

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CAPSAİCİN UYGULANAN DİYABETİK VE NON-DİYABETİK**  
**RATLARIN OVARYUMUNDA BMP-15'İN**  
**İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU**

**Kübra TOSUN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Turgay DEPREM**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**2019- KARS**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CAPSAİCİN UYGULANAN DİYABETİK VE NON-DİYABETİK  
RATLARIN OVARYUMUNDA BMP-15'İN  
İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU**

**Kübra TOSUN**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Turgay DEPREM**

**Bu tez Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2018-TS-74 kodlu proje  
numarası ile desteklenmiştir.**

**2019- KARS**

TC

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Kübra TOSUN tarafından hazırlanmış olan **Capsaicin Uygulanan Diyabetik ve Non-Diyabetik Ratların Ovaryumunda BMP-15'in İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy. *birleşik* ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/06/2019

Adı Soyadı:

İmza:

Başkan: Prof. Dr. Şahin ASLAN

Üye: Doç. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK

Üye: Doç. Dr. Turgay DEPREM

*[Handwritten signatures]*

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

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada capsaicin uygulanan diyabetik ve non-diyabetik ratların ovaryumunda BMP-15 in immunohistokimyasal lokalizasyonu incelendi.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşarak her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen bana sabırla yol gösteren başta tez danışmanım Doç. Dr. Turgay DEPREM' e, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Şahin ASLAN' a, Doç. Dr. Serap KORAL TAŞÇI' ya teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Serpil DAĞ' a, Dr. Öğr. Üyesi Serpil ADIGÜZEL IŞIK' a, laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımızda doktora öğrencisi olan Serap İLHAN AKSU ve yüksek lisans öğrencisi olan Sinem GÜNCE DEMİRBAŞ' a, bugünlere gelmemde her zaman bana destek olan aileme, her daim yanımda olan sevgili eşim Yavuz TOSUN' a ve bu süreçte beni sabırla bekleyen biricik kızım Azranur' uma ayrıca ismini yazamadığım herkese teşekkürlerimi sunarım. Desteklerinden dolayı Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa No</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>V</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>VII</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b>	<b>VIII</b>
<b>ÖZET</b>	<b>IX</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>X</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. OVARYUM YAPISI VE HİSTOLOJİSİ	1
1.1.1.Ovaryum Follikülleri	2
1.2.TRANSFORMİNG GROWTH FACTOR- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) AİLESİ ve BMP-15	6
1.2.1. BMP-15 ve Sinyal İletimi	7
1.3. DİYABETES MELLİTUS	8
1.3.1.Diyabetes Mellitus' un Tipleri	9
1.4. CAPSAİCİN	10
1.5. STREPTOZOTOSİN (STZ)	12
1.6. DİYABET, CAPSAİCİN VE BMP-15	12
<b>2. MATERYAL VE METOD</b>	<b>16</b>
2.1. MATERYAL	16
2.1.1. Deney Hayvanı Materyali	16

2.2. METOD	16
2.2.1. Deneysel Diyabet Oluşturulması	16
2.2.2. Canlı Ağırlık Ölçümü ve Kan Glukoz Değerlerinin Ölçümü	16
2.2.3. Capsaicin Uygulanması	17
2.2.4. Histolojik İnceleme	17
2.2.5. İmmunohistokimyasal İncelemeler	18
2.2.6. İstatistiksel Değerlendirme	19
<b>3. BULGULAR</b>	<b>20</b>
3.1. Canlı Ağırlık Bulguları	20
3.2. Kan-Glukoz Değerleri	21
3.3. Histolojik Değerlendirme	22
3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	29
<b>4. TARTIşMA VE SONUÇ</b>	<b>37</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>43</b>
<b>6. EKLER</b>	<b>50</b>
<b>7. ÖZGEÇMİş</b>	<b>51</b>

