



## **Düşük Doz Kapsaisin Uygulanan Sıçanların Ovaryumlarında TGF-Beta 1'in İmmunohistokimyasal Yerleşimi**

Cansel Güzin ÖZGÜDEN AKKOÇ, Ender Deniz ASMAZ, Tuncay İLHAN, Berrin ZİK

Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE

**Özet:** Transforme edici büyüme faktörü-beta1 (TGF-β1), ovaryum fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Sunulan çalışmada, sıçan ovaryumlarında düşük doz kapsaisin (KAP) uygulamasının, follikülogenezis ve atrezi sürecinde TGF-β1 ekspresyonuna etkisinin olup/olmadığı incelendi. Otuz adet 21 günlük dişi Sprague-Dawley sıçan üç eşit grubu ayrıldı. İlk gruba hiçbir enjeksiyon yapılmadı (kontrol A grubu), ikinci gruba (deney grubu) taşıyıcı solüsyon içinde eritilen KAP (0.5 mg/kg/gün) enjeksiyonu yapıldı, üçüncü gruba (kontrol B grubu) sadece taşıyıcı solüsyon (0.1 mg/kg/gün) enjeksiyonu yapıldı. Onbeş günlük uygulama periyodundan sonra hayvanlar eter inhalasyonu ile uyutulmuş ovaryumları alındı ve rutin histolojik prosedür uygulandı. TGF-β1, işaretli streptavidin-biotin tekniği kullanılarak gösterildi. Deney grubunda oositler, tüm folliküllerin (primordiyal, primer, sekonder, preantral, antral folliküller) granuloza hücreleri, teka hücreleri ve intersitisyel hücreler pozitif boyandı. Kontrol grubundaki boyanmada genel olarak deney grubuna benzerdi, fakat preantral ve antral folliküllerin granuloza hücrelerinde boyanma yoktu. Deney grubundaki TGF-β1 boyanması, kontrol gruplarından daha yoğundu. Deney ve kontrol gruplarında atretik folliküllerde TGF-β1 ekspresyonu gözlenmedi. Sonuç olarak, CAP, follikülogenezis sırasında ovaryan hücrelerdeki kendi reseptörüne bağlanarak TGF-β1 ekspresyonunu artırmıştır.

**Anahtar kelimeler:** İmmunohistokimya, kapsaisin, ovaryum, sıçan, TGF-Beta1

### **Immunohistochemical Localization of TGF-Beta1 in Low Dose Capsaicin Treated Rat Ovary**

**Summary:** Transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) plays an important role in regulation of ovarian functions. In the present study, it was investigated whether low dose capsaicin (CAP) administration in rat ovaries was effected on TGF-β1 expression during folliculogenesis and atresia. Thirty 21-day-old female Sprague-Dawley rats were divided randomly into three groups. The first group received no treatment (control A group), the second group received (0.5 mg/kg/day) CAP dissolved in the vehicle (experimental group), and the third group was treated with the (0.1 mg/kg/day) vehicle only (control B group). After 15 days treatment period, animals were euthanized by ether inhalation and ovarian tissues were sampled and processed routinely. TGF-β1 was demonstrated by labeled streptavidin-biotin technique. Oocytes, granulosa cells of all follicles (primordial, primer, secondary, preantral and antral follicles), theca cells and interstitial cells were stained positively in experimental group. In control group, the staining was generally in similar fashion but there was no staining in granulosa cells of preantral and antral follicles. TGF-β1 staining was more intense in experimental group than both control groups. There was no TGF-β1 staining in experimental group and control groups' atretic follicles. As a result, we demonstrated that binding of CAP to its receptor in ovarian cells resulted with increased TGF-β1 expression during the folliculogenesis.

**Key word:** Capsaicin, immunohistochemistry, ovary, rat, TGF-Beta1

### **Giriş**

Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β) süper ailesinin üyeleri, ovaryumda önemli olan pek çok olayın düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar (46). TGF-β ailesi, 112 amino asitten oluşan, aynı büyüklükteki TGF-β1, TGF-β2 ve TGF-β3 olmak üzere üç alt ünite içeren, 25 kDa ağırlığındaki peptidlerdir (27). Bu aile; hücre çoğalması ve farklılaşması, apoptozis, hücre dışı matriks üretimi, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, yaraların iyileşmesi ve erken embriyonik gelişim gibi sayısız biyolojik aktiviteyi düzenlemektedir (2, 33). Dişi genital sistem üzerine yapılan çalışmalarda, TGF-β süper ailesinin et-

kili olduğu, oositlerde, granuloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde folliküllerin gelişim aşamalarıyla ilişkili olarak ifade olduğu bildirilmektedir (17). Aynı zamanda granuloza ve teka hücre çoğalması/atrezisi, steroidogenezis, oosit olgunlaşması, ovulasyon ve luteinizasyonda intraovarian düzenleyici moleküller olarak işlev gördüğü ifade edilmektedir (17, 31, 37). Memelilerde tanımlanan TGF-β1, TGF-β2 TGF-β3'ün ekspresyonu türler arasında farklılık göstermektedir. Bazı türlerde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği (23), bazı türlerde ise diğer büyüme faktörlerinin etkisi altında granuloza ve teka hücrelerinde proliferasyonu uyardığı belirtilmektedir (4, 35).

