

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PUBERTE DÖNEMİNDE CAPSAİCİN UYGULANAN
SIÇANLARIN OVARYUM DOKUSUNDA
TRANSFORME EDİCİ GELİŞİM FAKTÖRÜ ALFA’NIN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL DAĞILIMI VE GEN
EKSPRESYONU**

Öğr. Gör. Sevda ELİŞ YILDIZ
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mümtaz NAZLI

2011-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PUBERTE DÖNEMİNDE CAPSAİCİN UYGULANAN
SIÇANLARIN OVARYUM DOKUSUNDA
TRANSFORME EDİCİ GELİŞİM FAKTÖRÜ ALFA'NIN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL DAĞILIMI VE GEN
EKSPRESYONU**

Öğr. Gör. Sevda ELİŞ YILDIZ
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mümtaz NAZLI

**Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurumu (TÜBİTAK)
tarafından desteklemiştir. Proje No: 109O829**

2011-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Öğr.Gör. Sevda ELİŞ YILDIZ tarafından hazırlanmış olan “Puberte Döneminde Capsaicin Uygulanan Sıçanların Ovaryum Dokusunda Transforme Edici Gelişim Faktörü Alfa'nın İmmunohistokimyasal Dağılımı ve Gen Ekspresyonu” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy *bu...ki...i* ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

12-09-2011

Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ

Üye : Prof. Dr. Şahin ASLAN

Üye : Prof. Dr. Mümtaz NAZLI

Üye : Doç. Dr. Nejdet ŞİMŞEK

Üye : Doç. Dr. Hasan ÖZEN

İmza

[Handwritten signatures in blue ink]

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22.09.2011 gün ve 02/12 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

[Handwritten signature and circular stamp of the Health Sciences Institute]

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ve doktora eğitimimin her aşamasında yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm, çalışma azmini, bilgiyi ve uygulamayı öğrendiğim, bu çalışmaya başlamamda, çalışmayı sürdürmede ve sonuçlandırmamda emeği olan değerli görüşleri ile katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Mümtaz NAZLI'ya teşekkür ederim. Çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ'e, Prof. Dr. Şahin ASLAN'a, Prof. Dr. Hakan KOCAMIŞ'a, Doç. Dr. Ebru KARADAĞ SARI'ya, Yrd. Doç. Dr. Turgay DEPREM'e ve Araş. Gör. Serap KORAL TAŞCI'ya, Öğr. Gör. Dr. Seyit Ali BİNGÖL'e, ayrıca tezimin izlenmesinde emeği geçen Doç. Dr. Hasan ÖZEN'e, Doç. Dr. Nejdet ŞİMŞEK'e, immunohistokimyasal çalışmalarda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Doç. Dr. Mahmut SÖZMEN'e ve diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim. RT-PCR çalışmalarımı yürüttüğüm Hayvan Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü'ne ve çalışanlarına, RT-PCR çalışmasında elde ettiğim sonuçların dansitometrik ölçümlerinde desteklerini esirgemeyen Missouri Üniversitesi Öğretim Üyesi Asistan Profesör Yüksel AĞCA'ya teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan ve manevi desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim Sebahattin YILDIZ'a, sabır ve desteklerinden dolayı sevgili ailemin tüm bireyelerine, maddi desteğinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na ve emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGE	AÇIKLAMA
°C	Santigrad Derece
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
dk.	Dakika
g	Devir (Santrifugal Kuvvet)
gr	Gram
kDA	Kilodalton
kg	Kilogram
M	Molarite
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
sn	Saniye
α	Alfa
β	Beta

KISALTMA	AÇIKLAMA
A	Adenin
ABC	Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks
bç	Baz Çifti
C	Sitozin
CAG	Krom Alüm Jelatin
CAP	Capsaicin
cDNA	Komplementary DNA
dATP	Deoksiadenozin Trifosfat
dCTP	Deoksisitozin Trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin Trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonukleotid Trifosfat
dTTP	Deoksitimidin Trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGF-R	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FSH	Folikül Stimüle Eden Hormon
G	Guanin
GTH	Gonadotrop Hormon
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
CGTH	Koryonik Gonodotrop Hormon
LH	Lutenize Edici Hormon
LT	Luteotrop Hormon

MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Mesajcı RNA
NF	Nükleaz Free
PBS	Fosfat Buffer Salin
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SD	Standart Sapma
Sig.	Anlamlılık
T	Timin
TBE	Tris Borate EDTA
TE	Tris EDTA
TGF	Transforme Edici Gelişim Faktör
UV	Ultraviyole
V	Volt
VEGF	Vasküler Endotele Ait Büyüme Faktörü
VRI	Vanilloid Reseptör I

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TABLO LİSTESİ	I
ŞEKİL LİSTESİ	II
GRAFİK LİSTESİ	IV
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1. Dişi Genital Sistem	2
1.1.1. Ovaryum	2
1.1.2. Ovaryumun Histolojisi	3
1.1.3. Ovaryum Folikülleri	4
1.2. Transforme Edici Gelişim Faktörü	6
1.2.1. Etki Mekanizması	6
1.2.2. TGF Türlerinin Sınıflandırılması	6
1.2.3. TGF α 'nın Dişi Genital Sistem Üzerine Etkileri	8
1.3. Capsaicin	9
2. MATERYAL VE METOT	12
2.1. Histolojik İncelemeler İçin Doku Hazırlanması	13
2.2. Gen Ekspresyonu Analizi	15
2.3. İstatiksel Hesaplamalar	24
3. BULGULAR	25
3.1. Canlı Ağırlık Bulguları	25
3.2. Ovaryum Ağırlığı Bulguları	27
3.3. Ovaryum Dokusunda Histolojik Bulgular	28
3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	30
3.5. Gen Ekspresyonu Bulgular	35
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
5. ÖZET	46
6. SUMMARY	47
7. KAYNAKLAR	48
8. ÖZGEÇMİŞ	56

TABLO**SAYFA NO**

Tablo 1: Her üç gruptaki sıçanların 0. ve 14. günlerdeki ortalama ağırlıkları.	25
Tablo 2: İstatistiki olarak canlı ağırlık farklılık testi	26
Tablo 3: İstatistiki olarak ovaryum ağırlığı farklılık testi	27
Tablo 4: Puberte döneminde capsaicin uygulanan sıçanların ovaryum dokusunda TGF α gen ekspresyonunun karşılaştırması	35

ŞEKİL LİSTESİ**SAYFA NO**

Şekil 1: Puberte döneminde capsaicin uygulanan deneme grubundaki sıçanların ovaryum dokusundaki TGF α 'nın gen ekspresyonu.	21
Şekil 2: Puberte döneminde capsaicin uygulanan beslenme grubundaki sıçanların ovaryum dokusundaki TGF α 'nın gen ekspresyonu.	22
Şekil 3: Puberte dönemindeki sham grubuna ait sıçanların ovaryum dokusundaki TGF α 'nın gen ekspresyonu.	22
Şekil 4: Ovaryumun genel görünümü	29
Şekil 5: Ovaryum korteksinde primer ve sekonder folikül	29
Şekil 6: Puberta döneminde capsaicin uygulanan deneme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda primordiyal folikülde, intersitisyel hücrelerde TGF α 'nın immunoreaktivitesi.	31
Şekil 7: Puberta döneminde capsaicin uygulanan beslenme grubundaki sıçanların ovaryum dokusundaki primer foliküllerde ve intersitisyel dokuda TGF α 'nın immunoreaktivitesi.	31
Şekil 8: Puberta döneminde sham grubundaki sıçanların ovaryum dokusundaki primordiyal folikülde, teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerinde TGF α 'nın immunoreaktivitesi.	32
Şekil 9: Puberta döneminde capsaicin uygulanan deneme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda teka hücrelerinde TGF α 'nın immunoreaktivitesi.	32
Şekil 10: Puberta döneminde capsaicin uygulanan beslenme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde TGF α 'nın immunoreaktivitesi.	33
Şekil 11: Puberta dönemindeki capsaicin uygulanan deneme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde TGF α 'nın immunoreaktivitesi.	33
Şekil 12: Puberta dönemindeki capsaicin uygulanan beslenme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde TGF α 'nın immunoreaktivitesi.	34
Şekil 13: Primer antikoru ilave edilmediği sıçan ovaryum dokusunda sekonder foliküle ait TGF α 'nın immunoreaktivite yokluğu.	34
Şekil 14: Puberte döneminde capsaicin uygulanan deneme grubuna ait sıçanların ovaryum dokusunda, TGF α gen ekspresyonu.	36

- Şekil 15: Puberte döneminde capsaicin uygulanan beslenme grubuna ait sıçanların ovaryum dokusunda TGF α gen ekspresyonu. 37
- Şekil 16: Puberte döneminde sham grubuna ait sıçanların ovaryum dokusunda TGF α gen ekspresyonu. 37

GRAFİK LİSTESİ**SAYFA NO**

Grafik 1: Her üç gruptaki sıçanların 0. ve 14. günlerdeki ortalama ağırlıkları.	26
Grafik 2: Her üç gruptaki sıçanların canlı ağırlıkları arasındaki farklılıklar.	27
Grafik 3: Her üç gruptaki sıçanların ovaryum ağırlığı ortalamaları.	28
Grafik 4: Puberta döneminde capsaicin uygulanan sıçanların ovaryum dokusunda TGF α 'nın gen ekspresyonu	36

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Transforme Edici Gelişim Faktörü Alfa (TGF α)'nın saf olarak elde edilmesinden bu yana, çeşitli dokulardaki lokalizasyonu ve dağılımını belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Deney modelinde TGF α 'nın genital sistemdeki dağılımını belirlemek östrus siklusu dönemlerinin karmaşıklığı sonucu kolay olmamaktadır. Özellikle sıçan ovaryumundaki yerleşimi gebelik öncesi ve gebelik süreci boyunca tam belirlenememiştir (3).

TGF α 'nın özellikleri ile ilgili çok sayıda bilimsel makale bulunmaktadır (26,33,42,58,62). Ancak TGF α 'nın dışı genital sistemdeki yerine ilişkin yapılan çalışmalara çok az sayıda rastlanmaktadır (2,3,38,66,78).

Yapılan birçok çalışmada (35,43,48,68) doğadaki bitkilerin, hastalıkların önlenmesinde veya tedavisinde önemli etkileri olduğu bildirilmiştir. Kırmızı acı biber de sebze ve gıdalara renk ve tat vermenin yanısıra tıbbi bitki olarak da kullanılmaktadır.

İnsanoğlunun acı kırmızı biber ile tanışması yaklaşık 7000 yıl önce Meksika'da yetiştirilmesi ile başlamıştır. Türkiye'de dahil olmak üzere Dünya nüfusunun yaklaşık $\frac{1}{4}$ ü tarafından tüketilmektedir. Yüzyıllardır tıbbi amaçlarla özellikle de ağrıyı ortadan kaldırmak için acı kırmızı biber kullanılmaktadır (77).

Yağ dokusunda acı kırmızı biberin lipid mobilizasyonunu ve genital sistem organlarında gelişmeyi hızlandırıcı etkisi bulunmaktadır (48). İçerdiği capsaicin yağ dokuda lipoprotein lipaz aktivitesini artırarak lipid mobilizasyonunu ve dolayısı ile metabolizmasını hızlandırdığı bildirilmektedir (45,69).

Capsaicinin etkisi; doza, yapılan uygulama çeşidine ve uygulama yerine göre değişmektedir. Sinirsel innervasyonun ovaryum üzerine etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, yüksek dozda capsaicin uygulanarak sinirlerde dejenerasyon meydana getirdiği tespit edilmiş, bunun sonucu olarak da folikül atrezisi ve fertilité üzerine sinirsel innervasyonun önemli olduğu vurgulanmıştır (83).

Bu çalışma ile organizmada başta gastrointestinal, kardiovasküler ve solunum sistemleri olmak üzere pek çok sistemi etkileyen capsaicinin ovaryumda farklı gelişim aşamalarında bulunan foliküller üzerine ne kadar etkili olup olmadığı değerlendirildi. Elde edilecek bulgulardan hareketle ülkemizde ve bütün dünyada tüketimi yaygın bir bitki olan kırmızı biberin fizyolojik ve farmakolojik etkilerinden dolayı tıp, veteriner hekimlik ve ilaç sanayinde kullanımı ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışma ile puberte döneminde capsaicin uygulanan sıçanların ovaryum dokusunda TGF α 'nın gen ekspresyonu RT-PCR yöntemi ile belirlenerek, TGF α 'nın gen ekspresyonuna etkisi ve ovaryum dokusunda immunohistokimyasal lokalizasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Dişi Genital Sistem

Görevi; ovumu üretmek, döllenmiş olan yumurtaya ev sahipliği yapmak, onu büyütme, korumak ve doğumdur. Dişi genital organları iç ve dış genital organlar olmak üzere iki kısımda incelenir. İç genital organlar ovaryum, tuba uterina, uterus, serviks ve vagina'dır. Dış genital organlar ise mons pubis, labium majus, labium minus, klitoris, vestibulum vagina ve glandula vestibularis major'dan oluşmaktadır (67).

1.1.1. Ovaryum

Ovaryum uterusun iki yanında, tuba uterinaların fimbrial uçlarına yakın olarak yerleşmiş, yassı ovalimsi bir çift organdır (21). Şekil ve ölçü olarak iri badem görünümündedir (7). Ovaryumun bir bölümü mezoovaryum adı verilen bir periton kıvrımı aracılığı ile geniş bağa (broad ligament), diğer bir bölümü de ovaryum aracılığı ile uterus duvarına tutunmuştur (21).

Görevi; ovulasyon yapmak (yumurta hücresinin olgunlaşip overlerden atılması) ve dişilik hormonu olan östrojen ve progesteronu salgılamaktır (72).

1.1.2. Ovaryum'un Histolojisi

Ovaryumda üç katman gözlenir.

Epithelium (Epitel Katı): Ovaryum yüzeyini örter. Bu kat tek sıra yassı, kübik yada prizmatik epitelten yapılmıştır. Germinatif epitel olarak adlandırılan bu epitel siklik aktiviteye göre değişebilmektedir. Epitelin peritona bakan yüzünde mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyalar izlenir. Hücre sitoplazması mitokondriyonlar ve pinositoz veziküllerinden zengindir.

Tunika Albuginea: Bağ dokusundan yapılı kattır. Yaş ilerledikçe kalınlaşır ve sertleşir. Az damarlı, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır. Kollajen lifler yüzeye koşut demetler oluştururlar.

Ovaryum Stroması: Ovaryum'un temel ve destek dokusudur.

Ovaryumlar dışta korteks, içte medulla olmak üzere iki bölgedir (17).

Korteks: Organın fonksiyon gören bölümüdür. Bu nedenle zona parenşimatoza olarak da adlandırılır. Ovaryumun medulla bölgesini saran dış kısımda bulunur. Korteks bölgesi, hücreden zengin bağ dokusuna gömülmüş olarak bulunan ovaryum foliküllerinden oluşur. Foliküller etrafında stromada dağılmış olarak düz kas telleri bulunur. Medulla ve korteks arasındaki sınır belirgin değildir. Medullayı dıştan saran korteks foliküllerin geliştiği yerdir. Korteks stromasında, dışta epithelium germinativum (germinal epitel), bunun altında sık bağ doku taşıyan tunika albuginea bulunur. Korteksin epithelium germinativumunda oogenez sonucu folikül gelişimi sağlanır. Oogenez, hipofiz ön lobundan salınan folikül stimüle eden hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH)'un kontrolü altında gerçekleşir (7).

Medulla: Ovaryumun merkezi kısmında bulunan medulla gevşek bağ dokusu, kan damarları, lenf damarları ve sinir telleri demetlerinden oluşan zengin bir yapı gösterir. Korteksteke değişimlere uygun olarak çoğalıp azalabilen bir kan ve damar ağına sahiptir. Kan damarlarının bol yaygın oluşu nedeni ile medullaya zona vaskuloza da denir (5,49).

1.1.3. Ovaryum Folikülleri

Bir ovaryum folikülü belli hücre tiplerinden oluşan oldukça karmaşık bir yapıdadır. Folikülün her biri değişik çapta olup, korteksin stroması içine yayılmış vaziyettedir. Folikülün çapı oositin gelişim durumunu gösterir (59).

Histolojik olarak primordiyal foliküller, gelişmekte olan foliküller (primer ve sekonder foliküller) ve olgun foliküller (graaf foliküller) olmak üzere 3 tip folikül tanımlanır (59).

Bir ovaryumda tüm tiplerdeki foliküller aynı anda görülmeyebilir ancak primordiyal foliküller en yaygın olan foliküllerdir (59).

1. **Primordiyal Foliküller:** Primordiyal foliküller gelişimin ilk aşamasıdır. Fetal dönemin üçüncü ayından itibaren izlenmeye başlarlar foliküllerin büyük bölümünü oluşturan primordiyal foliküller, korteksin stromasında bulunan tunika albugineanın hemen altında yer alırlar. İmmatür bir oosit ve çevresinde yer alan tek sıra yassı foliküller hücrelerden oluşan küçük foliküllerdir. Organelden zengin hücrelerdir. Belirgin bir golgi kompleksi, endoplazma retikulumu, bol mitokondriyon, lizozom ve vezikül içerirler (22). Fötal dönemde yaklaşık 1-2 milyon iken doğuma kadar çoğunluğu dejenere olur. Doğumdan sonra yaklaşık 500 bin kadar olan bu foliküllerin çoğu puberte döneminde olmak üzere atreziye olur. Bu foliküllerden geriye kalanları ise östrus siklusunda bir ya da daha fazla olmak üzere ovale olmaktadırlar. Pubertedan sonra primordiyal foliküller az sayıdadır. Tanıtımsal amacı için ayrıntılı yapısı sırası ile primer, sekonder ve tersiyer olarak ayrılmaktadır (6).

2. **Gelişmekte Olan Folikül:** Primer ve sekonder folikül olmak üzere ikiye ayrılır.

2. a. **Primer Folikül:** Folikül hücreleri tek katlı kübik hücreler haline geldiğinde foliküle primer folikül denir. Bu hücrelerin çoğalması sonucunda oositi çevreleyen tek katlı epitel çok katlı epitele dönüşür. Bu epitele stratum granulozum denir. Tek katlı prizmatik ve çok katlı prizmatik epitel içeren foliküller de primer folikül olarak

değerlendirilir. Tek katlı epitel içeren foliküle unilaminer primer folikül, stratum granülozum içeren foliküle ise multilaminer primer folikül de denir (22).