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>AMH</b>	: Anti Müllerian Hormon
<b>Bfgf</b>	: Bazic Fibroblast Growth Factor
<b>BMP4</b>	: Bone Morfogenetik Protein4
<b>BMP6</b>	: Bone Morfogenetik Protein 6
<b>BMP7</b>	: Bone Morfogenetik Protein7
<b>BMP15</b>	: Bone Morfogenetik Protein 15
<b>CAP</b>	: Capsaicin
<b>DM</b>	: Diyabetes Mellitus
<b>EGF</b>	: Epitelial Growth Factor
<b>FSH</b>	: Folikül Stimüle Edici Hormon
<b>FST</b>	: Follistatin
<b>GDF9</b>	: Growth Differentiation Factor 9
<b>GDM</b>	: Gestasyonel Diyabetes Mellitus
<b>GIS</b>	: Gastrointestinal Sistem
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
<b>IGF-1</b>	: Insulin-Like Growth Factor 1
<b>LH</b>	: Luteinizan Hormon
<b>mRNA</b>	: Haberci Ribonükleik Asit
<b>PBS</b>	: Fosfat Buffer Salin
<b>STZ</b>	:Streptozotosin
<b>TGF-β</b>	: Transforming Growth Factor-Beta

**TABLÖLAR DİZİNİ**

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1.</b> Gröplara ait canlı ağırlıklarının değeriendirilmesi	20
<b>Tablo 2.</b> Gröplara ait kan-glikoz değeri (mg/dl).	21
<b>Tablo 3:</b> Folliköl sayılarının değeriendirilmesi	27
<b>Tablo 4:</b> Gröplara ait ovaryum dokusunda BMP-15 immunoreaktivite yoğunluğunun değeriendirilmesi	30





**ŞEKİLLER DİZİNİ****Sayfa No**

<b>Şekil 1:</b> Follikül gelişimi; korpus luteum ve folliküler atreziyanın şematik gösterimi	5
<b>Şekil 2:</b> Oosit-kumulus hücre sinyal yolağı	8
<b>Şekil 3:</b> Capsaisinin moleküler yapısı	11



**RESİMLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa No</b>
<b>Resim 1.</b> Capsaicin grubu genel görünüm. H&E	22
<b>Resim 2.</b> Kontrol grubu ovaryum dokusu genel görünümü. Triple boyama	23
<b>Resim 3.</b> Kontrol grubu ovaryum dokusu. Triple boyama	24
<b>Resim 4.</b> Kontrol grubu genel görünüm. PAS boyama	25
<b>Resim 5.</b> Kontrol grubu ovaryum dokusu. Triple boyama	25
<b>Resim 6.</b> Capsaicin grubu ovaryum dokusu. H&E	26
<b>Resim 7.</b> Diyabet grubu ovaryum dokusu. H&E	26
<b>Resim 8.</b> Diyabet grubu follikül epitel hücrelerinde dejeneratif Değişiklikler ve Disorganizasyon. Triple boyama	28
<b>Resim 9.</b> Diyabet grubu antrumda yıkılanmış hücre döküntüleri. Triple boyama	29
<b>Resim 10.</b> Capsaicin grubu BMP-15 immunoreaktivitesi.	31
<b>Resim 11.</b> Diyabet grubu BMP-15 immunoreaktivitesi.	31
<b>Resim 12.</b> Diyabet+Capsaicin grubu BMP-15 immunoreaktivitesi.	32
<b>Resim 13.</b> Kontrol grubu BMP-15 immunoreaktivitesi.	32
<b>Resim 14.</b> Diyabet grubu BMP-15 immunoreaktivitesi.	33
<b>Resim 15.</b> Diyabet grubu BMP-15 immunoreaktivitesi.	34
<b>Resim 16.</b> Capsaicin grubu BMP-15 immunoreaktivitesi .	34
<b>Resim 17.</b> Kontrol grubu BMP-15 immunoreaktivitesi .	35
<b>Resim 18.</b> Diyabet grubu BMP-15 immunoreaktivitesi.	35
<b>Resim 19.</b> Negatif boyama	36

## ÖZET

### **Capsaicin Uygulanan Diyabetik ve Non-diyabetik Ratların Ovaryumunda BMP-15' in İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu.**

Çalışmada 40 adet Sprague-Dawley ırkı rat dört gruba ayrılarak kullanıldı. Diyabet oluşturmak için 45 mg/kg dozunda streptozotosin (STZ) intraperitoneal (IP) yolla uygulandı. Diyabet oluşumunun teyit edildiği 3. günden sonra diyabet + capsaicin ve sadece capsaicin gruplarına 2 hafta süreyle 1mg/kg dozunda günlük capsaicin uygulandı. Deneklerin ovaryum dokuları 14. günde alındı. Ovaryumun histolojik yapısını incelemek için alınan kesitlere Crossman'ın üçlü boyaması (Triple Boyama), Hematoksilen & Eosin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları yapıldı. Bone Morfogenetik Protein 15 (BMP15)' in ovaryumdaki immünoreaktivitesini belirlemek için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) metodu uygulandı.

