilk ağırlıkları, hamileliğin ilk 18 günü boyunca tükettikleri günlük ortalama sıvı ve yem miktarları Tablo 4.1’de gösterilmektedir. Ayrıca her gruptan rastgele seçilen 3 hamile sıçanın, hamileliğin 10. gününde metabolik kafese konularak elde edilen 24 saatlik ağırlık farkları, idrar ve feçes miktarları da Tablo 4.1’de yer almaktadır. Gerek metabolik kafes bulguları gerekse de günlük tüketilen ortalama sıvı ve yem miktarları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark yoktu.

Tablo 4.1. Hamile sıçanlara ait genel metabolik değerler (ort \pm SH).

| | KO | DK | YK |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| Hamileliğin ilk 18 gününe ait bulgular | | | |
| Anne Sayıları | 8 | 7 | 8 |
| İlk ağırlık (g) | 251,9 \pm 6,3 | 251,7 \pm 7,1 | 244,3 \pm 6,8 |
| Sıvı Tüketimi (mL/gün) | 33,9 \pm 1,0 | 38,8 \pm 2,0 | 34,4 \pm 1,3 |
| Yem Tüketimi (g/gün) | 22,5 \pm 0,6 | 23,6 \pm 0,9 | 23,4 \pm 0,7 |
| Tek günlük Metabolik Kafes Değerleri | | | |
| Anne Sayıları | 3 | 3 | 3 |
| Ağırlık Farkı (g/gün) | -4,2 \pm 0,2 | -4,5 \pm 1,3 | -4,7 \pm 1,0 |
| İdrar miktarı (mL/gün) | 20,0 \pm 0,9 | 25,7 \pm 3,6 | 22,0 \pm 4,6 |
| Feçes miktarı (g/gün) | 18,1 \pm 1,5 | 19,0 \pm 0,1 | 19,9 \pm 0,8 |

KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein

Sıçanların hamilelik döneminin ilk 18 günü boyunca, üç günlük dönemlerde tükettikleri sıvıların günlük ortalama değerlerinin zaman içerisindeki değişimi Şekil 4.1’de gösterilmektedir. Buna göre DK grubundaki hamile sıçanların tükettikleri sıvı miktarı 4-6 ve 13-15 günleri arasında hem KO hem de YK grubuna; 7-9 günleri arasında ise sadece KO grubuna göre yüksekti ($P < 0,05$).



Şekil 4.1. Sıçanların hamilelik döneminin ilk 18 günü boyunca üç günlük dönemlerde tükettikleri sıvıların günlük ortalama değerleri (ort ± SH) *; ($P < 0,05$) KO grubuna göre, #; ($P < 0,05$) YK grubuna göre. KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein

Hamile sıçanların su tüketimleri üzerinden günlük kafein tüketimleri vücut ağırlıklarına göre hesaplandı. Buna göre DK grubu günlük ortalama $46,4 \pm 2,2$ mg/kg, YK grubu ise $113,1 \pm 4,3$ mg/kg kafein tüketti. Kafein tüketimleri açısından gruplar arasındaki fark anlamlıydı ($P < 0,001$).

4.1.2. Fetüs ve Yavru Sıçanlara Ait Metabolik Bulgular:

Her üç gruptaki annelere ait fetüs ve yavru sayıları incelendiğinde, gerek toplam gerekse de erkek-dişi sayıları arasında anlamlı bir fark yoktu (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Annelere ait fetüs ve yavru sıçan sayıları (ort ± SH).

| | Erkek | Dişi | Toplam |
|-----------------|---------------|---------------|----------------|
| KO (n=8) | $5,1 \pm 0,6$ | $5,4 \pm 0,7$ | $10,5 \pm 1,1$ |
| DK (n=7) | $4,3 \pm 0,4$ | $4,4 \pm 0,5$ | $8,7 \pm 0,8$ |
| YK (n=8) | $5,4 \pm 0,7$ | $4,6 \pm 0,6$ | $10,0 \pm 0,9$ |

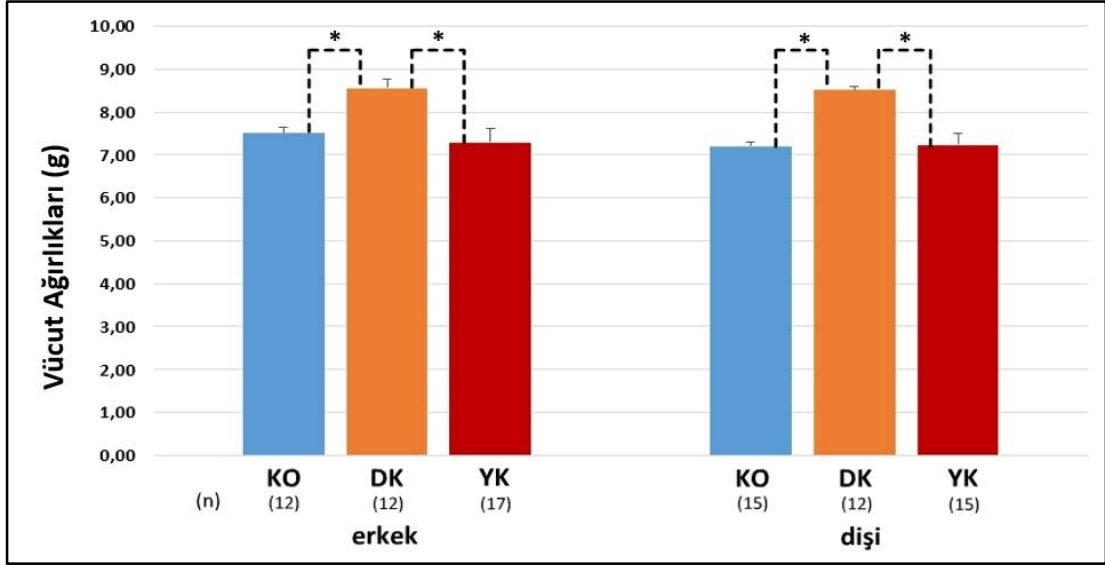
n: Anne sayısı. KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein

Fetüs ve yavru ağırlıklarının gruplara (KO, DK ve YK), zamana (H19, D0 ve D4) ve cinsiyete (erkek, dişi) göre karşılaştırmaları yapıldığında, cinsiyetler açısından erkek ve dişiler arasında fark yoktu. Hamileliğin 19. günündeki fetüslerde ve yenidoğanlarda gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 4.3). Ancak doğum sonrası 4. günde DK grubundaki dişi ve erkek yavruların ağırlıkları KO ve YK grubundaki dişi ve erkeklere göre anlamlı derecede yüksekti ($P<0,001$) (Şekil 4.2) (Tablo 4.3). Tüm gruplarda, her iki cinsiyet için zamana bağlı ağırlık artışı anlamlı olup ($P<0,001$), anlamlılık işaretleri Tablo 4.3’de gösterilmemiştir.

Tablo 4.3. H19, D0 ve D4 günlerindeki fetüs/yavruların vücut ağırlıkları (ort \pm SH).

| | KO | | DK | | YK | |
|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | Erkek | Dişi | Erkek | Dişi | Erkek | Dişi |
| H19 (g) | 2,27 \pm 0,17 | 2,23 \pm 0,14 | 2,33 \pm 0,22 | 2,06 \pm 0,19 | 2,32 \pm 0,16 | 2,09 \pm 0,16 |
| D0 (g) | 5,46 \pm 0,17 | 5,32 \pm 0,20 | 6,03 \pm 0,22 | 5,79 \pm 0,21 | 5,80 \pm 0,19 | 5,28 \pm 0,25 |
| D4 (g) | 7,51 \pm 0,21 | 7,20 \pm 0,17 | 8,56 \pm 0,18 * | 8,52 \pm 0,18 # | 7,29 \pm 0,15 | 7,23 \pm 0,16 |

*; ($P<0,001$) D4 günündeki KO ve YK grubundaki erkeklere göre #; ($P<0,001$) D4 günündeki KO ve YK grubundaki dişilere göre. Tüm gruplarda, her iki cinsiyet için zamana bağlı ağırlık artışı anlamlı olup ($P<0,001$), anlamlılık işaretleri tabloda gösterilmemiştir. H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün. KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein



Şekil 4.2. Doğum sonrası 4. gündeki erkek ve dişi yavruların vücut ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması (ort ± SH). *; ($P<0,001$). KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: yavru sıçan sayıları).

4.2. Genel Bulgular

4.2.1. Serum Serbest Testosteron ve Kortizol Düzeyleri:

Annelerin serum serbest testosteron ya da kortizol seviyeleri incelendiğinde gruplar arasında herhangi bir fark yoktu (Tablo 4.4). Ayrıca grupların hiçbirisinde annelerdeki serum serbest testosteron ve kortizol seviyeleri arasında bir ilişki bulunmadı (KO ($r = 0,61$), DK ($r = -0,32$), YK ($r = 0,07$)).

Tablo 4.4. Annelerin serum serbest testosteron ve kortizol düzeyleri (ort ± SH).

| | KO | DK | YK |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Anne Sayıları | 8 | 7 | 8 |
| Serbest Testosteron (pg/ml) | 0,40 ± 0,15 | 0,31 ± 0,15 | 0,49 ± 0,14 |
| Kortizol (µg/dl) | 1,92 ± 0,22 | 1,60 ± 0,21 | 1,78 ± 0,29 |

Fetüslerde kan miktarının oldukça az olması nedeniyle hamileliğin 19. günündeki fetüslerin kan analizi yapılamadı. Yenidoğanlarda ve doğum sonrası 4. gündeki yavruların serum serbest testosteron seviyeleri istatistiksel olarak normal

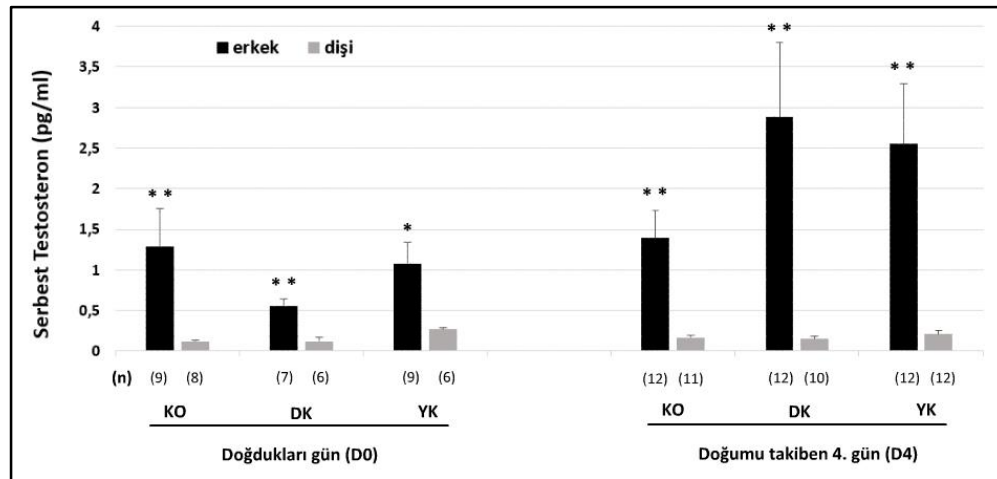
dağılım göstermediği için Log dönüşümleri yapılarak verilerin normal dağılımı sağlandı ve karşılaştırma analizleri dönüştürülmüş Log verisi ile yapıldı. Bununla birlikte ilgili tablo ve grafiklerde verilerin ölçülmüş ham değerleri gösterildi (Tablo 4.5, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

Tablo 4.5. D0 ve D4 günlerindeki yavruların serum serbest testosteron düzeyleri (ort ± SH).

| | KO | | DK | | YK | |
|----------------------|----------------|-------------|-------------------|-------------|----------------|---------------|
| | Erkek | Dişi | Erkek | Dişi | Erkek | Dişi |
| D0 (pg/ml) | 1,29 ± 0,46 ** | 0,12 ± 0,02 | 0,56 ± 0,08 ** | 0,12 ± 0,06 | 1,08 ± 0,26 * | 0,27 ± 0,02 # |
| D4 (pg/ml) | 1,39 ± 0,34 ** | 0,17 ± 0,02 | 2,88 ± 0,91 **, § | 0,15 ± 0,03 | 2,55 ± 0,74 ** | 0,21 ± 0,04 |

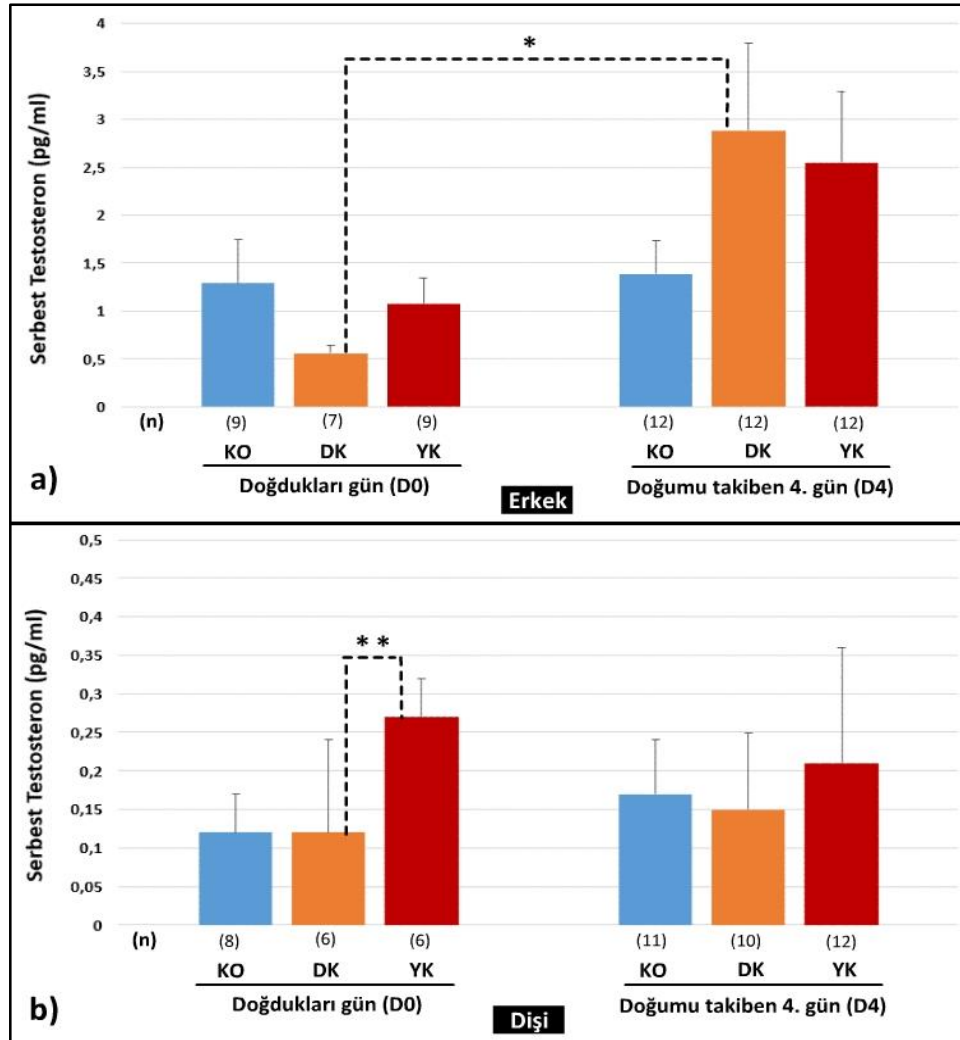
*, ($P<0,01$) kendi grubundaki dişilere göre, **, ($P<0,001$) kendi grubundaki dişiye göre #; ($P<0,01$) D0 günü DK grubundaki dişiye göre §; ($P<0,05$) D0 günü DK grubundaki erkeğe göre. D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün. KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein

Hem yenidoğanlarda hem de doğum sonrası 4. gündeki kontrol ve kafein gruplarında, erkek yavruların serum serbest testosteron seviyeleri dişilerden yüksekti ($P<0,01$ ve $P<0,001$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. D0 ve D4 günlerindeki erkek ve dişi yavrulara ait serum serbest testosteron değerleri *, ($P<0,01$) kendi grubundaki dişiye göre, **, ($P<0,001$) kendi grubundaki dişilere göre. KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein (n: yavru sayısı).

Serum serbest testosteron değerleri açısından yenidoğan ve doğum sonrası 4. günde ki erkek yavrularda gruplar arasında fark yoktu. Grupları kendi ilerinde zamana bağlı kıyasladığımızda, sadece DK grubundaki erkeklerde doğum sonrası 4. günde ki serbest testosteron değeri ($2,88 \pm 0,91$ pg/ml) yenidoğanlarınkine ($0,56 \pm 0,08$ pg/ml) göre artmıştı ($P < 0,05$) (şekil 4.4a). Dişilere baktığımızda, yenidoğan ve doğum sonrası 4. günde serbest testosteron değerleri açısından zamana bağlı bir değişim söz konusu değildi. Ancak yenidoğanlarda YK grubundaki dişilerin serbest testosteron değeri ($0,27 \pm 0,02$ pg/ml) DK grubundaki dişilere ($0,12 \pm 0,06$ pg/ml) göre yüksekti ($P < 0,01$) (şekil 4.4b).



şekil 4.4. D0 ve D4 günlerindeki yavruların gruplara göre serum serbest testosteron değerleri (ort \pm SH) *; ($P < 0,05$). **; ($P < 0,01$) KO: Kontrol, DK: Duşuk doz kafein, YK: Yüksekte doz kafein. (n: yavru sıan sayıları).