2. b. Sekonder Folikül: Folikül hücreleri bölünmelerine devam edip, sayılarını arttırmırlar. Bu evrede, folikül hücrelerinin tanecikli görünüşleri nedeniyle, bunların oosit etrafında oluşturdukları tabakaya, zona granüloza denir. Hemen oosit etrafında, homojen, hücresiz bir tabaka yer alır. Bu tabaka, zona pellusidadır. Yapısında glikoproteinleri içeren zona pellusidayı, oosit ve folikül hücreleri ortaklaşa olarak üretirler. Oosit mikrovillusları ve oosit etrafındaki ilk sıra granüloza hücrelerinin mikrovillusları, zona pellusida içine uzanır ve birbirleriyle temas ederler (31,44). İleri primer folikül evresinde şekillenmeye başlayan teka folikülü sekonder folikülde iki tabakalı olarak gelişimini sürdürür. Sekonder folikülü dıştan kuşatan hücre ve damardan zengin olan iç tabaka teka internadır. Bağ dokudan geliştiği halde hücreleri epitelooid karakterde olup büyük, oval ya da polygonal biçimli hücreler olarak gelişip östrojen hormonu sentezler. Damardan da oldukça zengin bir katmandır. Teka interna ile folikül epitel hücreleri arasında folikül bazal membranı bulunur. Teka eksterna'da az sayıda konsantrik yerleşimli bağ doku hücreleri arasında folikül bazal membranı bulunur ve dış tabakayı oluşturur (49).

3. Graaf Folikül (Tersiyer Folikül): Foliküler gelişim devam ettiği sürece antrum yarımaya ya da C şeklinde tek bir boşluk halini alır ve oosit antrum içinde küçük bir adacık görünümüne sahiptir. Bu aşamada oositi çok sıralı granuloza hücreleri sarar ve kumulus ovoforus olarak adlandırılır. Kumulus ovoforusun oosite yakın olan hücreleri prizmatiktir ve korona radyata hücreleri olarak tanımlanır. Oositle korona radyata arasında zona pellusida vardır. Korona radyata spermatozoonun ovumu dölediği zamanda mevcut olup oviduktta da daha sonra görülebilir (49).

Ovulasyondan sonra, ovaryumda graaf folikülünden arta kalan yapılar farklılaşıp, korpus luteumu oluştururlar. Ovaryum korteksinde yer alan korpus luteum, burada geçici bir endokrin bez gibi fonksiyon yapıp, östrojenleri ve progesteron hormonunu üretir (44,81).

1.2. Transforme Edici Gelişim Faktörü (TGF)

Hücrelerin normal veya anormal proliferasyonu; hücre içi haberci (messenger) işlevini gören, polipeptid yapısındaki büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Son yıllarda arka arkaya yeni büyüme faktörleri bulunmakta, yapı ve etkileri tanımlanmaktadır (33). Büyüme faktörleri 4000–60000 dalton arasında değişen, çok az miktarları bile hücrenel aktiviteleri etkileyebilen proteinlerdir (80).

1.2.1. Etki Mekanizması

Büyüme faktörleri, hücrelerin G_0 fazını bırakıp G_1 fazına girmesini uyarırlar. Büyüme faktör reseptörleri arasında etki mekanizmaları yönünden farklılıklar olsa da benzer bir takım özellikler vardır. Bunları şu şekilde sıralanabilir;

1. Özel bir gen grubunun transkripsiyonuna ihtiyaç duyarlar.
2. Birçok büyüme faktör reseptörü, hücre içi kinazları ve fosfatidilinozitolin hidrolizini aktive ederler. Birçok büyüme faktörün reseptörü tirozin kinazlardır. Tirozin kinaz-büyüme faktör reseptörünün işleyiş mekanizması oldukça iyi bilinmektedir. Hedef hücreyi bir büyüme faktörün aktive etmesi için temel mekanizma; reseptörün mevcut olması ve ona bağlanabilmesidir (36,63,79).

Büyüme faktörlerinin fibroblast ve miyoblastları etkilediği bilinmektedir. Bunlardan en önemlisi TGF ailesidir (33).

1.2.2. Transforme Edici Gelişim Faktör Türlerinin Sınıflandırılması

Önemli büyüme faktörlerinden biri olan TGF, kendi aralarında alt gruplara ayrılmış olup, TGF α ve β tipleri vardır (42). Her ikisi arasında önemli farklılıklar vardır. Epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörlerine bağlanırlar. TGF α epitel hücreler için mitojendir. TGF β yumuşak doku hücrelerinin çoğalmasını baskılar, kollajen ve hücre dışı matriks üretimini ile hücre adhezyon moleküllerini arttırmaktadır (33). α ve β tipi TGF'ler hem benzersiz aminoasit dizilimleri yolu ile kimyasal olarak, hem de hücreler üzerindeki farklı faaliyetleri ile biyolojik olarak

ayrıt edilir. α tipi TGF'ler, üç disülfat bağ ile çapraz bağlı, 50–53 aminoasit içeren tek zincirli peptidlerdir. Onların bağlayıcı reseptör için rekabet ettiği EGF ile oldukça güçlü bir homojenliği vardır. β tipi TGF'ler 112 aminoasitlik 2 zincir içeren bir homodimerik yapıya sahiptir. β tipi TGF özel bir yüzeysel hücre reseptörüne bağlanır (58).

İlk keşifleri izleyen period, bu iki TGF'nin homojenliğe doğru saflaştırılması üzerine odaklanan yoğun çabalardan biridir. Todaro ve arkadaşlarının laboratuvarında α tipi TGF'nin, Sporn ve arkadaşlarının laboratuvarında β tipi TGF'nin saflaştırılması bu peptidlerin herbirinin tüm aminoasit dizisinin açıklanması ile sonuçlanmıştır ve göreceli cDNA'nın kopyalanmasına yol açmıştır (58).

TGF α ve TGF β , hücrelerin dönüşümü için sinerji yeteneğini temel alan yaygın bir terminolojiyi paylaştığına vurgu yapılması gerekir. Onların her biri farklı büyüme faktör ailesine ait tüm ölçütleri ile yeni büyüme faktörlerini temsil eder: onların aminoasit dizileri, ikincil yapıları, hücre zarı reseptörleri ve mRNA'ları benzersizdir (58).

β tipi TGF'ler hücre büyümesi üzerinde fonksiyonel olmayan etkilere sahip ve koşullara bağlı olarak aynı hücrelerin büyümesini hem önleyebiliyor hem de uyarabiliyor iken, β tipi TGF'ler genellikle fibroblastlar için mitojeniktir. α ve β tipi TGF'lerin etkileşimi hem sinerjik hem de antogonistik olabilir. α tipi TGF'lere karşıt olan peptid gelişimi tümörlerin tedavisi için, tedavi edici potansiyele sahip olabiliyorken, β tipi TGF'ler tümör oluşumunu önleyebilir (58).

TGF α , EGF ile % 30 yapısal benzerlik gösterir; EGF'nin daha otokrin çalışabilen bir varyantı olarak kabul edilebilir. Uyarılmış makrofajlar, trombositler, keratinositler ve vücuttaki diğer bazı hücrelerce sentezlenir. Biyolojik etkilerini EGF reseptörlerine bağlanarak gösterir. Mezenşimal, epitelyume ait, endotelial hücre büyümesini ve endotel hücre kemotaksisini uyarır. Endotelial hücre proliferasyonunu sağlaması açısından EGF ile aynı güçte; ancak anjiogenezi stimüle etmesi açısından 10 kat daha güçlüdür (80). TGF α proliferasyon, diferansiasyon ve apoptosis gibi biyolojik cevapları düzenler (20).

TGF α , yaklaşık 50 aminoasit büyüklüğünde (26), molekül ağırlığı salgılanma bölgesine göre 5-20 kDa arasında değişebilen (11,42), biyolojik etkileri

ve fonksiyonel yapısı ile EGF'ye oldukça benzeyen küçük bir polipeptittir (11,26,62).

1.2.3. TGF α 'nın Dişi Genital Sistem Üzerine Etkileri:

Genital sistemin intrauterin dönemdeki gelişimi oldukça karmaşık olmakla birlikte diğer sistemlerde olduğu gibi belirli bir sıra içinde meydana gelmektedir. Döllenmeden sonraki ilk 7 hafta morfolojik olarak embriyonun cinsiyetinin belirlenmediği dönem olup indifferent dönem adını almaktadır. Bu dönemden sonra Wolffian kanal gelişimine devam edip Müllerian kanalın gerilediği durumlarda erkek embriyo yönünden cinsiyet farklılaşması görülürken; Müllerian kanalın gelişimine devam edip Wolffian kanalın gerilediği durumlarda dişi embriyo yönünden cinsiyet farklılaşması görülür. Bu gonadal yapılar yapılanmalarını tamamlayıncaya kadar gelişimlerine devam ederek sonunda yeni doğanda tespit edilen morfolojilerine erişirler. Bu zaman içinde birçok faktör gerek olumlu gerekse olumsuz yönde etkilemek suretiyle gonadal gelişimi yönlendirirler. Bunlar içinde esas olarak genetik ve hormonal faktörler oldukça büyük bir önem taşırlar. Fakat bunların dışında varolan değişik tipte faktörlerin de gonadal gelişimi etkiledikleri yapılan farklı çalışmalarla vurgulanmıştır (16,73). Genetik faktörlerin genital sistem gelişiminde direkt veya dolaylı bir şekilde etkin olduğu saptanmıştır (73).

TGF α ve β , EGF benzeri polipeptidlerdir ve transforme olmamış hücrelerin tutunma-bağımsız gelişimini uyarırlar. TGF α , EGF reseptörüne bağlanır ancak anti-EGF antikörlerine bağlanmaz (3,54). 7.5 günlük fare embriyosunda ve insan normal term plasantasında, bunlar göz önüne alınca yüksek özgüllüktedir. TGF α , EGF reseptörüne bağlanabildiği için, orta-gebelikteki embriyonun TGF α 'ya otokrin yolla cevap verdiği bildirilmiştir (3).

Ovaryum teka hücrelerinden salgılanan TGF α ile oosit tarafından üretilen Büyüme ve Farklılaşma Faktörü ve Kemik Matris Proteinleri gibi faktörler FSH'nin granuloza hücre farklılaşması ve erken folikül gelişimi üzerine olan etkilerini azaltır (55).

Ovaryumda EGF'nin granuloza hücrelerinin proliferasyonu ve differensiyasyonunda rol oynayabileceği, TGF α 'nın erişkin organizmada bulunan

şeklinin EGF olabileceği ileri sürülmüştür. Ovaryumda teka interna hücreleri tarafından üretilip salınan TGF α 'nın, fenotipik değişimin oluşmasını sağladığı, aynı zamanda bu etkinin geri dönüşümlü olduğu tespit edilmiş ve TGF α 'nın hem granuloza hem de teka interna hücrelerinde var olduğu, oluşan foliküller aktiviteyi yönlendirdiği vurgulanmıştır (3,71).

Vasküler endotele ait büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGF-R) ve TGF gibi anjiogenik büyüme faktörleri plasenta tarafından da üretilmektedir (12,37). VEGF ve TGF α , muhtemelen, uterin arterin yeniden yapılanmasında ve gebelik süresince büyüyen plasentada olan anjiogeneziste görev almaktadır (24,37). TGF α ve EGF-R normal plasental sitotrofoblast proliferasyonu uyarmaktadır (12).

1.3. Capsaicin

Doğada bulunan bitkiler, devamlı gelişen ve ilerleyen tıp alanı ve kimya sanayisine büyük ölçüde fayda sağladığı bilinmektedir. *Capsicum annuum* L. de, ilaç sanayiinde, kimya, tıp, veterinerlik ve halk arasında oldukça sık kullanılan önemli bir bitkidir (70,82). Ayrıca dünyada biber üretimi ve ticareti de giderek artmakta ve kırmızı acı biber daha yaygın olarak kullanılmaktadır (10,18).

Kırmızı acı biber ile ilgili elde edilen en eski bilgiler Maya ve Asteklere dayanmaktadır. Yazıtlarından acı biberi yemeklere çeşni olarak kattıkları ya da diş ağrıları ve bazı hastalıkların iyileştirilmesi için kullandıkları vurgulanmıştır. Mayalılar kırmızı acı biberin antimikrobal ve antihemolitik ajan olarak terapötik özelliklerinden yararlanmışlardır. Meksika ve Hindistan'da da inflamasyon, diş ağrıları ve kabızlık tedavilerinde kırmızı acı biberden yararlandırdığı belirtilmiştir (10,18).

Çalışmamızda kullanılan *Capsicum annuum* L. olarak adlandırılan kırmızı acı biberin etken maddesi capsaicin, kuvvetli acı, beyaz, kokusuz, sıcak su, etil alkol, metil alkol ve asetonda kolayca eriyebilen bir maddedir. Acı kırmızı biberin yapısında; acılık veren etken madde capsaicin ve buna ilave olarak, bazı vitaminler A, C, E, kırmızı karotenoidler, yağ, mineraller ve aromatik bileşikler, askorbik asit, thiamin, demir, fosfor, nikotinik asit, kalsiyum, şeker, protein ve su bulunmaktadır.

Taze biberde C vitamini oranı limon suyuna oranla 4–6 misli daha fazladır. Kırmızı acı bibere acılığını veren etken madde capsaicinin biberdeki oranı % 0,1 ile % 17 arasında değişmektedir (70,82).

Acı kırmızı biber sıcak ve bol güneşi sever. 50'ye yakın çeşidi yetiştirilmiştir. Baharat türleri kuru topraklarda daha iyi yetişir. Boyu 60 cm ye kadar uzayabilir, kazık köklü, 1 yıllık bir bitkidir. Yapraklarının büyük bölümü geniş mızrak biçimli, az bir bölümü de elips biçimli sivri uçludur. Üstleri yeşil - koyu yeşil, altları ise açık yeşildir. Çiçeklerin sapları kalınca olup aşağı doğru eğiktir. Hazirandan sonbaharın sonuna dek sarımsı beyaz çiçekler açar. Kendine has bir kokusu vardır (31).

Capsaicin (CAP) etkisi üzerine birçok deneysel çalışma yapılmıştır (1,19,29,32,48,51,68,82,83,84,85). Kawada ve ark (34) erkek ratlarda yaptıkları çalışmada domuz yağı içeren ve capsaicin ilave edilmiş diyetlerle beslenen hayvanların, capsaicinin yağ dokuda lipid mobilizasyonunu uyardığı ayrıca böbrek çevresi yağ ağırlığını ve serum trigliserid seviyesini düşürdüğünü ifade etmişlerdir.

Capsaicinin lipid peroksidasyonunu artırarak yağ doku miktarı ile karaciğer ve serum trigliseridlerinin seviyesini düşürdüğünü aynı zamanda, *invitro* ortamda iskelet kaslarında glikojen metabolizmasını inhibe edici bir etkisi olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (30,35,61). Kırmızı biberin etken maddesi olan capsaicinin barsaklardan gaz giderici, santral sinir sistemini uyarıcı, sindirimi kolaylaştırıcı, vücut ısısını arttırıcı, metabolizma ürünlerinin atılmasını hızlandırıcı ve kan damarlarında daraltıcı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Halk arasında astım, romatizma, nevralsi, lumbago, faranjit ve yaraların tedavisinde kullanılmaktadır (8). Ayrıca yapılan çalışmalarda capsaicinin serumda kolesterol düzeyini de etkilediği (69), kan, serum, kolesterol ve trigliserid değerlerini azaltarak arteroskleroz gelişme riskini azalttığı da vurgulanmıştır (34).

Acı kırmızı biberin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri, özellikle kanser hücrelerini yok eden özelliği, İngiltere'de yapılan bir araştırma ile bir kez daha doğrulanmıştır. Nottingham Üniversitesi tarafından yapılan çalışmada, acı kırmızı biberin içinde bulunan capsaicin maddesinin hücrelerin enerji üreten ısı odası mitokondriye saldırarak, kanser hücrelerinin ölümünü tetiklediği belirlenmiştir. Araştırmaya göre, capsaicindeki molekül ailesi vanilloidler, kanser hücrelerindeki

protein gelişimine engel olarak “apoptosis”i (hücre ölümünü) tetiklediği vurgulanmıştır (31).

Bu çalışma ile puberte döneminde capsaicin uygulanan sıçanların ovaryum dokusunda TGF α 'nın gen ekspresyonu RT-PCR yöntemi ile belirlenerek, TGF α 'nın gen ekspresyonuna etkisi ve ovaryum dokusunda immunohistokimyasal lokalizasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Organizmada başta gastrointestinal, kardiovasküler ve solunum sistemleri olmak üzere pek çok sistemi etkileyen capsaicinın ovaryumda farklı gelişim aşamalarında bulunan foliküller üzerine ne kadar etkili olup olmadığı değerlendirildi. Elde edilecek bulgulardan hareketle capsaicinın, fizyolojik ve farmakolojik etkilerinden dolayı tıp, veteriner hekimlik ve ilaç sanayinde kullanımı ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

2. MATERYAL VE METOT

Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan bu çalışmada daha önce çiftleşmemiş ve herhangi bir çalışmada kullanılmamış 45 adet Sprague-Dawley ırkı dişi sıçan kullanıldı. Çalışmada kullanılan deney hayvanları Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edildi Araştırmaya puberte (50. gün) dönemindeki sıçanlar alındı. Sıçanlar deneme, beslenme ve sham olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

Çalışmada kullanılan sıçanlar $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ortam sıcaklığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda standart kafeslerde barındırıldılar. Standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendiler. Capsaicin oranının belirlenmesinde Moran ve ark. (43) ile Tütüncü ve arkadaşlarının (74) yaptığı çalışma dikkate alındı.

Deneme grubundaki sıçanlara 1 mg/kg dozdaki capsaicin (Sigma M 2028) % 10 ethanol içinde çözdürüldükten sonra % 1 Tween 20 (Merck M8170772100) ve % 80 distile su ilave edildi. Günlük olarak hazırlanan CAP daha sonra subkutan olarak hayvanın günlük ağırlığına göre insülin enjektörü ile 1 hafta süre ile her gün aynı saatte enjekte edildi.

Beslenme grubuna ise; 1 mg/kg dozdaki Capsaicin, % 10 ethanol içinde çözdürüldükten sonra % 1 Tween 20 ve % 80 distile su hayvanların günlük ağırlığına göre oral olarak sularına eklenerek hayvanlara içirildi.

Sham grubundaki sıçanlara ise; 1 mg/kg dozdaki % 10 ethanol, % 1 Tween 20 ve % 80 distile su içeren karışım subkutan olarak hayvanın ağırlığına göre insülin enjektörü ile enjekte edildi.

Sıçanların ağırlık ölçümleri; puberte döneminde 50. günden itibaren başlandı. Enjeksiyon yapılmadan önce 1 hafta boyunca her gün üç gruptaki sıçanlar tartıldı. Bir hafta sonra her üç gruptaki sıçanların vücut ağırlıkları tartıldıktan sonra eter anestezi altında öldürülüp ovaryumları alındı. Alınan ovaryumlar hassas terazide tartıldı. Sol ovaryum immunohistokimya ve histolojik çalışmalar için formaldehitte

tespit edildi. Daha sonra rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Sağ ovaryum ise gen ekspresyonunda kullanılmak üzere 50-100 mg ovaryum dokusu 1 ml Tri-Reagent içine alınarak homojenizatör ile homojenize edilerek +4 °C de kullanılmaya kadar buzdolabında saklandı.

Çalışmadaki tüm deneysel işlemler Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 11.06. 2009 /04).