Çalışmamızda diyabetik ratların ovaryumunda bulunan bazı follikül epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler ve disorganizasyon gözlemlendi. Ayrıca bazı folliküllerin follikül epitel hücrelerinde yıkımlanma ve dejeneratif değişiklikler ile birlikte antrumda yıkımlanmış hücre döküntüleri tespit edildi. Follikül sayılarında diyabete göre diyabet + capsaicin grubunda artış meydana gelmesi capsaicin'in olumlu etkisinden kaynaklandığı düşünüldü. Kontrol, diyabetik, capsaicin ve diyabetik + capsaicin gruplarında BMP-15' in benzer bölgelerde: oositte, granuloza hücrelerinde, korpus luteumlarda immunolokalizasyon gösterdiği gözlemlendi. Diyabetik grupta diğer gruplara oranla canlı ağırlıkta azalma olduğu belirlendi. Bu çalışmada diyabetik ve non-diyabetik ratlara capsaicin uygulamasının ovaryumda BMP-15 immünoreaktivitesi üzerine etkisi incelendi. Sonuç olarak diyabetin ovaryum foliküllerinde dejeneratif değişikliklere yol açtığı, diyabet üzerine capsaicin'in olumlu etki ettiğini, ayrıca BMP-15 immünoreaktivitesinin diyabette azaldığını diyabet + capsaicin grubunda ise azda olsa arttığını belirledik. Bu konunun daha farklı tekniklerle incelenmesinin özellikle capsaicin diyabet ilişkisinin ortaya konmasının gerektiğini düşünüyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** BMP-15, Capsaicin, Diyabet, İmmunohistokimyasal, Ovaryum

## SUMMARY

### **Immunohistochemical Localization of BMP-15 in the Ovarium of Capsaicin-Administered Diabetic and Non-Diabetic Rats.**

Forty Sprague-Dawley rats were divided into four groups. Streptozotocin (STZ) was administered intraperitoneally (IP) at a dose of 45 mg / kg to induce diabetes. After the 3rd day of the occurrence of diabetes confirmed, diabetes + capsaicin and capsaicin alone were administered capsaicin daily at a dose of 1mg / kg for 2 weeks. Ovarian tissues of the subjects were obtained on the 14th day. In order to examine the histological structure of the ovary, Crossman triple staining (Triple Staining), Hematoxylin & Eosin (H&E) and Periodic Acid Schiff (PAS) staining were performed. Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) method was used to determine the immunoreactivity of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) in the ovary.

In our study, degenerative changes and disorganization were observed in some follicular epithelial cells in the ovary of diabetic rats. In addition, degradation and degenerative changes of follicular epithelial cells of some follicles and destruction of debris in the antrum were detected. The increase in follicle counts in diabetes + capsaicin group compared to diabetes was thought to be caused by the positive effect of capsaicin. In control, diabetic, capsaicin and diabetic + capsaicin groups, BMP-15 showed immunolocalization in similar regions: oocyte, granulosa cells, corpus luteum. Diabetic group was found to have a decrease in body weight compared to other groups. In this study, we investigated the effect of capsaicin administration on BMP-15 immunoreactivity in diabetic and non-diabetic rats. As a result, we found that diabetes caused degenerative changes in ovarian follicles, capsaicin had a positive effect on diabetes, and BMP-15 immunoreactivity decreased in diabetes and slightly increased in diabetes + capsaicin group. We think that this issue should be examined with different techniques, especially the relationship between capsaicin and diabetes.

**Keywords:** BMP-15, Capsaicin, Diabetes, Immunohistochemistry, Ovarium

## 1.GİRİŞ

### 1.1. OVARYUMUN YAPISI ve HİSTOLOJİSİ

Ovaryum, pelvis boşluğunun yan duvarlarında badem şeklinde (Erdoğan ve ark. 2007) eşey hücrelerini (oosit) meydana getiren, dişi genital sisteminin diğer organları üzerinde salgıladığı hormonlarla etkili olan ve genital siklusu düzenleyen ekzokrin ile endokrin salgı yapan organdır (Tanyolaç 1999, Kierszenbaum 2006). Ekzokrin işlevini yumurta üretip dişi genital kanala vererek, endokrin işlevini ise dişi cinsiyet hormonlarını salgılayarak görür. Östrojen ve progesteron salgılayarak ikincil cinsiyet karakterlerini oluşturmasının yanısıra gebeliğin devamlılığı için de önemlidir (Ojeda 2000).