4.2.2. Adrenal bez ve Gonad Ağırlıkları:

Adrenal Bez:

Annelerin, fetüslerin ve yavruların adrenal bez ağırlıkları vücut ağırlıklarına göre oranlandı ve gram vücut ağırlığı başına miligram doku ağırlığı (mg/g) olarak ifade edildi. Annelerin adrenal bez ağırlıkları açısından gruplar arasında fark yoktu (Tablo 4.6). Fetüs ve yavruların ise adrenal bezlerinin gerek oranlanmış ağırlıkları, gerekse de yüzdeleri tüm gruplarda hamileliğin 19. gününden itibaren zamana bağlı olarak azaldı ($P < 0,05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.6. Annelerin adrenal bez ağırlıkları ve tüm vücut ağırlığına göre yüzdeleri (ort \pm SH).

| | KO | DK | YK |
|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Anne Sayıları | 8 | 7 | 8 |
| Adrenal Bez (mg/g) | 0,220 \pm 0,01 | 0,223 \pm 0,01 | 0,221 \pm 0,01 |
| Vücut Ağırlığına Göre Yüzdesi | % 0,02 | % 0,02 | % 0,02 |

KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein

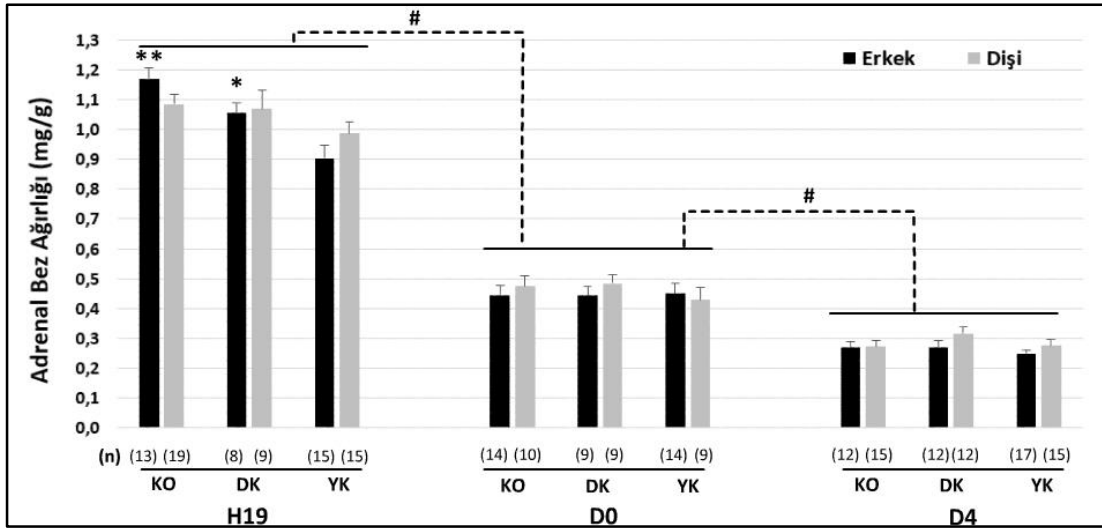
Tablo 4.7. Fetüs ve yavruların adrenal bez ağırlıkları ve tüm vücut ağırlığına göre yüzdeleri (ort \pm SH)

| * | | KO | | DK | | YK | |
|------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | Erkek | Dişi | Erkek | Dişi | Erkek | Dişi |
| H19 | Ağırlık (mg/g) | 1,17 \pm 0,04 | 1,08 \pm 0,03 | 1,06 \pm 0,04 | 1,07 \pm 0,04 | 0,90 \pm 0,03 | 0,99 \pm 0,03 |
| | Vücuda göre % | % 0,109 | % 0,105 | % 0,105 | % 0,107 | % 0,090 | % 0,099 |
| D0 | Ağırlık (mg/g) | 0,45 \pm 0,03 | 0,47 \pm 0,04 | 0,44 \pm 0,05 | 0,48 \pm 0,04 | 0,45 \pm 0,03 | 0,43 \pm 0,05 |
| | Vücuda göre % | % 0,045 | % 0,049 | % 0,043 | % 0,048 | % 0,045 | % 0,043 |
| D4 | Ağırlık (mg/g) | 0,27 \pm 0,04 | 0,27 \pm 0,03 | 0,27 \pm 0,03 | 0,32 \pm 0,03 | 0,25 \pm 0,03 | 0,28 \pm 0,03 |
| | Vücuda göre % | % 0,026 | % 0,027 | % 0,027 | % 0,032 | % 0,025 | % 0,028 |

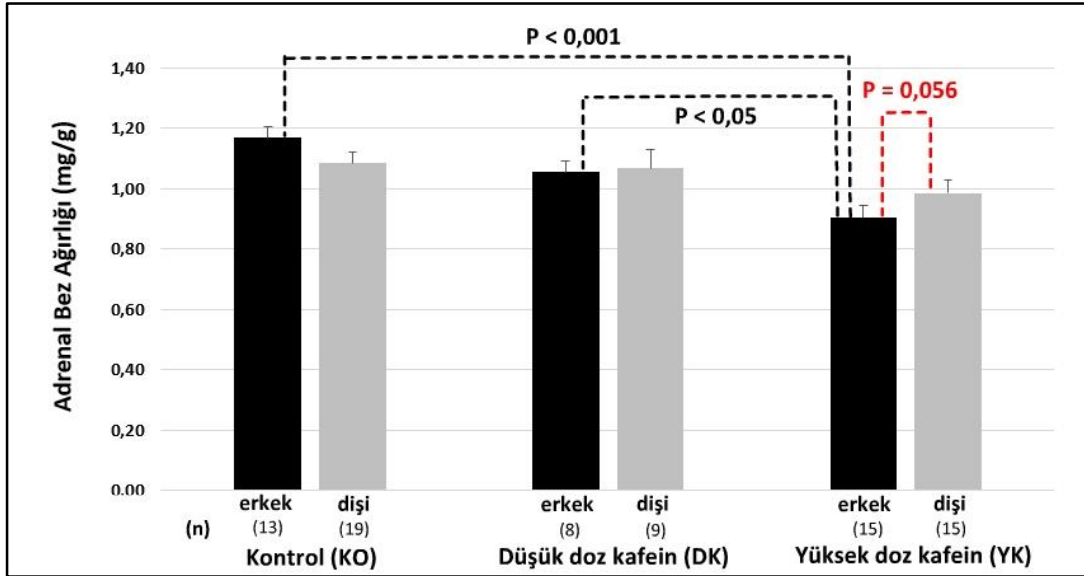
*Adrenal bez ağırlığı açısından tüm cinsiyet ve gruplarda H19>D0>D4 ($P < 0,05$).

H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün
KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. Cinsiyet ve gruplara ait istatistiksel farklılıklar bu tabloda gösterilmemiş olup Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da yer almaktadır.

Her üç gruptaki erkek ve dişilerin oranlanmış adrenal bez ağırlıklarının zamana göre değişimi incelendiğinde, yenidoğanlarda ve doğum sonrası 4. günde gruplar ya da cinsiyetler arasında herhangi anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.5). Hamileliğin 19. gününde ise erkek fetüslerde YK grubundaki ($0,90 \pm 0,03$ mg/g) oranlanmış adrenal bez ağırlıkları, KO ($1,17 \pm 0,04$ mg/g; $P<0,001$) ve DK ($1,06 \pm 0,04$ mg/g; $P<0,05$) gruplarındaki erkek fetüslere göre düşüktü (Şekil 4.6). Kontrol ve DK grubu arasında ise fark yoktu. Hamileliğin 19. gününde YK grubundaki dişilerin adrenal bez ağırlıkları erkeklere göre daha yüksek gözükmeyle birlikte aradaki fark anlamlı değildi ($P=0,056$) (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



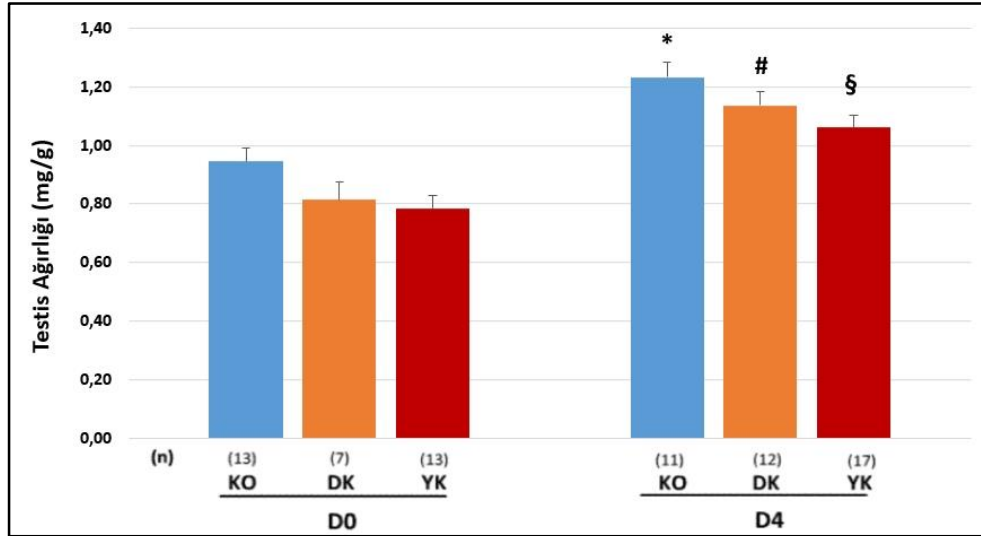
Şekil 4.5. Kontrol ve kafein gruplarındaki fetüs/yavrusların vücut ağırlığına göre oranlanmış adrenal bez ağırlıklarının zamana göre değişimi (ort ± SH). *; ($P<0,05$) **; ($P<0,001$) H19 günü YK grubundaki erkeklere göre. #; ($P<0,05$) Her grup kendi içinde H19>D0>D4. H19: Hamileliğin 19.günü D0: Yavrusların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4.gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları).



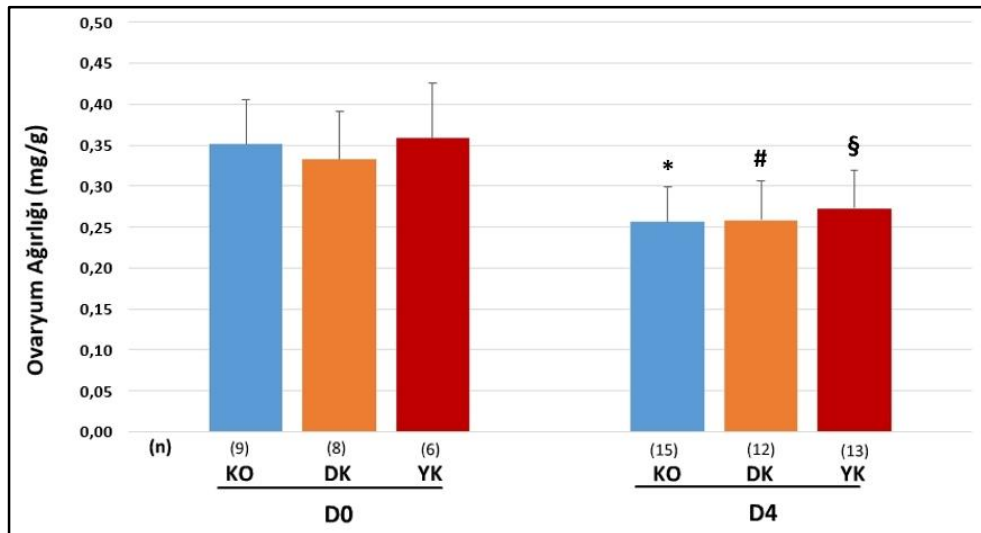
Şekil 4.6. Hamileliğin 19. günündeki fetüslerde vücut ağırlığına göre oranlanmış adrenal bez ağırlıkları (ort \pm SH). (n: fetüs sayıları).

Gonad:

Hamileliğin 19. günündeki fetüslerin cinsiyet ayrımı anogenital mesafe aracılığıyla yapıldı. Testis ve ovarumlar çıkarılmadığı için H19 günündeki fetüslerin gonad karşılaştırmaları yapılamadı. Yenidoğanlar ve doğum sonrası 4. gündeki yavrularda çıkarılan gonadlar gram vücut ağırlığı başına miligram doku ağırlığı (mg/g) olarak ifade edildi. Buna göre doğum sonrası 4. günde her üç gruptaki erkeklerin oranlanmış testis ağırlıkları aynı gruptaki yenidoğan erkeklere göre yüksekti ($P < 0,05$). Erkeklerde kafein dozajına bağlı olarak testis ağırlıklarında azalma eğilimi olmasına rağmen aradaki fark anlamlı değildi (Şekil 4.7). Diğer taraftan doğum sonrası 4. günde her üç gruptaki dişilerin oranlanmış ovaryum ağırlıkları aynı gruptaki yenidoğan dişilere göre azalmıştı ($P < 0,05$) (Şekil 4.8).



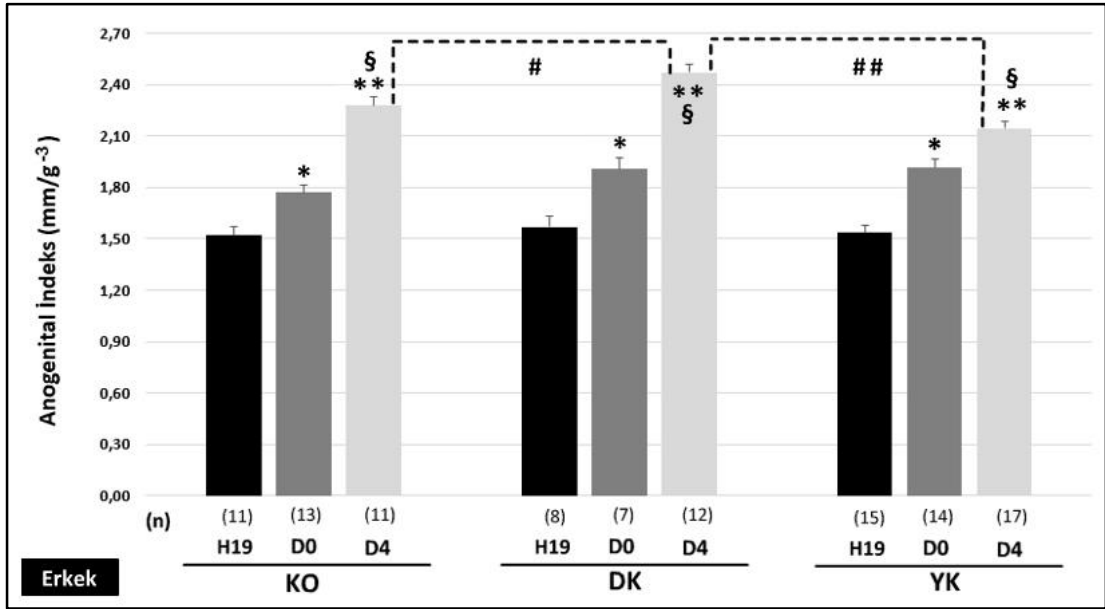
Şekil 4.7. D0 ve D4 günlerindeki erkek yavru sıçanların vücut ağırlığına göre oranlanmış testis ağırlıklarının gruplara-zamana göre değişimi (ort ± SH). *;(P<0,05) KO'ya göre #; (P <0,05) DK'ya göre §; (P <0,05) YK'ya göre. D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: yavru sıçan sayıları).



Şekil 4.8. D0 ve D4 günlerindeki dişi yavru sıçanların vücut ağırlığına göre oranlanmış ovaryum ağırlıklarının gruplara-zamana göre değişimi ve (ort ± SH). D0: *;(P<0,05) KO'ya göre #; (P <0,05) DK'ya göre §; (P <0,05) YK'ya göre. D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: yavru sıçan sayıları).

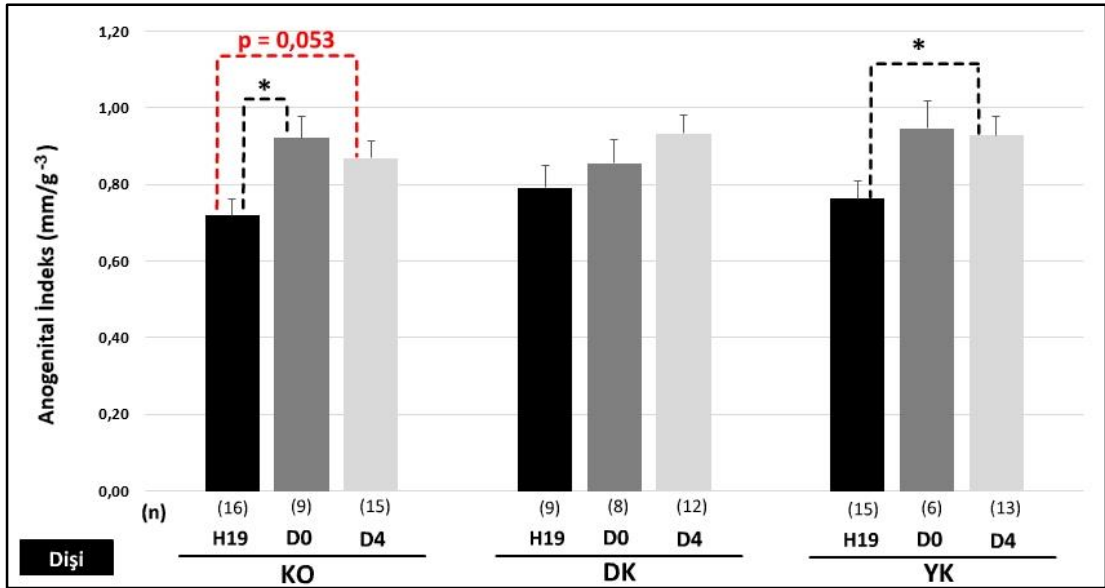
4.2.3. Anogenital Mesafe

Fetüs ve yavrularda ölçülen AGM değerleri, vücut ağırlığının küp kökü (mm/g^{-3}) ile standardize edilerek her bir hayvana ait anogenital indeks oluşturuldu. Hamileliğin 19. günü, yenidoğan ve doğum sonrası 4. gündeki tüm fetüs/yavrularda erkeklerin anogenital indeksi dişilere göre yüksekti ($p < 0,001$). Erkek fetüs/yavruların anogenital indekslerindeki zamana bağlı değişimine bakıldığında, erkeklerde tüm gruplarda zamanla beraber anogenital indekslerde bir artış görülmektedir ($P < 0,05$). Ayrıca doğum sonrası 4. gündeki DK grubundaki erkeklerin anogenital indeksi ($2,47 \pm 0,05 \text{ mm/g}^{-3}$) aynı zaman dilimindeki KO grubu ($2,28 \pm 0,05 \text{ mm/g}^{-3}$) ve YK grubuna ($2,15 \pm 0,04 \text{ mm/g}^{-3}$) göre anlamlı derecede yüksekti ($P < 0,05$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Erkek fetüs/yavruların oranlanmış anogenital indekslerinin zamana göre değişimi (ort \pm SH). *; ($P < 0,005$) **; ($P < 0,001$) H19'a göre, §; ($P < 0,001$) D0'a göre, #; ($P < 0,05$) ##; ($P < 0,001$). H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün. KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: fetüs /yavru sıçan sayıları).

Dişi fetüs/yavruların anogenital indekslerindeki zamana bağlı değişim Şekil 4.10'da gösterilmektedir. Dişilerde zamana bağlı gelişen anogenital indeksteki artış eğilimi erkekteki kadar belirgin değildi. KO grubunda yenidoğanlarda anogenital indeks değeri ($0,92 \pm 0,06 \text{ mm/g}^{-3}$) hamileliğin 19. gününe ($0,72 \pm 0,04 \text{ mm/g}^{-3}$) göre yüksekti ($P < 0,05$). KO grubunda doğum sonrası 4. gün indeksi de hamileliğin 19. gününe göre yüksek gözükmeyle beraber aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P = 0,053$). DK grubunda zamana bağlı bir değişim söz konusu değildi. YK grubunda ise sadece doğum sonrası 4. gündeki anogenital indeks değeri ($0,93 \pm 0,05 \text{ mm/g}^{-3}$) hamileliğin 19. gününe ($0,76 \pm 0,05 \text{ mm/g}^{-3}$) göre yüksekti ($P < 0,05$) (Şekil 4.10).



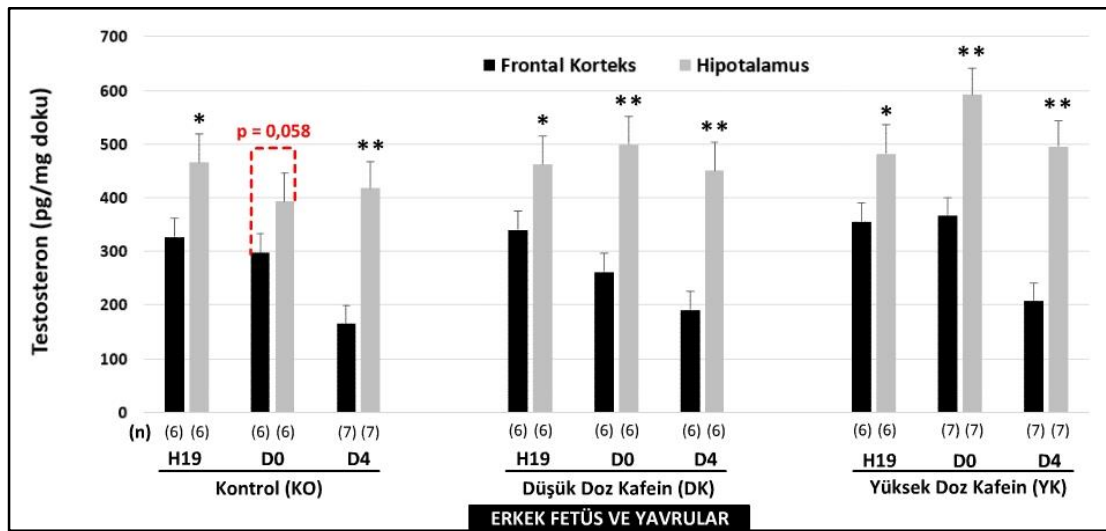
Şekil 4.10. Dişi fetüs/yavruların oranlanmış anogenital indekslerinin zamana göre değişimi (ort \pm SH). *; ($P < 0,05$) H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları).