Acı bibere acılığı veren etken madde kapsaisin

(trans -8- methyl-N- vanillyl-6-nonendamid), Capsicum bitki ailesine ait olup, reseptörü olan Vanilloid Reseptör 1 (VR1) aracılığıyla, sensorik sinir sonlarından vazodilatatör etkili P maddesi (SP) ve Kalsitonin Gen İlişkili Peptid (CGRP) gibi nöropeptidlerin salınımını uyararak analjezik etki göstermektedir (47). KAP ağrı giderici etkisinin yanında, immun (32), gastrointestinal (15), kardiovasküler ve solunum sistemleri (45, 48) olmak üzere pek çok sistem üzerine etkilidir. Son yıllarda fizyolojik ve farmakolojik etkilerinden dolayı tıp alanı ve ilaç sanayinde kullanımı yaygınlaşmıştır (8, 11). KAP'ın etkisi dozuna, uygulama şekline ve dokuya göre değişiklik göstermekte ve KAP'ın iki yönlü etkisi olduğu belirtilmektedir (40). Düşük konsantrasyonda KAP sensorik sinirleri etkileyerek nöropeptitlerin salınımını uyarırken, yüksek doz KAP nörotoksik etkilidir (19).

Yapılan taramalarda KAP'ın ovaryum üzerine etkileri ile ilgili yeterli sayıda çalışmaya rastlanamamıştır. Alatrıste ve ark. (1) kobaylara, yüksek dozda KAP uygulamasının, puberteyi geciktirdiğini ve ovaryumdaki preantral ve antral folliküllerin sayısını azalttığını bildirmişlerdir. Buna karşılık Moran ve ark. (24) yüksek doz (50 mg/kg) KAP'ın sıçanların puberteye gelme sürelerini etkilemediğini fakat yavrulama sayılarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (24), KAP uygulanan sıçanların ovaryumlarında sağlıklı follikül sayılarının azaldığını, atretik follikül sayılarının ise kontrol gruplarına göre arttığını gözlemişlerdir. Nance ve ark. (25) da yüksek dozda KAP uygulamasının, köitus sırasında nöyroendokrin refleksin bozulmasına yol açtığını, dolayısıyla serviks uterusinin sensorik uyarım eksikliğinin, fertilité üzerine olumsuz etki yaptığını bildirmişlerdir. Yüksek doz KAP'ın ovaryum üzerine etkileriyle ilgili çalışmalar mevcutken, düşük doz uygulamalarıyla ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Özer ve ark. (30), civciv rasyonlarına %1 oranında kırmızı acı biber ilave ederek, genital sistem organlarının daha hızlı gelişip puberteye daha erken girdiklerini gözlemişler ve kırmızı acı biberin biyolojik aktivatör bir madde olduğunu belirtmişlerdir.

Zık ve ark. (49) da sıçanlara uyguladıkları düşük doz KAP'ın (0.5 mg/kg) folikülleri atreziden koruduğunu, foliküllerin gelişimini ve granuloza hücre proliferasyonunu uyardığını belirtmişlerdir. Sınırlı sayıda yapılan çalışmalarla, düşük doz KAP'ın ovaryum üzerinde olumlu yönde etkileri olduğu belirlenmiştir (43, 49).

Yapılan literatür taramasında KAP uygulanmış hayvanlarda, ovaryumda follikülogenezis ve atrezide önemli rol oynayan TGF-β1 ekspresyonu üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Dolayısıyla sunulan çalışmada, düşük doz KAP uygulamasının ovaryumda TGF-β1 ekspresyonu üzerine etkisinin olup/olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## **Gereç ve Yöntem**

### **Deneyisel Uygulama**

Çalışmada, Uludağ Üniversitesi, Deney Hayvanları Yetiştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 21 günlük 30 adet Sprague-Dawley ırkı dişi sıçan kullanıldı. Laktasyon sürecini tamamlayan 21 günlük sıçanlar, follikül gelişiminin yoğun olduğu puberte dönemine kadar 15 gün boyunca ad libitum, pelet şeklindeki standart sıçan yemi ile beslendiler, içme suyunu serbest olarak tükettiler ve 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık periyodunda tutuldular, ayrıca klima ile buldukları oda sıcaklığı 21–23 °C, nem ise %50–60 oranında sabitlendi. Çalışmadaki tüm deneysel işlemler Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (UÜ HADYEK) tarafından onaylandı (Karar no: 2005/2).

Hayvanlar; hiçbir enjeksiyon yapılmayan (kontrol A grubu n: 10), KAP'ın eritildiği taşıyıcı solüsyonun enjekte edildiği (kontrol B grubu n: 10) ve KAP (Sigma M2028) enjekte edilen (deney grubu n: 10) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. KAP, %10 Tween 80 (Merck 817061), %10 absolüt ethanol (Merck 100983) ve %80 steril distile su içeren solüsyonda eritildi ve bu eritme için hazırlanan solüsyon kontrol B grubu için kullanıldı (0.3 ml/sıçan). Her gün, tüm gruptaki hayvanlar tartıldı ve grupların ortalama vücut ağırlıkları günlük olarak belirlendi. KAP, hayvanların vücut ağırlıklarındaki artış göz önüne alınarak, enjeksiyon öncesi her gün taze olarak hazırlandı. Eritilen KAP, toplamda 0.3 ml içinde 0.5 mg/kg dozda olacak şekilde, subkutan yolla, deney grubundaki sıçanlara 15 gün süresince enjekte edildi. Deney sonunda, dokuların alınacağı gün hayvanlara enjeksiyon yapılmadı.