2.1. Histolojik İncelemeler İçin Doku Hazırlanması

Sıçanlardan alınan ovaryum dokuları TGF α immunoreaktivitesini belirlemek için % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi ve toplanan doku örnekleri % 70'lik alkolde +4 °C de muhafaza edildi. Örnekler dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek parafinde bloklandı. Krom alüm jelatin ile kaplanmış lamlara, parafin bloklarından 4 μ m kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra PBS (0,1 M, PH, 7,2)'de çalkalanarak endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 0,1 M'lik PBS'te hazırlanmış % 3'lük H₂O₂'de 15 dk. inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra antijenleri açığa çıkarmak için 10 dk mikrodalga fırında sitrat buffer solüsyonun içinde maksimum sıcaklıkta ısı uygulandı. Daha sonra tekrar PBS ile yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalarını engellemek için Blocking solution A damlatıldı (Invitrogen Histostain Plus Broad Spectrum (AEC) Ref. 85.9943). Sonra kesitler üzerine oda sıcaklığında, 1 saat süreyle, nemli ortamda anti TGF α antikoruna (Merk Chem (Ab-2) Mouse mAb (213-4.4) Calbiochem, Cat. No. GF10) 1/50 oranında PBS ile dilüe edilen primer antikor uygulandı. Primer antikorun inkübasyonundan sonra indirekt yöntemlerden biri olan Strept-avidin-biotin peroksidaz tekniği kullanıldı (64). Bu amaçla primer antikorun üretildiği türe karşı olan Broad Spectrum Antibody (Invitrogen Histostain Plus Broad Spectrum (AEC) Ref. 85.9943) antikoruna kesitler üzerine ilave edildi ve 15 dk. oda ısısında tutuldu. PBS ile yıkandıktan sonra HRP streptavidin (Invitrogen Histostain Plus Broad Spectrum (AEC) Ref. 85.9943) oda ısısında 15 dk. süre ile inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kromojen

uygulaması için AEC Substrate Solution eklendi. Kesitlere AEC solüsyonu eklendikten sonra ışık mikroskobunda kontrol edilerek immunoreaktivitenin olma durumuna göre reaksiyon distile su ile durduruldu. Zıt boyama için 15 sn süre ile hematoksilene daldırılıp çıkarıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra dokuların üzerine su bazlı yapıştırıcı (Labvision, Large Volume Vision Mount, TA-060-UG) damlatılarak lamelle kapatıldı. Işık mikroskobunda preparatlar incelendi ve fotoğrafları çekildi.

İmmunoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını tespit etmek amacı ile deneme, beslenme ve sham grubundan alınan ovaryum kesitlerine bütün işlemler aynı olmak koşulu ile primer antikor ilave edilmeksizin (omission control) PBS'te tutuldu ve diğer işlemler aynen uygulandı.

Kesitlerde, boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesi kriter olarak alanda semikantitatif bir yöntemle, skorlama yapıldı. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), +1 (zayıf boyanma), +2 (orta derecede boyanma), +3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi.

Hangi doku üzerinde çalışıldığını göstermek ve dolayısıyla dokuyu bütün olarak gözlemek amacı ile alınan kesitlere Crossman'ın üçlü boyama tekniği de (Triple Boyama) uygulandı (40).

2.2. Gen Ekspresyonu Analiz

2.2.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA, Chomczynski ve Sacchi (9) tarafından tanımlanan, guanidin isothiocyanate/phenol-kloroform metodunun modifikasyonu sonucu oluşan, gen RNA, DNA ve proteinleri ayırt etmek için en iyi Tri-Reagent kullanıldı.

Ovaryum dokusu 50-100 mg olacak şekilde alındı. Sonra 1 ml Tri-Reagent (Sigma, T9424-100ML) içerisine konarak homojenizatör ile homojenize edildi ve uygulama yapılincaya kadar +4 °C de bekletildi.

Tri-Reagent içerisindeki doku +4°C'de, 12 000 g de 10 dk santrifüj edildi. DNA-RNA içeren süpernatant, alta çöken pelete dokunulmadan mikropipetle alındı ve 1,5 ml'lik yeni steril ependorf tüplere aktarıldı.

Steril ependorf tüpe süpernatant alındıktan sonra 0,2 ml kloroform (Merck, M102431.2500) üzerine ilave edildi. Oda ısısında 10-15 sn çalkalandıktan sonra oda ısısında 10-15 dk bekletildi.

Sonra +4°C ve 12 000 g de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpte 3 tabaka oluştu. Üstte sarı renkte RNA, ortada pembe renkte ince halka şeklinde DNA ve dipte koyu kırmızı tabaka protein içeren 3 tabaka meydana geldi. DNA'ya dokunmadan üstteki RNA mikropipet yardımıyla alındı ve yeni steril ependorf tüplere aktarıldı.

İçinde RNA bulunan yeni steril ependorflara 0,5 ml isopropanal (Merck, M100995.1000) eklenip 5-10 dk. oda ısısında bekletildi. Ardından ependorflar 10 dk süre ile +4°C ve 12 000 g santrifüj edildi.

Santrifüjden sonra RNA pelet şeklinde tüpün dip kenarına yapıştı. Tüpün sıvı kısmı alındıktan sonra, peleti yıkamak için üzerine % 75'lik etanolden (Merck, M100983.2500) 1 ml konuldu.

Ardından 3-5 sn vortekslenerek peletin yapıştığı yerden ayrılması ve peletin yıkanması sağlandı 7500 g ve +4°C'de 5 dk santrifüj yardımıyla pelet yeniden çöktürüldü

Ethanolle çöktürülüp yıkandıktan sonra üzerindeki alkol döküldü. Kalan alkolün uçması için tüpün ağzı açık bir şekilde oda ısısında 5–10 dk bekletildi.

Sürenin sonunda peletin yıkanması amacıyla içinde hiçbir nükleazın olmadığı 30–40 µl nükleaz free su (NFsu) konuldu. Tüpler 10–15 dk 55–60°C'deki su banyosunda bekletilerek peletin çözülmesi sağlandı. Buraya kadar yapılan işlem ile RNA izole edildi. RNA izole edildikten sonra numuneler kullanılmaya kadar -22 °C'de bekletildi.

Daha sonra bir mikrolitredeki RNA miktarı 260 nm dalga boyunda spektrofotometreyle (UV1201) ölçüldü. RNA bütünlüğü ise % 1'lik agaroz jelde ölçüldü.

2.2.2. Spektrofotometrik Ölçümü

Spektrofotometre ile 1 µl'deki RNA konsantrasyonunun hesaplanması.

- Ölçümler 260 ve 280 nm dalga boyunda köre (NFsu) karşı yapıldı.
- Spektrofotometre kuvvetlerinden bir tanesine NFsu (kör) konuldu, diğer kuvvete 1,5 µl örnek RNA+ 1,5 ml NF su konularak köre karşı okundu.
- Ölçümler sonucu 260/280 oranının 1.7 ve üzeri olan örneklerin RNA'ları iyi kabul edilerek yönleme devam edildi.

2.2.3. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

Spektrofotometre işleminden sonra 1 µl. de kaç mikrogram RNA olduğunu tespit etmek için;

40 X 260 nm. de Absorbasyon Miktarı X Dilüsyon Faktörü.

Buradan çıkan sonuç ile ilgili formül kullanılarak 1 µl. de ne kadar RNA olduğu tespit edildi ve sonraki c-DNA (gen havuzunu elde etme) aşaması için bu miktar 2 mg RNA alınacak şekilde hesaplandı.

2.2.4. mRNA Elde Etme

Komplementary DNA yapmak için mRNA'lar kullanılır. mRNA'lar çekirdekten çıkarken çok sayıda adenin son uçlarına bağlanır. mRNA'nın bu durumundan yararlanılarak Oligo dT (Promega, C1101) primeri ile bunların bağlanması sağlanır. En iyi sıcaklık bu primer için 70 °C'dir. RNA miktarı her tüpte farklı olmasından dolayı gerekli hesaplamalar ona göre yapıldı. RNA içeren örnek ve nukleaz enzimi içermeyen su (NF) miktarı aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$\text{RNA miktarı} + \text{Oligo dT miktarı} + \text{NF Su Miktarı} = 15 \mu\text{l}$$

Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen verilerle hesaplanan RNA konsantrasyonu esas alınarak tespit edilen örnek miktarı, 2 µl oligo dT ve tüp hacmini 15 µl'ye tamamlayacak şekilde NF su eklenerek örnek tüpleri hazırlandı. Bunlar vortekslendi. Daha sonra PCR için program 1'e sokuldu.

PCR'da Program 1:

1. 70 °C'de 5 dakika +
2. 4 °C'de en az 2 dk.

Bu şekilde bekletilerek tüm mRNA'lar elde edildi.

Program 1 devam ederken sonraki aşama için kullanılacak olan solüsyonlar hazırlandı. Komplementary DNA elde etmek için dNTP set hazırlandı. Bunun arkasından Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) master miks hazırlandı.

2.2.5. dNTP Setinin Hazırlanması

dNTP (Sigma, DNTP100-1KT) set için dATP, dCTP, dGTP ve dTTP 4 ayrı bazın her birinden 4 farklı tüpe 10 nM hazırlamak için her tüpe 40 µl kondu. Daha sonra her tüp üzerine 60 µl NFsu koyuldu (sulandırma oranı 1.5 kat). Sonra vortekslendi. Sonuç ihtibarı ile bu dört tüpün her biri birer çalışma solüsyonu oldu. Bir örnek için her solüsyondan 2 µl kullanıldı. Daha sonra her birinden 25 µl konarak yeni bir set hazırlandı. Bunun için her bir baz tüpünden 25 µl alınarak yeni steril ependorflarda 100 µl'lik stok dNTP seti hazırlandı. Kullanılıncaya kadar -22 °C'de bekletildi.

Daha sonra DNA'nın bir iplikçliğini oluşturacak olan mRNA'daki urasilin oradan ayrılmasını ve yerine timinin bağlanmasını sağlamak için MMLV ve Master miks hazırlandı.

2.2. 6. MMLV ve Master Miks'in Hazırlanması

Her bir örnek için;

1. Buffer MMLV enzim bufferden (Promega, M1701) 8µl,
2. dNTP'den 8 µl,
3. rRNA'sin'den (Promega, N2511) 1 µl,
4. MMLV-RT enziminden 1,6 µl
5. su 6,4 µl eklenerek her bir örnek için 25 µl karışım hazırlandı.

Daha sonra PCR 1. programdan çıkarılan ve oligo dT ile işaretlenmiş mRNA içeren ependorf tüplerin her birine 25 µl master miks eklendi. Hazırlanan tüpler kısa bir süre vortekslendi. Daha sonra 2. program için PCR cihazına yerleştirildi. Bu program sonrası cDNA elde edilmiş oldu.

PCR'de 2. Program:

1. 37 °C'de 1 saat
2. 95 °C'de 5 dakika
3. 4 °C'de süresiz (Genelde 1 ya da 2 saate ayarlandı o süre içerisinde alındı).

2.2.7. Primer ve Mastermiks Hazırlanması**2.2.7.1. Primerlerin hazırlanması:**

Primerler liyofilize halde oldukları için önce 7 500 g ve +4°C'de bir dakika santrifüj edildi. Üzerine 500 µl otoklavlanmış distile su ilave edildi. Daha sonra primerler kısa bir süre vortekslendi ve sonra 7 500 g ve +4°C'de 1 dk santrifüj edildi. Hazırlanan primerler 50 µl halinde ependorf tüplere konarak -22 °C'de saklandı. Bu şekilde gene özgü primerler hazırlandı.

2.2.7.2. Taq karışımı (mastermiks) hazırlanması:

Bunun için gerekli malzemeler bir örnek için;

1. 5 µl Taq Buffer (Sigma, D1806-250UN)
2. 1 µl dNTP
3. 1 µl Primer Forward
4. 1µl Primer Revers
5. 1 µl Taq Enzimi (karışıma en son Taq enzimi kondu.)

Hepsi karıştırıldıktan sonra NFsu (41 µl) ile 50 µl ye tamamlandı. Her tüp için 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan mastermiks kısa bir süre vortekslendi.

Daha sonra her örnek için 50 µl mastermiks 2 µl örnek (cDNA'sı elde edilmiş örneklerden) tüpe kondu. Kısa bir süre vortekslendi. Daha sonra üzerine buharlaşmayı önlemek için 2 µl mineral yağ (Mineral oil, Sigma, M8410-1L) eklendi. Hazırlanan tüpler PCR cihazında 3. programa sokuldu.

PCR'de 3. PROGRAM

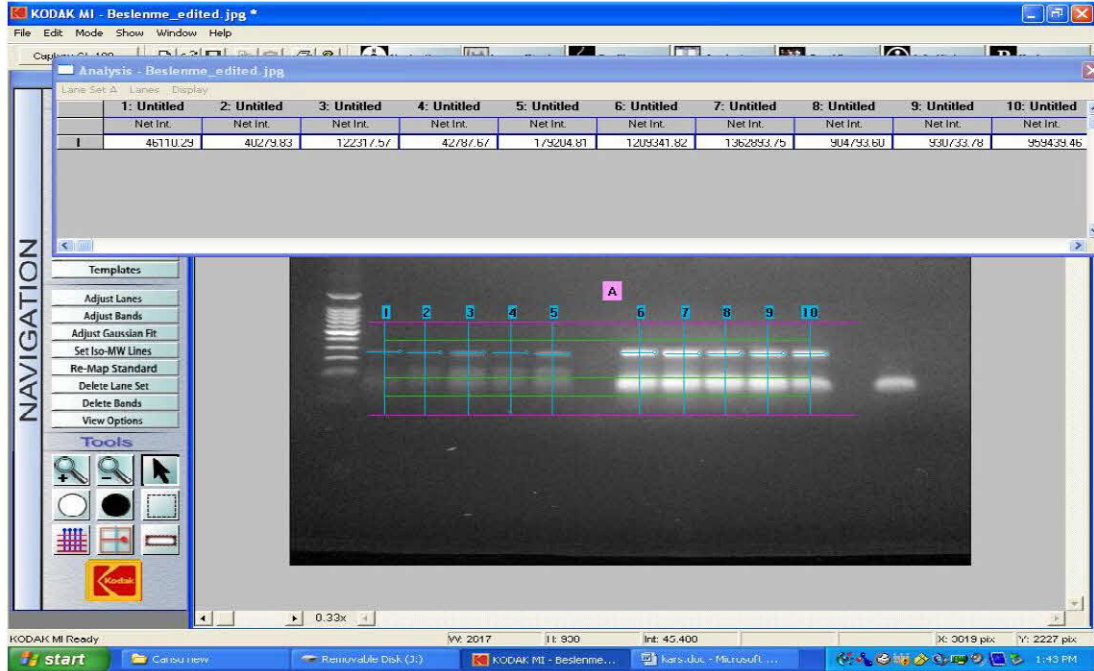
1. 94°C'de 5 dk
2. 62°C'de 1 dk
3. 72°C'de 1,5 dk
4. 94°C'de 1 dk
5. 57°C'de 1 dk
6. 72°C'de 1,5 dk
7. 94°C'de 1 dk
8. 55 °C'de 1 dk
9. GOTO 6' ya dön 33 defa tekrar
10. 72°C'de 10 dk
11. 4°C'de 2 saat bekletme.

Sürenin sonunda örnekler PCR cihazından alındı. Jelde yürütme işlemine kadar ürünler -22 °C'de işlem yapılmıca kadar bekletildi.

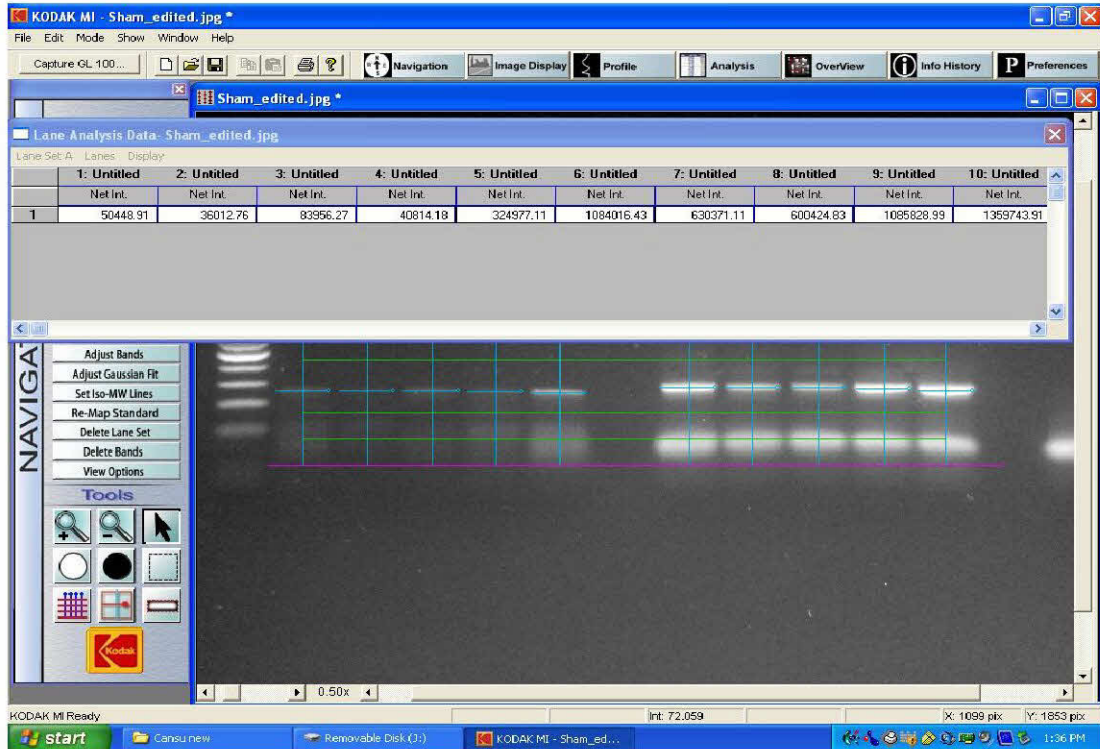
2.2.8. Jelin Hazırlanması

Jel hazırlamada % 1, % 1,5 veya % 2 lik jeller kullanılır. Jelin yoğunluğu arttıkça bantlar daha net ayrılır. İdeali 1,5'lik jeldir. 0,75 gr Agar (Invitrogen, 16500100), 49 ml TBE 1X konsantrasyonun içine katıldı. Hiç tortu kalmayacak şekilde mikrodalgada eritildi. Kolu yakmayacak ısıya geldiğinde 1 µl ethidium bromide (Sigma, E1510-10ML) konup çalkalandı.

Tarak yerleştirilip jel kalıba döküldü. Donunca tarak çıkartıldı (jel genelde 5 dk. da dondu). Bunun kontrolü jelin kenar kısmına pipet ucu ile dokunarak ve renginin grileşmesine bakılarak yapıldı. Tarak çıkartılırken eğer kurumuşsa tarak uçlarına biraz TBE damlatıldı.