4.3. Beyin Dokusundaki Seks Steroit Hormonlarına Ait Bulgular

4.3.1. Frontal Korteks ve Hipotalamus Bölgelerinin Karşılaştırılması

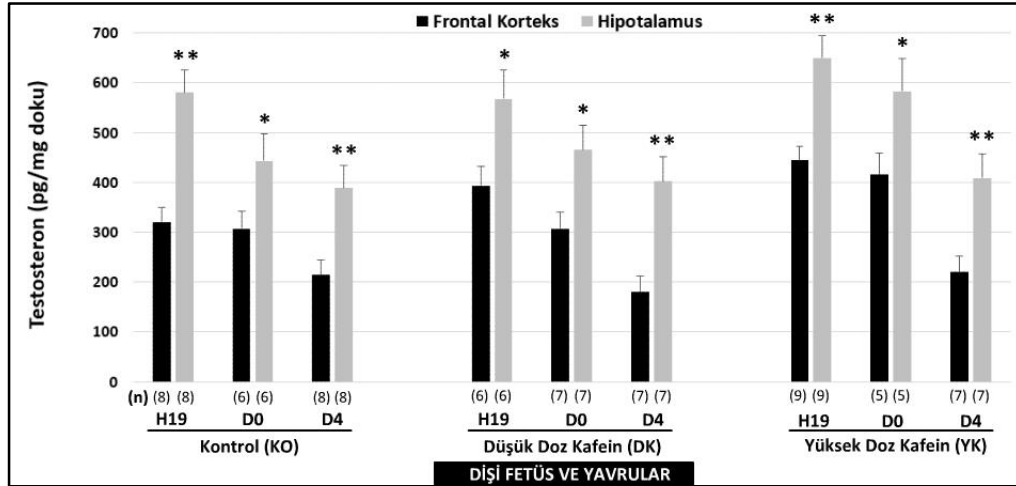
Doku Testosteron Seviyeleri:

Kontrol grubundaki yenidoğan erkekler dışında tüm gruplarda hipotalamustaki testosteron seviyeleri frontal korteksten yüksekti ($P < 0,05$ ve $P < 0,001$). Her ne kadar kontrol grubunda yenidoğan erkeklerde fark anlamlı olmasa da P değeri istatistiksel anlamlılık sınırına oldukça yakındı ($P = 0,058$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Erkek fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki testosteron seviyeleri *; ($P < 0,05$) **; ($P < 0,001$) Frontal kortekse göre. Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları).

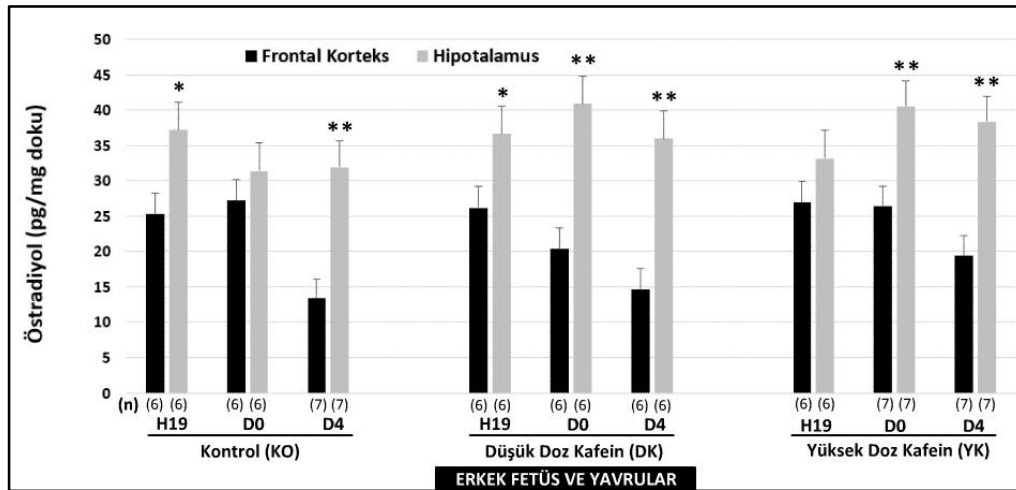
Dişi fetüs ve yavrularda testosteron seviyeleri karşılaştırdığında, tüm gruplarda hem hamileliğin 19. günü, hem yenidoğanlarda hem de doğum sonrası 4. günde hipotalamustaki testosteron seviyeleri frontal korteksten yüksekti ($P < 0,05$ ve $P < 0,001$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Dişi fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki testosteron seviyeleri *; ($P<0,05$), **; ($P<0,001$) Frontal kortekse göre. Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları).

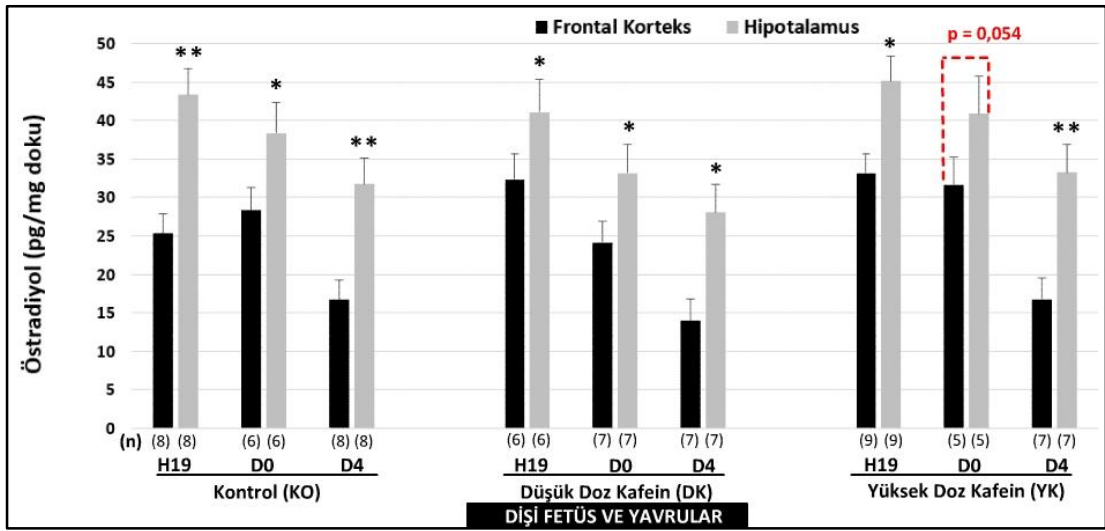
Doku Östradiyol Seviyeleri:

Erkek fetüs ve yavrularda östradiyol seviyeleri karşılaştırıldığında, kontrol grubundaki yenidoğanlar ve YK grubundaki fetüsler (H19) dışında kalan tüm gruplarda hipotalamustaki östradiyol seviyesi frontal kortekse göre daha yüksekti ($P<0,05$ ve $P<0,001$) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Erkek fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki östradiyol seviyeleri *; ($P<0,05$), **; ($P<0,001$) Frontal kortekse göre. Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları).

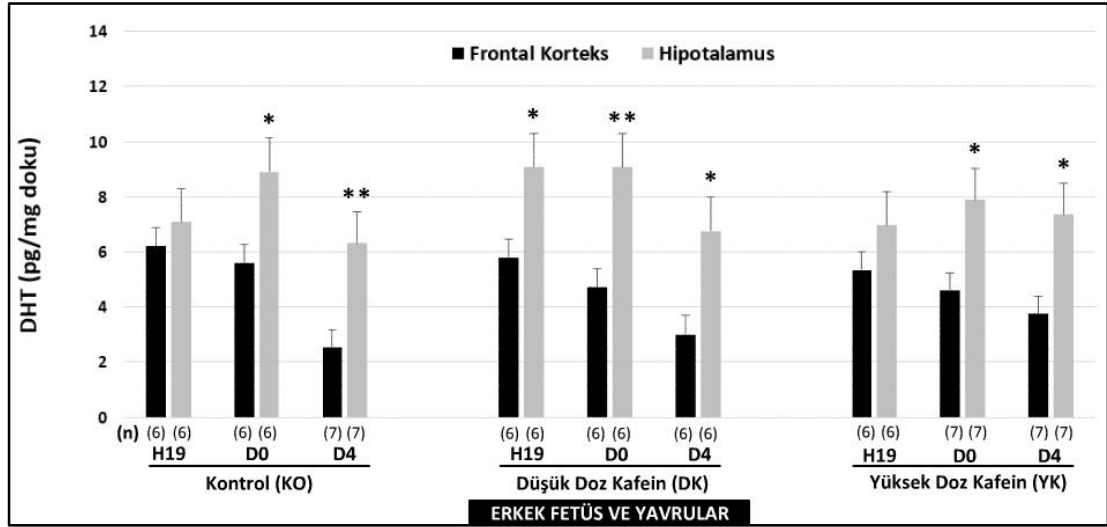
Dişi fetüs ve yavrulardaki östradiyol seviyeleri incelendiğinde, YK grubundaki yenidoğanlar dışında, hem hamileliğin 19. günü, hem yenidoğanlarda hem de doğum sonrası 4. günde tüm gruplarda hipotalamustaki östradiyol seviyeleri frontal kortekse göre anlamlı olarak yüksekti ($P<0,05$ ve $P<0,001$) (Şekil 4.14). Her ne kadar YK grubunda yenidoğan dişilerde fark anlamlı olmasa da P değeri istatistiksel anlamlılık sınırına oldukça yakındı ($P=0,054$).



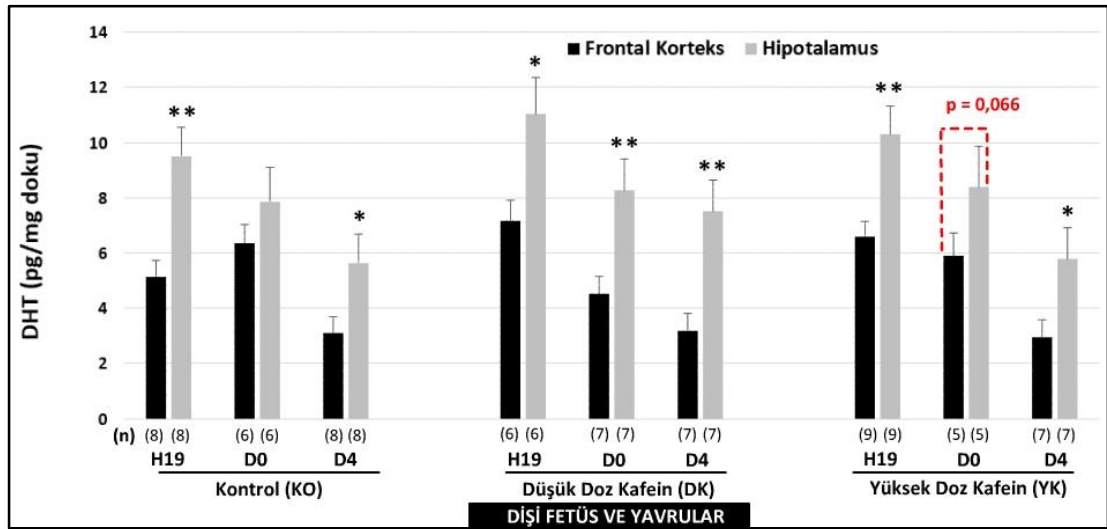
Şekil 4.14. Dişi fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki östradiyol seviyeleri *; ($P<0,05$), **; ($P<0,001$) Frontal kortekse göre. Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları).

Doku DHT Seviyeleri:

Fetüs ve yavrulardaki DHT seviyeleri karşılaştırıldığında; erkeklerde, KO ve YK gruplarındaki fetüsler (H19); dişilerde ise KO ve YK gruplarındaki yenidoğanlar hariç, tüm gruplarda hipotalamustaki DHT seviyesi frontal kortekse göre anlamlı derecede yüksekti ($P<0,05$ ve $P<0,001$) (sırasıyla Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Erkek fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki dihidrotestosteron (DHT) seviyeleri *; ($P < 0,05$), **; ($P < 0,001$) Frontal kortekse göre. Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları).

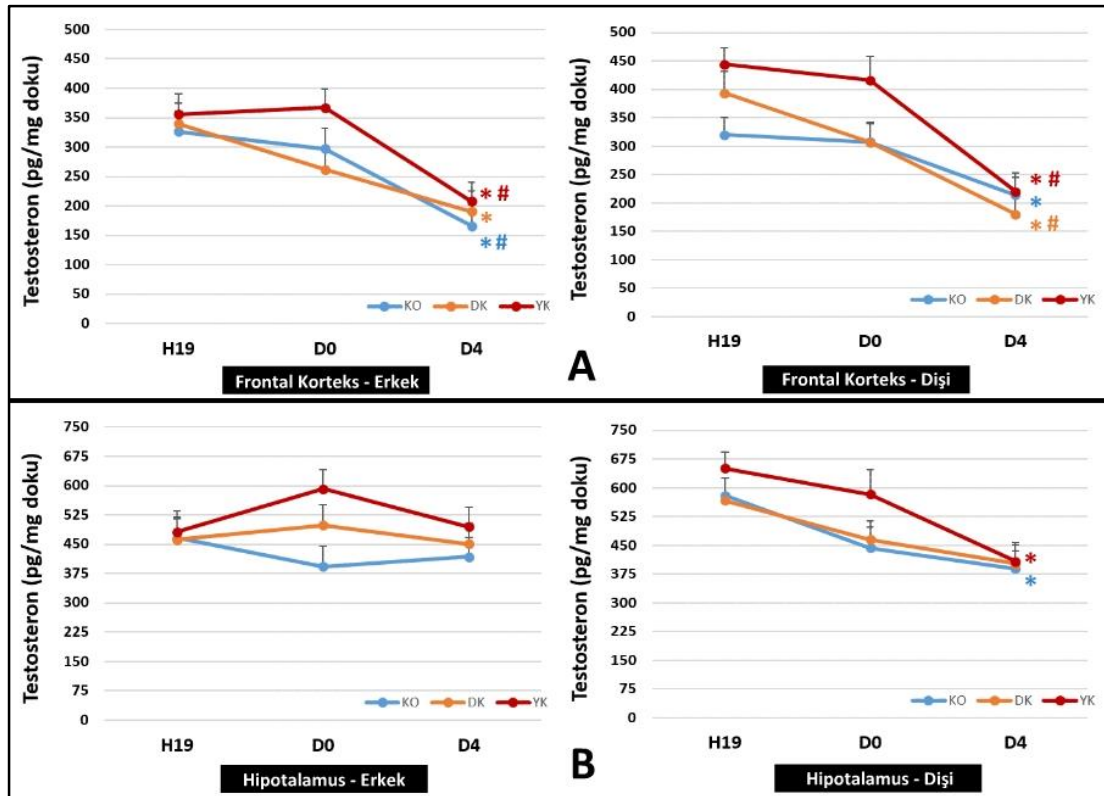


Şekil 4.16. Dişi fetüs ve yavrularda frontal korteks ve hipotalamustaki dihidrotestosteron (DHT) seviyeleri *; ($P < 0,05$), **; ($P < 0,001$) Frontal kortekse göre. Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları).

4.3.2. Seks Steroit Hormonlarının Zamana Bağlı Değişimi

Doku Testosteron Seviyeleri:

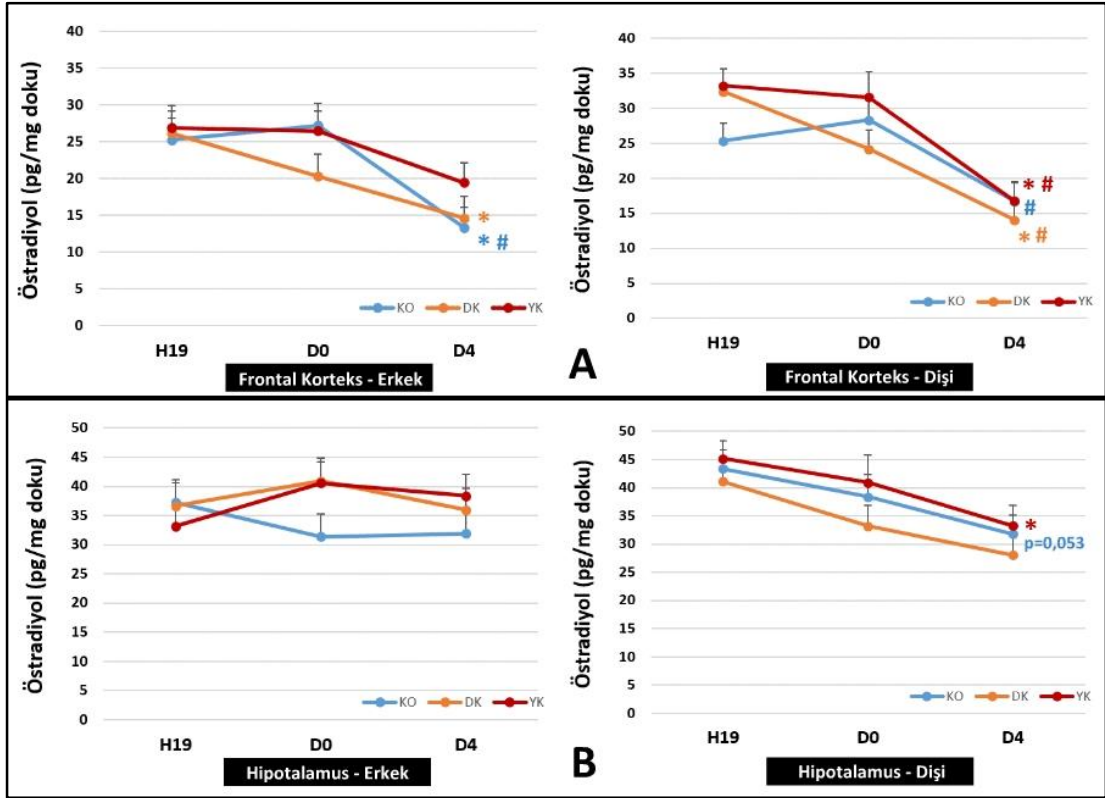
Frontal korteksteki testosteron seviyeleri gruplarda zamana bağlı olarak azalma eğilimi göstermekle birlikte, istatistiksel anlamlık sadece doğum sonrası 4. günlerde söz konusuydu. Doğum sonrası 4. gündeki testosteron seviyeleri, tüm gruplardaki erkek ve dişilerde hamileliğin 19. gününe göre düşük bulundu ($P<0,05$). Ayrıca doğum sonrası 4. gün frontal korteksteki testosteron miktarları, erkeklerde KO ve YK, dişilerde ise DK ve YK gruplarında yenidoğanlara göre de azalmıştı ($P<0,05$) (Şekil 4.17A). Diğer taraftan, hipotalamustaki testosteron seviyelerini incelediğimizde, erkeklerde zamana bağlı herhangi bir değişiklik yokken dişilerde doğum sonrası 4. gündeki KO ve YK gruplarındaki testosteron seviyeleri hamileliğin 19. gününe göre düşüktü ($P<0,05$) (Şekil 4.17B).