### **Histolojik Prosedür**

Onbeş gün devam eden deney sonrasında, hayvanlar eter inhalasyonu ile uyutularak karın bölgeleri açıldı ve her iki ovaryum alındı. Ovaryumlar numaralandırılmış kasetler içerisinde % 10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonuna alınarak 24 saat tespit edildi. Tespit solüsyonunda bulunan ovaryumlar, değişik derecelerde (%50, 70, 80, 90, absolüt) alkol, ksilol ve parafin

**Tablo 1.** Ovaryum foliküllerinin sınıflandırılması (44).

Folikül Sınıfları	Oosit	Oositi Çevreleyen Folikül Epitel Hücreleri
Primordiyal Folikül	Primer Oosit	Tek katlı yassı pregranuloza hücreleri ve en fazla bir tane kübik granuloza hücresi içerir.
Primer Folikül	Primer Oosit	Tek katlı, iki ya da daha fazla sayıda kübik granuloza hücresi içerir.
Sekonder Folikül	Primer Oosit	İki ya da üç katlı kübik granuloza hücresi içerir.
Preantral Folikül	Primer Oosit	Üç kattan daha fazla granuloza hücresi içerir. Antrum şekillenmemiştir ya da granuloza hücreleri arasında küçük aralıklar oluşmuştur.
Antral Folikül	Primer Oosit	Çok katlı granuloza hücreleri içerir ve antrum şekillenmiştir.

serisinden geçirilerek, 58-60 °C'de eriyen parafinle bloklandılar. Parafin bloklardan elde edilen kesitlere, yapısal özelliklerin tespit edilebilmesi için Mallory'nin Crossmonn tarafından modifiye edilen üçlü boyama (7) ve immunohistokimyasal boyama tekniği uygulandı (42).

#### **İmmunohistokimyasal Prosedür**

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığındaki kesitler lizinli lamlara alınarak, indirekt streptavidin-biotin-peroksidaz kompleks yöntemi (42) ile boyandı ve ışık mikroskopunda (Nikon Eclips 80i, Tokyo, Japonya) incelendi.

İmmunohistokimyasal boyamada, rabbit poliklonal TGF-β1 (Santa Cruz, sc-90) primer antikor, Histostain Plus Bulk (Zymed 85-6743) sekonder antikor kiti kullanıldı. Kesitler deparafinize edildikten sonra suyu giderildi ve proteoliz için distile su içerisinde hazırlanan %0.05 Saponin (Serva, Heidelberg, Almanya) solüsyonu içerisinde 20 dakika oda ısısında bekletildi. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkamayı takiben endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için, dokular %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu içerisinde 10 dakika bekletildi. PBS ile yıkamayı takiben kesitler spesifik olmayan protein bağlanmalarını önlemek amacıyla sekonder kit içerisindeki bloking serum reagent A (Histostain Plus Bulk / Zymed Laboratuvarları, ABD) ile oda ısısında 60 dakika muamele edildi. Daha sonra kesitlere 1/750 dilüsyondaki primer antikor damlatılarak +4 °C'de bir gece bekletildi. Bu arada negatif kontrol grubu dokularına sadece PBS solüsyonu damlatıldı. Kesitler biotinlenmiş sekonder antikor damlatılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve yıkamayı takiben streptavidin-HRP komplekste oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Son aşamada kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAB- Zymed Laboratuvarları, ABD) kullanıldı ve hematoksilin ile zıt boyama yapılarak preparatlar entellan yapıştırıcı ile kapatıldı.

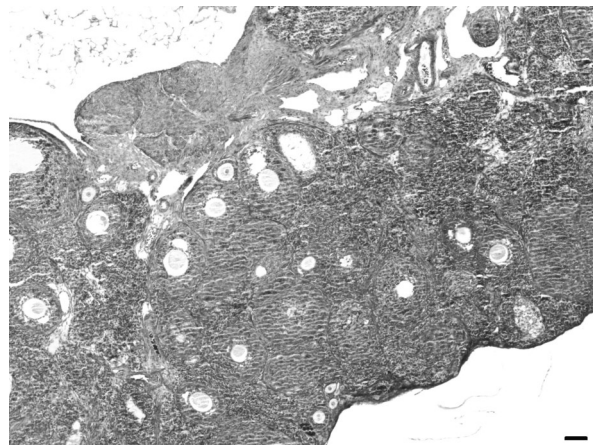
#### **Foliküllerin Morfolojik Sınıflandırması**

Çalışmada folliküller, klasik follikül sınıflandırması göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır (44). Bu sınıflandırmada, granuloza hücre şekli ve hücre katman sayısı göz önüne alınmıştır (Tablo 1).