Şekil 2: Puberte döneminde capsaicin uygulanan beslenme grubundaki sıçanların ovaryum dokusundaki TGF α 'nın gen ekspresyonu. TGF α : İlk 5 tanesi TGF α . β -aktin: Diğer 5 tanesi β -Aktin.



Şekil 3: Puberte dönemindeki sham grubuna ait sıçanların ovaryum dokusundaki TGF α 'nın gen ekspresyonu. TGF α : İlk 5 tanesi TGF α . β -aktin: Diğer 5 tanesi β -Aktin.

2.2.10. Kullanılan Gen Primerleri

1. β -Aktin Gen Primeri

B-aktin için kullanılan gen primerlerinin çoğalttığı ürün büyüklüğü 285 baz çifti (bp) uzunluğundadır.

Primer name: B-aktin Forward Primer

Oligo name: TT72548

Sequence (5' to 3'): TCA TgA AgT gTg ACg TTg ACA TCC gT

Primer name: B-aktin Reverse Primer

Oligo name: TT72549

Sequence (5' to 3'): CCT AgA AgC ATT TgC ggT gCA CgA Tg dir.

2. TGF α Gen Primeri

Primer Name: TGF alpha Lower Primer

Oligo Name: TT72547

Sequence (5' to 3'): gCg CTg ggC TTC TCg Tg dir (76).

Primer Name: TGF alpha Upper Primer

Oligo Name: TT72546

Sequence (5' to 3'): Tgg AgA ACA gCA CgT CC dir dir (76).

TBE Solüsyonunun Hazırlanması

Trisma Base (Sigma C₄H₁₁NO₃, T1503-KG) 54 gr,

Borik Asid (Sigma, H₃BO₃, B6768) 27,5 gr ve

20 ml 0,5 molar EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt solution, Sigma, E7889-100 ml, 05OM8718) pH 8 olacak şekilde alındı.

500 ml otoklavlanmış distile su eklenerek karıştırıldı. 20 dk otoklavlandı. Bu şekilde 10X konsantrasyonunda TBE hazırlandı.

2.3. İstatiksel Hesaplamalar

Deney, beslenme ve sham gruplarının ovaryum ağırlıkları, canlı ağırlık ortamları ve immunohistokimyasal boyamalardan elde edilen veriler “Statistical Package for Social Sciences 15.0 (SPSS) for windows programı” kullanılarak değerlendirildi. Testlerde $P < 0,05$ anlamlı değer olarak kabul edildi.

Ovaryum ağırlığı değerlerinin sıçanların grup durumuna göre değişiklik gösterip göstermediğini saptamak, kilo artışları arasında farklılık için ve TGF α 'nın gen ekspresyonunu karşılaştırmak için sürekli değişkenlere sahip üç ya da daha fazla grup içinde karşılaştırma yapmayı sağlayan Kruskal-Wallis Varyans Analizi uygulandı. Bu test gruplar arası tek yönlü varyans analizinin nonparametrik alternatifidir. Değerler sıralı hale çevrildi ve her grup için sıralı ortalamalar karşılaştırıldı.

3. BULGULAR

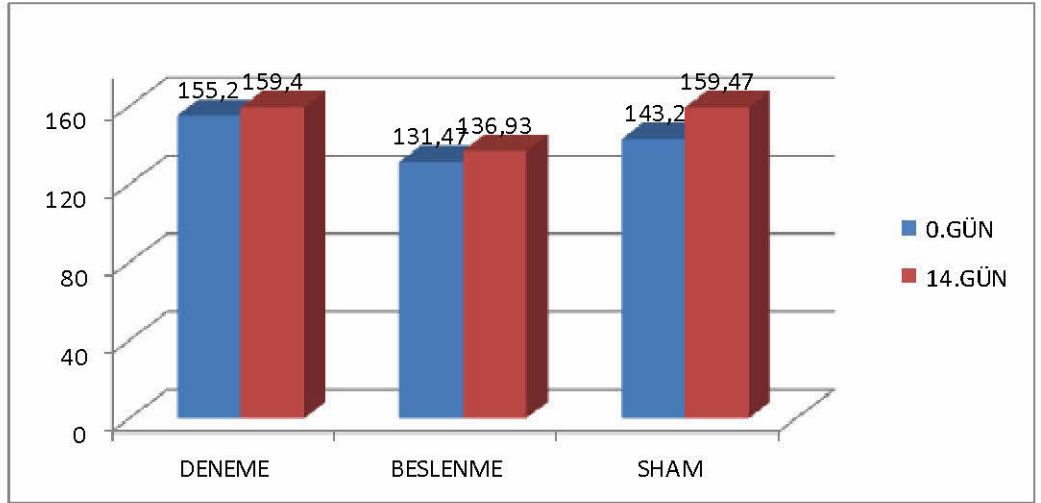
3.1. Canlı Ağırlık Bulguları

Puberte dönemindeki sıçanların uygulama süresince deneme, beslenme ve sham grubundaki ağırlıkları tespit edildi ve canlı ağırlık ortalamaları alındı. Elde edilen verilerle grup içinde 0. ve 14. günler arasında fark olup olmadığı değerlendirildi (Tablo 1).

Tablo 1: Her üç gruptaki sıçanların 0. ve 14. günlerdeki ortalama ağırlıkları

Grup	Sayı (n)	0.gün	14.gün	Fark (14. gün ve 0. gün)
Deneme Grubu	15	155,20 F	159,40 F	4.20
		14,46	16,51	
Beslenme Grubu	15	131,47 F	136,93 F	5.46
		19,10	18,40	
Sham Grubu	15	143,20 F	159,47 F	16.27
		22,65	15,86	

Yukarıdaki tabloda da görüldüğü gibi her üç gruptaki sıçanların vücut ağırlıklarında artış olmuştur. Ancak bu artış en fazla sham grubundadır. Beslenme grubundaki artışta deneme grubundaki artıştan daha fazladır (Grafik 1).



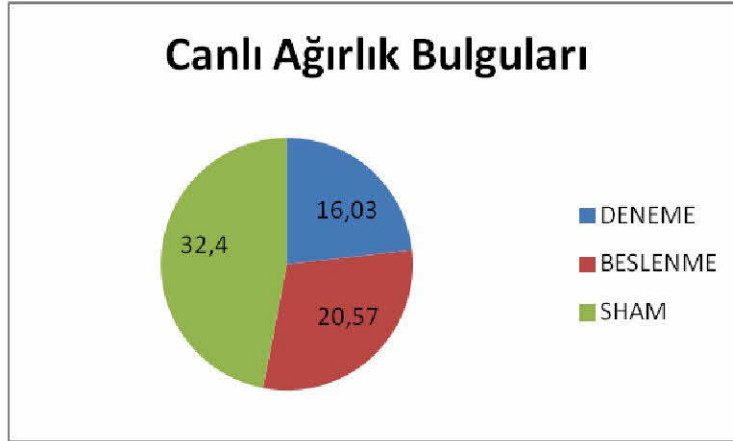
Grafik 1: Her üç gruptaki sıçanların 0. ve 14. günlerdeki ortalama ağırlıkları.

Gruplar arasındaki bu kilo artışları arasındaki farklılıkların istatistikî olarak anlamlı olup olmadığını belirlemek için Kruskal-Wallis Varyans Analizi yapıldı. Gruplar arası tek yönlü varyans analizinin (ANOVA) nonparametrik alternatifi olan ve sürekli değişkenlere sahip üç ya da daha fazla grup için karşılaştırma yapmayı sağlayan bu analiz, grup sayıları 30'dan az olduğu için yapıldı (4). Gruplar arasındaki kilo artışları arasındaki fark tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: İstatistikî Olarak Canlı Ağırlık Farklılık Testi

Grup	Sayı (n)	Mean Rank (Ortalama Sıralama Değeri)	Ki- Kare	P (Anlamlılık)
Deneme	15	16,03	2,514	0,002
Beslenme	15	20,57		
Sham	15	32,40		

Farklılığın istatistikî olarak hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için yapılan testin sonuçları yukarıdaki tabloda gösterilmektedir. Buna göre sham grubu diğer iki gruptan da daha fazla kilo artışı göstermesi istatistikî olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı bulundu. Beslenme grubundaki artışta deneme grubuna göre anlamlı olarak daha fazladır (Grafik 2).



Grafik 2: Her üç gruptaki sıçanların canlı ağırlıkları arasındaki farklılıklar.

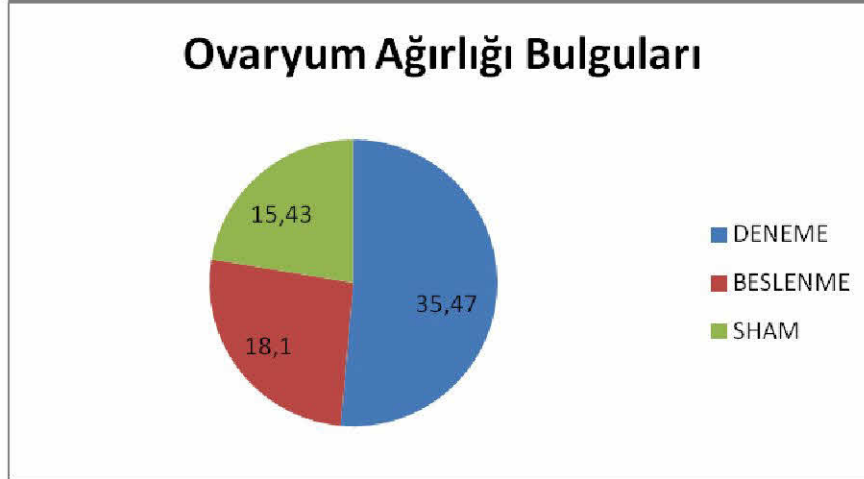
3.2. Ovaryum Ağırlığı Bulguları

Tüm gruplardan alınan sol ovaryum tartıldı. Her üç grup arasında 14. gün ovaryum ağırlıkları arasında fark olup olmadığını değerlendirmek için Kruskal Wallis Varyans Analizi yapıldı (Tablo 3).

Tablo 3: İstatistiki Olarak Ovaryum Ağırlığı Farklılık Testi

Grup	Sayı (n)	Mean Rank	Ki- Kare	P Anlamlılık)
Deneme	15	35,47	21,390	0,000
Beslenme	15	18,10		
Sham	15	15,43		

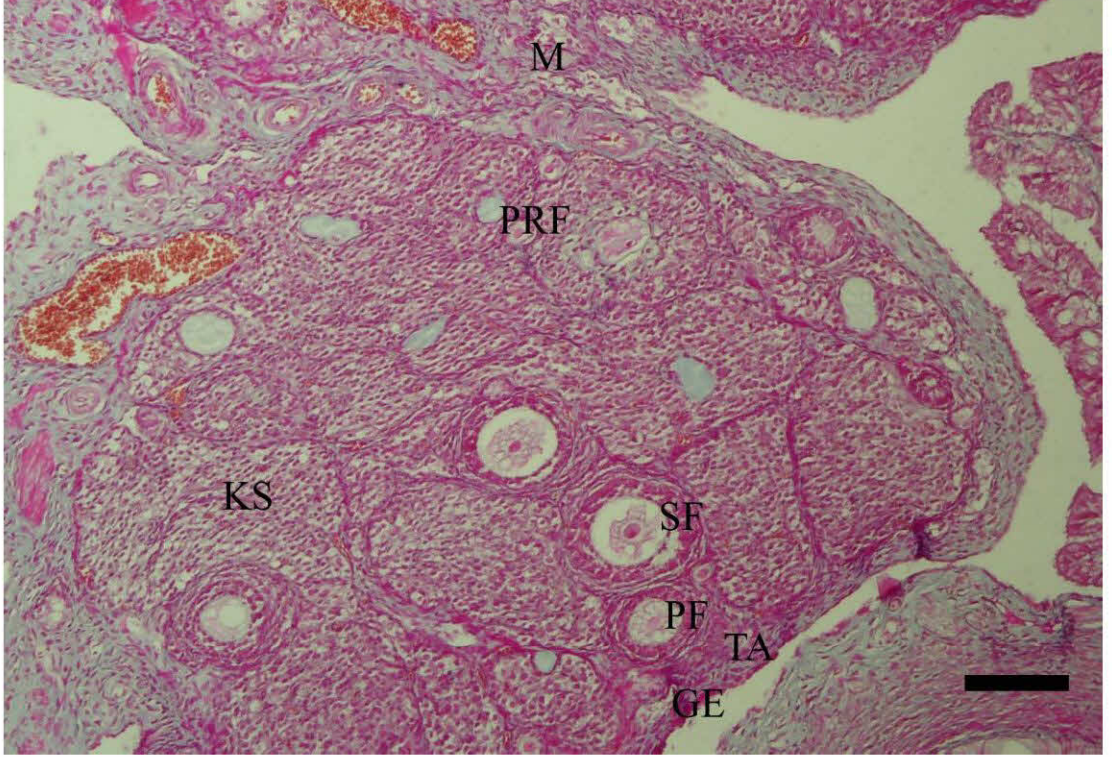
Buna göre aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi ovaryum ağırlıkları dikkate alındığında deneme grubundaki sıçanların ovaryum ağırlıkları beslenme ve sham gruplarına göre istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulundu (Grafik 3).



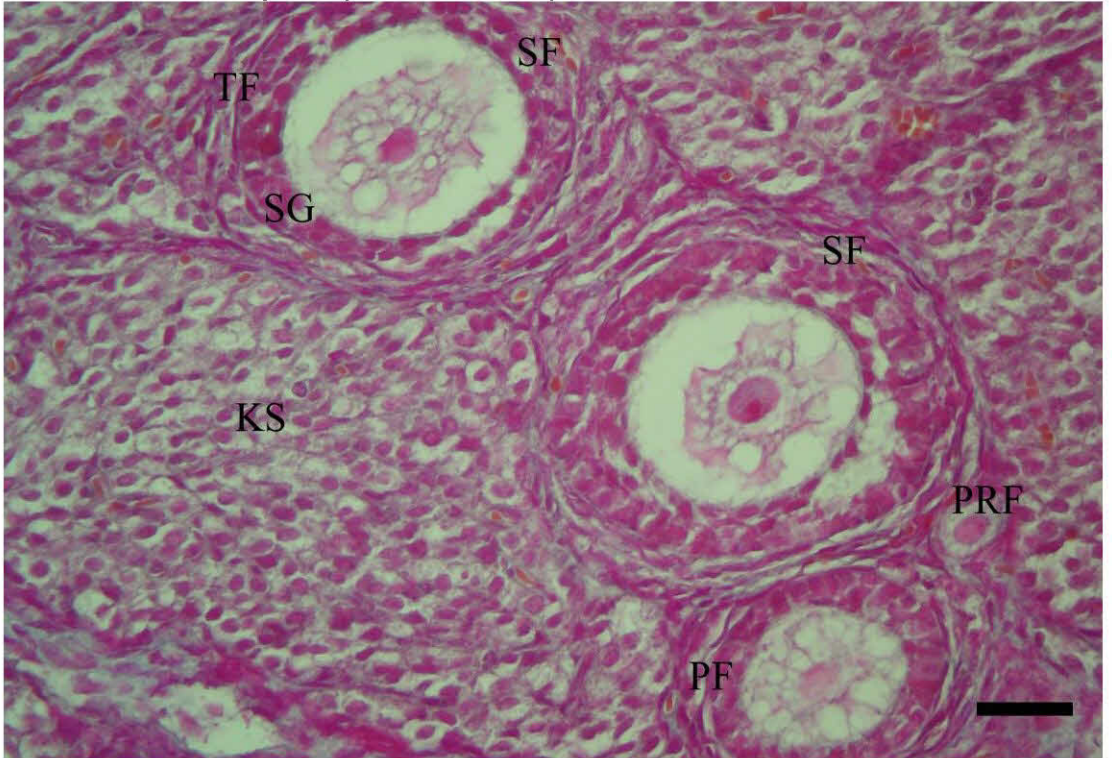
Grafik 3: Her üç gruptaki sıçanların ovaryum ağırlığı ortalamaları.

3.3. Ovaryum Dokusunda Histolojik Bulgular

Deneme, beslenme ve sham gruplarına ait sıçanların yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda ovaryumlarında normal histolojik bulgular tespit edildi. Her üç grubunda histolojik yapısında herhangi bir farklılık gözlemlenmedi. Üçlü boyama yöntemi ile boyandığında ovaryumun yüzeyini döşeyen tek katlı germinal epitel ile kaplı olduğu gözlemlendi. Germinal epitelin altında ki tunika albuginea olarak isimlendirilen sıkı bağ dokusu ile çevrili olduğu görüldü. Ovaryumun, çok miktarda kan damarı, lenf damarı, gevşek fibroelastik bağ doku içeren medullası ve folikülerin bolca bulunduğu alan olan korteks bölgesi ayırtedildi. Dışta yer alan kortekste farklı gelişme dönemlerinde, primordiyal, primer ve sekonder foliküllerine rastlandı (Şekil 4). Ovaryum korteksinde oosit ve çevresinde tek katlı yassı hücrelerden oluşan primordiyal folikül görüldü. Bunun yanında oosit ve çevresinde stratum granulozum ve onun çevresinde teka folikülü içeren primer folikül, çok kata sahip ve yer yer boşluk içeren sekonder folikül belirlendi (Şekil 5). Tersiyer folikülde antrum çevresinde çok katlı stratum granulozum ve teka interna görüldü. Büyük bir nükleus içeren oosit çevresinde korona radyata izlendi. Oosit ve korona radyatanın antruma doğru yaptığı çıkıntı kumulus ooforus gözlemlendi. Ovaryum da foliküllerden başka korpus luteum ve atretik foliküllere de rastlandı.



Şekil 4: Ovaryumun genel görünümü, KS: korteks, M: medulla, TA: tunika albuginea, GE: germinal epitel, PRF: primordiyal Folikül, PF: primer folikül, SF: sekonder Folikül. Üçlü Boyama. Bar: 100 µm.