Şekil 4.17. Frontal korteks ve hipotalamustaki testosteron seviyelerinin zamana göre değişimi *; ($P<0,05$) H19'a göre, #; ($P<0,05$) D0'a göre. H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein.

Doku Östradiyol Seviyeleri:

Erkeklerin frontal korteksindeki östradiyol seviyelerinin zamana bağlı değişimi incelendiğinde doğum sonrası 4. günde KO ve DK gruplarındaki östradiyol seviyeleri hamileliğin 19. gününe göre düşük bulundu ($P<0,05$). YK grubunda ise bu azalma gözlenmedi. Ayrıca doğum sonrası 4. gün KO grubunun frontal korteksindeki östradiyol miktarı yenidoğan KO grubuna göre de düşüktü ($P<0,05$) (Şekil 4.18A). Diğer taraftan dişilerin frontal korteksinde, doğum sonrası 4. gün DK ve YK gruplarındaki östradiyol miktarı hamileliğin 19. gününe göre azalmıştı ($P<0,05$). Kontrol grubunda da azalma eğilimi olmasına rağmen fark anlamlı değildi ($P=0,065$). Ayrıca dişilerde doğum sonrası 4. gün tüm grupların östradiyol seviyeleri yenidoğanlara göre düşüktü ($P<0,05$) (Şekil 4.18A).

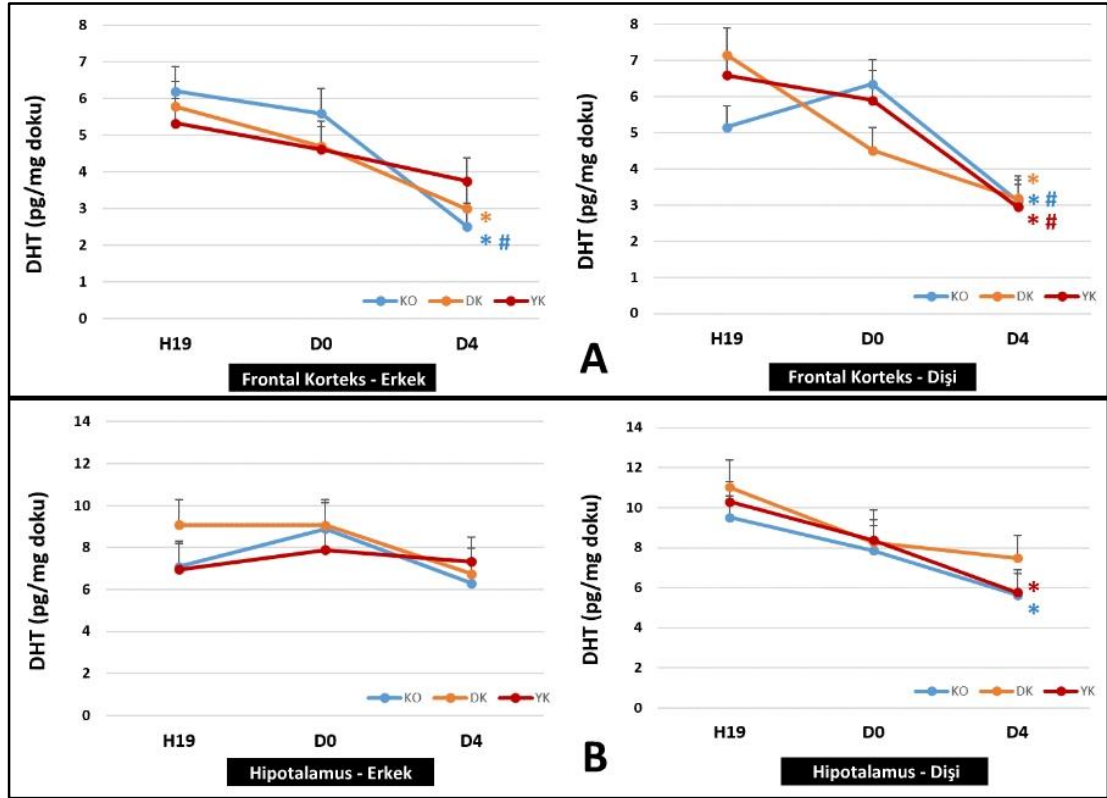


Şekil 4.18. Frontal korteks ve hipotalamustaki östradiyol seviyelerinin zamana göre değişimi *; ($P<0,05$) H19'a göre, #; ($P<0,05$) D0'a göre. H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein.

Hipotalamustaki östradiyol miktarına baktığımızda erkeklerde zamana bağlı herhangi bir değişiklik söz konusu değildi. Dişilerde ise doğum sonrası 4. gün DK ve KO gruplarındaki östradiyol seviyeleri hamileliğin 19. gününe göre azalma eğilimi göstermekle birlikte aradaki fark anlamlı değildi (DK için $P=0,066$, KO için $P=0,053$). Sadece YK grubundaki doğum sonrası 4. gün östradiyol seviyeleri hamileliğin 19. gününe göre azalma göstermişti ($P<0,05$) (Şekil 4.18B).

Doku DHT Seviyeleri:

Erkeklerin frontal korteksindeki DHT seviyelerinin zamana bağlı değişimine baktığımızda, doğum sonrası 4. günde KO ve DK gruplarındaki DHT seviyeleri hamileliğin 19. gününe göre azalma gösterirken ($P<0,05$) bu azalma YK grubunda anlamlı değildi. Bununla beraber doğum sonrası 4. günde KO grubunun frontal korteksindeki DHT seviyesi yenidoğanlara göre de düşüktü ($P<0,05$). Dişilerin frontal korteksinde doğum sonrası 4. günde tüm grupların DHT seviyeleri hamileliğin 19. gününe göre azalmıştı ($P<0,05$). Ayrıca doğum sonrası 4. günde KO ve YK gruplarının frontal kortekslerindeki DHT seviyeleri yenidoğanlara göre de düşük bulundu ($P<0,05$) (Şekil 4.19A). Hipotalamustaki DHT miktarına baktığımızda, erkeklerde zamana bağlı herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Dişilerde ise doğum sonrası 4. günde KO ve YK gruplarındaki DHT seviyeleri hamileliğin 19. gününe göre azalmıştı ($P<0,05$) (Şekil 4.19B).

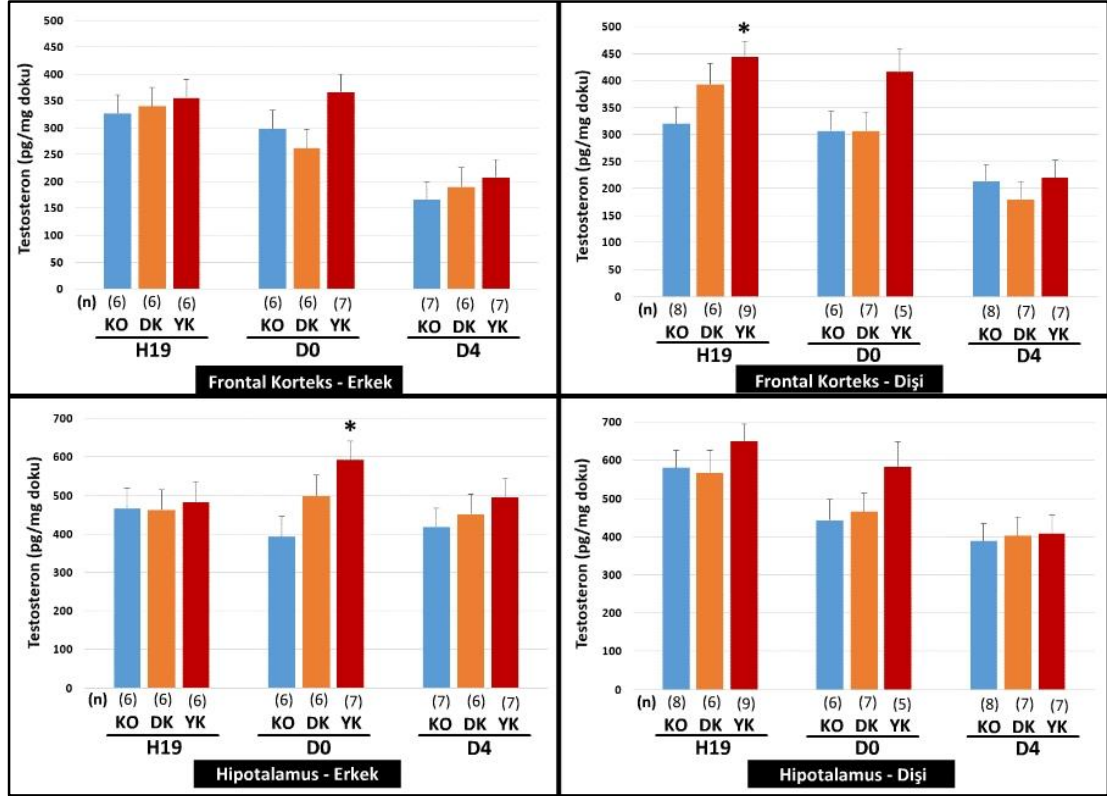


Şekil 4.19. Frontal korteks ve hipotalamustaki dihidrotestosteron (DHT) seviyelerinin zamana göre değişimi *; ($P<0,05$) H19'a göre, #; ($P<0,05$) D0'a göre. H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein.

4.3.3. Kontrol ve Kafein Gruplarının Karşılaştırılması

Doku Testosteron Seviyeleri:

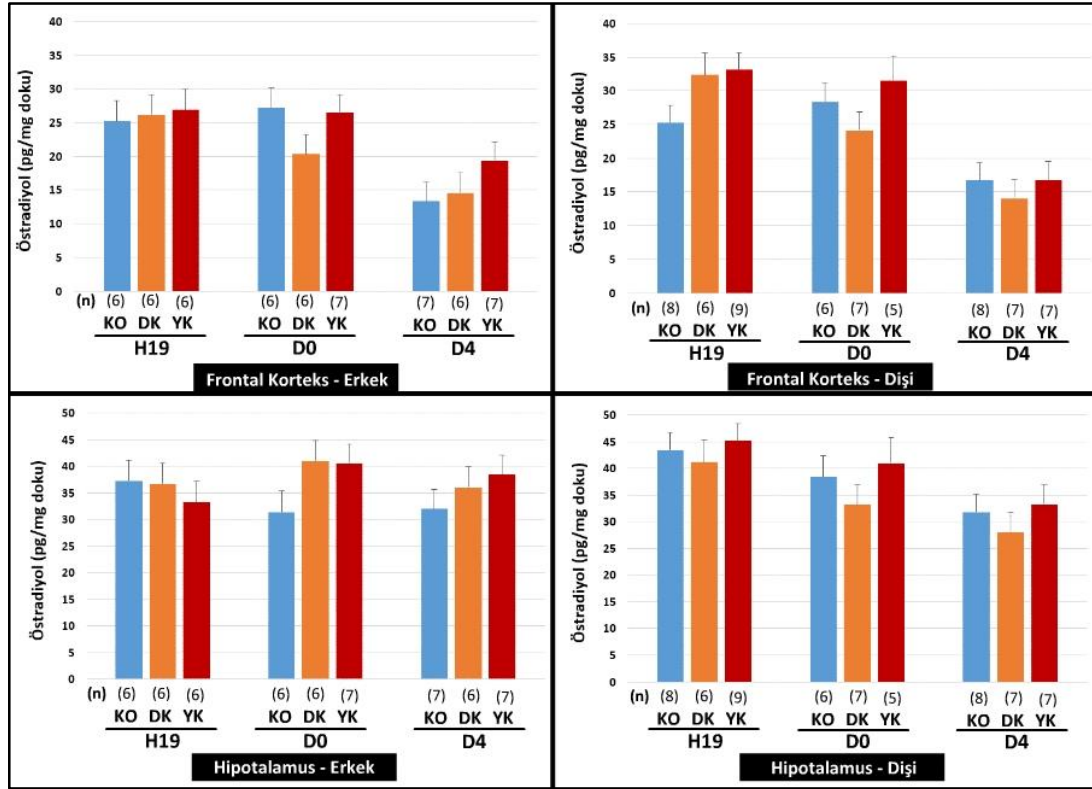
Tüm fetüs ve yavruların frontal korteks ve hipotalamusları incelendiğinde, düşük doz kafein uygulamasının doku testosteron seviyesi üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Yüksek doz kafein uygulaması ise, hamileliğin 19. günündeki dişi fetüslerin frontal korteksinde, yenidoğan (D0) erkeklerin ise hipotalamusunda doku testosteron seviyelerinde artışa neden oldu ($P<0,05$) (Şekil 4.20). Gerek dişi fetüslerin frontal korteksinde, gerekse de yenidoğan erkeklerin hipotalamusunda anlamlılığın olduğu bu dönemlerde kafein dozajına bağlı bir artış eğilimi olmakla birlikte, düşük doz kafein gruplarındaki fark anlamlılığa ulaşmadı (Şekil 4.20).



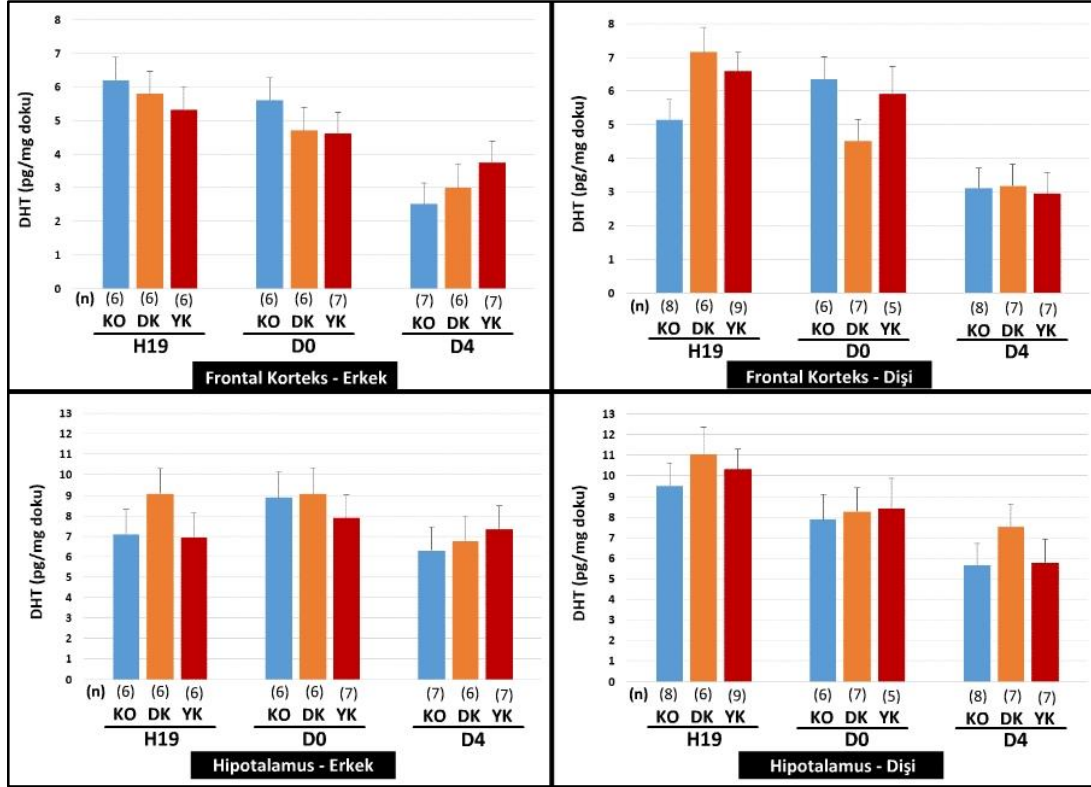
Şekil 4.20. Fetüs ve yavru sıçanlarda kafein uygulamasının frontal korteks ve hipotalamustaki testosteron seviyeleri üzerine etkisi *; ($P < 0,05$) KO'ye göre. H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları)

Doku Östradiyol ve DHT Seviyeleri:

Düşük ve yüksek doz kafein uygulamalarının fetüs ve yavruların frontal korteks ve hipotalamuslarındaki östradiyol ve DHT seviyeleri üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.21, Şekil 4.22).



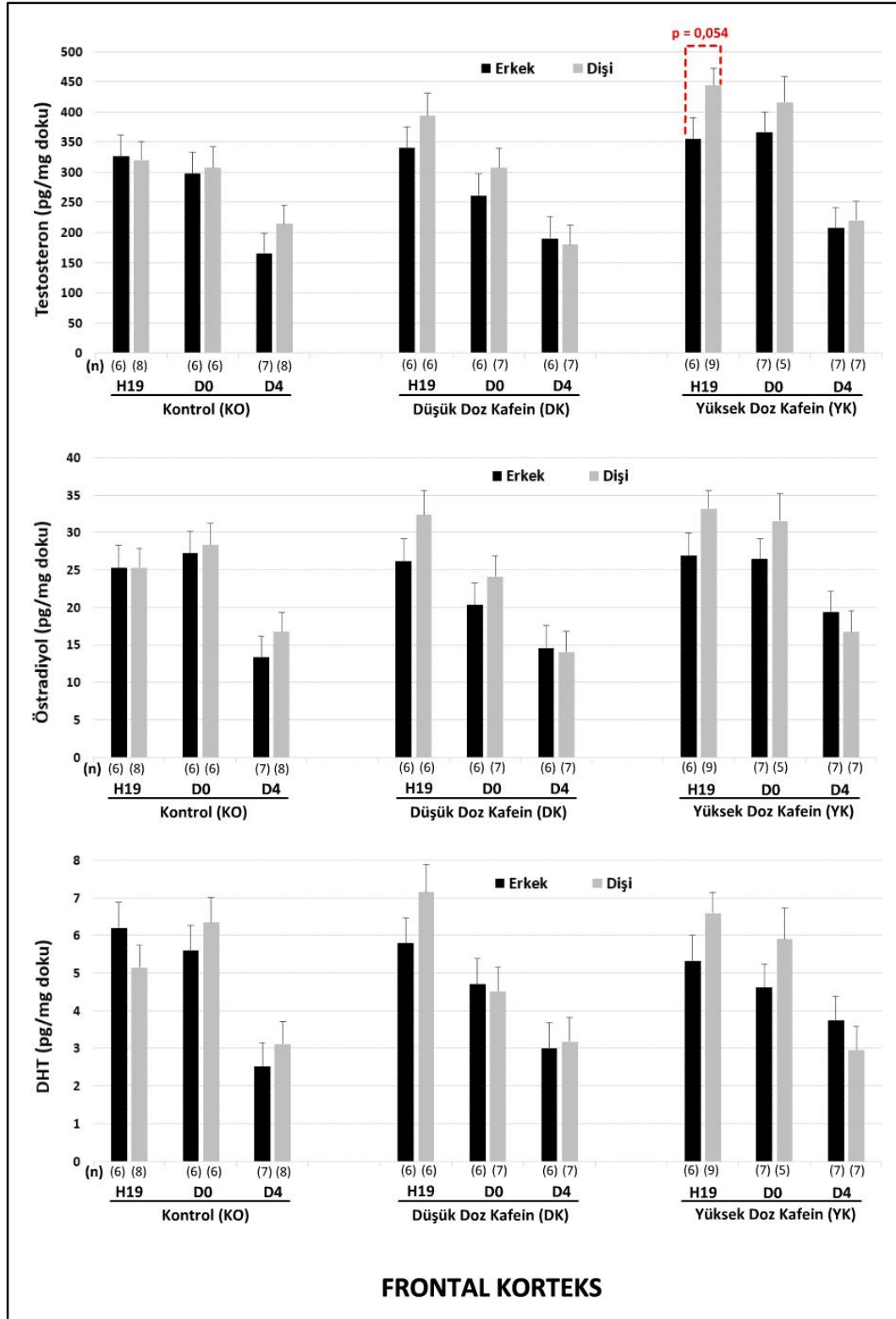
Şekil 4.21. Fetüs ve yavru sıçanlarda kafein uygulamasının frontal korteks ve hipotalamustaki östradiyol seviyeleri üzerine etkisi H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları)