#### **Bulgular**

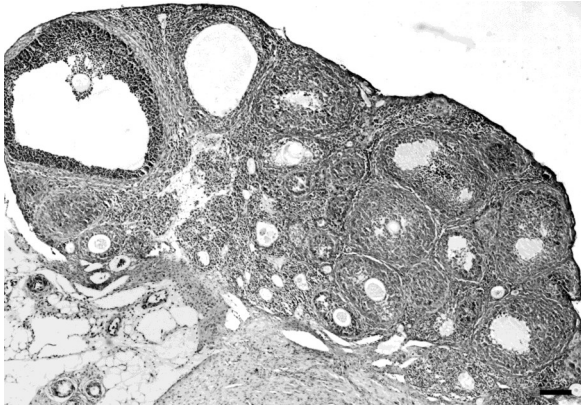
##### **Histolojik Bulgular**

Çalışma süresince deney ve kontrol gruplarını oluşturan hayvanlarda ölüm gözlenmedi. Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların ovaryum dokuları incelendiğinde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. Ayrıca mikroskopik değerlendirmede deney grubu ovaryumlarının, kontrol gruplarındaki ovaryumlara oranla daha büyük olduğu gözlemlendi. Her üç gruba ait hayvanların ovaryumlarının germinatif epitel ile çevrili olduğu ve bununda altında tunika albuginea bulunduğu görüldü. Ovaryumların zona parankimatoza bölümünde değişik gelişim aşamasında olan folliküller, (primordiyal, primer, sekonder, preantral, antral, graf folikülleri) atretik foliküller ve bu foliküller arasında da intersitisyel hücreler gözlemlendi (Şekil 1).



**Şekil 1.** Kontrol grubu ovaryumlarının genel görünümü, üçlü boyama. Bar 100 µm

Deney grubundaki hayvanlara ait ovaryumlarda, gelişmekte olan follüküllere rastlanmakla birlikte özellikle büyük antral/graff follüküllerin, kontrol gruplarına göre sayıca daha fazla olduğu gözlemlendi. Kontrol A ve kontrol B grubuna ait ovaryumlarda ise, gelişmekte olan follüküllerin çok sayıda olduğu, büyük antral/graff follüküllerin ise deney grubuna göre daha az sayıda olduğu dik-kati çektii. Her üç gruptaki ovaryumlarda da korpus luteum gözlenmedi (Şekil 2).

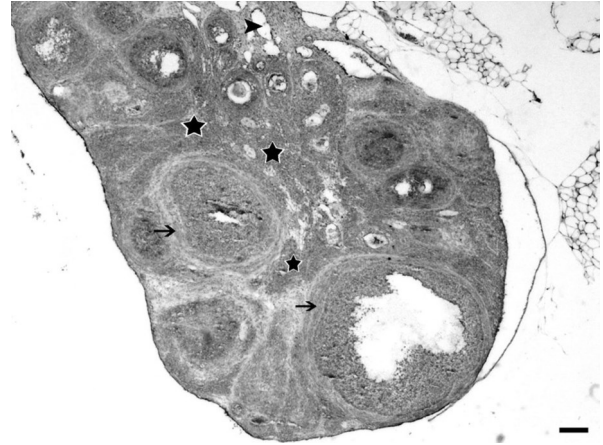


Şekil 2. Deney grubu ovaryumunun genel görünümü, üçlü boyama. Bar 100 µm.

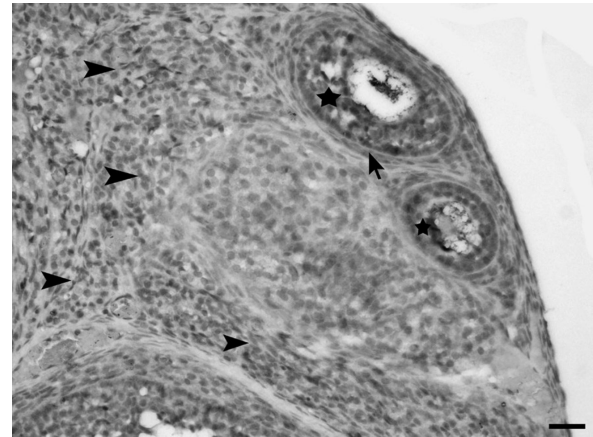
### İmmunohistokimyasal Bulgular

TGF-β1 immunreaksiyonu, tüm grupların ovaryumlarında; oositte, granuloza hücreleri, teka hücreleri ve intersitisyel hücrelerde farklı şiddetlerde belirlendi (Şekil 3, Tablo 2). TGF-β1, hücre içerisinde, farklı boyanma yoğunluğunda intrasitoplazmik tarzda gözlemlendi (Şekil 4).

Kontrol grupları ve deney grubunun ovaryumlarında tek katlı prizmatik germinatif epitel, şiddetli TGF-β1 immunpozitif reaksiyon gösterdi. Ayrıca tüm grupların follüküllerinde bulunan oosit sitoplazmalarında şiddetli immunpozitif reaksiyon belirlendi (Şekil 5). Tüm gru-



Şekil 3. Deney grubuna ait ovaryum dokusunda TGF-β1 immunreaksiyonunun genel görünümü. Yıldız: intersitisyel alanı, ince ok: teka hücreleri, ok başı: atretik follüküller. Bar 100 µm.



Şekil 4. Deney grubuna ait ovaryum dokusunda intrasitoplazmik tarzda görülen TGF-β1 immunreaksiyonu. Ok başı: intersitisyel alan, ok: teka hücresi, yıldız: granuloza hücreleri. Bar 25 µm.