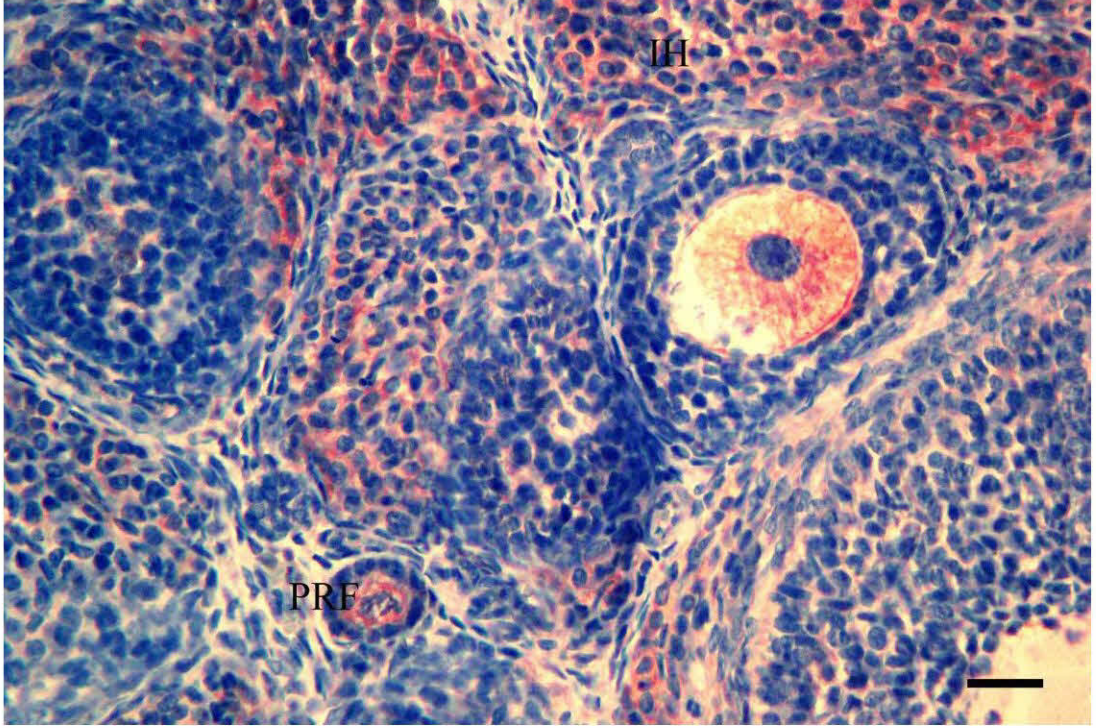
Şekil 5: Ovaryum korteksinde primer ve sokonder folikül. KS: korteks, SG: stratum granulozum, PRF: primordiyal folikül, PR: primer folikül, SF: sekonder Folikül, TF: teka folikülü, SG: stratum granulozum. Üçlü Boyama. Bar: 200 µm.

3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

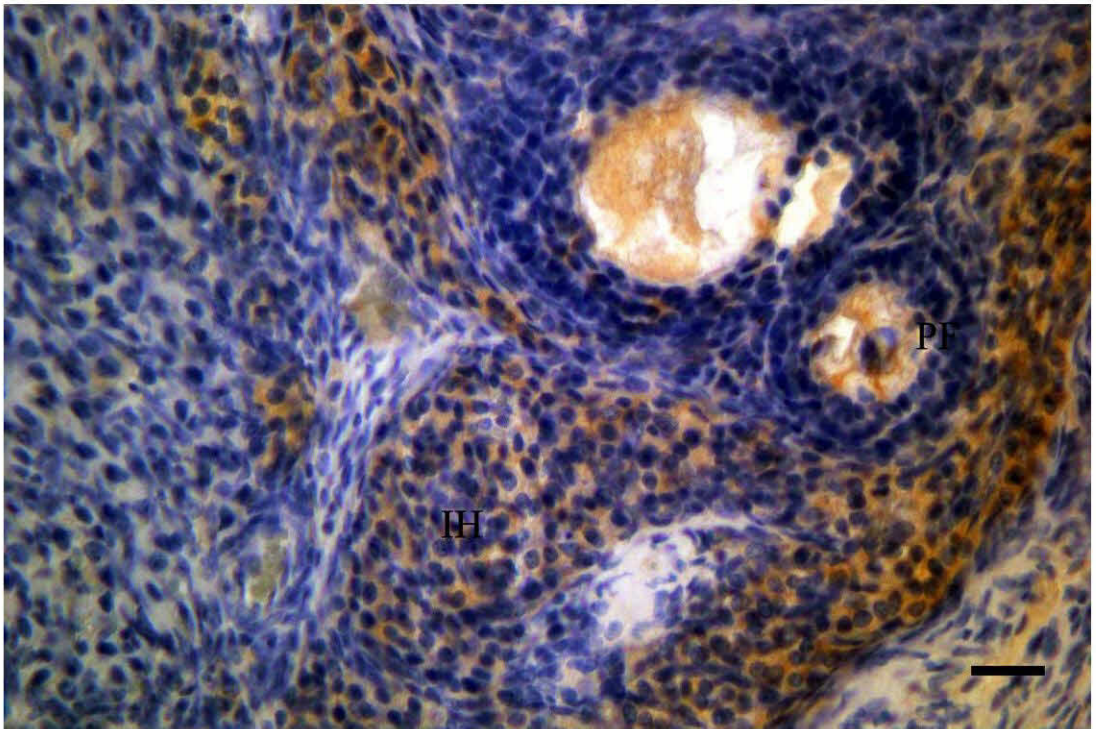
Deneme, beslenme ve sham grubunun her üçünden de alınan ovaryum dokuları TGF α immunoreaktivitesi yönünden incelendi. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), +1 (zayıf boyanma), +2 (orta derecede boyanma), +3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi. Yapılan mikroskopik incelemede her üç grupta da TGF α boyanması görüldü. Tüm folikül sınıflarında TGF α immunoreaktivitesi interstisyel hücrelerde, teka hücrelerinde, primordiyal ve primer foliküllerin sitoplazmasında gözlemlendi. Deneme, beslenme ve sham grubundaki ovaryum dokusunda TGF α immunoreaktivitesi orta yoğunlukta gözlemlendi.

Puberte döneminde capsaicin uygulanan deneme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda primordiyal folikülde ve primer foliküllerin sitoplazmasında TGF α immunoreaktivitesi orta yoğunlukta tespit edildi (Şekil 6). Buna benzer olarak beslenme ve sham grubunda primordiyal folikülde ve primer folikülün sitoplazmasında TGF α immunoreaktivitesi orta yoğunlukta tespit edildi (Şekil 7,8). Ayrıca her üç grupta da teka hücrelerinde ve interstisyel hücrelerinde TGF α immunoreaktivitesi +2 orta derecede boyanma olarak tespit edildi (Şekil 9,10,11,12). Graaf folikülde deneme, beslenme ve sham grubunda da TGF α immunoreaktivitesi negatif olarak gözlemlendi.

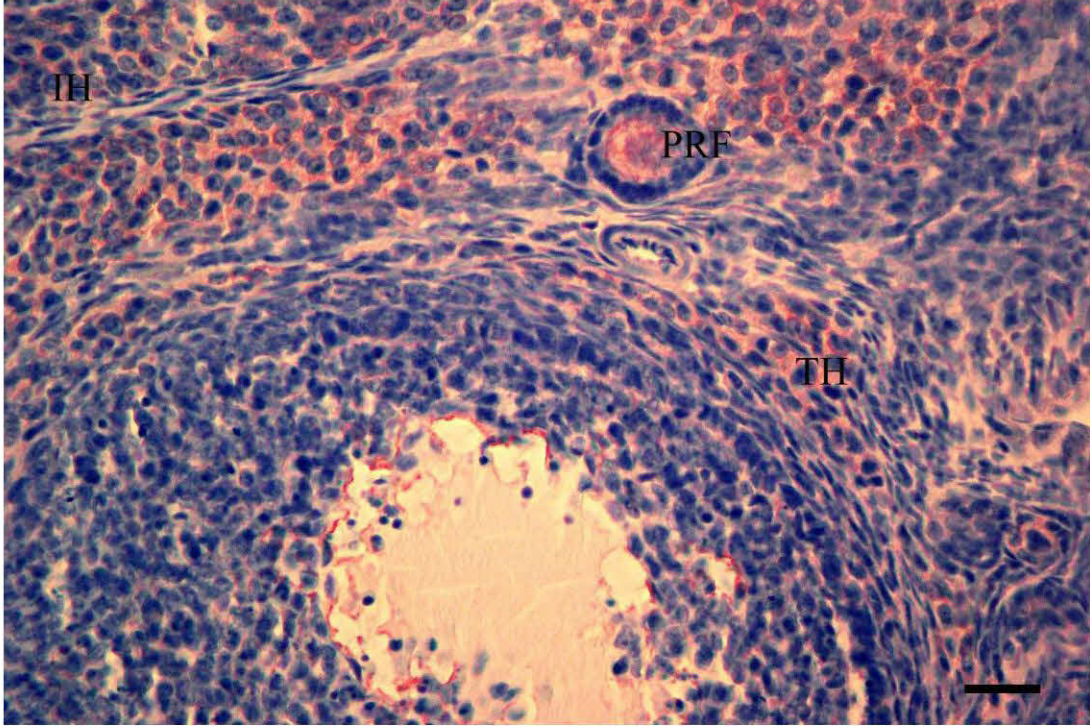
Çalışmada kullanılan örneklerin TGF α için spesifik olarak boyanıp boyanmadığını tespit etmek için her gruptan birer kesite bütün işlemler aynı kalmak koşulu ile primer antikor yerine sadece PBS uygulandı. Negatif kontrol için ayrılan bu kesitlerde immunoreaktivite görülmedi (Şekil 13).



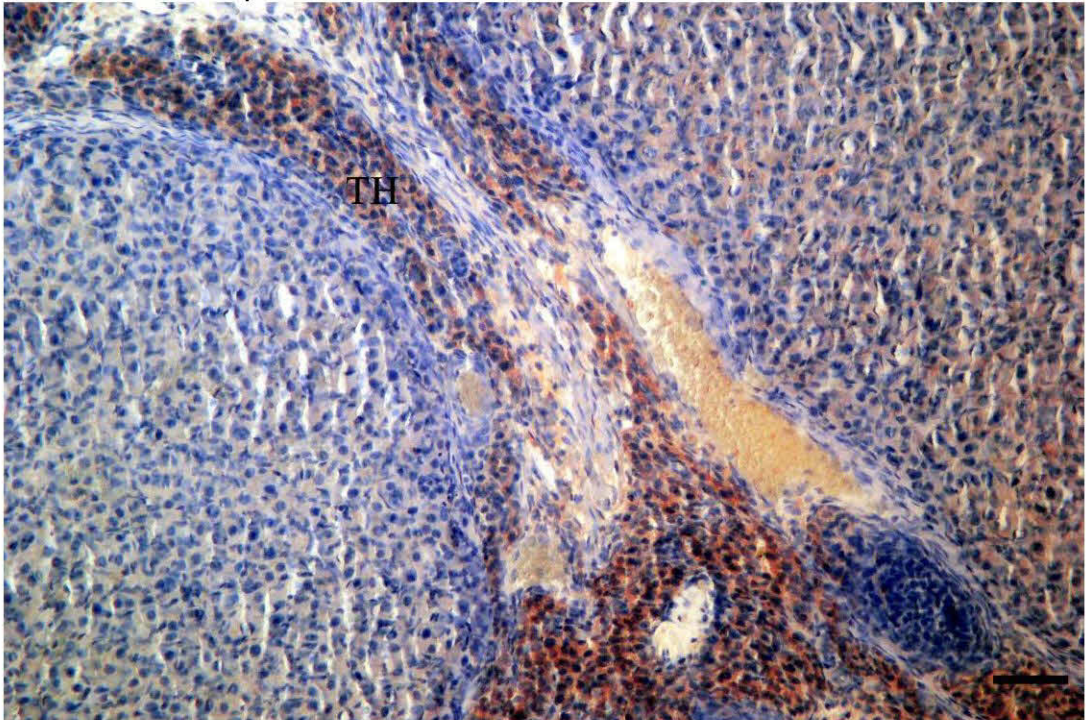
Şekil 6: Puberte döneminde capsaicin uygulanan deneme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda primordiyal folikülde ve intersitisyel hücrelerde TGF α 'nın immunoreaktivitesi. PRF: Primordiyal folikül, IH: intersitisyel hücreler. Bar:50 μ m.



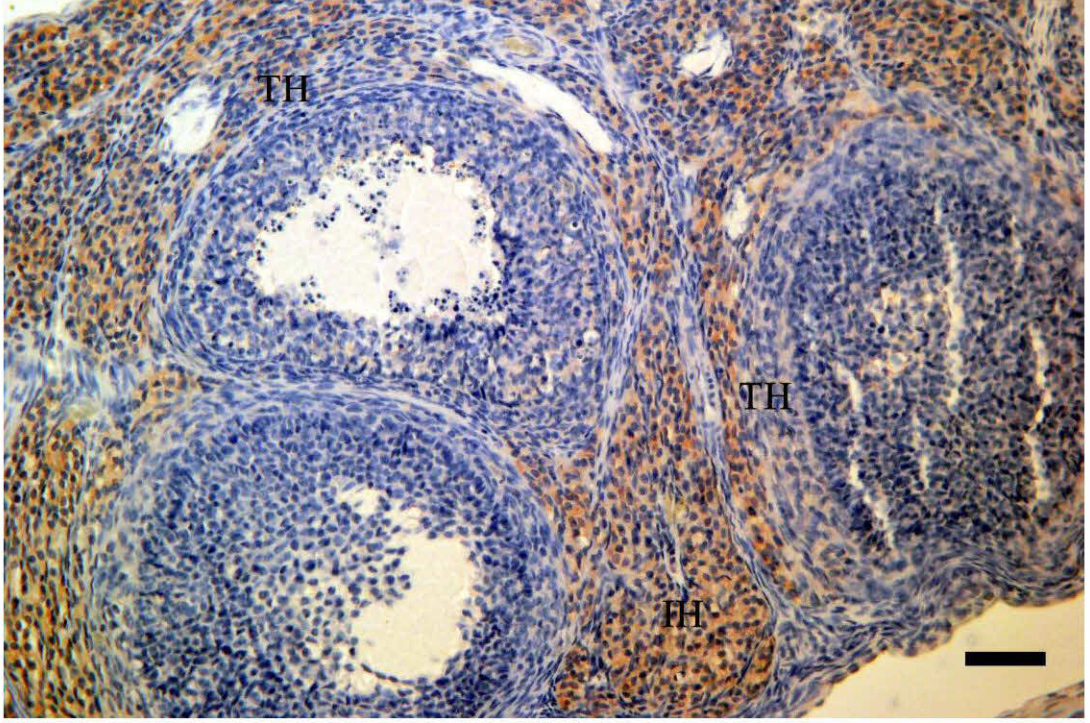
Şekil 7: Puberte döneminde capsaicin uygulanan beslenme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda primer folikülde ve intersitisyel dokuda TGF α 'nın immunoreaktivitesi. PF: primer folikül, IH: intersitisyel hücreler. Bar: 50 μ m.



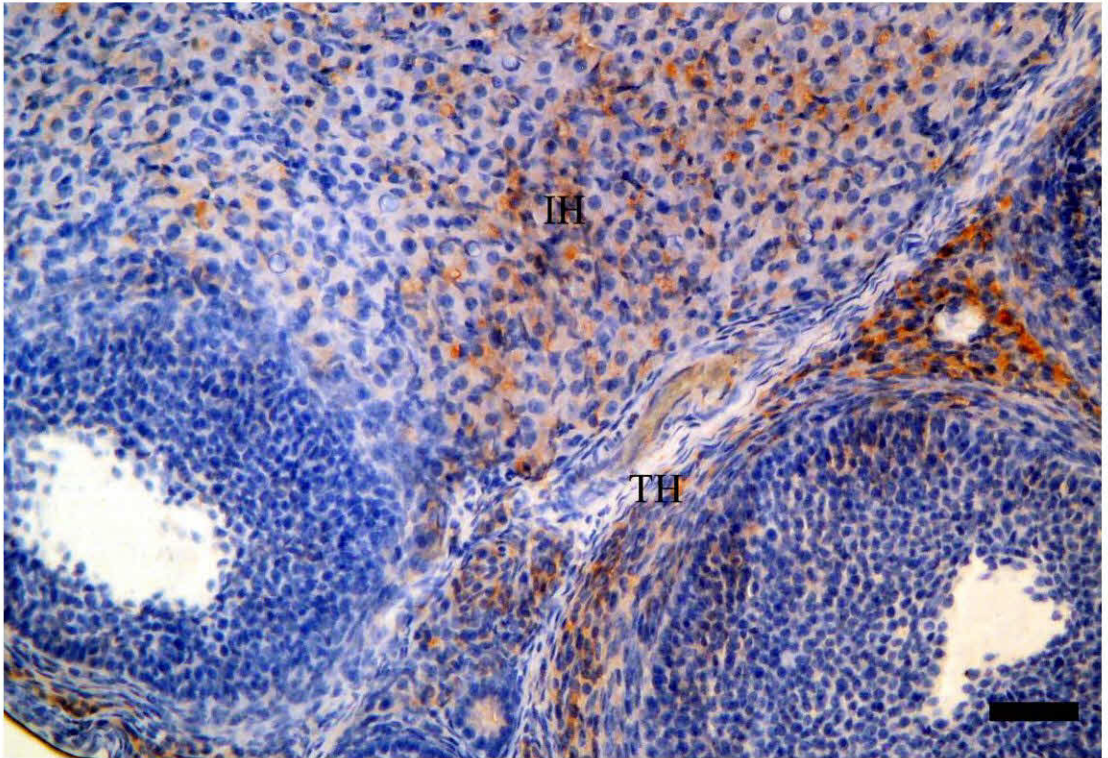
Şekil 8: Puberte döneminde sham grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda primordiyal folikülerde, teka hücreleri ve intersitisyel hücrelerde TGF α 'nın immunoreaktivitesi. PRF: primordiyal folikül, TH: teka hücreleri, IH: intersitisyel hücreler. Bar: 100 μ m.



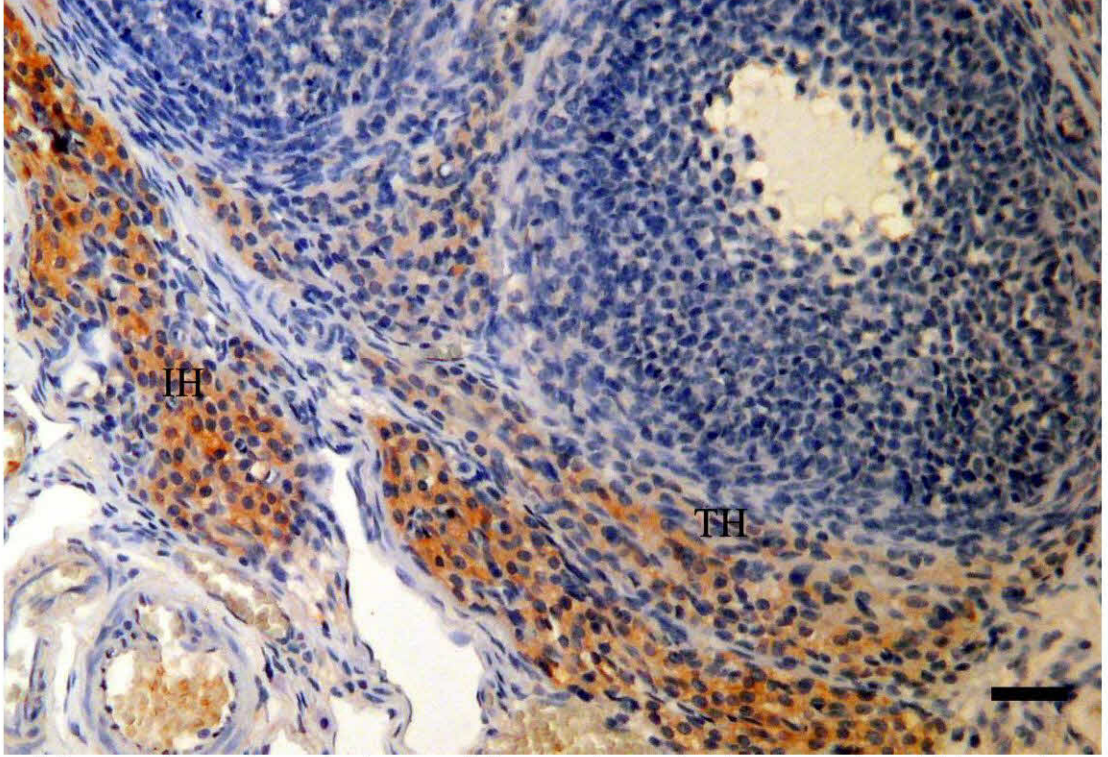
Şekil 9: Puberte döneminde capsaicin uygulanan deneme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda teka hücrelerde TGF α 'nın immunoreaktivitesi. TH: teka hücreleri. Bar: 100 μ m.