Ovaryumun yüzeyini örten germinatif epitel tek katlı kübik olup embriyonik dönemde birkaç kere çoğalarak primer ve sekonder seks kordonlarını meydana getirir (Erdoğan ve ark. 2007, Gürsoy ve ark 2007). Sıkı bağ dokulu tunika albuginea germinatif epitelin altında yer alır (Tanyolaç 1999). Ovaryumlar morfolojik olarak korteks, medulla ve hilus olmak üzere üç bölgeden oluşur. Kan damarlarının ve sinir tellerinin bulunduğu bölge olan hilus; ovaryumu mezovaryuma bağlar (Ojeda 2000). Tunika albuginea'nın altında ovaryum folliküllerinin ve fibroblastların bulunduğu korteks (stroma) yer alır. Stromada bulunan fibroblastlar humoral uyaranlara diğer organlarda bulunanlardan farklı cevap verir (Junqueira ve ark 2009). Fibroblastlar, ovaryum paraneşimindeki bağ dokuda yaygın olarak görülen epiteloid karakterde intersitisyel hücrelere dönüşüp östrojen hormonu salgırlar (Tanyolaç 1999). Ovaryumun iç kısmında yer alan medulla kollojen ve elastik liflerden yapılmış sıkı bağ dokusu yapısındadır (Ovalle ve ark 2009). Kalın sinir demetleri, kan ve lenf damarları ile birkaç düz kas hücrelerini içerir (Erdoğan ve ark. 2007). Medulla kan damarlarınca zengin bir bölge olmasından dolayı zona vaskuloza olarak da adlandırılır (Tanyolaç 1993).

### **1.1.1. Ovaryum Follikülleri**

Ovaryum follikülleri; korteksin (stroma) içinde bulunan, follikül hücrelerinin (granüloza hücreleri) bir ya da daha fazla tabaka oluşturarak çevrelediği oositin meydana gelir (Junqueira ve ark 2009). Follikül büyümesi sırasında folliküller değişiklikler geçirerek, primordial, primer, sekonder ve olgunlaşmış folliküller olarak ayırt edilebilirler (Krause 1996).

#### **1.1.1.1. Primordiyal Follikül**

Olgun dişi ve erkek üreme hücreleri, gelişimin üçüncü haftası sonunda vitellus (yolk) kesesi duvarında beliren ilkel üreme hücrelerinden gelişir. Bu hücreler vitellus kesesinden, gelişmekte olan gonadlara ameboik hareketlerle göç eder ve gonadlara 4. haftanın sonu veya 5. haftanın başında ulaşırlar. Doğum öncesi olgunlaşma evresi primordiyal üreme hücrelerinin dişi gonada ulaşip oogoniumlara farkanması ve primer oositi bulunduran primordiyal follikülün oluşması sürecidir (Sadler 1995).

Bir küme içinde yer alan oogoniumların tamamı tek bir ilkel üreme hücresinden gelişirken, follikül hücreleri olan oogoniumların çevresindeki yassı epitel hücreleri overin yüzey epitelinden köken alırlar. (Sadler 1995).

Primordiyal folliküller, folliküler gelişimin ilk üç ayı döneminde baskın olarak bulunur. Primordiyal folliküller, tunika albugineanın altında korteks stromasında yer alır (Ross ve ark. 2003). Oositi yassı ve tek sıra halinde folliküler hücreler çevreler (Erdoğan ve ark. 2007, Gürsoy ve ark. 2007).