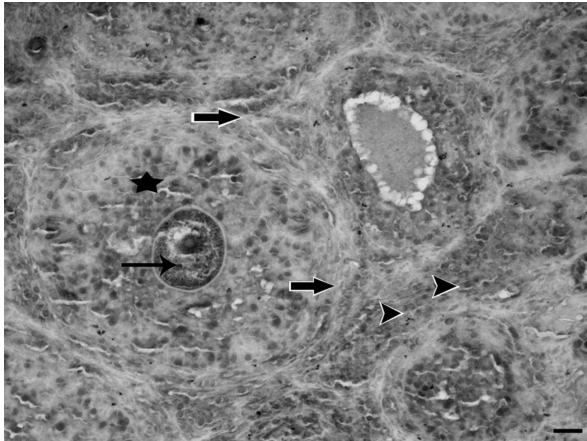
pların ovaryumunda yer alan atretik follüküllerde TGF-β1 ekspresyonu gözlenmedi. Kontrol gruplarının ovaryumlarında gelişmekte olan follükül-

Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarında TGF-β1'in immunohistokimyasal boyanma değerleri

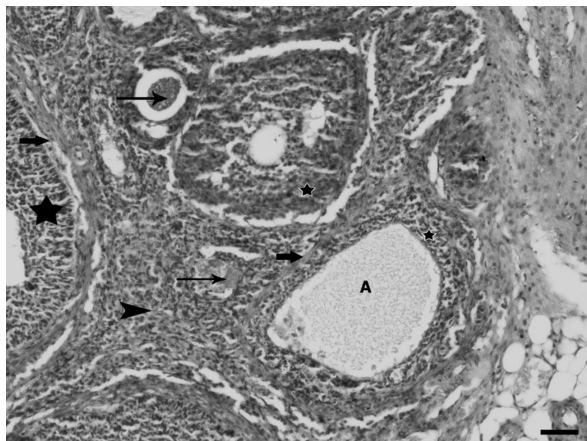
	Oosit	Sitoplazması	Granuloza Hücreleri		Teka Hücreleri	İntersitisyel Hücreler	Atretik Follüküller
			PO, P, S	PA, A			
Kontrol A Grubu (n:10)	+++	+	-	+	++	-	
Kontrol B Grubu (n:10)	+++	+	-	+	++	-	
Deney Grubu (n:10)	+++	+++	+++	+++	+++	-	

PO:Primordiyal Follükül, P: Primer Follükül, S: Sekonder Follükül, PA: Preantral Follükül, A: Antral Follükül  
-: boyanma yok, +: Hafif düzeyde boyanma, ++: Orta düzeyde boyanma, +++: Şiddetli düzeyde boyanma

lerin granuloza hücrelerinde ve follikül epitel hücrelerinde TGF- $\beta$ 1 immunreaksiyonu hafif şiddette gözlenirken (+1), büyük folliküllerin (preantral ve antral folliküllerin) granuloza hücrelerinde TGF- $\beta$ 1 ekspresyonu gözlenmedi (Şekil 5). Deney grubunda ise gelişmekte olan folliküllerin (primordiyal, primer, sekonder) granuloza hücrelerinde şiddetli immunreaksiyon (+3) gözlenirken, büyük folliküllerin granuloza hücrelerinde orta şiddette (+2) immunreaksiyon belirlendi (Şekil 6). Kontrol gruplarında folliküllerin teka hücrelerinde TGF- $\beta$ 1 ekspresyonu hafif şiddette (+1) belirlendi, buna karşılık deney grubunda şiddetli immunreaksiyon (+3) gözleildi. İntersitisyel hücrelerde ise TGF- $\beta$ 1 ekspresyonu kontrol gruplarında orta (+2), deney



**Şekil 5.** Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda TGF- $\beta$ 1 immunreaksiyonu. İnce ok: sekonder folikülün oosit sitoplazması, yıldız: granuloza hücreleri, ok başı: intersitisyel alan, kalın ok: teka hücreleri. Bar 25  $\mu$ m.



**Şekil 6.** Deney grubuna ait ovaryum dokusunda TGF- $\beta$ 1 immunreaksiyonu. Ok başı: intersitisyel alan, küçük yıldız: sekonder follikül ve atretik (A) folliküllerin granuloza hücreleri, büyük yıldız: büyük folliküllerin granuloza hücreleri, ince ok: oosit sitoplazması, kalın ok: teka hücreleri. Bar 50  $\mu$ m.



**Şekil 7.** Deney grubuna ait ovaryum dokusunda TGF- $\beta$ 1 immunreaksiyonu. İnce ok: antral follikül oosit sitoplazması, yıldız: granuloza hücreleri, kalın ok: teka hücreleri, ok başı: intersitisyel alan. Bar 50  $\mu$ m.

grubunda ise şiddetli (+3) olarak gözleildi (Şekil 5,7).