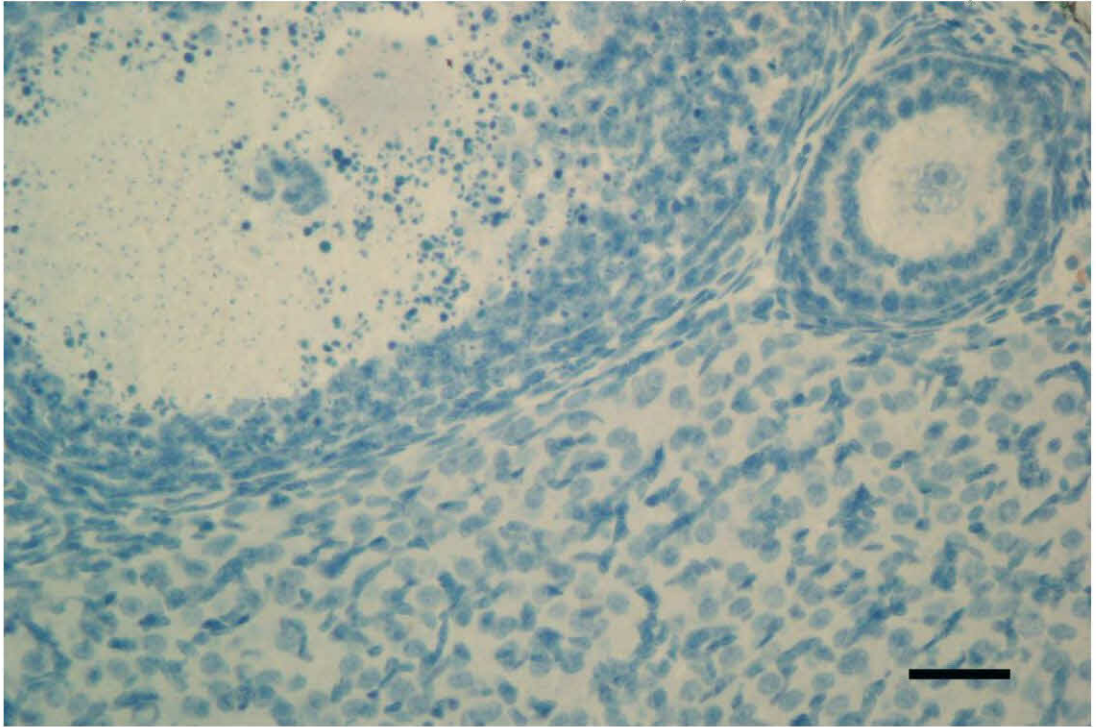
Şekil 10: Puberte döneminde capsaicin uygulanan beslenme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde TGF α immunoreaktivitesi. TH: teka hücreleri, IH: intersitisyel hücreler. Bar: 100 μ m.



Şekil 11: Puberte döneminde capsaicin uygulanan deneme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde TGF α immunoreaktivitesi. TH: teka hücreleri, IH: intersitisyel hücreler. Bar: 50 μ m.



Şekil 12: Puberte döneminde capsaisin uygulanan beslenme grubundaki sıçanların ovaryum dokusunda teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde TGF α immunoreaktivitesi. TH: teka hücreleri, IH: intersitisyel hücreler. Bar: 100 μ m.



Şekil 13: Primer antikorun ilave edilmediği sıçan ovaryum dokusunda sekonder foliküle ait TGF α 'nın immunoreaktivite yokluğu. Bar: 200 μ m.

3.5. Gen Ekspresyonu Bulguları

Capsaicinin etkisini belirlemek için deneme, beslenme ve sham gruplarından alınan ovaryum dokularında TGF α ve kontrol geni olan β -aktin genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile ölçüldü. TGF α 'ya ait değerler β -aktine normalize edildi. Bu ölçümler sonucunda elde edilen bulgularla gruplar arasında ve grup içinde istatistiksel yönden karşılaştırılma yapıldı.

RT-PCR ile TGF α Gen Ekspresyonu Analizi Bulguları

Ovaryum Dokusunda TGF α Gen Ekspresyon Düzeyinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Her üç grupta da ovaryum dokusunda TGF α gen ekspresyonu tespit edildi. Ancak gruplar arasında TGF α gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4).

Tablo 4: Puberte döneminde capsaicin uygulanan sıçanların ovaryum dokusunda TGF α gen ekspresyonunun karşılaştırması.

Grup	Sayı (n)	Mean Rank	Ki-Kare	P (Anlamlılık)
Deneme	5	10.60	2,780	0,249
Beslenme	5	6.00		
Sham	5	7.40		

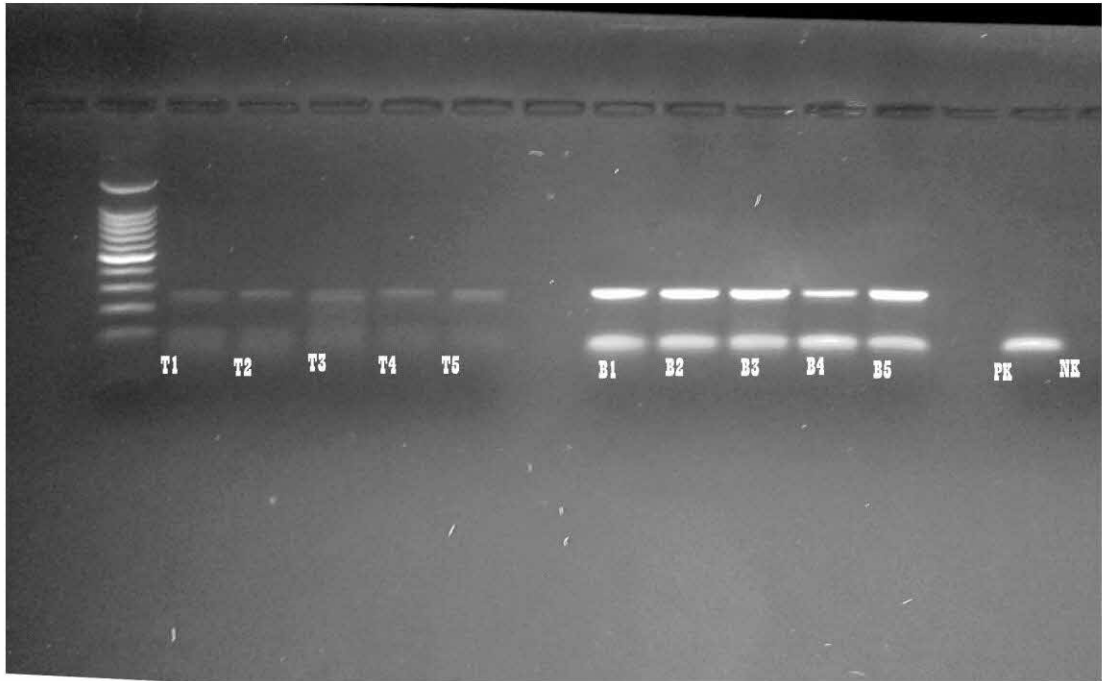
Üç araştırma grubu olan deneme, beslenme ve sham grupları arasında TGF α değerlerinde bir farklılık olup olmadığının analizi için Kruskal Wallis farklılık testi (gözlem sayıları 30'dan az olduğu için parametrik olmayan test olan) yapılmıştır. Buna göre her bir gruptan elde edilen TGF α skorların istatistikî olarak anlamlı olmadığı ortaya çıkmıştır (Ki-kare: 2,780, $p > 0,05$). Her ne kadar gruplar arasında

istatistiki olarak anlamlı bir fark olmasa da deneme grubunun TGF α değerinin beslenme ve sham grubundan daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Grafik 4).

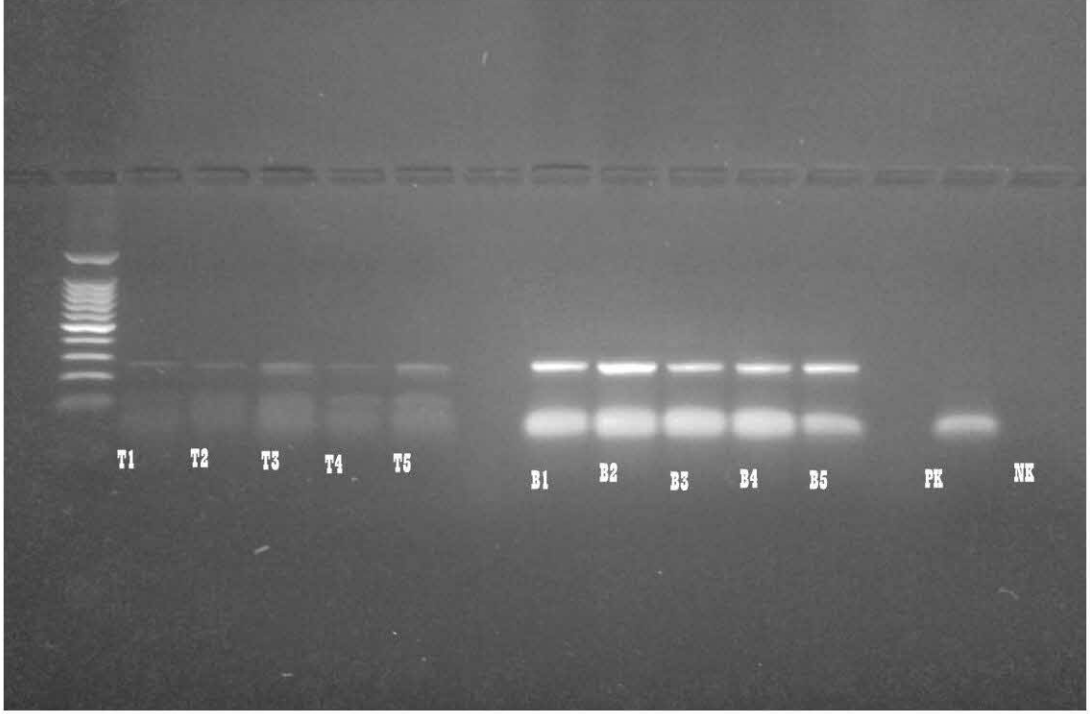


Grafik 4: Puberte döneminde capsaicin uygulanan sıçanların ovaryum dokusunda TGF α nın gen ekspresyonu.

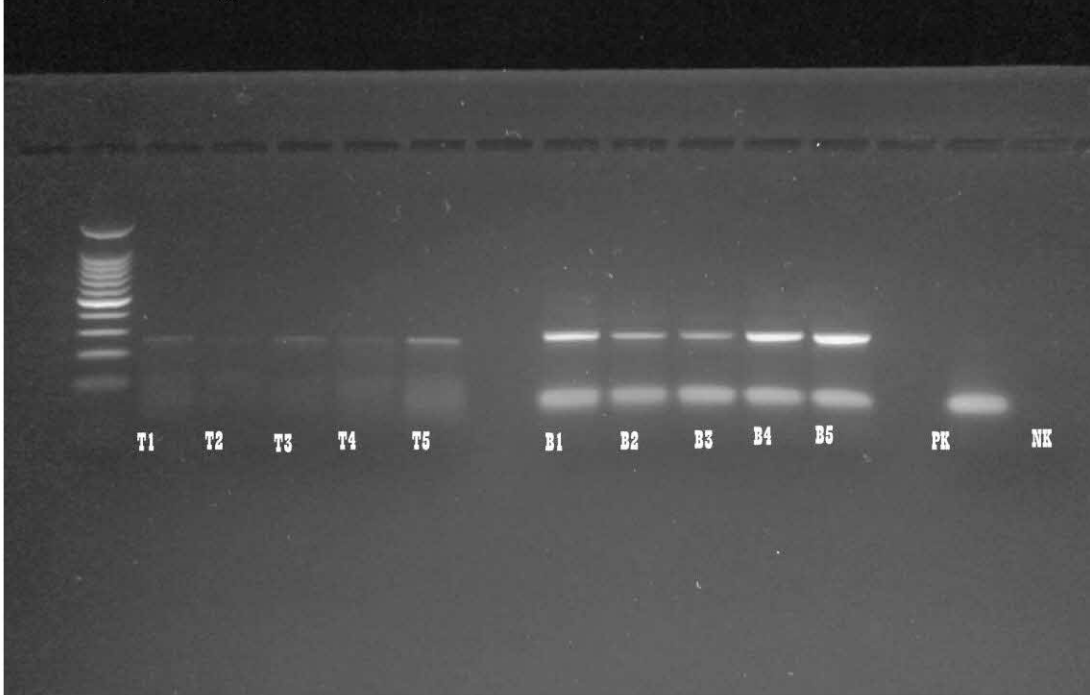
Puberte döneminde capsaicin uygulanan her üç grupta TGF α 'nın gen ekspresyonu tespit edildi ve gruplar arası karşılaştırma yapıldı (şekil 14,15,16).



şekil 14: Puberte döneminde capsaicin uygulanan deneme grubuna ait sıçanların ovaryum dokusunda TGF α gen ekspresyonu. T: TGF α , B: β Actin, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol.



Şekil 15: Puberte döneminde capsaicin uygulanan beslenme grubuna ait sıçanların ovaryum dokusunda TGF α gen ekspresyonu. T: TGF α , B: β Actin, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol.



Şekil 16: Puberte döneminde sham grubuna ait sıçanların ovaryum dokusunda TGF α gen ekspresyonu. T: TGF α , B: β Actin, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma ile puberte döneminde capsaicin uygulanan sıçanlarda; canlı ağırlık ve ovaryum ağırlığındaki değişiklikler, ovaryum dokusunda histolojik yapısal değişiklikler, TGF α 'nın immunohistokimyasal lokalizasyonu ve RT-PCR ile gen ekspresyonu incelendi.

Tütüncü ve ark. (74), capsaicin uygulamış oldukları sıçanlarda deneme grubundaki vücut ağırlığını diğer gruplara göre daha düşük olarak tespit etmişlerdir. Bu bulgular ile capsaicin uygulamasının vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Çalışmamızda ise capsaicin deneme grubundaki canlı ağırlık kazancında beslenme ve sham grubuna göre daha az artışa sebep olmuştur. Bu bulgular yapılan birçok çalışmada vurgulanan capsaicin'in canlı ağırlık kazancını azalttığı görüşünü desteklemektedir (19,32,35,43,48,50,51,68). Ayrıca Kempaiah ve ark. (35) yaptıkları başka bir çalışmada da capsaicin ile beslenen ratlarda yem tüketiminde bir azalma olmamasına karşılık vücut ağırlığında bir azalma olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda da benzer olarak günlük yem tüketiminde her üç grupta da bir farklılık olmamasına rağmen deneme grubundaki vücut ağırlığındaki artış, beslenme ve sham grubuna göre daha az tespit edilmiştir. CAP karbonhidrat metabolizması ve karaciğer enzimlerinin aktivitesini arttırdığı, lipit metabolizmasını uyarak yağ dokudan lipidin mobilizasyonunu kolaylaştırmaktadır (60).

Yapılan bu çalışmada da Srinivasan ve ark (68), Özer ve ark. (48) Özfiliz ve ark (50), Moran ve ark. (43), Kempaiah ve ark. (35), Özgüden ve ark. (51), Erdost ve ark. (19), İlhan ve ark. (32)'nin elde ettikleri sonuçlara benzer olarak; deneme, beslenme ve sham grubundaki sıçanların vücut ağırlıklarında artış olmuştur. Ancak bu artış en fazla sham grubundadır. Beslenme grubundaki artışta deneme grubundaki artıştan daha fazladır. Farklılığın hangi gruplar arasında olduğuna bakıldığında ise sham grubunun diğer iki gruptan da daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Ayrıca ovaryum ağırlıklarına bakıldığında ise Özer ve ark. (48) acı kırmızı biberle beslenen horozlarda deney gruplarındaki canlı ağırlık kazancı azalırken testis ağırlığının arttığı sonucuna ulaşmışlardır.

Sunulan başka bir çalışmada da CAP uygulanan hayvanların testis ağırlıkları incelendiğinde deney gruplarında ilk dönemde artış gözlenmiştir (51).

Karaciğerde yapılan başka bir çalışmada da capsaicinin vücut ağırlığının azalmasına neden olduğu buna karşılık karaciğer dokusunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı sonucuna varmışlardır (68).

Çalışmamızda ovaryum ağırlığına bakıldığında; Özer ve ark. (48), Özgüden ve ark. (51) bulgularına paralel olarak gruplara göre farklılık gözlenmiştir. Ovaryum ağırlığı değerlerinin sıçanların grup durumuna göre değişiklik göstermiştir. Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığına bakıldığında ise deneme grubunun değerleri beslenme ve sham grubuna göre daha yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır.

Erdost ve ark (19), Tütüncü ve ark (74) da bizim bulgularımıza zıt olarak puberte dönemindeki deneme gruplarındaki ortalama canlı ağırlık kazançları ile ovaryum ağırlıkları birbirine paralel olarak azalma olduğunu vurgulamışlardır.

Kawada ve ark. (34)'da capsaicinin perirenal yağ doku ağırlığını ve serum trigliserid yoğunluğunu azalttığını ve lipid absorpsiyonun capsaicin tarafından engellendiğini vurgulamışlardır. Ancak capsaicinli diyetle bağlı olarak karaciğer ve vücut ağırlığında herhangi bir farklılık gözlemlememişlerdir. Furuse ve ark. (25) diyetlerine 0,2 ve 10 g/kg oranında kırmızı acı biberli diyetle ve bibersiz beslenen gruplar arasında yem tüketiminde bir farklılık olmadığını karın içi yağ miktarının değişmediği fakat yumurta üretiminde biberli diyetle beslenenlerde % 3 oranında artma, yumurta sarısının renginde ise koyulaşma olduğunu saptamışlardır. Özer ve ark. (48) yumurtacı tavuk ve horozlarla yaptıkları çalışmalarda rasyonlarına acı kırmızı biber ilave ederek puberte çağına gelen tavuk ve horozlarda karın içi yağlanmanın azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca tavukların ovaryumlarında foliküller gelişmenin daha hızlı olduğunu ve kontrol grubuna göre deney grubu tavukların 11 gün önce ve iki kat daha fazla sayıda yumurta verdikleri görülmüştür.