#### **1.1.1.2. Primer Follikül**

Oosit ile oositi çevreleyen follikül epitel hücreleri, puberte döneminde salgılanmaya başlayan follikül stimulan hormonun (FSH) etkisiyle gelişir (Ergün ve ark 2012). Pubertede gonadotropinlerin etkisi ile follikül hücreleri önce tek katlı kübik sonra çok katlı kübik hücreler halini alarak primer follikülleri oluşturur (Schoenwolf ve ark 2009). Tek katlı kübik hücrelerden oluşan folliküle ünilaminar primer follikül denilmektedir. Follikül hücreleri proliferasyon ile oositin çevresinde çok katlı hale gelir ve follikül, multilaminar primer follikül adını alır. Çok katlı follikül epiteline bu aşamada, granüloza tabakası ismi verilir

(Junqueira ve ark 2009). Granüloza hücreleri, oositin gelişimi için gerekli östradiol, progesteron, inhibin-B ve Anti Müllarian Hormon (AMH) gibi birçok hormonal faktörü de sentezlemekle yükümlüdür (Matsuda ve ark 2012).

Zona pellüsida glikoprotein yapısında olup primer follikül aşamasında salgılanan oosit ile granüloza hücreleri arasında şekillenir (Schoenwolf ve ark 2009). Zona pellusida ZP1, ZP2 ve ZP3 olarak adlandırılan üç glikoprotein şeklinde bulunur (Matzuk ve ark 2002). ZP1 dimerlerince ZP2 ve ZP3 düzenli aralıklarla birbirlerine bağlanarak filament kompleksi oluştururlar (Junqueira ve ark 2009). ZP3 yokluğunda, farelerde follikülogenezin devam ettiği fakat ovüle olduktan sonra oositlerin oviduktlara yapışması sebebiyle farelerin infertil olduğu bildirilmiştir (Elvin ve ark 1998).

#### **1.1.1.3. Sekonder Follikül**

Büyüyen oositi çoğalan follikül epitel hücreleri çok sıralı olarak sarar ve ovaryumun daha derininde yer alırlar (Tanyolaç 1999). Hipofizden salgılanan Follikül Stimulan Hormon (FSH), büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörü, Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) ile kalsiyum iyonlarının (Ca<sup>2+</sup>) etkisiyle folliküllerin büyümesi gerçekleşir (Erdoğan ve ark. 2007, Kierszenbaum 2006). Follikül epitel (granuloza hücreleri) hücreleri çoğaldıkça follikülü çevreler ve bazal laminanın dış tarafında bulunan teka follikülü olarak da bilinen bağ doku hücrelerinden bir kılıf oluşturur (Ross 2016). Bu katman daha sonra teka interna ve teka eksterna olarak iki alt tabakaya ayrılır (Junqueira ve ark 2009). İç tarafta yer alan teka interna damarca zengin olup, çok sayıda LH reseptörü bulundurur. Östrojenin öncüsü olan androjenleri LH uyarımına cevap olarak sentezler. Teka interna tabakası, fibroblastlar, kollajen lifler ve zengin bir damar ağı içerir (McGee ve ark 2000). Teka eksterna tabakası ise düz kas hücreleri ve kollajen lifler içerir (Michael ve ark 2011). Teka tabakası, kan kapillerleri ile oosit arası madde alışverişinde görevlidir (Gürsoy ve ark. 2007).

Folliküler hücreler arasında hücreler arası boşluklar oluşarak folliküler sıvı içerirler. Bu boşluklar birleşerek antrumu meydana getirir (Abraham ve Kierszenbaum 2006). Follikül sıvısı; glikozaminoglikanlar, bazı proteinler ve yüksek konsantrasyonda steroidler bulundurur (Guyton ve ark.2001).

Antrumun oluşması, folliküler hücrelerin primer oosite göre yeniden düzenlenmesine neden olur (Abraham ve Kierszenbaum 2006).

#### **1.1.1.4. Graaf Follikülü**

Folliküler gelişim devam ederken antrum yarımaya ya da C şeklinde tek bir boşluk halini aldıktan sonra oosit antrum içinde adacık görünümüne sahiptir (Girgin ve ark. 2008). Granüloza hücreleri, anatomik ve fonksiyonel olarak farklı iki tip hücreye ayrılırlar: follikül duvarı boyunca yerleşen steroidojenik aktiviteye sahip mural granüloza hücreleri (MGH) ve kumulus-oosit kompleksi (KOK) yapısını oluşturan (kumulus hücreleri) hücrelerdir (Gilchrist ve ark 2008). Oositi çok sıralı granuloza hücreleri çevreler ve bu hücelere kumulus ovoforus denilir. Korona radiyata hücreleri olarak adlandırılan kumulus ovoforusun oosite yakın hücreleri prizmatiktir (Girgin ve ark. 2008). Bu hücreler ovulasyon sırasında oosit ile birlikte ovaryumdan ayrılmaktadır (Mescher 2015). Kumulus ovoforus hücreleri oosite protein sentezini uyarıp oosit olgunlaşması sürecine katılmaktadır (Lorenz 1995). Zona pellusida oositle korona radiyata arasında yer alır (Girgin ve ark. 2008).