#### Tartışma ve Sonuç

Ovaryumda follikülogenez ve atrezi, endokrin sistemi, bağışıklık sistemi, sinir sistemi ve parakrin-otokrin faktörlerin de dahil olduğu pek çok mekanizmalarla düzenlenmektedir (28, 29, 39). Ovaryumlar sinirsel innervasyondan oldukça zengindir. Duyusal innervasyon, ovaryum fonksiyonunun düzenlenmesinde anahtar bir rol oynamakla birlikte, afferent sinirler, gonadotropinlere karşı follikülogenez ve atrezinin düzenlenmesinde aktif rol alırlar (24). Ovaryumu innerve eden KAP'a duyarlı sensorik sinir sonları da, gonadotropinlere cevapta ovaryumda follikülogenezin ve atrezinin düzenlenmesine katılmaktadırlar (3). Sinirsel innervasyondan oldukça zengin olan ovaryumda düşük doz KAP'ın etkilerini inceleyen çok az çalışma mevcuttur. Sunulan çalışmada düşük doz KAP'ın, ovaryum follikülogenezisi ve atrezisinde önemli rol oynayan TGF- $\beta$ 1'in ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada düşük doz KAP'ın ovaryumda TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunu arttırdığı gözleildi. TGF- $\beta$ 1 ekspresyonu, ovaryumdaki folliküllerin oositlerinde, granuloza hücrelerinde, teka ve intersitisyel hücrelerde saptandı. Kontrol grupları ve deney grubunda tüm folliküllerin oositlerinde TGF- $\beta$ 1 ekspresyonu benzer olup, şiddetli immunreaksiyon gösterdi. Yapılan çalışmaya benzer olarak sıçan (41), fare (16), hamsterlerde (36) yapılan immunhistokimyasal çalışma-

larda da follikül sınıflarında farklılık olmaksızın, tüm folliküllerin oositlerinde TGF-β1 ekspresyonu gözlemlendi.

Araştırmalarda, TGF-β1'in tür, yaş ve doku tipine bağlı olarak ekspresyonunun değiştiği belirtilmektedir (14, 21). Yapılan in vitro çalışmalarda, erişkin olmayan sıçan folliküllerinden (9) ve hamster preantral folliküllerinden (37) elde edilen granuloza hücrelerinde, TGF-β1'in proliferasyonu arttırdığı, ineklerin büyük antral folliküllerinden elde edilen granuloza hücrelerinde (38) ise proliferasyonu inhibe ettiği belirtilmektedir. Bununla birlikte, insan ve farelerin preantral folliküllerinin granuloza ve teka hücrelerinde TGF-β1'in eksprese olduğu (5, 6), bunun aksine ineklerin tüm folliküllerinde TGF-β1 ekspresyonuna rastlanmadığı bildirilmektedir (26). TGF-β1'in ayrıca sıçan, domuz ve hamsterlerin teka hücrelerinde eksprese edildiği bildirilmektedir (20, 22).

Sunulan çalışmada kontrol grubu ovaryum dokularında gelişmekte olan folliküllerin (primordiyal, primer ve sekonder) granuloza hücrelerinde zayıf şiddette immunreaksiyon gözlenirken, gelişmiş folliküllerde immunreaksiyon gözlenmemiştir. Bunun aksine, çalışmada uygulanan düşük doz KAP'ın gelişmekte olan folliküllerin granuloza hücrelerinde TGF-β1 ekspresyonunu arttırdığı, gelişmiş folliküllerde ise orta şiddette TGF-β1 ekspresyonu sağladığı belirlendi. Yapılan çalışmaya benzer olarak, Nilsson ve ark. (26) folliküller geliştikçe TGF-β1 ekspresyonunun azaldığını gözlemişlerdir. Bunun aksine, insanlarda follikül gelişimine paralel olarak granuloza ve teka hücrelerinde TGF-β1 ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir (8). Ayrıca, yapılan çalışmaya benzer olarak, insanlarda (5), hamster ve sıçan (20) ovaryumunun teka ve intersitisyel hücrelerinde TGF-β1 proteini tespit edilmiştir. Sunulan çalışmada, düşük doz kısa süreli KAP uygulamasının ovaryumda özellikle folliküllerin granuloza hücrelerinde, teka ve intersitisyel hücrelerde TGF-β1 ekspresyonunu arttırdığı gözlemlendi. Erdost ve ark. (10)' nın düşük doz KAP ile yaptığı bir diğer çalışmada, diyetlerine düşük dozda acı kırmızı biber ilave edilen tavuk ve horozların hipofiz bezinde FSH ve LH sentezinin ilk aylardan itibaren arttığını saptamışlardır. Araştırmacılar (10) bu hormonların hedef organları olan gonad gelişimini etkileyeceğini düşünmüşlerdir. Zık ve ark. (49) günlük diyetle kırmızı biberden alınacak miktara eş değer dozda KAP'ın, puber-