Bu şekilde farklı sonuçların olması capsaicinin uygulama şekline, verilmiş yoluna, dozuna, hayvanların yaşına, bağlı olabileceği sonucunu akla getirmektedir.

Deneme, beslenme ve sham gruplarına ait sıçanların yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda ovaryumlarında normal histolojik bulgular tespit edildi. Bu sebeple capsaicinin her üç grupta da yapısal anlamda farklılık yaratmadığı sonucuna ulaşıldı.

Zık ve ark. (84), sıçan ovaryumunda düşük doz capsaicin'in NF-kB ve XIAP proteinin sentezlenmesi üzerine muhtemel etkisini araştırdıkları çalışmada, düşük doz CAP uygulamasının ovaryum folikül gelişiminin düzenlenmesine yardımcı olduğu sonucuna varmışlardır. Bunun nedenini ise nöropeptitlerin salınımını artması olarak vurgulamışlardır.

Tütüncü ve ark. (74) farklı gelişme süreleri boyunca 1 mg/kg dozda subkutan capsaicin uygulanan ratların ovaryum dokusunda meydana gelebilecek değişiklikleri saptamaya çalışmışlardır. Yapılan bu çalışmada uzun süre düşük dozda capsaicin uygulanmasının capsaicin reseptörü olan vanilloid reseptör I (VRI)'i inaktive etmediğini ve dolayısıyla sinir sonlarındaki nöropeptidlerin salınımının uyarılabileceğini ve bu yol ile ovaryum üzerine olumlu yönde etkili olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca capsaicin'in hipofiz-gonad sistemi üzerine olumlu yönde etki yaptığı görüşünü desteklemişlerdir.

Erdost ve ark. (19) yapmış oldukları çalışmada acı kırmızı biberli diyetle beslenen tavuk ve horozlarda üreme organlarının gelişmesinde etkili olabilecek hipofiz ve epifiz bezleri incelenmeye alınmış ve elde edilen bulgularla, acı kırmızı biberin üreme organlarının gelişmesine katkısı olabileceği saptamıştır. Çalışmada bir günlük yaştan itibaren diyetlerine düşük dozda kırmızı acı biber ilave edilen tavuk ve horozların beş aylık gelişme süreci içinde hipofiz bezinde FSH, LH ve prolaktin hücrelerinin morfolojik farklılıkları immunohistokimyasal yöntemler ile ışık mikroskopta, gonadotropik hücreler ise elektron mikroskopta incelenmiştir. Kırmızı acı biberli diyetle beslenen tavuk ve horozların hipofizinde FSH ve LH hormonlarının sentez aktivitesinin elektron ve ışık mikroskopik bulgular ışığında ilk aylardan itibaren arttığı vurgulanmıştır.

Özgüden ve ark. (51) yaptıkları çalışmada gelişme süreleri boyunca uygun dozlarda CAP uygulanan farelerin testislerinde, immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak genital sistem organlarının gelişmesinde rolü olduğu, TGF beta'nın lokalizasyonu ve ekspresyonu belirlenmeye çalışılmış ve sonuç olarak deney grubu testislerinde; tubulus seminiferus konturtusların çaplarını kontrol grubuna göre daha büyük olarak saptamışlardır. Buna karşılık çalışmamızda capsaicin uygulanan sıçanların ovaryum dokusunun histolojik yapısında herhangi bir değişiklik meydana

gelmemiştir. Bu şekilde farklı sonuçların olması deney hayvanlarının türlerinin ve çalışılan organların farklı olması ile açıklanabilir.

Moran ve ark. (43), capsaicini neonatal dönemin 3. günündeki ratlara 50 mg/kg subkutan olarak uygulayarak pubertenin başlangıcında serum hormon seviyelerine, ilk vajinal östrus zamanına, over ve uterus ağırlıklarına, foliküller gelişimi ve overlerdeki noradrenalin yoğunluklarını analiz etmişler ve over fonksiyonların düzenlenmesinde rolü olabileceğini vurgulamışlardır.

Zık ve ark. (83) sıçanların ovaryum gelişimi üzerine yaptıkları çalışmada, günlük diyetle alacağımız miktardaki capsaicinin, ovaryum hücre proliferasyonu ve folikül apoptozisi üzerine etkisini immunohistokimyasal ve western blot yöntemiyle ortaya koymaya çalışmışlardır. Bu amaçla ovaryal ve folikül gelişiminin fazla olduğu prepubertel dönemdeki sıçanları deneme süresince kullanmışlardır. Çalışmalarının sonucunda, düşük doz CAP, ovaryum folikül gelişiminin düzenlenmesinde önemli rol oynayabileceğini göstermişlerdir. CAP, dişilerde reproduktif fonksiyonlara katılan ve capsaicine duyarlı sensorik sinir sonlarında bulunan nöropeptidlerin salımını uyararak bu fonksiyonları gerçekleştirdiğini saptamışlardır.

Furuse ve ark. (25) diyetlerine 0,2 ve 10 mg/kg oranında kırmızı acı biberli diyetle ve bibersiz beslenen gruplar arasında yem tüketiminde bir farklılık olmadığını karın içi yağ miktarının değişmediğini fakat yumurta üretiminde biberli diyetle beslenenlerde % 3 oranında artma, yumurta sarısının renginde ise koyulaşma olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda hayvanların günlük yem tüketimlerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır.

Akkoyunlu ve ark (2) yaptıkları bir çalışmada TGF α 'nın hem granuloza hem de teka interna hücrelerinde ve primordiyal foliküllerde var olduğunu ve bunun oluşan foliküller aktiviteyi yönlendirdiğini göstermişlerdir. Özçakır ve ark. (47) hiperstimüle edilen sıçan ovaryumunda TGF α 'nın endothelium, stroma, granuloza hücreleri ve korpus luteumda varlığını ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda TGF α 'nın varlığı primordiyal foliküllerde, primer foliküllerde, teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde tespit edilmiştir. Her iki çalışmada bizim çalışmamız ile benzerlik göstermektedir.

Qu ve ark. (55) insan ovaryum dokusunda TGF α 'yı bizim çalışmamıza paralel olarak primordiyal, primer foliküllerde, granuloza ve teka hücrelerinde

gözlemlemişlerdir. Ancak stroma hücrelerinde TGF α 'nın immunoreaktivitesini zayıf olarak tespit etmişlerdir ve TGF α nın otokrin ya da parakrin mekanizma tarafından EGF reseptörüne bağlanarak folikülogenezin mekanizmasında rol oynayabileceği sonucuna ulaşmışlardır. Epidermal büyüme faktör ve TGF α ortak bir reseptöre bağlanmakta ve iki faktör de insan ovaryum folikülünde görülmektedir. Bu faktörlerin görevi granuloza hücre çoğalmasını uyarmaktır (71).

Yapılan *invitro* çalışmalarda, fertilize olmuş oositte, blastosiste maternal kaynaklı transkriptler olarak TGF α ve ancak fertilizasyondan sonra ise TGF β nın varlığı saptanmıştır (56). Bu faktörlerin genel olarak memeli embriyolarında büyüme ve farklılaşma üzerine etkisi vardır. Preimplantasyon evredeki fare embriyolarında, bunların bir grubuna ait mRNA'lar tespit edilmiş ve ayrıca tekli yerine grup halinde yapılan fare embriyolarında benzer bir ilişkinin olduğu izlenmiştir (52,75). TGF α keratinositlerde, epitel hücrelerinde, makrofajlarda, beyinde, hipofizde ve çeşitli embriyonik dokuların gelişiminde rol oynadığı ortaya konmuştur (15).

Yine insan *invitro* kültürlerinde, TGF α ve insülin benzeri büyüme faktörü-II (IGF-II) üretiminin özellikle fertilizasyondan 5 gün sonra yani moruladan blastosiste geçiş sırasında olduğu ortaya konmuş erken gelişim sırasında TGF α 'nın embriyonun gelişimini olumlu yönde etkileyebileceği vurgulanmıştır (23,28).

Akkoyunlunun çalışmasında belirttiği ovaryum dokusunda yapılan bir çalışmada (39), TGF α 'nın sitolojik yerleşimi ve hücresel düzeyleri araştırılmış ve TGF α ekspresyonunun, foliküllerin gelişmesiyle arttığı ve orta luteal faz sırasında lutein hücrelerinde maksimum düzeye ulaştığı belirtilmiştir. Bu sonuçların neticesinde, folikül büyüklüğü arttıkça hem granuloza hücreleri hem de teka hücrelerinin etkinliklerinin de artması sonucunu düşündürmektedir.

Bizim çalışmamız daha önce yapılan birçok çalışma ile de benzerlik göstermiştir (2,14,47,55,57,65). Çalışmamızda yoğunlukları değişmekle birlikte deneme grubunda ovaryum dokusunun tüm primordiyal foliküllerde, primer folikülerde, teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde TGF α immunoreaktivitesi pozitif olarak gözlemlendi. Beslenme ve sham grubunda da benzer olarak primordiyal ve primer foliküller ile teka ve intersitisyel hücrelerinde TGF α immunoreaktivitesi tespit edildi. Ancak graaf folikülde TGF α immunoreaktivitesi her üç grupta da gözlenmedi. Bizim çalışmamızda her üç grupta da ovaryum folikülerinde TGF α

immunoreaktivitesi orta derecede boyanma olarak tespit edildi. Her üç grupta da aynı yoğunlukta TGF α immunorektivitesinin olması kısa sürede hem subkutan yolla hem de oral yolla alınan capsaicinin etkisini tam olarak göstermemesi ile açıklanabilir. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda capsaicin hem subkutan hem de oral yol ile daha uzun süre verilerek TGF α 'nın ovaryum üzerindeki etkisine bakılabilir.

Yapılan başka bir çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak 1 hafta oral yolla verilen capsaicin sonucunda hayvanların duodenumun epitel hücrelerinde bir değişiklik oluşmadığı ancak 56 gün boyunca ağız yolu ile verilen capsaicinin duodenum üzerine istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (46).

Harada ve ark (27), yaptıkları çalışmada fare blastosistinde TGF α , EGF ve EGF reseptörünü (EGF-R) RT-PCR yöntemi ile araştırmışlar ve çalışmanın sonucunda TGF α ve EGF'yi saptamışlardır. Ancak EGR mRNA tekrarlanan deneylerde ortaya konmamıştır. Bunun sonucunda TGF α 'nın özellikle embriyonik gelişimde otokrin faktör olarak rol oynadığı görüşüne ulaşmışlardır.

Kudlow ve ark. (38), Skinner ve ark. (66), Yeh ve ark. (78), da benzer şekilde sıçanların ovaryum dokusundaki granüloza hücrelerinde RT-PCR yöntemi ile TGF α 'nın varlığını saptamış ve TGF α 'nın diğer büyüme faktörleri ile etkileşimde olduğunu vurgulamışlardır.

Pehlivan ve ark. (53), sıçanların ovaryum dokusunda teka hücrelerinde TGF α ve TGF β 'nin apoptozis ve proliferasyonuna baktıkları çalışmada TGF α ve TGF β 'nin tek başına veya birlikte mitotik aktivite ve apoptozisi azaltan veya arttıran T hücrelerini etkilediğini belirtmişlerdir.

Başka bir çalışmada da fare embriyolarında preimplantasyon döneminde, TGF α geninin fare blastosistinde ve fertilize olmamış ovumun oositinde varlığını saptamışlardır. TGF α 'nın birçok fonksiyonun olduğunu ve büyüme faktörlerinin mitozis ve farklılaşmada rol oynadığını, ayrıca erken embriyonal dönemde uterusun decidualizasyonunda, anjiogenezinde ve yaraların iyileşmesinde rolünün olabileceğini ortaya koymuşlardır (13,56).

Yapılan başka bir çalışmada da RT-PCR yöntemi kullanılmış ve TGF α 'nın varlığını granüloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde saptamışlardır. Bu şekilde TGF α 'nın folikül büyümesi döneminde rolü olduğu kanaatine ulaşmışlardır (41).

Bizim çalışmamızda Harada ve ark. (27), Yeh ve ark. (78), Skinner ve ark. (66) Kudlow ve ark. (38), Pehlivan ve ark. (53), Rappolee ve ark. (56), Lobb ve ark. (41) çalışmalarına benzer olarak RT-PCR yolla TGF α ovaryum dokusunda tespit edilmiştir. Dolayısı ile TGF α 'nın ovaryum gelişiminde rolü olduğu görüşünü düşünmekteyiz.

Domuzlarda yapılan bir çalışmada bizim çalışmamıza paralel olarak ovaryum dokusunda primordiyal ve primer foliküllerde TGF α 'yı hem immunohistokimyasal hem de RT-PCR ile tespit etmişler fakat oositte belirleyememişlerdir. Bu sonucun da TGF α 'nın ve çeşitli peptidlerin türler arasında önemli ölçüde farklılık göstermesinden dolayı olabileceği bildirilmiştir (65).

Bizim çalışmamızda ise üç araştırma grubu olan deneme, beslenme ve sham grupları arasında TGF α 'nın varlığı RT-PCR yöntemi ile tespit edilmiştir ve capsaicinin TGF α üzerinde etkisi olup olmadığı analiz edilmiştir. Her üç grupta da TGF α 'nın varlığı saptanmıştır. Ancak gruplar arasında TGF α 'nın yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Her ne kadar gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark olmasa da deneme grubunun TGF α değerinin beslenme ve sham grubundan daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Bu şekilde RT-PCR ve immunohistokimyasal olarak CAP uygulanan sıçanların ovaryum dokusunda TGF α ; deneme, beslenme ve sham grubunda anlamlı bir değişiklik yapmadığı saptanmıştır. Bir öneri olarak bundan sonraki çalışmalarda uzun zaman ve farklı dozlarda CAP uygulaması yapılarak hem gen düzeyinde hem de immunohistokimyasal olarak meydana gelebilecek değişiklikler saptanabilir.

Sonuç olarak; bu çalışmada hem subkutan hem de oral yolla verilen düşük doz capsaicinin sıçanların ovaryum dokusunda TGF α 'nın; canlı ağırlık ve ovaryum ağırlığı üzerine etkisi, ovaryumun histolojik yapısı, immunohistokimyasal lokalizasyonu ve RT-PCR ile gen ekspresyonu üzerine etkisi incelenmiştir.

Canlı vücut ağırlıkları ve ovaryum ağırlığı karşılaştırıldığında; her üç gruptaki sıçanların vücut ağırlıklarında artış olmuştur. Ancak bu artış en fazla sham grubundadır. Beslenme grubundaki artışta deneme grubundaki artıştan daha fazladır. Ovaryum ağırlıkları dikkate alındığında da deneme grubundaki sıçanların ovaryum ağırlıkları beslenme ve sham grubuna göre anlamlı olarak daha fazladır.

Deneme beslenme ve sham gruplarına ait sıçanların yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda ovaryumlarında normal histolojik bulgular saptandı. Her üç grubunda histolojik yapısında herhangi bir farklılık gözlemlenmedi.

Yapılan tüm incelemeler sonucunda deneme, beslenme ve sham grubundaki sıçanların ovaryumunda TGF α 'nın immunoreaksiyonu orta tüm primordiyal foliküllerde, primer foliküllerde, teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde orta yoğunlukta tespit edilmiştir.

RT-PCR yöntemi ile yapılan çalışmada ise ovaryum dokusunda TGF α 'nın varlığı saptanmıştır. Ancak capsaicinin TGF α üzerindeki etkisine bakıldığında ise her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bunun nedeninin capsaicinin miktarı, uygulama zamanı, veriliş yolu, kullanılan RT-PCR metodları gibi faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Planlanan bu çalışmanın gerçekleştirilmesi bunun devamı olabilecek daha ileri düzeydeki real time, mikroarray gibi teknikler kullanılarak yapılacak olan çalışmalara da öncülük edecektir.

Bu çalışmanın literatüre katkısı daha önce puberte döneminde capsaicin uygulanan sıçanların ovaryum dokusunda TGF α 'nın RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyonunun ve immunohistokimyasal lokalizasyonunun belirlenmesinin yapılmamış olması ve bu konudaki boşluğu doldurmasıdır. Bu çalışmada düşük doz uygulanan capsaicinin ovaryum dokusunda TGF α üzerine olan etkisi hem immunohistokimyasal olarak hem de RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir.

5. ÖZET

Bu çalışmada, puberte döneminde capsaicin (CAP) uygulanan sıçanların ovaryumlarında Transforme Edici Gelişim Faktörü Alfa'nın (TGF α) immunohistokimyasal lokalizasyonu ve gen ekspresyonu üzerine etkisi incelendi.

Bu çalışmada 50 günlük 45 adet sıçan kullanıldı. Sıçanlar deneme, beslenme ve sham olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Deneme grubundaki (n=15) sıçanlara subkutan yolla her gün 1 mg/kg dozda capsaicin, % 10 ethanol, % 1 Tween, % 80 distile su içeren karışım bir hafta süre ile enjekte edildi. Beslenme grubuna (n=15), ağız yolu ile 1 mg/kg dozda capsaicin, % 10 ethanol, % 1 Tween, % 80 distile su içeren karışım hayvanlara su ile içirildi. Sham grubunu (n=15) oluşturan sıçanlara da aynı deneme grubundaki sıçanlarda olduğu gibi subkutan yolla CAP yerine sadece % 10 ethanol, % 1 Tween, % 80 distile su içeren karışım subkutan olarak yapıldı. Her üç gruptaki hayvanların vücut ağırlıkları tartıldıktan sonra eter anestezisi altında öldürülüp ovaryumları alındı.

Grupların canlı ağırlık ve ovaryum ağırlıkları karşılaştırıldı. Histolojik boyanma için üçlü boyama yöntemleri kullanıldı. TGF α lokalizasyonu, immunohistokimyasal yöntemle ve gen ekspresyonu, RT-PCR yöntemi ile tespit edildi.

Deneme grubunda, diğer gruplara göre canlı ağırlıkta azalma, ovaryum ağırlığında ise artış bulundu. Her üç grubunda histolojik yapısında herhangi bir farklılık gözlemlenmedi. İmmunohistokimyasal olarak tüm gruplarda TGF α immunoreaktivitesi primordiyal foliküllerde, primer foliküllerde, teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde orta yoğunlukta tesbit edildi. Capsaicinin TGF α üzerindeki etkisine RT-PCR ile bakıldığında ise her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bu çalışma ile organizmada pek çok sistemi etkileyen capsaicin, ovaryumda farklı gelişim aşamalarında bulunan folikülleri üzerine istatistiksel olarak önemli bir etki oluşturmadığı belirlenmiş oldu.

Anahtar Kelimeler: Capsaicin, TGF α , Ovaryum, RT-PCR, İmmunohistokimya, Sıçan.

6. ABSTRACT

In this study, the effect on the Immunohistochemical Distribution and Gene Expression of Transforming Growth Factor Alpha (TGF α) were examined in ovary of the rat administered capsaicin at the pubertal age.