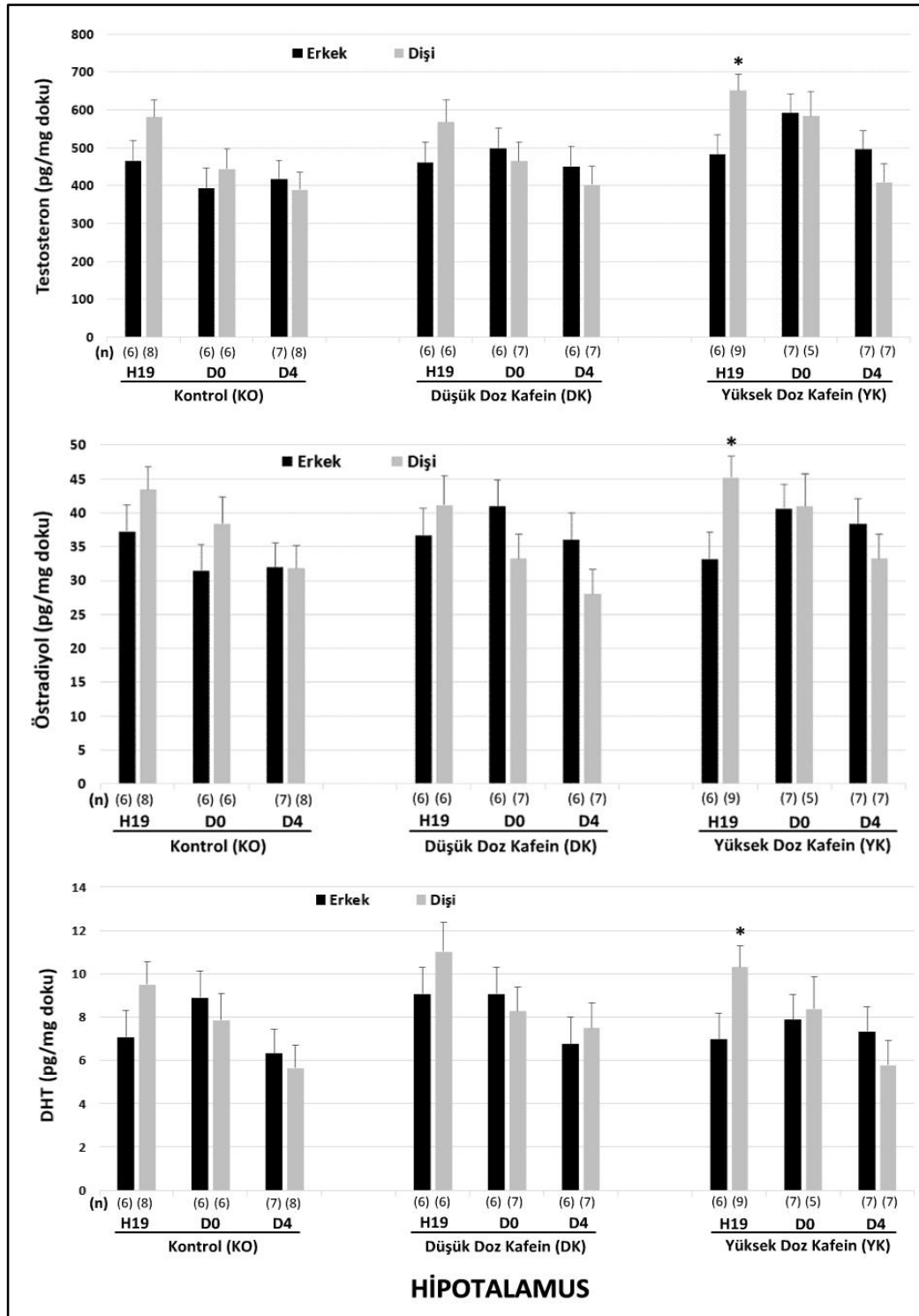
Şekil 4.22. Fetüs ve yavru sıçanlarda kafein uygulamasının frontal korteks ve hipotalamustaki dihidrotestosteron (DHT) seviyeleri üzerine etkisi H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları)

4.3.4. Seks Steroit Hormonlarının Cinsiyete Göre Değişimi

Frontal korteksteki testosteron, östradiyol ve DHT seviyeleri açısından erkek ve dişi fetüs/yavrular arasında anlamlı fark yoktu. Bununla birlikte, YK grubunda, hamileliğin 19. günündeki dişi fetüslerin testosteron seviyesi erkek fetüslere göre yüksek gözükmeyle birlikte aradaki fark anlamlı değildi ($P=0,054$) (Şekil 4.23). Diğer taraftan hipotalamusa baktığımızda, YK grubunda hamileliğin 19. günündeki dişi fetüslerin testosteron, östradiyol ve DHT seviyeleri YK grubundaki erkek fetüslere göre daha yüksekti ($P<0,05$) (Şekil 4.24).



Şekil 4.23. Frontal korteksteki testosteron, östradiyol ve dihidrotestosteron (DHT) seviyelerinin cinsiyete göre karşılaştırılması H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: fetüs/yavru sıçan sayıları)



Şekil 4.24. Hipotalamustaki testosteron, östradiyol ve dihidrotestosteron (DHT) seviyelerinin cinsiyete göre karşılaştırılması *; ($P < 0,05$) Kendi grubundaki erkeğe göre H19: Hamileliğin 19. günü D0: Yavruların doğdukları gün D4: Doğum sonrası 4. gün KO: Kontrol, DK: Düşük doz kafein, YK: Yüksek doz kafein. (n: fetüs/yavru şıcan sayıları)

5-TARTIŞMA

Kadın ve erkek beyni arasında, gerek yapısal, gerekse de davranışsal olarak ortaya çıkan birçok farklılık bulunmaktadır. Beyindeki bu temel farklılıkların oluşmasındaki ana nedenin gelişim döneminde maruz kalınan seks steroid hormonlarından kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Özellikle testosteron, östradiyol ve DHT bu konuda başlıca sorumlu seks steroid hormonlarıdır (75, 108). Bu hormonların üretilmesinde kilit rollere sahip hipotalamus-hipofiz aksında, üreme organlarında ve adrenal bezlerde adenozin reseptörleri bulunmaktadır (18, 31, 91, 93, 100). Kahve, çikolata, çeşitli içecekler ve çok sayıda tedavinin içeriğinde yer alan kafein, adenozin reseptör antagonisti olup bu yolları etkileme olasılığına sahiptir. Hamile kadınların yaklaşık %60'ı kafein içeren içecekler tüketmektedir (26). Kafein hem kan-beyin bariyerini hem de plasenta bariyerini geçebilmektedir. Ayrıca, fetüsteki yarılanma ömrü yenidoğanlara göre daha uzundur (26, 93). Bu nedenlerle anne sıçanların perinatal dönemde tükettikleri kafeinin fetüs ve yavru sıçanların beyin dokusundaki seks steroid hormonlarının düzeyi üzerine olan etkilerini incelemeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda kafein, düşük ve yüksek olmak üzere iki ayrı dozda hamilelik ve emzirme dönemi boyunca annelerin içme suyuna karıştırılarak verildi. Daha sonra anne ve fetüs/yavru sıçanlara ait metabolik bulgular, kandaki serum serbest testosteron ve kortizol düzeyleri, adrenal bez ve gonadlardaki ağırlık değişimleri, anogenital mesafe ve beyinde (frontal korteks ve hipotalamus) doku steroid seviyeleri araştırıldı. Sonuçlarımıza göre, düşük doz kafein (DK) uygulaması doğum sonrası 4. günde hem erkek hem de dişi yavruların ağırlıklarını ve sadece erkeklerin anogenital indeksini artırırken, dişilerde hipotalamusta dördüncü günde azalması beklenen testosteron ve DHT düzeylerinin yüksek kalmasına neden oldu. Yüksek doz kafein (YK) uygulaması ise erkeklerde hamileliğin 19. gününde adrenal bez ağırlığını azalttı. Yenidoğan dişilerde YK grubundaki serum serbest testosteron seviyesi DK grubuna göre yüksek bulundu. Ayrıca YK uygulaması hamileliğin 19. günündeki dişi fetüslerin frontal korteksinde, yenidoğan erkeklerin ise hipotalamusunda doku testosteron seviyelerinde artışa neden oldu. Bununla birlikte erkeklerin frontal korteksinde dördüncü günde azalması beklenen östradiyol ve DHT düzeyleri yüksek kaldı. Cinsiyetler arası farkı incelediğimizde, sadece hamileliğin 19. gününde YK grubundaki dişilerin

hipotalamusundaki testosteron, östradiyol ve DHT seviyeleri erkeklere göre daha yüksek bulundu. Diğer doku steroid ölçümleri açısından cinsiyetler arası bir fark söz konusu değildi.

İnsanlarda seks steroid hormonlarının beyin üzerine olan etkisi prenatal dönemde belirgin, sıçanlarda bu etki hamileliğin son haftası ve doğum sonrası ilk 10 gün arasında önemlidir (64, 85). Bu nedenle çalışmamızda kontrol ve kafein gruplarındaki fetüs/yavru sıçanları, hamileliğin 19. günü (H19), doğdukları gün (D0) ve doğum sonrası 4. gün (D4) olacak şekilde 3 farklı zaman diliminde inceledik. Hamile rodentlere kafein uygulaması yapıldığında, fetal kafein seviyesinin annedeki seviyenin %90'ı kadar olması (26) ve hamile hayvanların içme suyuna karıştırılan kafeinin fetüse geçebilmesi (72) nedeniyle kafeini, annelerin içme suyuna karıştırılarak verdik. Literatürde kafein uygulamasında enjeksiyon ve gavaj gibi alternatif yöntemler olsa da bu uygulamaların annelerde oluşturabileceği stres sonuçlarımızı etkileyebileceğinden, kafeini içme suyu aracılığıyla vermeyi tercih ettik. Buna ek olarak anne sıçanlarda insan ve hayvan çalışmalarında (24, 86, 123) stres göstergesi olarak kullanılan kan kortizol düzeyini ölçtük. Kan kortizol seviyesi belirgin bir sirkadiyen ritme sahip olup gün içinde değişiklik göstermektedir. O nedenle çalışmamızda tüm anne sıçanların cerrahisi ve kan alma işlemlerini 12.00 – 14.00 arası yaptık. Çalışmamızda anne sıçanların kortizol seviyeleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark olmaması, yapılan ölçümlerde anne sıçanların stres düzeyleri arasında bir fark olmadığını göstermektedir.

Hamile sıçanlarda yapılan çalışmalarda kafeinin içme suyu aracılığı ile verilmeye başladığı zaman çeşitlilik göstermektedir. Literatüre baktığımızda yapılan çalışmaların çoğunda kafein, içme suyu aracılığıyla hamileliğin 2. gününden itibaren verilirken (1, 77, 78, 83) bazı çalışmalarda hamileliğin 7. gününden sonra verilmiştir (22, 122). İnsanda kafein tüketimi genellikle hamileliğin başından itibaren görüldüğü için çalışmamızda kafein uygulamasını hamileliğin 2. gününden itibaren başlattık. Ayrıca literatürde sıçanlara içme suyu aracılığıyla verilen kafeinin dozajı ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda genellikle 0,2 g/L (21, 114), 0,3 g/L (1, 19) ve 1 g/L (78, 83) olacak şekilde kafeinin tek dozu tercih edilmiştir. Ancak laboratuvar hayvanlarında kafeinin etkisi dozaja bağlı olarak değişmektedir (38, 122). Örneğin, Bona ve diğ. (22) doğumdan itibaren 7 gün boyunca anneye verilen farklı

dozlardaki kafeinin yavruların beyindeki adenosin reseptörleri üzerine farklı etkiler yaptığını göstermiştir. Anneye verilen düşük doz kafein (0,3g/L) yavruların beyindeki A₁ adenosin reseptörleri üzerine herhangi bir etki yapmazken, annelerdeki yüksek doz kafein (0,8 g/L) uygulaması yavruların beyinde A₁ adenosin reseptör yoğunluğunu değiştirmektedir (22, 83). Bundan dolayı çalışmamızda kafeinin doza bağımlı etkisi nedeniyle düşük (0,3g/L) ve yüksek (0,8 g/L) olmak üzere iki farklı kafein dozu kullandık.

Çalışmamızda elde edilen sıvı-yem tüketimi, idrar üretimi, ağırlık değişimi gibi tüm metabolik bulgular literatür ile uyumlu olup aralarında bir fark yoktu (21, 83, 114). Hamileliğin 18 günü boyunca tüm gruplarda ortalama sıvı tüketimleri arasında bir fark olmamasına rağmen su tüketimini üçer günlük dönemlerde incelediğimizde bazı noktalarda (4-6, 7-9 ve 13-15 günleri arasında) düşük doz kafein verilen annelerde sıvı tüketiminde bir artış gözlemlendi. Böbreklerden sodyum ve su atılımında A₁ reseptörünün blokajı A₂ reseptör blokajından daha önemlidir (120). Düşük doz kafein A₁ ve A₂ reseptörlerine bağlanabilirken, yüksek doz kafein A_{2B} reseptörüne bağlanabilmektedir (46). Bu durum çalışmamızda sadece düşük doz kafein grubunda görülen diüretik etkinin yüksek doz kafein uygulamasında ortaya çıkmamasının nedeni olabilir.

Çalışmamızda sıçanların kafein tüketimlerini sıvı tüketimleri üzerinden hesapladık (DK; 46,4 ± 2,2 mg/kg/gün, YK; 113,1 ± 4,3 mg/kg/gün). Sıçanlardaki metilksantin yarılanma ömrünün ve vücut ağırlıklarının insandan farklı olması nedeniyle sıçandaki 10mg/kg/gün tüketimin insanda yaklaşık 3,5mg/kg/gün tüketime karşılık geldiği kabul edilmektedir (46, 77). Bu doğrultuda hesapladığımızda, çalışmamızda, DK grubundaki anne sıçanların günlük tükettiği kafein miktarının insandaki karşılığı yaklaşık 16mg/kg/gün iken YK grubundakilerin tükettiği kafein miktarının insandaki karşılığı 39,5mg/kg/gün olarak hesaplandı. Bu değerler ortalama 65 kg bir kadın için düşük doz kafeinde günlük 5-7 fincan kahve-çaya, yüksek doz için ise 12-15 fincan kahve-çaya karşılık gelmektedir.

Çalışmamızda hamileliğin 19. günündeki fetüslerde ve yenidoğan yavrularda vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında fark olmasa da doğum sonrası 4. günde DK grubunda hem erkek hem de dişilerdeki vücut ağırlığının YK ve KO grubuna göre yüksek olduğunu gözlemledik. Yavruların anne sütüyle beslendikleri dönemde bu

farkın oluşması kafein ile süt üretimi arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir. Literatürde hamilelik döneminde anne tarafından tüketilen kafeinin doğum ağırlıkları ve süt üretimi üzerine olan etkisi ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Hart ve diğ.nin (59) içme suyu aracılığıyla kafein tüketen anne sıçanların yavrularını incelediği çalışmalarında kullandıkları kafein miktarı (50 mg/kg/gün) bizim çalışmamızda düşük doz için kullandığımız miktara (46,4 mg/kg/gün) oldukça yakındı. Bu çalışmanın sonucunda kafein verilen annelerin yavruları doğum ağırlıkları açısından kontrol grubundan farklı olmamasına rağmen, laktasyon döneminde annesi kafein tüketen gruptaki yavrular kontrole göre daha fazla ağırlık artışı göstermiştir (59). Bu bulgular bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar ile uyuşmaktadır. Ayrıca Sheffield ve diğ. (118) farelerin meme dokusunda yaptıkları çalışmada toplam DNA ve RNA miktarlarının kafein grubunda daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte annelerin süt analizleri yapıldığında, sütün yağ ve protein yüzdelerinin kafeinden etkilenmediğini ortaya koymuşlardır. Bu da kafeinin asıl olarak, sütün içeriğinden ziyade meme bezlerinde hücre sayısını artırarak süt hacmini etkilediğini göstermektedir (59, 118). Bizim çalışmamızda süt ile ilgili bir analiz yapılmamış olmasına rağmen yukarıdaki literatür bilgisi doğrultusunda DK grubunda doğum sonrası 4. günde meydana gelen ağırlık artışının kafeinin annedeki süt hacmini artırmasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Hamilelik boyunca yüksek doz kafein (1g/L) kullanılan çalışmalarda doğum ağırlıkları açısından kontrol ve kafein grupları arasında fark bulunmamıştır (37, 83) ve bu sonuçlar bizim YK grubunda elde ettiğimiz bulgular ile uyuşmaktadır. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak günde 0,2g/L kafein kullanılan bazı çalışmalarda kafein grubunun doğum ağırlıkları kontrole göre daha yüksek olarak bulunmuştur (21, 114). Bu sonuç düşük doz kafeinin süttten bağımsız bir şekilde de yavrunun ağırlığını artırabileceğini göstermektedir.

Dolaşımdaki testosteronun büyük kısmı (%65) seks hormonu bağlayıcı globüline bağlı bir şekilde taşınır. Bu kısım biyolojik olarak inaktiftir. Geriye kalan kısmı ise biyolojik kullanılabilirliği yüksek olan, albümine bağlı testosteron (%33) ve herhangi bir taşıyıcı moleküle bağlanmadan serbest bir şekilde taşınan testosteron oluşturur. Toplam testosteronun yaklaşık %1-2'lik kısmını oluşturan serbest testosteron, aktif biyolojik etkiyi gösterdiğinden çalışmamızda serbest testosteron

değerlerini karşılaştırdık. (41). Fetüslerde kan miktarının oldukça az olması nedeniyle hamileliğin 19. gününe ait hiçbir hayvanın kan analizi yapılamadı. Sadece yenidoğanların ve doğum sonrası 4. gündeki yavruların kanları analiz edildi. Yavruların doğdukları gün (D0) yapılan cerrahi saatleri literatüre göre belirlendi (127). Çünkü yenidoğan erkek sıçanlarda plazma testosteron düzeyi, doğumu takiben 1. ve 2. saatlerde maksimum seviyeye çıkıp sonrasında normal seviyeye dönmektedir. Ancak dişilerde benzer değişiklik görülmemektedir (127). Doğumu takiben testosteron seviyesindeki bu ani yükselişin sonuçlarımızı etkilememesi açısından çalışmamızda sıçanların cerrahisi doğumu takiben yaklaşık 6-10 saat sonra gerçekleştirildi. Literatürde genellikle kandaki toplam testosteron düzeyleri araştırılmıştır. Serbest testosteronun, toplam testosteronun yaklaşık %1-2'lik kısmına karşılık geldiğini düşündüğümüzde ölçtüğümüz serbest testosteron değerleri, yeni doğanlar ve doğum sonrası dönemin incelendiği çalışmalarda elde edilen bulgular ile tutarlılık göstermektedir (20, 127). Ayrıca doğum sonrası 12. günden itibaren erkek yavrularda serbest testosteron ölçümlerinin yapıldığı çalışmada elde edilen değer aralıkları da bizim sonuçlarımız ile uyumaktadır (111). Serum serbest testosteron değerlerinin cinsiyete göre değişimine baktığımızda, çalışmamızda gerek yenidoğanlarda gerekse de doğum sonrası 4. gündeki yavrularda erkeklerin serbest testosteron düzeyleri dişilere göre daha yüksek bulundu. İnsan ve hayvanlarda gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarda da testosteron ya da serbest testosteron değerlerinin erkeklerde daha yüksek olduğu gösterilmektedir (51, 127, 128).