ta öncesi sıçanlarda ovaryum follikül atrezisini önlediğini, proliferasyon faktörü olan Ki 67 ekspresyonunu özellikle granuloza hücrelerinde kontrol grubuna göre yüksek seviyede olduğunu gözlemleyerek, ovaryum üzerinde düşük doz kısa süreli KAP'ın follikül gelişiminde etkili olduğunu belirtmişlerdir. Özer ve ark. (30) kanatlılarda yaptıkları bir çalışmada, kırmızı acı biber ile beslenen hayvanların ovaryumlarında folliküler gelişimin daha hızlı seyrederek deney grubu hayvanların yumurtlama dönemine 11 gün önce girdiklerini ve yumurta performanslarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca in vitro yapılan bir çalışmada, düşük doz KAP'ın granuloza hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı belirtilmektedir (13). Dolayısıyla sunulan çalışmada kısa süreli düşük doz KAP'ın ovaryum üzerinde yapmış olduğu etkilerde TGF-β1 protein yolağının rol oynayabileceği düşünülmektedir. KAP reseptörü olan VR1'in granuloza hücrelerinde varlığı düşünüldüğünde (43), KAP'ın VR1 aracılığıyla TGF-β1 yolağını aktive ederek ovaryum follikülogenezisini düzenlediği ileri sürülebilir. Ayrıca sıçan granuloza hücrelerinde TGF-β1 ve β2 varlığında FSH-R ve LH-R ekspresyonunun arttığı da gösterilmektedir (12). KAP'ın granuloza, teka ve intersitisyel hücrelerde TGF-β1 ekspresyonunu arttırması bu hücrelerde FSH-R ve LH-R ekspresyonunu da arttırabileceği ve dolaylı olarak östrojen üretiminde etkili olabileceği öngörülebilir. Bununla birlikte TGF-β1 seviyesinin hem polikistik over sendromlu (PCOS) dişi bireylerin serumlarında (34) hem de epitelyal over kanserli bireylerden alınan ovaryum dokularında (18) yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, sunulan çalışmada, düşük dozda KAP uygulanmasının, follikülogenezis aşamasında TGF-β1 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. KAP'ın ovaryum üzerine olası etkileri ile ilgili detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu ileri sürülebilir.

#### Kaynaklar

1. Alatrıste V, Herrera-Camacho I, Martínez MI, Limon ID, Gonzalez-Flores O, Luna F. Sensory denervation with capsaicin reduces ovarian follicular development and delays the onset of puberty in guinea pigs. *Adv Reprod Sci* 2013; 1(3): 29-37.
2. Bondestam J, Huotari MA, Morén A, Ustinov J, Kaivo-Oja N, Kallio J, Horelli-Kuitunen N, Aaltonen J, Fujii M, Moustakas A, Ten Dijke

- P, Otonkoski T, Ritvos O. cDNA cloning, expression studies and chromosome mapping of human type I serine/threonine kinase receptor ALK7 (ACVR1C). *Cytogenet Cell Genet* 2001; 95(3-4): 157-62.
3. Calka J, McDonald JK, Ojeda SR. The innervation of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide. *Biol Reprod* 1988; 39(5): 1215-23.
  4. Chang WY, Ohmura H, Kulp SK, Lin YC. Transforming growth factor  $\beta$ 1 regulates differentiation of porcine granulosa cells in vitro. *Theriogenology* 1993; 40(4): 699-712.
  5. Chegini N, Flanders KC. Presence of transforming growth factor-beta and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology* 1992; 130(3): 1707-15.
  6. Christopher B. Immunolocalization of transforming growth factor-beta1 during follicular development and atresia in the mouse ovary. *Endocr J* 2000; 47(4): 475-80.
  7. Crossmonn G. A modification of mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec* 1937; 69 (1): 33-8.
  8. Derry S, Lloyd R, Moore RA, McQuay HJ. Topical capsaicin for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD007393.
  9. Dorrington J, Chuma AV, Bendell JJ. Transforming growth factor  $\beta$  and follicle-stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinology* 1988; 123 (1): 353-9.
  10. Erdost H, Özer A, Yakışık M, Özfiliz N, Zık B. FSH and LH cells in the laying hens and cocks, fed with a diet containing red hot pepper. *J Food Agri Environ* 2006; 4(1): 119-23.
  11. Filipczak-Bryniarska I, Krzyzewski RM, Kucharz J, Michalowska-Kaczmarczyk A, Kleja J, Woron J, Strzepek K, Kazior L, Wordliczek J, Grodzicki T, Krzemieniecki K. High-dose 8% capsaicin patch in treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Single-center experience. *Med Oncol* 2017; 34(9): 162.
  12. Gitay-Goran H, Kim IC, Miggans ST, Schomberg DW. Transforming growth factor beta modulates gonadotropin receptor expression in porcine and rat granulosa cells differently. *Biol Reprod* 1993; 48(6): 1284-9.
  13. Güler S, Zık B. Effects of capsaicin on ovarian granulosa cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res* 2018; 372(3):603-9.
  14. Hu PP, Datto MB, Wang XF. Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling. *Endocr Rev* 1998; 19(3): 349-63.
  15. Jensen-Jaorlim E, Gajdzik L, Haberl I. Hot spices influence permeability of human intestinal epithelial monolayers. *J Nutr* 1998; 128(3): 577-81.
  16. Juneja SC, Chegini N, Williams RS, Ksander GA. Ovarian intra-bursal administration of transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits follicle rupture in gonadotropin-primed mice. *Biol Reprod* 1996; 55(6): 1444-51.
  17. Knight PG, Glister C. Local roles of TGF-superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci* 2003; 78(3-4): 165-83.
  18. Kohan-Ivani K, Gabler F, Selman A, Vega M, Romero C. Role of dihydrotestosterone (DHT) on TGF- $\beta$ 1 signaling pathway in epithelial ovarian cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142(1): 47-58.
  19. Kress M, Gutimann C, Averbeck B, Reeh PW. Calcitonin gene related peptid and prostaglandin E2 but not substance P release induced by antidromic nerve stimulation from rat skin in vitro. *Neuroscience* 1999; 89 (1): 303-10.
  20. Levacher C, Gautier C, Saez JM, Habert R. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 in the fetal and neonatal rat ovary. *Differentiation* 1996; 61(1): 45-51.
  21. Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992; 68(4): 775-85.
  22. May JV, Stephenson LA, Turzcynski CJ, Fong HW, Mau YH, Davis JS. Transforming growth factor beta expression in the porcine ovary: evidence that theca cells are the major secretory source during antral follicle development. *Biol Reprod* 1996; 54(2): 485-96.
  23. Mondschein JS, Canning SF, Hammond JM. Effects of transforming growth factor  $\beta$  on the production of immunoreactive insulin-like growth factor I and progesterone and on [3H] thymidine incorporation in porcine gra-