#### **1.1.1.5. Ovulasyon ve Korpus Luteum Oluşumu**

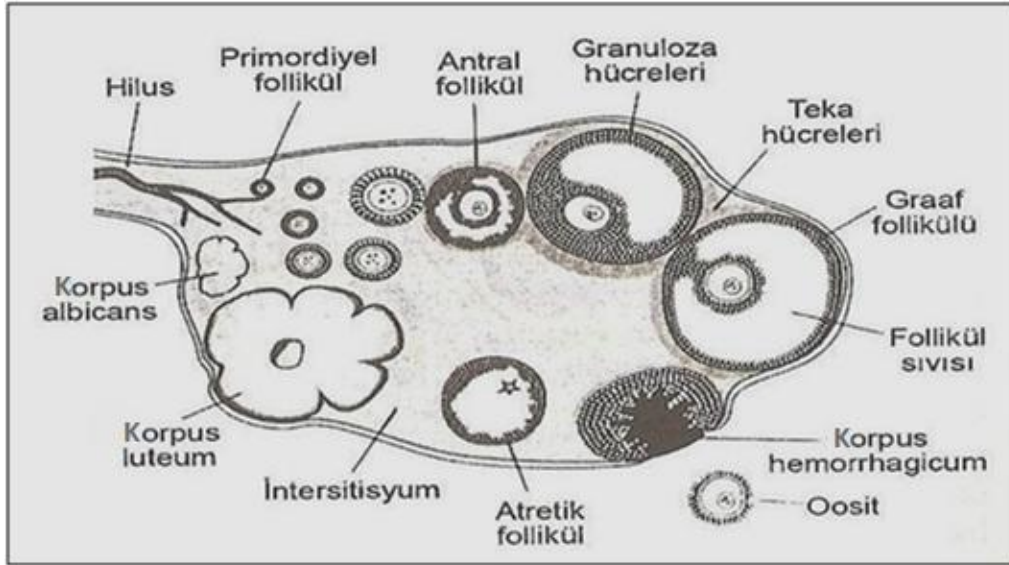
Ovulasyondan önce graaf follikülünün bulunduğu yerde stigma denilen soluk, kansız, ince duvarlı bir kabarıklık görülür (Karaöz 2002). Ovulasyon (yumurtlama) sırasında stigma bölgesinde dejenerasyonla açılan delikten follikül sıvısıyla birlikte sekonder oosit (oosit II) ve çevresindeki bir miktar kumulus hücresi periton boşluğuna atılır (Tekelioğlu 2002). Ovulasyondan sonra follikülde kalan granüloza ve teka hücrelerinden oluşan duvar derin katlantılar yapar ve teka internadaki kapillerler follikül lümenine aktıktan sonra korpus hemorajikum oluşur. Luteinizasyon sırasında hücrelerinin ve teka interna tabakasındaki hücrelerin sitoplazmalarında bulunan lipid damlacıklarının miktarı artar ve hücreler teka lutein ve granüloza lutein hücrelerine dönüşerek progesteron ve östrojen salgılayan korpus luteum (sarı cisim) yapısı oluşur (Ross 2011).



İnsan ovaryumunda follikülün ovulasyona uğraması Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) artışının LH ve FSH seviyesini düzenlemesiyle olmaktadır. Pubertede GnRH salınımı, hipofizden FSH ve LH salınımını stimüle eder. Overde ovaryan siklus (28-30 gün) hipofiz hormonlarının etkisi ile meydana gelir. Bununla beraber meydana gelen her siklusta 5-15 adet primer follikül FSH'in etkisiyle gelişip büyür ve çoğunlukla bunlardan bir tanesi olgun hale gelerek olgun oosit ovulasyon ile atılır. Geri kalan antral folliküller apoptoz ile atreziye uğrarlar (Bükülmez ve ark. 1996).