Hamilelik ve emzirme döneminde anne tarafından tüketilen kafeinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada, erkek yavrularda serum testosteron değerleri ölçülmüş ve doğum sonrası 1. gün ve 150. günler arasında dokuz farklı zaman diliminde kafein tüketen gruptaki yavruların serum testosteron değerleri kontrole göre düşük bulunmuştur (40). Aynı çalışmada erkek yavruların testis ağırlıklarında da bir azalma söz konusu olup bu azalmanın düşük testosteron seviyesi ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür. Diğer taraftan kafein uygulamasının testosteronun plazma seviyesini artırdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin Pollard ve diğ. (104)'nin yaptıkları çalışmada, 85 günlük sıçanlarda kafeinin akut uygulaması (30 veya 60 mg/kg) sonucu testosteronun plazma seviyesi artmış, 1-4 saat sonra normale dönmüştür. Bir başka çalışmada yetişkin erkek sıçanlarda kronik kola tüketimi sonucu

alınan kafeinin (30 –60 mg/kg/gün), testosteron ve östradiyol seviyelerini artırdığı ortaya konulmuştur (30). Beş haftalık erkek sıçanlara 120 gün boyunca 20 mg/L kafein verilen başka bir çalışmada, plazmadaki testosteron ve DHT seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir (115). Kafeinin testisteki Leydig hücrelerini sempatik sistem aracılığıyla uyararak plazma testosteron seviyesini artırdığı düşünülmektedir (42, 129). Biz ise bu çalışmamızda erkek yavrularda gruplar arasında serbest serum testosteron seviyeleri açısından bir fark bulamadık. Her ne kadar gruplar arasında fark olmasa da, DK grubundaki erkeklerde serbest testosteron seviyelerinde zamana bağlı bir artış gözlemledik. Çalışmamızda DK grubunda gözlenen zamana bağlı bu artış ve literatürde düşük doz kafeinin testosteron seviyesini artırdığını gösteren çalışmaların yetişkinlerde yapılmış olması, kafeinin testosteron üzerine artırıcı etkisinin ilerleyen dönemlerde daha net ortaya çıkacağını gösterebilir.

Literatürü incelediğimizde dişilerdeki serum testosteron değerleri açısından fetüs ve yenidoğanlarda yapılan bir çalışmaya rastlamadık. Bununla birlikte insanda postmenapozal kadınlarda kafein alımının testosteron seviyesini değiştirmediğini (54) ya da azalttığını (43) gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda yavruların doğdukları dönemde YK grubundaki dişilerin serbest testosteron miktarı DK grubuna göre yüksekti. Bu durum kafeinin doza bağlı etkisinin, dişilerin serum serbest testosteron değerleri üzerine olan etkisinin yenidoğanlarda daha baskın ortaya çıktığını göstermektedir. Ayrıca D0 gününde gözlenen YK ve DK arasındaki bu fark doğum sonrası 4. günde ortadan kalktı. Dişilerde serbest testosteron kaynağı olan adrenal bez ve ovaryumların oranlanmış ağırlıklarının D4 gününde D0 gününe göre azalmış olması bu farkın ortadan kalkmasının nedenlerinden biri olabilir.

Fetüs ve yavruların adrenal bezlerini incelediğimizde, hamileliğin 19. gününde erkek fetüslerin adrenal bez ağırlıklarında kafein dozajına bağlı bir azalma eğilimi söz konusuydu. Ancak istatistiksel anlamlılık sadece YK grubunda (KO ve DK grubuna göre) oluştu. Literatüre baktığımızda hamilelik döneminde alınan kafeinin fetüslerin adrenal bez ağırlığı üzerine olan etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlamadık. Doğrudan kafein verilen hayvanlarda ise adrenal bez ağırlıklarının genellikle değişmediği gösterilmiştir. Pettenuzzo ve diğ. (103) tarafından yapılan çalışmada 60 günlük sıçanlarda bizim çalışmamızda kullanılan dozlar 40 gün boyunca uygulanmış olmasına

rağmen adrenal bez ağırlıklarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Benzer sonuçlar sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada da gösterilmiştir (97). Onsekiz aylık erkek sıçanlarda yapılan egzersiz araştırmasında, 30 mg/kg kafeinin gavaj aracılığıyla haftada 5 gün boyunca 4 hafta süreyle verildiği çalışmada, adrenal bez ağırlığı açısından gruplar arasında herhangi bir fark oluşmamıştır (97). Diğer taraftan Tinwell ve diğ. (124)'nin yaptıkları çalışmada, erkek ve dişi sıçanlara yaklaşık 20. ve 50. günler arası kafein verildiğinde erkekler arasında bir fark oluşmazken 100 mg/kg/gün kafein verilen dişi sıçanlarda adrenal bezlerin net ağırlıkları anlamlı biçimde azalmıştır. Çalışmamızda kullanılan yüksek doz kafein miktarı Tinwell ve diğ. (124)'nin dişilerde uyguladığı doza benzerlik göstermekte olup bizim sonuçlarımıza göre dişilerde hiçbir dönemde adrenal bez ağırlıkları açısından kontrol ve kafein grupları arasında fark oluşmamıştır. Tinwell ve diğ. (124)'nin buldukları azalma sadece adrenal bezlerin net ağırlıklarının karşılaştırılmasında bulunmuş olup bizim çalışmamızda adrenal bez ağırlıkları vücut ağırlıklarına göre oranlanmıştır. Diğer taraftan erkeklere baktığımızda sadece hamileliğin 19. gününde YK grubunda vücut ağırlığına oranlanmış adrenal bez ağırlıklarında bir azalma söz konusuydu. Bu durum erkeklere yüksek doz kafein uygulamasının prenatal dönemde adrenal bez üzerinde atrofiye edici bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Ancak H19 gününe ait serum serbest testosteron değerlerini ölçebilseydik bu bulgumuzu daha güçlü savunabilirdik.

Kafein alımının erkek üreme sistemi üzerine yaptığı etkiler ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Friedman ve diğ. (47) 4-6 haftalık erkek sıçanlarda yaptıkları çalışmada, kafein tüketiminin testislerde atrofiye neden olduğunu göstermişlerdir. Kafein mitotik hücrelerin sayısı azaltmakta ve spermatogenezi bozmaktadır (42, 129). Testis ağırlığı, çoğunlukla farklılaşmış spermatojenik hücrelerin kütlesine bağlıdır (23, 89) ve kafeinin spermatojenik hücre sayısını azalttığı ileri sürülmektedir (10). Örneğin hamilelik ve emzirme döneminde 45mg/kg/gün kafein tüketen annelerin yavrularının doğum sonrası 1, 7, 21, 28, 60, 90, 120 ve 150. günlerde incelendiği çalışmada; testis ağırlıklarında 1. ve 7. günlerde kontrol grubuna göre bir fark görülmemiş olup, 21. gün ve sonraki günlerde azalma meydana gelmiştir (40). Bu çalışmada kullanılan kafein dozu (45mg/kg/gün) bizim çalışmamızda kullanılan düşük kafein dozu ile benzerdir. Bizim çalışmamızda da DK grubundaki yenidoğanlarda ve doğum sonrası 4. gündeki yavruların testis ağırlıklarında kontrole

göre azalma eğilimi olsa da arada bir fark olmayışı yukarıdaki çalışma ile uyum göstermektedir. Gerek bizim çalışmamız gerekse de literatürde görüldüğü üzere, artan kafein dozajı doğum sonrası ilerleyen dönemlerde erkeklerde oluşabilecek testiküler atrofinin daha belirgin gözükmesine neden olmaktadır.

Kafein tüketiminin dişilerin ovaryum ağırlıkları üzerine yaptığı etkiler kafeinin uygulanma zamanına göre değişiklik göstermektedir. Örneğin West ve diğ. (130) sıçanlarda yaptıkları çalışmada, hamileliğin 3. ve 19. günleri arasında anne sıçanlara gavaj aracılığıyla çeşitli dozlarda kafein (5, 25, 50 ve 75mg/kg/gün) vermişlerdir. Dişi yavrular 9 haftalık olduğunda, 75mg/kg/gün kafein alan gruptaki dişilerin ovaryum ağırlığının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (130). Bir başka çalışmada hamilelik döneminde kafein tüketen anne sıçanların dişi fetüslerinde, ovaryum farklılaşmasının olduğu erken dönemlerden hamileliğin sonuna kadar olan zamanda ovaryumlarda morfolojik bir farklılık gözlenmemiştir (105). Kafeinin sıçanlara 3 farklı dozda (5, 20 ve 100 mg/kg/gün) 22. ve 50. günler arası gavaj aracılığıyla verildiği bir başka çalışmada ise, 5 ve 20 mg/kg/gün verilen sıçanların ovaryum ağırlıklarında bir değişiklik olmamakla birlikte 100 mg/kg/gün kafein verilen dişi sıçanlarda ovaryum ağırlıkları azalmıştır (124). Yukarıdaki çalışmaların ortak noktası, düşük kafein dozları genel anlamda ovaryum ağırlığını etkilememektedir. Bu sonuç bizim bulgularımız ile uyumaktadır. Yüksek doz kafein açısından sonuçları birbirleriyle çelişen iki çalışmadan ilkinde yüksek doz kafein anne aracılığı ile hamilelik döneminde verilirken (130) diğer çalışmada kafein doğrudan dişi yavrulara verilmektedir (124). Bizim çalışmamızda yenidoğanlarda ve doğum sonrası 4. gündeki yüksek doz kafein grubundaki dişi yavruların ovaryum ağırlıkları kontrole göre yüksek gözükmeyle birlikte aradaki fark anlamlı değildi. Sonuç olarak hamilelik döneminde tüketilen yüksek doz kafeinin dişi yavruların ovaryumları üzerindeki etkisinin ağırlık artışı yönünde olabileceği daha olası gözükmektedir.

Fetüs ve yavrularda vücut ağırlığı kübik olarak artış gösterirken AGM lineer bir artış gösterdiği için, çalışmamızda ölçülen AGM değerleri, vücut ağırlığının küp kökü (mm/g^{-3}) ile standardize edilerek karşılaştırıldı (49). Prenatal androjen maruziyetinin AGM üzerine yaptığı etkiler ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır.

Genellikle erkeklerin AGM'si dişilerin yaklaşık iki katıdır. Hamilelik döneminde anneye dışarıdan verilen testosteron ve türevleri dişi yavrularda AGM'nin uzamasına ve diğer maskülin profillerin gelişmesine neden olmaktadır (131, 134). Hamilelik döneminde testosteron propionat alan anne sıçanlarda, doğum sonrası 2. günde dişi yavruların AGM'leri artarken erkek yavrularda herhangi bir değişiklik oluşmamıştır (69, 135). Diğer taraftan, hamilelik döneminde verilen antiandrojenik ilaçlar erkek yavrularda maskülin özelliklerin ve AGM'nin azalmasına neden olmaktadır (55, 60, 68, 133). Örneğin Wolf ve diğ. (135)'nin yaptıkları çalışmada hamileliğin 14 ve 19. günleri arasında anne sıçanlara androjen reseptör antagonisti *vinclozin* verilmiştir. Erkek yavruların doğduktan iki gün sonra yapılan ölçümlerinde AGM'nin kontrole göre azaldığı gösterilmiştir. Dişilerde ise böyle bir durum söz konusu olmamıştır. Özetle prenatal testosteron'un artması dişilerdeki AGM'yi artırmakta, azalması ise erkeklerdeki AGM'yi azaltmaktadır.

Kafeinin AGM üzerine olan etkisinin incelendiği bir çalışmada, 30mg/kg/gün kafeinin verilen hamile sıçanların yavrularının, doğdukları gün ölçülen AGM'leri açısından, kontrol ve kafein grubu arasında herhangi bir fark bulunmamıştır (106). Bu sonuç bizim çalışmamızdaki yenidoğan sıçanların bulgularıyla uyumaktadır. Diğer taraftan çalışmamızda doğum sonrası 4. günde DK grubundaki erkek yavruların AGM'si hem kontrol hem de YK grubuna göre yüksek bulundu. Erkeklerdeki bu farkın sadece 4. günde görülmesi, tüm gruptaki erkek sıçanların AGM'sinin zamana bağlı artış göstermesinden kaynaklanmış olabilir. Sadece düşük doz da ortaya çıkmasının nedeni ise yüksek doz kafein tüketiminin testislerde neden olduğu atrofiye bağlı olabilir (47). Diğer taraftan çalışmamızda dişi fetüs ve yavruların AGM'sinde erkeklerdekine benzeyen zamana bağlı bir artış söz konusu olmamakla birlikte sadece YK grubundaki dişi yavruların AGM'si doğum sonrası 4. günde prenatal döneme göre yüksek bulundu. Bu durum çalışmamızda yenidoğan dişilerde görülen serbest testosteron miktarının yüksek seviyede olmasıyla ilgili olabilir.

Beyindeki dokular toplanmadan önce tüm kanın boşaltılması gibi bir işlem yapılmadı. Çünkü daha önce yapılan bir çalışma, perinatal beyin dokusunda steroid ölçümlerinin bu durumdan etkilenmediğini göstermiştir (6). Literatürde kafein uygulaması ve beyin dokusundaki seks steroid hormonlarının ilişkisi üzerine bir

yayına rastlanmamış olup beyin dokusunda seks steroid hormonlarının seviyelerinin ölçüldüğü çalışma sayısı da oldukça sınırlıdır.

Seks steroid hormonlarının beyindeki bölgelere (frontal korteks ve hipotalamus) göre dağılımına baktığımızda, çalışmamızdaki kontrol grupları açısından; hamileliğin 19. günündeki erkeklerde ve yenidoğan dişilerde DHT seviyesi ile yenidoğan erkeklerdeki testosteron ve östradiyol seviyeleri dışında tüm erkek ve dişi fetüs/yavrularda hipotalamustaki testosteron, östradiyol ve DHT seviyeleri her üç zaman diliminde de frontal korteksten yüksekti. Konkle ve McCharty'nin çalışmasında (76), hem prenatal hem de postnatal dönemlerde hipotalamustaki testosteron seviyesi frontal korteksten düşük bulundu. DHT seviyeleri ise prenatal dönemde frontal kortekte postnatal dönemde ise hipotalamusta daha yüksek olarak bulundu. Östradiyol seviyeleri açısından prenatal dönemde hipotalamus ve frontal korteks arasında fark yokken, postnatal dönemde hipotalamustaki östradiyol seviyesi daha yüksekti (76). Amateu ve diğ.nin (6) çalışmasında ise, yenidoğan sıçanlarda östradiyol seviyesi açısından frontal korteks ve hipotalamus arasında herhangi bir fark yokken, doğumdan 32 saat sonra yaptıkları incelemede hipotalamustaki östradiyol seviyesi frontal korteksten düşük bulundu (6). Seks steroid hormon seviyelerinin zamana göre (H19, D0 ve D4) değişimine baktığımızda, çalışmamızda kontrol grupları açısından erkek ve dişilerin frontal korteksinde ve sadece dişilerin hipotalamusunda prenatal dönemdeki (H19) testosteron ve DHT miktarları postnatal döneme (D4) göre yüksekti. Erkeklerin hipotalamusunda ise postnatal dönemde bir azalma eğilimi olmasına rağmen aradaki fark anlamlı değildi. Östradiyol seviyeleri açısından da postnatal dönemde bir azalma eğilimi olmasına rağmen fark sadece erkeklerin frontal korteksinde oluştu. Konkle ve McCharty'nin çalışmasında (76) tüm bölgelerde prenatal dönemdeki testosteron, östradiyol ve DHT seviyeleri postnatal döneme göre daha yüksekti. Hem bölgesel (hipotalamus ve frontal korteks) hem de zamana bağlı (prenatal ve postnatal dönem) sonuçlarımız yukarıdaki iki çalışma (6, 76) ile genelde benzerlik göstermekte olup bazı sonuçlarımız uyuşmamaktadır. Bunun nedeni yöntemlerimizde yer alan bir takım farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Örneğin Konkle ve McCharty'nin çalışmasında (76) prenatal dönem (19 ve 21. günler) ve postnatal dönem (0 ve 60. günler arası) birbirleriyle karşılaştırılırken özellikle postnatal kısımda daha geniş bir zaman aralığı söz konusudur. Ayrıca Amateu ve diğ.

(6)'nin çalışmasında ise postnatal dönem sadece doğum sonrası 32. saatte incelenmiştir.

Tüm fetüs ve yavruların frontal korteks ve hipotalamustalarındaki steroid seviyeleri incelendiğinde, kafein dozajı arttıkça testosteron düzeylerinde bir artış eğilimi söz konusu olmasına rağmen östradiyol ve DHT için böyle bir durum söz konusu değildi. Testosteronun kafein dozajına bağlı artış eğilimi sadece YK grubunda hamileliğin 19. günündeki dişilerin frontal korteksinde ve yenidoğan erkeklerin hipotalamusunda anlamlılığa ulaştı. Bu bulgulara ek olarak yenidoğan erkeklerde östradiyol ve testosteron seviyeleri açısından hipotalamus ve frontal korteks arasında bir fark yokken, kafein uygulaması (DK ve YK) östradiyol ve testosteron düzeylerini etkileyerek hipotalamusla frontal korteks arasında farkın oluşmasına yol açtı. Tüm bunların yanında YK uygulaması postnatal dönemdeki erkek yavruların frontal korteksindeki azalması beklenen östradiyol ve DHT düzeylerinin yüksek kalmasına, dişilerde ise DK uygulaması hipotalamusta testosteron ve DHT düzeylerinin yüksek kalmasına neden oldu. Çalışmamızda kafein gruplarında meydana gelen bu farkların periferik steroid kaynaklarından bağımsız gerçekleşmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü yenidoğan erkeklerde periferik serbest testosteron miktarı diğer gruplardan farklı değilken hipotalamustaki doku testosteron miktarı yüksek bulunmuştur. Ayrıca periferik steroid kaynakları hakkında dolaylı bilgi veren adrenal bez ve gonadlarda da yenidoğan erkeklerde gruplar arasında bir fark olmayışı bu bulguyu desteklemektedir. Hamileliğin 19. günündeki dişi fetüslerde herhangi bir serum analizi yapılamamış olsa da yüksek doz kafein uygulaması bu fetüslerin adrenal bezlerinde bir değişiklik yaratmamıştır. Diğer taraftan literatürde beyindeki seks steroid hormonlarının periferik steroidlerden etkilenmediği konusıyla ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada beyin dokusundaki östradiyol ile dolaşımdaki östradiyol seviyesi arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır (76). Ayrıca doğdukları gün steroidojenik organları (gonad ve adrenal bez) çıkarılan yavru sıçanlarda doğumdan üç gün sonra yapılan incelemede beyindeki testosteron, östradiol ve DHT seviyelerinin değişmediği görülmüştür (76). Yani periferdeki steroid hormonlarının üretilmesinden sorumlu olan yapıların çıkarılması sonrasında beyindeki steroid miktarlarının değişmemesi, beyinde muhtemel bir lokal sentez olabileceğini göstermektedir.