Forty- five rats ageing 50 days old were used in this study. Rats were divided into three groups; treated, oral feeding and sham group. Treated group (n = 15) rats, subcutaneously every day, was injected 1 mg / kg doses of capsaicin, 10% ethanol, 1% Tween, containing 80% distilled water mixture for a period of one week. Only oral feeding group (n = 15), through the mouth were drunk with water 1 mg / kg doses of capsaicin, 10% ethanol, 1% Tween, 80% distilled water mixture. Sham group (n = 15) rats, route in the same trial as in the CAP group of rats, was by subcutaneously injected only 10% ethanol, 1% Tween, containing 80% distilled water mixture. After a week followed by last day injection, rats of three groups were taken to their body weights, sacrificed under the ether anesthesia and were removed the ovary.

Groups were compared with body weight and ovary weight. Triple methods were used for histological examination. The tissue localization of TGF α was analysed by immunohistochemical methods and gene expression level was undertaken via RT-PCR technique.

The treatment group had lowered body weights along with the increased ovary weights compared that of other groups. Any difference in the structure of the three groups were not observed histologically. Immunohistochemical, TGF α immunoreactivity in all groups, the primordial follicles, primary follicles, theca cells and interstitial cells were detected in medium density. The effect capsaicin on TGF α with RT-PCR were found statistically significant differences between the three groups.

In this study, the organism that affects many systems capsaicin, on ovarian follicles in different developmental stages was determined not produce a statistically significant effect.

Keywords: Capsaicin, TGF α , Ovary, RT-PCR, Immunohistochemistry, Rat.

7. KAYNAKLAR

1. **Abdel Salam, O. M.E., Heikal, O. A., El-Shenawy, S. M.:**Effect of capsaicin on bile secretion in the rat. *Pharmacology*, 73: 121-128, 2005.
2. **Akkoyunlu, G., Demir R., Üstünel İ.:** Distribution patterns of TGF α , laminin and fibronectin and their relationship with folliculogenesis in rat ovary. *Acta Histochem.*, 105: 4, 295-301, 2003.
3. **Akkoyunlu, G., Üstünel, İ., Demir, R.:** Sıçan ovariumunda transforme edici gelişim faktörü alfa, laminin, fibronectin ve desmin'in immünohistokimyasal dağılımı. *Türk J. Biol.*, 24: 476-481, 2000.
4. **Altunışık, R., Coşkun, R., Bayraktaroğlu, S., Yıldırım, E.:** Sosyal Bilimlerde Araştırma Yöntemleri SPSS Uygulamalı. Sakarya Kitabevi. Geliştirilmiş 3. Baskı. S: 184, 2004.
5. **Andolf, E. Et al.:** Ultrasound measurement of the ovarian volume. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 66: 5, 387-9, 1987.
6. **Bannister, L. H., Berry, M. M., Collins, P., Dyson, M., Dussek, J. E., Ferguson, M. W. J.:** Gray's Anatomy. Churchill Livingstone. Thirty-Eighth Edition. 1861-1867, Newyork, 1995.
7. **Başaran, A.:** Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı. Güneş & Nobel Tıp Kitapevleri, 7. Baskı, 460-461, 2005.
8. **Beis, S.H.:** Kırmızı Biberden Gıda Boyası Eldesi. Anadolu Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1990.
9. **Chomczynski, P., Sacci, N. :** Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162, 156-159, 1987.
10. **Cichewicz, R.H., Thorpe, P.A.:** The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum species*) and their uses in mayan medicine. *J Ethnopharmacol*, 52: 2, 61-70, 1996.

11. **Çelebi, N., Gökçora, N., Can, A., Yetkin G.:** Transforming growth faktör alfa'nın oral mikroemülsiyon formülasyonunun gastrointestinal sistemdeki stabilitesinin ve etkisinin incelenmesi. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) projesi, SBAG-2164, 2002.
12. **Çırpanlı, T., Akercan, F., Terek, M. C., Özçakır, H. T., Giray, G., Sağol, S., Karadadaş, N.:** Preeklampsi hastalarının plasentalarında immünohistokimya metodu ile VEGF, EGF-R ve TGF α bakışı. Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, 5 : 1, 40-5, 2008.
13. **De La Fuente, R., J. O. Brien, M., Eppig, JJ.:** Epidermal growth factor enhance preimplantation developmental competence of maturing mouse oosits. Hum. Reprod., 14, 3060-3068, 1999.
14. **Derek, K. L.:** Expression and actions of transforming growth factors during human follicular development. Fertility and Sterility. 92: 3, September, 2009.
15. **Derynck, R.:** Transforming Growth Factor- α . Molecular Reproduction and Development, 27: 3-9, 1990.
16. **Drews, U.:** Female Organs in Color Atlas of Embryology. Thieme Medical Publishers Inc, New York, 22-31, 1995.
17. **Erdoğan, D., Hatiboğlu, T., Görgün, M., Ilgaz, C.:** Özel Histoloji. Ankara: SBAD Yayınları, 1996.
18. **Erdost, H.:** Capsaicin. Uludağ Üniv. J. Fac. Vet. Med., 23:149-155., 2004.
19. **Erdost, H., Özfiliz, N., Özgüden, C., Güneş, Önen, Ş., İlhan, T., Özer, A.:** Ekspression of a capsaicin reseptor (VRI) in the testis of mice after an application of capsaicin. Bull Vet Inst Pulaway, 51: 649-653, 2007.
20. **Ergün, A.:** Yağ hücresi ve salgı ürünlerinin fonksiyonları. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 56: 3, 179-188, 2002.
21. **Eroschenko, V. P.:** Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle. Çeviri Editorü: Ramazan Demir. Palme Yayıncılık Dokuzuncu Baskıdan Çeviri. 301-308, Ankara, 2001.
22. **Eşrefoğlu, M.:**Renkli Resimli Genel ve Özel Hisoloji. Feryal Matbaacılık San. Ve Tic. Ltd. Şti. Malatya, Ağustos 2004.
23. **Fair, T.:** Follicular oosit growth and acguisition of developmental competence. Anim Reprod Sci. 78: 3-4, 203-16, 2003.

- 24. Ferrara, N.:** Vascularendothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.*, 55, 15-35, 2000.
- 25. Furuse, M., Nakajima, S-H., Nakagawa, J., Okumura, J-I.:** Feeding behavior, abdominal fat and laying performance in laying hens given diets containing red pepper. *Jap. Poult. Sci.* 31: 1, 45-52, 1994.
- 26. Gentry, L., Twardzik, D. R., Lim, G. J., Ranchalis J. E., Lee, D. C.:** Expression and characterization of transforming growth factor α precursor protein in transfected mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology.* 7: 5, 1585-1591, May 1987.
- 27. Harada, T., Fujikawa, T., Yoshida, S., Onohara Y., Tanikawa M., Terakawa N.:** Ekspresyon of transforming growth factor alpha (TGF α) gene in mouse embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetic.* Vol. May, 14: 5, 262-9, 1997.
- 28. Hemmings, R., Langlais, J., Falcone, T., Granger, L., Miron, P., Guyda, H.:** Human embriyos produce transforming growth factors-activity and insulin like growth factor II. *Fertility and Sterility.* 58: 1, 101-4, 1992.
- 29. Hoffmann, P., Mazurkiewicz, J., Holtmann, G., Gerken, G., Eysselein, VE., Goebell, H.:** Capsaicin-sensitive nevre fibres induce epithelial cell proliferation, inflammatory cell immigration and transforming growth factor-alpha expression in the rat colonic mucosa in vivo. *Scand J. Gastroenterol.* Apr, 37: 4, 414-22, 2002.
- 30. Holzer, P.:** Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacology Review*, 43: 2, 143-201, 1991.
- 31. http://www.dogasal.com.tr/index.php?option=com_content&view=article&id=10:kirmizi-biber-capsicum-annuum&catid=2:baharatlar&Itemid=9**
- 32. İlhan, T.:** Postnatal gelişme dönemlerinde capsaicinli yemle beslenen fare testislerinde ghrelinin immunohistokimyasal ekspresyonu. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi. Bursa 2009.
- 33. Kaş, Y., Gül, S., Danacı, M., Üskent, N.:** Growth faktörler ve tedavide yeni ufuklar. *T. Klin. Tıp Bilimleri.* 12, 355-359, 1992.
- 34. Kawada, T., Hagihara, K., Iwai, K.:** Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed with high fat diet. *J. Nutr.* 116:1272-1278, 1986.

35. **Kempaiah, R.K., Srinivasan, K.:** Influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on the antioxidant status of red blood cells and the liver in high-fat-fed rats. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 48: 314-320. 2004.
36. **King, KL., Cidlowski, J. A.:** Cell cycle and apoptosis: Common pathways to life and death. *J. Cell. Biochem*. 58, 175-80, 1995.
37. **Kingdom, J.C., Kaufmann, P.:** Oxygen and placental vascular development. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 474: 259-75, 1999.
38. **Kudlow, JE., Korbin, MS., Purchio, AF., Twardzik, DR., Hernandez, ER., Asa, SL., Adashi, EY.:** Ovarian transforming growth factor-alpha gene expression: immunohistochemical localization to the theca-interstitial cells. *Endocrinology*, 121:1577-1579, 1987.
39. **Li, S., Maruo, T., Ladines-Liave, C.A., Samoto, T., Kondo, H., Mochizuki, M.:** Expression of transforming growth factor α in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocr. J.* 4: 6, 693-701, 1994.
40. **Luna, LG.:** Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third ed. Mc Graw-Hill Book Comp. 1968.
41. **Lobb, DK.:** Expression and actions of transforming growth factors during human follicular development. *Fertil Steril*. 92:3,1080-4, 2009.
42. **Marquard, H., Rose, T.M., Webb, N. R., et. Al:** Rat transforming growth factor type I: structure and relation to epidermal growth factor. *Science*, 223, 1079-82, 1984.
43. **Moran C., Morales L., Razo R. S., Apolonio J., Quiroz U., Chavira R., Dominguez R.:** Effects of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy. *Life Sciences*. 73, 2113-2125, 2003.
44. **Murathanoğlu, O.:**Histoloji. İstanbul : İ.Ü.Fen Fakültesi Yayınları, 1996.
45. **Nopanitaya, W., Nye, S.W.:** Duodenal mucosal response to the pungent principle of hot pepper (capsaicin) in the rat: Light and Electron Microscopic Study. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 30: 1, 149-161. 1974.
46. **Nopanitaya, W.:** Long term effects of capsaicin on fat absorption and growth of the rat. *Growth*. 37, 269-279, 1973.

47. **Özçakır, H. T., Özbilgin, M. K., Uyar, Y., Laçın, S., Çağlar, H.:** Immunohistochemical detection of transforming growth factor- α , epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor expression in hyperstimulated rat ovary. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 84: 887–893, 2005.
48. **Özer, A., Zık B., Erdost, H., Özfiliz, N.:** Horozlarda acı kırmızı biberli rasyonla beslenmenin reproduktif sistem organları üzerine etkisinin histolojik yönden incelenmesi. *Türk J Vet. Anim Sci.* 30, 7-15, 2006.
49. **Özer, A.** Veteriner Özel Histoloji. Nobel Yayın ve Dağıtım. 219-231, 2008.
50. **Özfiliz, N.:** Isobrown ırkı tavuklarda kırmızı acı biberli rasyonla beslemenin M. iliofibularis ve M. pektoralisin yapısal özelliklerine etkilerinin incelenmesi. *Uludağ Univ. J. Fac. Med.* 21, 33-38, 2002.
51. **Özgüden Akkoç, C. G.:** Postnatal Gelişme Dönemlerinde Capsaicin Uygulanan Fare Testislerinde Transforming Growth Factor β 'nin İmmunohistokimyasal Ekspresyonu. Uludağ Üniversitesi Doktora Tezi, Bursa, 2007.
52. **Paria, B.C., Dey, S.K.:** Preimplantation embriyo development in vitro: Cooperative interactions among embriyos and role of growth factors. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 4756-60, 1990.
53. **Pehlivan, T., Mansour, A., Spaczynski, R.Z., Duleba, A. J.:** Effects of transforming growth factors and on proliferation and apoptosis of rat teka interstitial cells. *Journal of Endocrinology.* 170, 639-645, 2001.
54. **Pedersen, R. A.:** The Physiology of Reproduction (Knobil, E.; et al. Eds). Raven Press, Ltd., Early Mammalian Embriyogenesis, 187-30 New York, 1988.
55. **Qu, J., Nisolle, M., Donnez, J.:** Expression of transforming growth factor- α , epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertil Steril.* 74: 1, 113-21, 2000.
56. **Rappolee, D.A., Brenner, C.A., Schultz, R., Mark, D., Werb,Z.:** Developmental expression of PDGF, TGF- α and TGF β genes in preimplantation mouse embriyos. *Science,* 241, 1923-25, 1988.

57. **Reeka, N., Berg, FD., Brucer, C.:** Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Hum. Reprod.*, 13-2199-205, 1998.
58. **Roberts, AB., Sporn, MB.:** Transforming growth factors. *Cancer Surveys*, 4: 4, 683-705, 1985.
59. **Ross, HM., GI, Pawlina.:** *Histology: A Text and Atlas*. 4. Ed Lippinoot Willams & Wilkins, Philadelphia, USA, 726-755, 2003.
60. **Sambaiah, K., Satyanarayana, M.N.:** Hypocholesterolemic effect of red pepper and capsaicin. *Indian Journal Expanded Biology*, 18: 898-99, 1980.
61. **Sambaiah, K., Satyanarayana, M.N.:** Influence of red pepper and capsaicin on body composition and lipogenesis in rats. *J. Biosci.*, 4: 4,425-430. 1982.
62. **Schultz, G.S., Rotatori, D.S., Clark, W.:** EGF and TGF- α in wound healing and repair, *J. Cell. Biochem.*, 45: 346-352, 1991.
63. **Shieff, C.:** Hematopoietic growth factors. *J Clin Invest*. 79: 1549-57, 1987.
64. **Shu, S., Ju, G. and Fan, L.:** The glucose oxidase-dab-nickel in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience Lett*, 85: 169–171, 1988.
65. **Singh, B., Armstrong, D. T.:** Transforming growth factor α gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Biyology of Repr*, 53, 1429-1435, 1995.
66. **Skinner, MK., Coffey, RJ. JR.:** Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-alpha by teka cells. *Endocrinology*, 123: 2632-2638, 1988.
67. **Solomon, E. P.:** İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş. 247. B, Süzen. 4. Baskı. Birol Yayıncılık, 2002-2003.
68. **Srinivasan, M.R., Satyanarayana, M.N:** Effect of capsaicin on skeletal muscle lipoprotein lipase in rats fed high fat diet. *Ind. J. Exp. Biol*, 27: 10, 910-912, 1989.

- 69. Srinivasan, M. R., Sambaiah, K.:** The effect of spices on cholesterol 7 alpha hydroxylase activity and on serum and hepatic cholesterol levels in the rat. *Int. J. Vitam. Res.*, 61: 4, 364-9, 1991.
- 70. Surh, Y-J.:** Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: A Short Review. *Food and Chem, Tox.*, 40: 1091-1097, 2002.
- 71. Tapanainen, J.:** Regulation of human granuloza-luteal cell progesterone production and proliferation by gonadotropins and growth factors. *Fertil Steril*, 48: 4, 576-80, 1987.
- 72. Taşkin, L.:** Doğum ve Kadın Sağlığı Hemşireliği, Genişletilmiş 6. Baskı, Sistem Ofset, Ankara, 553-562, 2003.
- 73. Tosun, M., Aktan, M., Duman, S., Erdoğan, E., Taşkapu, H.:** İntrauterin dönemde dişi ve erkek gonadal yapıların gelişimine etkin olan faktörler. *T. Klin Tıp Bilimleri*, 20: 40-46, 2000.
- 74. Tütüncü, Ş., Özfiliz, N.:** Gelişme Sürecinde Capsaicin Uygulanmış Rat Ovaryumlarında Vanilloid Reseptör 1'in İmmunohistokimyasal Ekspresyonu. Uludağ Üniversitesi Doktora Tezi, Bursa, 2009.
- 75. Twardzik, D.R.:** Differential expression of transforming growth factor- α during prenatal development of the mouse. *Cancer Research*, 45, 5413-5416, November, 1985.
- 76. Verine Boille, SE., Cadusseau, J., Couplier, M., Grannec, I. G., Pierre Junier M:** Transforming Growth factor: A promoter of motoneuron survival of potential biological relevance. *The Journal of Neuroscience*, 21, 18:7079-7088, 2001.
- 77. Verit, A., Yeni, E., Ünal, D.:** Tarihten günümüz ürolojisine kırmızı acı biber. *Türk Üroloji Dergisi*, 27: 4, 399-402, 2001.
- 78. Yeh, J., Lee, Y. G., Anderson, E.:** Presence of transforming growth factor-alpha messenger ribonucleic acid (mRNA) and absence of epidermal growth factor mRNA in rat ovarian granulosa cells, and effects of these factors on steroidogenesis in vitro. *Biology of reproduction*, 48, 1071-1081, 1993.
- 79. Wilson, JD., Braunwald, E., Isselbacher, KJ.:** Harrison's Principles of Internal Medicine. 12th edition, Espana: Mc Graw-Hill Inc, 60-4, 1991.

- 80.** www.dermanetürk.com/yara_online/büyüme_fak.doc
- 81.** www.turkivflab.net/index.php?action=dlattach;topic=19.0;attach=144
- 82.** Zık, B., Erdost, H.: Horozlarda acı kırmızı biberli rasyonla beslenmenin üropigi bezi üzerine etkisinin histolojik yönden incelenmesi. Turk J Vet Anim Sci, 26, 1223-1232, TÜBİTAK, 2002.
- 83.** Zık, B., Özgüden Akkoç, C., Tütüncü, Ş., Yılmaztepe, A.: Sıçanların folikül gelişimi üzerine capsaicinin etkisi. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Projesi. Proje No: TOVAG. 104 0 372. 2007.
- 84.** Zık, B., Özgüden Akkoç, C. G., Tütüncü, Ş.: Sıçan ovaryumunda düşük doz capsaicinin NF-kB ve XIAP proteininin sentezlenmesi üzerine etkisi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg, 57, 223-228, 2010.
- 85.** Zittel, TT., Meile, T., Jehle, EC., Becker, HD.: Intraperitoneal capsaicin treatment reduces postoperative gastric ileus in awake rats. Langenbeck's Arch. of Surg., 386: 204-2121, 2001.

8. ÖZGEÇMİŞ

19-12-1977 Kars doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Kars'ta tamamladım. 1996 yılında başladığım Atatürk Üniversitesi Erzurum Sağlık Yüksekokulu'ndan 2000 yılında mezun oldum. 2004 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. 2006 yılında Yüksek Lisans eğitimimi tamamladım. 2007 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimime başladım. 1997-2001 tarihleri arasında Erzurum Numune Hastanesi'nde hemşire olarak görev yaptım. 2002 yılında Kafkas Üniversitesi Kars Sağlık Yüksekokulu'nda öğretim görevlisi olarak göreve başladım. Halen bu görevime devam etmekteyim.