#### 1.1.1.6. Atritik Follikül

Follikül hücrelerinin ve oositin ölümüyle birlikte ovaryum folliküllerinin çoğunluğu geriler ve gerileyen bu folliküller fagositoz yapan hücreler tarafından yok edilir. Bu aşamada granuloza hücrelerinde mitoz durur, granuloza hücreleri bazal membrandan ayrıldıktan sonra follikül hücreleri dejenere olarak atritik follikül oluşur (Tekelioğlu 2002).



**Şekil 1:** Follikül gelişimi; korpus luteum ve folliküler atreziyanın şematik gösterimi (Thompson 2004).

## 1.2. TRANSFORMİNG GROWTH FACTOR- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) AİLESİ ve BMP-15

TGF- $\beta$  ailesi, fonksiyonel olarak farklı fakat yapısal olarak aynı olan en az 35 üyeden oluşan proteinleri içerir. Vücudun farklı bölgelerinde meydana gelen fizyolojik olaylarda ekstrasellüler bağlantıda görev alırlar.

Yapısal özelliklerine göre: TGF- $\beta$  alt ailesi (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3), bone morphogenetic protein (BMP) ailesi (yaklaşık 20 üyeli), growth and differentiation factor (GDF) alt ailesi (en az 9 üyeli), aktivin/inhibin alt ailesi (aktivin A, AB, B, inhibin A, B), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) alt ailesi (GDNF, artemin ve neutrin), anti- müllerian hormon (AMH) olarak gruplandırılır (Knight, Claire 2006). TGF- $\beta$  süper ailesi; hücre proliferasyonu, differensiyasyonu ve matris sekresyonu gibi gelişimsel olayların birçoğunu düzenler (McNatty ve ark 2000).

Folikülogenez boyunca; oosit granuloza hücrelerinden nutrisyonel destek ve regülatur sinyalleri alması yanında, kendisi de mikro çevresini ve gelişimsel kapasitesini artırıcı parakrin faktörler salgılamaktadır. Çoğu türde oositte GDF-9 ve BMP-15 (GDF-9B)'in haberci ribonükleik asit (mRNA) ve proteini saptanmıştır. Bu nedenle öncelikle bu proteinlerin oositte salınan parakrin faktörler oldukları ve folikülogenez boyunca oosit granuloza hücre etkileşiminde ve dolayısıyla oosit gelişiminde çok önemli oldukları düşünülmektedir (Dube ve ark. 1998).

Primordial folliküllerin primer folliküllere dönüşümleri fetal hayatta başlayıp menopoza kadar devam eder (Oktem ve ark 2008). Primordial folliküllerin primer folliküllere dönüşümünde rol alan Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) ailesinin bazı üyeleri: Bone morphogenetic proteinler, BMP-4 ve BMP-7 (Nilsson ve ark 2003); GDF-9 (oosit kaynaklı) dur (Vitt ve ark 2000). GDF-9 ve BMP-15, oositlerde preproproteinler olarak sentezlenen bu ailenin üyeleri arasındadır (Gilchrist ve ark 2008). TGF- $\beta$  süper ailesinin bir üyesi olan ve oositlerde X'e bağımlı gen tarafından eksprese edilen BMP-15 aynı zamanda GDF-9B olarak da bilinir (Otsuka ve ark 2000).