Yapılan başka bir çalışmada sağlam sıçanlardaki serum östradiyol seviyesi, gonadları çıkarılan sıçanlardan yüksek olmakla birlikte bu fark beyin dokusunda kendini göstermemiştir. Erkek ve dişi sıçanların amigdalasındaki ve dişi sıçanların prefrontal korteksindeki östradiyol miktarı sağlam ve gonadları çıkarılmış sıçanda benzer konsantrasyonda bulunmuştur (12). Ayrıca kuş beyinde yapılan çeşitli çalışmalarda *de novo* östrojen sentezi (67, 116) ve sıçan hipokampus kültüründe *in vitro* östrojen sentezi gösterilmiştir (107). Bu sonuçlar beynin çeşitli bölgelerinde perifer steroid kaynaklarından bağımsız lokal steroid sentezi olabileceğini göstermektedir (13, 126). Sonuç olarak çalışmamızda hamilelik döneminde tüketilen kafein, perifer kaynaklı steroidlerden bağımsız bir şekilde beyindeki olası lokal steroid hormon sentezini etkilemiş olabilir. Bu etki erkekte hipotalamus bölgesinde dişide ise frontal kortekste daha belirgin gözükmemektedir.

Seks steroid hormonlarını cinsiyete göre incelediğimizde çalışmamızdaki kontrol gruplarında her üç steroid hormon (testosteron, östradiyol ve DHT) açısından, hiçbir dönemde (H19, D0 ve D4) beyindeki bölgelerde (frontal korteks ve hipotalamus) erkek ve dişiler arasında fark yoktu. Konkle ve McCharty'nin çalışmasında (76) prenatal dönemdeki hipotalamus ve frontal kortekste, postnatal dönemde ise hipotalamustaki testosteron düzeyleri açısından cinsiyetler arasında fark yoktu. Bu sonuç bizim kontrol hayvanlarımızın sonuçları ile uyum göstermektedir. Diğer taraftan aynı ekip bizim sonuçlarımızdan farklı olarak frontal kortekste doğum sonrası 4. gündeki erkeklerde testosteron seviyesinin dişilere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (76). Caruso ve diğ. (28) 2 aylık sıçanlarda yaptıkları çalışmada erkeklerin frontal korteksindeki testosteron seviyesini dişilere göre daha yüksek bulmuştur.

Beyindeki östradiyol seviyeleri açısından ise literatürde farklı sonuçlar bulunmaktadır. Amateu ve diğ. (6)'nin yaptıkları çalışmada yenidoğan erkeklerdeki östradiyol seviyesi hem korteks hem de hipotalamusta dişilere göre yüksek bulunmuştur. Doğum sonrası 32. saatte ise sadece hipotalamusta erkeklerin östradiyol seviyesi yüksek bulunurken, kortekste cinsiyetler arası bir fark gözlenmemiştir. Konkle ve McCharty'nin çalışmasında (76) prenatal dönemdeki östradiyol seviyesi

açısından frontal kortekste herhangi bir fark yokken, hipotalamusta iki durum söz konusudur. H19 gününde cinsiyetler arasında herhangi bir fark gözlenmezken H21 gününde erkeklerin östradiyol seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Postnatal dönemde ise hipotalamusta herhangi bir fark ortaya çıkmamıştır. Bununla birlikte frontal kortekste doğum sonrası 4. günde erkeklerdeki östradiyol seviyesi yüksekken, 6. günde dişilerdeki östradiyol seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Çalışma ekibi 4 ve 6. günlerdeki bu farkı açıklamak için sürekli aktif halde olan dinamik bir örünütünün olabileceğini öne sürmüşlerdir (76). Barker ve diğ. (12)'nin yetişkin sıçanlarda yaptıkları çalışmada, prefrontal korteks, amigdala ve hipokampüste yapılan ölçümlerde erkek ve dişi sıçanlarda beyin dokusundaki östradiyol seviyeleri arasında fark bulunmamıştır. Caruso ve diğ. (28)'nin 2 aylık sıçanlarda yaptıkları çalışmada frontal kortekste östradiyol seviyesi dişilerde daha yüksek bulunmuştur. DHT açısından incelediğimizde, Konkle ve McCharty'nin çalışmasında (76) embriyonik ve postnatal dönemdeki DHT seviyesi açısından cinsiyetler arasında herhangi bir fark saptanmamıştır. Bu sonuç bizim bulgularımız ile uyumaktadır. Caruso ve diğ. (28)'nin çalışmasında frontal kortekste DHT seviyesi erkeklerde daha yüksek bulunmuştur. Cinsiyetler arasında beyindeki steroid seviyelerinde farklı sonuçların bulunmasının nedeni fetüslerin farklı intrauterin pozisyonları olabilir. Yapılan çeşitli çalışmalar, fetüslerin intrauterin pozisyonlarının fetüsün gelişiminde ve doğum sonrası fizyolojisinde önemli etkileri olduğunu göstermektedir (45, 61, 113). Örneğin yapılan bir çalışmada Wistar sıçanlarda hamileliğin 18 ve 21. günlerinde beyindeki testosteron ve östradiyol seviyelerinin intrauterin pozisyona göre değişip değişmediği enzim immunoassay yöntemiyle araştırılmıştır. Hamileliğin 18. gününde gruplar arasında bir fark gözlenmemiştir. Diğer taraftan hamileliğin 21. gününde intrauterin pozisyonlarına göre 2 erkek fetüs arasında yer alan erkek fetüslerdeki testosteron ve östradiyol seviyesi, 2 dişi fetüs arasında yer alan erkek fetüsteki seviyelerden daha yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca 2 erkek arasında yer alan dişi fetüs ile 2 dişi arasında yer alan dişi fetüs arasında ise fark yoktur (101). Bu sonuçlar fetüslerin intrauterin pozisyonun özellikle doğuma yakın dönemlerde beyin steroid hormon düzeyleri üzerine etkisi olduğunu göstermektedir.

Kafein uygulamasının cinsiyete bağımlı etkilerini incelediğimizde, yüksek doz kafein hamileliğin 19. günündeki dişilerin hipotalamusunda testosteron, östradiyol ve

DHT seviyelerinin erkeklerden daha yüksek olmasına neden oldu. Hipotalamustaki bu bulgular ve yüksek doz kafeinin frontal korteksteki (H19) testosteron seviyesi üzerindeki artırıcı etkisi göz önüne alındığında, yüksek doz kafein uygulamasının dişilerin beyindeki steroid seviyeleri üzerine özellikle prenatal dönemde daha etkili olabileceği düşünülmektedir.

6-SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamızdan elde edilen bulgular, hamilelik ve emzirme döneminde tüketilen kafeinin, fetüs ve yavruların beyin dokusu, üreme organları ve adrenal bezleri üzerinde kafeinin dozajına ve cinsiyete göre çeşitli etkiler yapabileceğini göstermektedir.

Hamilelik ve emzirme döneminde annenin düşük doz kafein tüketimi, doğum sonrası dönemdeki erkek ve dişi yavruların ağırlığını, sadece erkek yavruların ise anogenital indeksini artırmaktadır. Dişi yavruların hipotalamusunda ise dördüncü günde azalması beklenen testosteron ve DHT düzeylerinin yüksek kalmasına neden olmaktadır.

Hamilelik ve emzirme döneminde annenin yüksek doz kafein tüketimi ise erkeklerde hamileliğin 19. gününde adrenal bez ağırlığını azaltmaktadır. Yenidoğan dişilerde ise serum serbest testosteron seviyesinin, anneleri düşük doz kafein tüketen yavrulara göre daha yüksek seviyede olmasına neden olmaktadır. Ayrıca yüksek doz kafein tüketimi hamileliğin 19. günündeki dişi fetüslerin frontal korteksinde, yenidoğan erkeklerin ise hipotalamusunda doku testosteron seviyelerini artırmaktadır. Bununla birlikte erkeklerin frontal korteksinde doğum sonrası dönemde azalması beklenen östradiyol ve DHT düzeylerinin yüksek kalmasına neden olmaktadır.

Fetüs ve yavrularda cinsiyetler arası farkı incelediğimizde, anneleri yüksek doz kafein tüketen dişi fetüslerin hipotalamusundaki testosteron, östradiyol ve DHT seviyeleri erkeklere göre daha yüksek seviyede bulunmaktadır.

Kafeinin beyin dokusundaki seks steroid seviyeleri üzerine olan etkilerinin periferik steroid kaynaklarından bağımsız da olabileceği düşünülmektedir. Kafeinin, beyin dokusundaki muhtemel lokal steroid sentezi üzerine olabilecek etkilerinin ayrıntılı mekanizmasının daha ileri çalışmalarla araştırılması konunun açıklığa kavuşması ve kafeinin beynin gelişim dönemindeki etkilerinin daha net ortaya çıkması açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın sonuçlarının insanda beyin cinsiyetleri üzerine yapılacak çalışmalara katkıda bulunabileceği, hamilelik ve emzirme döneminde annelerin beslenme alışkanlıklarının düzenlenmesinde yol göstereci olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Aden, U., Herlenius, E., Tang, LQ. ve Fredholm BB. (2000). Maternal caffeine intake has minor effects on adenosine receptor ontogeny in the rat brain. *Pediatric research*; 48(2):177-183.
- 2- al'Absi, M. ve Lovallo, WR. (2004). Caffeine effects on the human stress axis. In: Nehlig, A., editor. *Coffee, tea, chocolate and the brain*. Boca Raton, FL: *CRC Press*; p. 113-131.
- 3- Allen, LS. ve Gorski, RA. (1990). Sex difference in the bed nucleus of the stria terminalis of the human brain. *The Journal of comparative neurology* 22; 302(4):697-706
- 4- Allen, LS. ve Gorski, RA. (1991) Sexual dimorphism of the anterior commissure and massa intermedia of the human brain. *The Journal of comparative neurology* 312(1): 97-104.
- 5- Alpar, R. 2014 *Spor, Sağlık ve Eğitim Bilimlerinden Örneklerle Uygulamalı İstatistik ve Geçerlik-Güvenirlilik, Detay Yayıncılık*.
- 6- Amateau, SK., Alt, JJ., Stamps, CL. ve McCarthy, MM. (2004). Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology*. Jun;145(6): 2906-2917
- 7- Andersen, SL. ve Teicher, MH. (2000). Sex differences in dopamine receptors and their relevance to ADHD. *Neuroscience and biobehavioral reviews* Rev. 24, 137–141.
- 8- Arnaud, MJ. (1993). Metabolism of caffeine and other components of coffee, in Caffeine, Coffee. *Health Raven Press*. pp 43–95.
- 9- Arnold, AP. (1992). Developmental plasticity in neural circuits controlling birdsong: sexual differentiation and the neural basis of learning. *Journal of neurobiology* (10):1506-1528.
- 10- Ax, RL., Collier, RJ. ve Lodge, JR. (1976). Effects of dietary caffeine on the testis of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Journal of reproduction and fertility*; 47:235-238.
- 11- Bakker, J., De Mees, C., Douhard, Q., Balthazart, J., Gabant, P., Szpirer, J. ve diğerleri. (2006). Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nature neuroscience* 9(2): 220-226.
- 12- Barker, JM. ve Galea, LA. (2009). Sex and regional differences in estradiol content in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of adult male and female rats. *General and comparative endocrinology*. 164(1): 77-84.
- 13- Baulieu, EE. (1998). Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23, 963–987.

- 14- Behrman, HR., Hall, AK., Preston, SL. ve Gore, SD. (1982). Antagonistic interactions of adenosine and prostaglandin F2 alpha modulate acute responses of luteal cells to luteinizing hormone. *Endocrinology*. 110(1):38-46.
- 15- Benowitz, NL., Jacob, 3rd P., Mayan, H. ve Denaro, C. (1995). Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. *Clinical pharmacology and therapeutics* 58: 684–691.
- 16- Bhat, SG., Wilson, M. ve Ramkumar, V. (1998). Age-dependent reductions in A1 adenosine receptor expression in rat testes. *The American journal of physiology* 274 (4 Pt 1): C1057-1064.
- 17- Billig, H. ve Rosberg, S. (1988). Evidence for A2 adenosine receptor-mediated effects on adenylate cyclase activity in rat ovarian membranes. *Molecular and cellular endocrinology* 56(3): 205-210.
- 18- Billig, H., Rosberg, S., Johanson, C. ve Ahrén, K. (1989). Adenosine as substrate and receptor agonist in the ovary. *Steroids*. 54(5): 523-542.
- 19- Björklund, O., Kahlström, J., Salmi, P. ve Fredholm, BB. (2008). Perinatal caffeine, acting on maternal adenosine A(1) receptors, causes long-lasting behavioral changes in mouse offspring. *PLoS One*. 3(12): 3977.
- 20- Boberg, J., Mandrup, KR., Jacobsen, PR., Isling, LK., Hadrup, N., Berthelsen, L. ve diğerleri (2013). Endocrine disrupting effects in rats perinatally exposed to a dietary relevant mixture of phytoestrogens. *Reproductive toxicology* 40: 41-51.
- 21- Bodineau, L., Cayetanot, F., Sådani-Makki, F., Bach, V., Gros, F., Lebleu, A. Ve diğerleri. (2003). Consequences of in utero caffeine exposure on respiratory output in normoxic and hypoxic conditions and related changes of Fos expression: a study on brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Pediatric research*. 53(2): 266-273.
- 22- Bona, E., Adén, U., Fredholm, BB. ve Hagberg, H. (1995). The effect of long term caffeine treatment on hypoxic-ischemic brain damage in the neonate. *Pediatric research*. 38(3): 312-318.
- 23- Boockfor, FR. ve Blake, CA. (1997). Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. *Biology of reproduction* 57: 267-277.
- 24- Broom, DM. ve Johnson, KG. (1993). Stress and animal welfare. *London: Chapman & Hall*.
- 25- Brown, J., Walker, S. ve Steinman, K. (2004). Endocrine Manual for Reproductive Assessment of Domestic and Non- Domestic Species. *Chiang Mai University*.
- 26- Browne, ML. (2006). Maternal exposure to caffeine and risk of congenital anomalies: a systematic review. *Epidemiology* 17: 324–331.

- 27- Byne, W., Lasco, MS., Kemether, E., Shinwari, A., Edgar, MA., Morgello, S. ve diğerleri. (2000). The interstitial nuclei of the human anterior hypothalamus: An investigation of sexual variation in volume and cell size, number and density. *Brain Research* 856: 254–258.
- 28- Caruso, D., Pesaresi, M., Abbiati, F., Calabrese, D., Giatti, S., Garcia-Segura, LM. ve diğerleri. (2013). Comparison of plasma and cerebrospinal fluid levels of neuroactive steroids with their brain, spinal cord and peripheral nerve levels in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 38(10): 2278-2290.
- 29- Caviness, VS Jr., Kennedy, DN., Richelme, C., Rademacher, J. ve Filipek, PA. (1996). The human brain age 7-11 years: a volumetric analysis based on magnetic resonance images. *Cerebral cortex*. 6(5): 726-736.
- 30- Celec, P. ve Behuliak, M. (2010). Behavioural and endocrine effects of chronic cola intake. *Journal of psychopharmacology*. 24(10): 1569-1572.
- 31- Chen, YC., Huang, SH. ve Wang, SM. (2008). Adenosine-stimulated adrenal steroidogenesis involves the adenosine A2A and A2B receptors and the Janus kinase 2-mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *International journal of biochemistry and cell biology*. 40(12): 2815-2825.
- 32- Chen, YC., Chen, Y., Huang, SH. ve Wang SM. (2010). Protein kinase C μ mediates adenosine-stimulated steroidogenesis in primary rat adrenal cells. *FEBS Letters*. 5;584(21): 4442-4448.
- 33- Cohen-Bendahan, CC., van de Beek, C. ve Berenbaum, SA. (2005). Prenatal sex hormone effects on child and adult sex-typed behavior: methods and findings. *Neuroscience and biobehavioral reviews* (2): 353-384.
- 34- Conti, M., Boitani, C. Demanno, D. Migliaccio, S. Monaco, L. ve Szymeczek C. (1989). Characterization and function of adenosine receptors in the testis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 546: 39–47.
- 35- Cooper, DM. ve Glead, C. (1978). The action of adenosine on steroidogenesis in isolated rat adrenocortical cells. *Journal of steroid biochemistry*. 9(10): 973-977.
- 36- Cosgrove, KP., Mazure, CM. ve Staley, JK. (2007). Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biological psychiatry* 62, 847–855.
- 37- da Silva, RS., Richetti, SK., da Silveira, VG., Battastini, AM., Bogo, MR., Lara, DR. ve diğerleri. (2008). Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *International journal of developmental neuroscience*. 26(3-4):339-343.
- 38- Daly, JW. ve Fredholm, BB. (1998). Caffeine—an atypical drug of dependence. *Drug and alcohol dependence*. 51: 199–206.
- 39- Davis, EC., Shryne, JE. ve Gorski, RA. (1996). Structural sexual dimorphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat

hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally, *Neuroendocrinology* 63:142–148.