- nulosa cell cultures. *Endocrinology* 1988; 123(4): 1970-6.
24. Moran C, Morales L, Razo SR, Apolonio J, Quiroz U, Chavira R, Dominguez R. Effect of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy. *Life Sci* 2003; 73(16): 2113-25.
  25. Nance DM, King TR, Nance PW. Neuroendocrine and behavioral effects of intrathecal capsaicin in adult female rats. *Brain Res Bull* 1987; 18(1): 109-14.
  26. Nilsson EE, Doraiswamy V, Skinner MK. Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol Reprod Dev* 2003; 66(3): 237-46.
  27. Ohtomo K, Ebihara N, Matsuda A, Tokura T, Funaki T, Murakami A. Role of TGF- $\beta$ 1 in tissue eosinophilia associated with vernal kerato-conjunctivitis. *Exp Eye Res* 2010; 91(5): 748-54.
  28. Oliveros L, Forneris M, Aguado L. Secretion from neuropeptidetreated splenocytes modifies ovarian steroidogenesis. *Medicina* 2001; 61(1): 35-40.
  29. Olson LM, Jones-Burton CM, Jablonka-Shariff A. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rats luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinology* 1996; 137(8): 3531-9.
  30. Özer A, Erdost H, Zık B. Histological investigations on the effects of feeding a diet containing red hot pepper on the reproductive organs of the chicken. *Phytother Res* 2005; 19(6): 501-5.
  31. Özgüden Akkoc CG, Ozer A. Immunohistochemical localization of transforming growth factor  $\beta$  1 and  $\beta$  2 in mouse testes during postnatal development. *Biotech Histochem* 2011; 87(2): 154-9.
  32. Panossian A, Gabrielian E, Wagner H. Dose-dependent reversal effects of Capsaicin on interleukin-1 $\alpha$  production is associated with the metabolism of arachidonic acid (leukotriene B(4) and prostaglandin E(2)) as well as nitric oxide production in human leukocytes. *Phytomedicine* 1996; 3(2): 169-74.
  33. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saade JI, West AB. Myofibroblasts, paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277(1): 1-19.
  34. Raja-Khan N, Kunselman AR, Demers LM, Ewens KG, Spielman RS, Legros RS. A variant in the fibrillin-3 gene is associated with TGF-beta and inhibin B levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2010; 94(7): 2916-9.
  35. Roberts AJ, Skinner MK. Transforming growth factor-alpha and -beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology* 1991; 129(4): 2041-8.
  36. Roy SK, Ogren C, Roy C, Lu B. Cell-type-specific localization of transforming growth factor-beta 2 and transforming growth factor-beta 1 in the hamster ovary: Differential regulation by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1992; 46(4): 595-606.
  37. Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(11): 807-21.
  38. Skinner MK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology* 1987; 121(2): 786-92.
  39. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the cycle and early pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; 96(1): 219-26.
  40. Surh YJ, Lee SS. Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food Chem Toxicol* 1996; 34(3): 313-6.
  41. Teerds KJ, Dorrington JH. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 during follicular development in the adult rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 84(1-2): 7-13.
  42. True LD. Atlas of Diagnostic Immunohistopathology. First Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1990; p.16-22.
  43. Tütüncü Ş, Özfiliz N. Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the capsaicin treated rat ovaries on different sexual development periods. *Rev Med Vet* 2011; 162(10): 460-7.
  44. Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AE, Passantino L. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *J Endocrinol* 2006;



- 191(3): 549-58.
45. Vaishnava P, Wang DH. Capsaicin sensitive sensory nerves and blood pressure regulation. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2003; 1(2): 177-88.
  46. Wang F, Shi R, Zhao L. Expression and significance of TGF- $\beta$  1 and VEGF in formation of new blood vessels after rabbit corneal suture. *Recent Adv Ophthalmol* 2008; 28(2): 96-9.
  47. Yang W, Gong X, Zhao X, An W, Wang X, Wang M. Capsaicin induces apoptosis in HeLa cells via Bax/Bcl-2 and Caspase-3 Pathways. *Asian Pac J Trop Med* 2006; 1(3-4): 1-7.
  48. Yu SM, Lin KH. Morphological alterations in the trachea of capsaicin-pretreated rat during postnatal development. *Zool Stud* 2002; 41(1): 13-22.
  49. Zık B, Özgüden Akkoç C.G. Tütüncü S, İlhan T, Yılmaztepe AO, Özenci CC. Effects of low dose capsaicin (CAP) on ovarian follicle development in prepubertal rat. *Rev Med Vet* 2010; 161(6): 288-94.

**Sorumlu Yazar:**

Prof. Dr. Berrin ZIK  
Uludağ Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Bursa-TÜRKİYE  
Tel:0-224-2941265  
E-posta:bzik@uludag.edu.tr