- 40- Dorostghoal, M., Erfani Majd, N. ve Nooraei, P. (2012). Maternal caffeine consumption has irreversible effects on reproductive parameters and fertility in male offspring rats. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 39(4):144-152.
- 41- Dunn, JF., Nisula, BC. ve Rodbard, D. (1981). Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 53(1): 58-68.
- 42- Ezzat, AR. ve el-Gohary, ZM. (1994). Hormonal and histological effects of chronic caffeine administration on the pituitary-gonadal and pituitary-adrenocortical axes in male rabbits. *Functional and developmental morphology*. 4(1):45-50.
- 43- Ferrini, RL. ve Barrett-Connor, E. (1996). Caffeine intake and endogenous sex steroid levels in postmenopausal women. The Rancho Bernardo Study. *American journal of epidemiology*. 144(7):642-644.
- 44- Filipek, PA., Richelme, C., Kennedy, DN. ve Caviness, VS Jr. (1994). The young adult human brain: an MRI-based morphometric analysis. *Cerebral cortex* 4(4):344-360.
- 45- Forger, NG., Galef, BG. Jr ve Clark, MM. (1996). Intrauterine position affects motoneuron number and muscle size in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Brain research*. 735; 119–124.
- 46- Fredholm, BB., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A. ve Zvartau, EE. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological reviews*. 51(1):83-133.
- 47- Friedman, L., Weinberger, MA., Farber, TM., Moreland, FM., Peters, EL., Gilmore, CE. ve diğerleri. (1979). Testicular atrophy and impaired spermatogenesis in rats fed high levels of the methylxanthines caffeine, theobromine, or theophylline. *Journal of environmental pathology and toxicology*. 2(3): 687-706.
- 48- Fuhr, U., Rost, KL., Engelhardt, R., Sachs, M., Liermann, D., Belloc, C. ve diğerleri. (1996) Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations. *Pharmacogenetics* 6:159–176.
- 49- Gallavan, RH Jr., Holson, JF., Stump, DG., Knapp, JF., Reynolds, VL. (1999). Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reproductive toxicology*. 13: 383–390.
- 50- Gallo-Payet, N., Cote, M., Chorvatova, A., Guillon, G. ve Payet, MD. (1999) Cyclic AMP-independent effects of ACTH on glomerulosa cells of the rat

- adrenal cortex. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 69, 335–342.
- 51- Gitau, R., Adams, D., Fisk, NM. ve Glover V. (2005). Fetal plasma testosterone correlates positively with cortisol. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*. 90(2): F166-169.
 - 52- Goldstein, JM., Seidman, LJ., Horton, NJ., Makris, N., Kennedy, DN., Caviness, VS Jr. Ve diğerleri. (2001). Normal sexual dimorphism of the adult human brain assessed by in vivo magnetic resonance imaging. *Cerebral cortex*. 11(6): 490-497.
 - 53- Gorski, RA., Harlan, RE., Jacobson, CD., Shryne, JE. ve Southam, AM. (1980). Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *The Journal of comparative neurology*. 193(2): 529-539.
 - 54- Goto, A., Song, Y., Chen, BH., Manson, JE., Buring, JE. ve Liu, S. (2011). Coffee and caffeine consumption in relation to sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in postmenopausal women. *Diabetes*. 60(1):269-275.
 - 55- Gray, LE Jr., Ostby, JS., Monosson, E., ve Kelce, WR. (1999). Environmental antiandrogens: Low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicology and industrial health* 15: 48–64.
 - 56- Gur, R., Gur, R., Obrist, W., Hungerbuhler, J., Younkin, D., Rosen, A ve diğerleri. (1982). Sex and handedness differences in cerebral blood flow during rest and cognitive activity. *Science*. 217:659–661
 - 57- Gur, R., Turetsky, B., Matsui, M., Yan, M., Bilker, W., Hughett, P. ve diğerleri. (1999). Sex differences in brain gray and white matter in healthy young adults: correlations with cognitive performance. *Journal of Neuroscience*. 19: 4065–4072.
 - 58- Harasty, J., Double, KL., Halliday, GM., Kril, JJ. ve McRitchie, DA. (1997). Language-associated cortical regions are proportionally larger in the female brain. *Archives of neurology*. 54(2):171-176.
 - 59- Hart, AD. ve Grimble, RF. (1990). The effect of methylxanthines on milk volume and composition, and growth of rat pups. *The British journal of nutrition*. 64(2): 339-350.
 - 60- Hellwig, J., van Ravenzwaay, B., Mayer, M., ve Gemberdt, C. (2000). Preand postnatal oral toxicity of vinclozolin in Wistar and Long-Evans rats. *Regulatory toxicology and pharmacology* 32, 42–50.
 - 61- Hernandez-Tristan, R., Arevalo, C. ve Canals, S. (1999). Effect of prenatal uterine position on male and female rats sexual behavior. *Physiology and behavior*. 67, 401–408.

- 62- Hines, M., Allen, LS. ve Gorski, RA. (1992). Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain research*. 579(2): 321-326.
- 63- Hines, M., Fane, BA., Pasterski, VL., Mathews, GA., Conway, GS. ve Brook, C. (2003). Spatial abilities following prenatal androgen abnormality: targeting and mental rotations performance in individuals with congenital adrenal hyperplasia. *Psychoneuroendocrinology*. 28(8):1010-1026.
- 64- Hines, M. (2006). Prenatal testosterone and gender-related behaviour. *European journal of endocrinology*. 155 Suppl 1:S115-121
- 65- Hines, M. (2009). Gonadal Hormones and Sexual Differentiation of Human Brain and Behavior. In: Pfaff, DW., Arnold, AP., Etgen, AM., Fahrbach, SE., Rubin, RT. *Hormones, brain and behavior, Academic Press*, Chapter(59) pp. 1870–1901.
- 66- Hines M. (2010). Sex-related variation in human behavior and the brain. *Trends in cognitive sciences*. 14(10):448-456.
- 67- Holloway, CC. ve Clayton, DF. (2001). Estrogen synthesis in the male brain triggers development of the avian song control pathway in vitro. *Nature neuroscience*. 4:170– 175
- 68- Hotchkiss, AK., Ostby, JS., Vandenberg, JD., ve Gray, LE. Jr. (2003). An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. *Physiology and behavior*. 79, 151–156.
- 69- Hotchkiss, AK., Lambright, CS., Ostby, JS., Parks-Saldutti, L., Vandenberg, JG. ve Gray, LE. Jr. (2007). Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats. (2007). *Toxicological sciences*. 96(2):335-345.
- 70- Hsu, HK., Yang, RC., Shih, HC., Hsieh, YL., Chen, UY. ve Hsu, C. (2001) Prenatal exposure of testosterone prevents SDN-POA neurons of postnatal male rats from apoptosis through NMDA receptor. *Journal of neurophysiology*. 86(5):2374-2380.
- 71- Hutchison, JB., Wozniak, A., Beyer, C., Karolczak, M. ve Hutchison, RE. (1999). Steroid metabolising enzymes in the determination of brain gender. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 69(1-6):85-96.
- 72- Ikeda, GJ., Sapienza, PP., McGinnis, ML., Bragg, LE., Walsh, JJ. ve Collins, TF. (1982). Blood levels of caffeine and results of fetal examination after oral administration of caffeine to pregnant rats. *Journal of applied toxicology*. 2, 307–314.
- 73- Jones, HE., Ruscio, MA., Keyser, LA., Gonzalez, C., Billack, B., Rowe, R. ve diğerleri. (1997). Prenatal stress alters the size of the rostral anterior commissure in rats. *Brain research bulletin*. 42: 341–346
- 74- Jovanovic, H., Lundberg, J., Karlsson, P., Cerin, A., Saijo, T., Varrone, A. Ve diğerleri. (2008). Sex differences in the serotonin 1A receptor and serotonin

- transporter binding in the human brain measured by PET. *Neuroimage*. 1;39(3):1408-1419.
- 75- Knickmeyer, RC. ve Baron-Cohen, S. (2006). Fetal testosterone and sex differences in typical social development and in autism. *Journal of child neurology*. (10):825-845.
- 76- Konkle, AT. ve McCarthy, MM. (2011). Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology*.152(1):223-235.
- 77- Leon, D., Albasanz, JL., Ruíz, MA., Fernández, M. ve Martín, M. (2002). Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *Journal of neurochemistry*. 82(3):625-634.
- 78- Leon, D., Albasanz, JL., Ruíz, MA. ve Martín, M. (2005). Chronic caffeine or theophylline intake during pregnancy inhibits A1 receptor function in the rat brain. *Neuroscience*.131(2):481-489.
- 79- Lephart, ED. (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain research*. Brain research reviews. 22(1):1-26.
- 80- Leu, SF., Poon, SL., Pao, HY. ve Huang, BM. (2011). The in vivo and in vitro stimulatory effects of cordycepin on mouse leydig cell steroidogenesis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 75(4):723-731.
- 81- LeVay, S. (1991). A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men. *Science* 253: 1034–1037.
- 82- Lin, AS., Uhde, TW., Slate, SO. ve McCann, UD. (1997). Effects of intravenous caffeine administered to healthy males during sleep. *Depression and Anxiety* 5:21–28.
- 83- Lorenzo, AM., Leon, D., Castillo, CA., Ruiz, MA., Albasanz, JL. ve Martín, M. (2010). Maternal caffeine intake during gestation and lactation down-regulates adenosine A1 receptor in rat brain from mothers and neonates. *Journal of neuroscience research*. 88(6):1252-1261.
- 84- Lovallo, WR., Farag, NH., Vincent, AS., Thomas, TL. ve Wilson, MF. (2006). Cortisol responses to mental stress, exercise, and meals following caffeine intake in men and women. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 83(3):441-447.
- 85- Matsumoto, A. (1991). Synaptogenic action of sex steroids in developing and adult neuroendocrine brain. *Psychoneuroendocrinology* 16:25–40.
- 86- Matteri, RL., Carroll, JA. ve Dyer, CJ. (2000). Neuroendocrine responses to stress. In: Moberg, GP., Mench, JA. editors. *The biology of animal stress*. CABI Publishing. p.43–76.
- 87- McElligott, ZA. ve Winder, DG. (2009). Modulation of glutamatergic synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 13;33(8):1329-1335.

- 88- Monaco, L. ve Conti, M. (1986). Localization of adenosine receptors in rat testicular cells. *Biology of reproduction*. 35(2):258-266.
- 89- Mruk, DD. ve Cheng, CY. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine reviews*. 25: 747-806.
- 90- Mumford, GK. ve Holtzman, SG. (1991). Qualitative differences in the discriminative stimulus effects of low and high doses of caffeine in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 258: 857–865.
- 91- Murphy, KMM., Goodman, RG., ve Synder, SH. (1983). Adenosine receptor localization in rat testis: biochemical and autoradiographic evidence for association with spermatocytes. *Endocrinology* 113: 1299–1305.
- 92- Murphy, DG., DeCarli, C., McIntosh, AR., Daly, E., Mentis, MJ., Pietrini, P. ve diğerleri. (1996). Sex differences in human brain morphometry and metabolism: an in vivo quantitative magnetic resonance imaging and positron emission tomography study on the effect of aging. *Archives of general psychiatry*. 53(7):585-594.
- 93- Nehlig, A. (1999). Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 23, 563–576.
- 94- Nehlig, A. ve Boyet, S. (2000). Dose-response study of caffeine effects on cerebral functional activity with a specific focus on dependence. *Brain research*. 858: 71–77.
- 95- Nicholson, SA. (1989). Stimulatory effect of caffeine on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in the rat. *Journal of Endocrinology* 122:535–543.
- 96- Nishizawa, S., Benkelfat, C., Young, SN, Leyton, M., Mzengeza, S., de Montigny, C. ve diğerleri. (1997). Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 13;94(10):5308-5313.
- 97- Noschang, CG., Pettenuzzo, LF., von Pozzer Toigo, E., Andreazza, AC., Krolow, R., Fachin, A. ve diğerleri. (2009). Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 94(1):63-69.
- 98- Palmer, TM. and Stiles, GL. (1997). Structure-function analysis of inhibitory adenosine receptor regulation. *Neuropharmacology*. 36, 1141–1147.
- 99- Parsey, RV., Oquendo, MA., Simpson, NR., Ogden, RT., Van Heertum, R., Arango, V. ve diğerleri. (2002). Effects of sex, age, and aggressive traits in man on brain serotonin 5-HT1A receptor binding potential measured by PET using [C-11]WAY-100635. *Brain research*. 954(2):173-182.

- 100- Patz, MD., Day, HE., Burow, A. ve Campeau, S. (2006). Modulation of the hypothalamo pituitary adrenocortical axis by caffeine. *Psychoneuroendocrinology*. 31(4):493-500.
- 101- Pei, M., Matsuda, K., Sakamoto, H. ve Kawata, M. (2006). Intrauterine proximity to male fetuses affects the morphology of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the adult rat brain. *The European journal of neuroscience*. 23(5):1234-1240.
- 102- Pelligrino, DA., Xu, HL. ve Vetri, F. (2010). Caffeine and the control of cerebral hemodynamics. *Journal of Alzheimer's disease*. 20 Suppl 1:S51-62.
- 103- Pettenuzzo, LF., Noschang, C., von Pozzer Toigo, E., Fachin, A., Vendite, D. ve Dalmaz, C. (2008). Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. *Physiology and behavior*. 95(3):295-301.
- 104- Pollard, I. (1988). Increases in plasma concentrations of steroids in the rat after the administration of caffeine: comparison with plasma disposition of caffeine. *The Journal of endocrinology*. 119(2):275-280.
- 105- Pollard, I., Williamson, S. ve Magre S. (1990). Influence of caffeine administered during pregnancy on the early differentiation of fetal rat ovaries and testes. *Journal of developmental physiology*. 13(2):59-65.
- 106- Pollard, I., Murray, JF., Hiller, R., Scaramuzzi, RJ. ve Wilson, CA. (1999). Effects of preconceptual caffeine exposure on pregnancy and progeny viability. *The Journal of maternal-fetal medicine*. 8(5):220-224.
- 107- Prange-Kiel, J., Wehrenberg, U., Jarry, H. ve Rune, GM. (2003). Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13:226– 234
- 108- Purves, D. (2004). Neuroscience. Purves D (Ed.), Sex, Sexuality, and the Brain *Sinauer Associates, Inc*.
- 109- Rapoport, JL. ve Gogtay, N., (2008). Brain neuroplasticity in healthy, hyperactive, and psychotic children: insights from neuroimaging. *Neuropsychopharmacology* 33, 181–197.
- 110- Riccardi, P., Zald, D., Li, R., Park, S., Ansari, MS., Dawant, B. ve diğerleri. (2006). Sex differences in amphetamine-induced displacement of [(18)F] fallypride in striatal and extrastriatal regions: a PET study. *The American journal of psychiatry*. 163(9):1639-1641.
- 111- Rijntjes, E., Swarts, HJ., Anand-Ivell, R. ve Teerds KJ. (2009). Prenatal induced chronic dietary hypothyroidism delays but does not block adult-type Leydig cell development. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 296(2):E305-14.
- 112- Rivkees, SA. (1994). Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis. *Endocrinology* 135: 2307–2313
- 113- Ryan, BC. ve Vandenbergh, JG. (2002). Intrauterine position effects. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 26, 665–678.

- 114- Saadani-Makki, F., Frugière, A., Gros, F., Gaytan, S. ve Bodineau, L. (2004). Involvement of adenosinergic A1 systems in the occurrence of respiratory perturbations encountered in newborns following an in utero caffeine exposure. a study on brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Neuroscience*. 127(2):505-518.
- 115- Sarobo, C., Lacorte, LM., Martins, M., Rinaldi, JC., Moroz, A., Scarano, WR. ve diğerleri. (2012). Chronic caffeine intake increases androgenic stimuli, epithelial cell proliferation and hyperplasia in rat ventral prostate. *International journal of experimental pathology*. 93(6):429-437.
- 116- Schlinger, BA. Ve Arnold, AP. (1993). Estrogen synthesis in vivo in the adult zebra finch: additional evidence that circulating estrogens can originate in brain. *Endocrinology*. 133:2610–2616.
- 117- Schocken, DD. ve Schneider, MN. (1986). Use of multiple radioligands to characterize adenosine receptors in human placenta. *Placenta*. 7(4):339-48.
- 118- Sheffield, LG. (1991). Caffeine administered during pregnancy augments subsequent lactation in mice. *Journal of animal science* 69(3):1128-1132.
- 119- Simerly, RB. (1998). Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behavioural brain research* 92(2):195-203.
- 120- Suzuki, F., Shimada, J., Mizumoto, H., Karasawa, A., Kubo, K., Nonaka, H. ve diğerleri. (1992). Adenosine A1 antagonists. 2. Structure-activity relationships on diuretic activities and protective effects against acute renal failure. *Journal of medicinal chemistry*. 35: 3066–3075
- 121- Swaab, DF. ve Hofman, MA. (1990). An enlarged suprachiasmatic nucleus in homosexual men. *Brain research*. 24; 537(1-2):141-148.
- 122- Tchekalarova, J., Kubová, H. ve Mares, P. (2006). Biphasic effect of chronic postnatal caffeine treatment on cortical epileptic afterdischarges during ontogeny in rats. *Brain research* 1082(1):43-49.
- 123- Terlouw, EM., Schouten, WGP. ve Ladewig, J. (1997). Physiology. In: Appleby, MC., Hughes, BO., editors. *Animal welfare*. Cambridge: CAB International, University Press. p. 143–158.
- 124- Tinwell, H., Colombel, S., Blanck, O. ve Bars, R. (2013). The screening of everyday life chemicals in validated assays targeting the pituitary-gonadal axis. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 66(2):184-96.
- 125- Tsubouchi, H., Shimoya, K., Hayashi, S., Toda, M., Morimoto, K. ve Murata, Y. (2006). Effect of coffee intake on blood flow and maternal stress during the third trimester of pregnancy. *International journal of gynaecology and obstetrics*. 92(1):19-22.
- 126- Tsutsui, K., Ukena, K., Usui, M., Sakamoto, H. ve Takase, M. (2000). Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neuroscience research* 36(4):261-273.

- 127- Ward, OB., Ward, IL., Denning, JH., French, JA. ve Hendricks, SE. (2002). Postparturitional testosterone surge in male offspring of rats stressed and/or fed ethanol during late pregnancy. *Hormones and behavior* 41(2): 229-235.
- 128- Ward, IL., Ward, OB., Affuso, JD., Long, WD 3rd., French, JA. ve Hendricks, SE. (2003). Fetal testosterone surge: specific modulations induced in male rats by maternal stress and/or alcohol consumption. *Hormones and behavior* 43(5):531-539.
- 129- Weinberger, MA., Friedman, L., Farber, TM., Moreland, FM., Peters, EL., Gilmore, CE. ve diğ erleri. (1978). Testicular atrophy and impaired spermatogenesis in rats fed high levels of the methylxanthines caffeine, theobromine, or theophylline. *Journal of environmental pathology and toxicology* 1(5):669-688.
- 130- West, GL., Sobotka, TJ., Brodie, RE., Beier, JM., O'Donnell, MW Jr. (1986). Postnatal neurobehavioral development in rats exposed in utero to caffeine. *Neurobehavioral toxicology and teratology*. 8(1):29-43.
- 131- Wilson, VS., Lambright, C., Ostby, J. ve Gray, LE Jr. (2002). In vitro and in vivo effects of 17-beta-trenbolone: a feedlot effluent contaminant. *Toxicological sciences* 70, 202–211.
- 132- Witelson, SF., Kigar, DL., Scamvougeras, A., Kideckel, DM., Buck, B., Stanchev, PL. ve diğ erleri. (2008). Corpus callosum anatomy in right handed homosexual and heterosexual men. *Archives of sexual behavior* 37, 857–863.
- 133- Wolf, CJ., LeBlanc, GA., Ostby, JS. ve Gray, LE. Jr. (2000). Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin. *Toxicological sciences* 55, 152–161.
- 134- Wolf, CJ., Hotchkiss, A., Ostby, JS., LeBlanc, GA. ve Gray, LE. Jr. (2002). Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: A dose-response study. *Toxicological sciences* 65, 71–86.
- 135- Wolf, CJ., LeBlanc, GA. ve Gray, LE. Jr. (2004). Interactive effects of vinclozolin and testosterone propionate on pregnancy and sexual differentiation of the male and female SD rat. *Toxicological sciences* 78(1):135-43.
- 136- Zhou, QY., Li, C., Olah, ME., Johnso RA., Stiles, GL ve Civelli, O. (1992). Molecular cloning and characterization of an adenosinereceptor: the A3 adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 7432–7436.
- 137- Zhou, JN., Hofman, MA., Gooren, LJ. ve Swaab, DF. (1995). A sex difference in the human brain and its relation to transsexuality. *Nature*. 378(6552):68-70.
- 138- Zuloaga, DG., Puts, DA., Jordan, CL. ve Breedlove, SM. (2008). The role of androgen receptors in the masculinization of brain and behavior: what we've learned from the testicular feminization mutation. *Hormones and behavior*. 53(5): 613-626.

EKLER

EK 1. Etik Kurul İzni



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/ 75

17 Eylül 2011

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 13.10.2011 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI : 2011/8
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2011/62
KARAR NUMARASI : 2011/62-7
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ : Doç. Dr. Ayşen Erdem
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI : Doç. Dr. Meltem Tuncer, Arş. Gör. Serkan Karaismailoğlu
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Prof. Dr. Eser Lay Ergün
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : 27 adet hamile Wistar Sıçan ve yavruları
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ : 12 ay

Üniversitemiz Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ayşe Erdem'in hayvan deneylerinden sorumlu araştırmacısı olduğu 2011/62 dosya numaralı ve "*Perinatal Kafein Uygulamasının Yavru Sıçanların Beyin Dokusundaki Seks Steroit Hormonları Üzerine Etkisi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Etik Kurul Başkanı