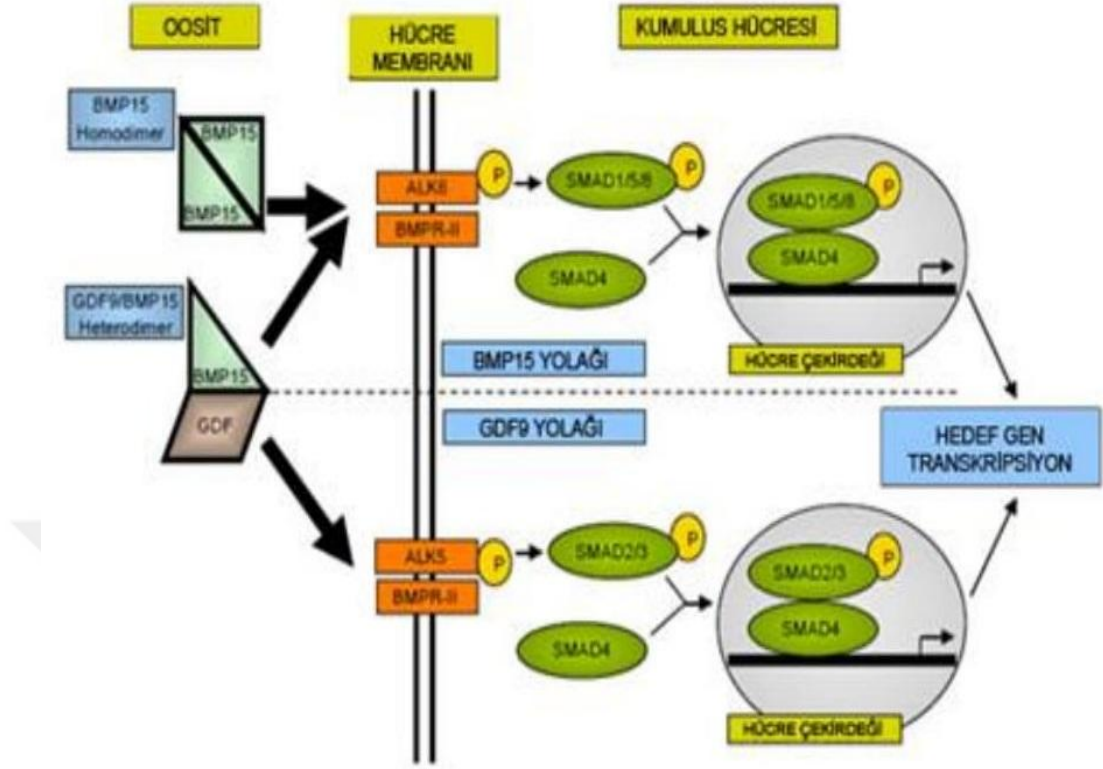
BMP-15 proteini oositlerin olgunlaştırılmasını ve folliküllerin gelişmesini homodimer bir yapı olarak ya da GDF-9 ile heterodimer bir yapı oluşturarak gerçekleştirmektedir (Carabatsos ve ark. 1998, Otsuka ve ark. 2000).

BMP-15, follikül stimüle edici hormonundan (FSH) bağımsız olarak granüloza hücrelerinin proliferasyonundan sorumludur (Otsuka ve ark 2000). BMP-15'e bağlanabilen bir bağlayıcı protein ve negatif aktiviteli follistatin tarafından BMP-15' in aktivasyonu düzenlenir. Rekombinant insan BMP-15'i kullanılan in vitro çalışmalarda BMP-15' in, FSH'dan bağımsız olarak, farklılaşmamış granüloza hücre çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir (Shimasaki ve ark. 2004). BMP-15' in FSH reseptör ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Otsuka ve ark 2000). BMP-15' in bu etkisini follistatinin (FST) antagonize ettiği izlenmiştir (Otsuka ve ark 2001). BMP-15' in diğer bir görevi ise follikül gelişimi sırasında oluşabilecek prematür luteinizasyonunda yer almaktır. BMP-15; BMP-6 ve GDF-9 ile beraber FSH tarafından indüklenen progesteron üretimini inhibe eder. Oluşabilecek erken bir luteinizasyon bu şekilde inhibe edilmektedir (Otsuka ve ark 2001).

Mitojenik sinyal iletim mekanizmaları yoluyla kumulus hücre fonksiyonunun düzenlenmesi, metabolizma, çoğalma, apoptoz, luteinizasyonda BMP-15 ve GDF-9 önemli etkilere sahiptir (Su1 ve ark 2008).

### **1.2.1. BMP-15 ve Sinyal İletimi**

BMP-15, SMAD üzerinden sinyal iletimini ya ALK-tip 1 reseptörüne ya da tip 2 reseptörüne bağlanarak gerçekleştirir. Reseptör ve SMAD'lar her iki (ALK6-BMPRII) bağlanma sonucunda da fosforillenmiş olur. BMP-15 homodimeri BMP yolağını kullanarak SMAD 1/5/8 üzerinden yolak aktive olur. SMAD 4 ile fosforile olan SMAD 1/5/8 birlikte hedef gen ekspresyonu için nükleusa geçerler (Şekil 2) (Moore ve ark 2005).



**Şekil 2:** Oosit-kumulus hücre sinyal yolağı. Marsh ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır.

SMAD 2/3 üzerinden BMP-15-GDF-9 heterodimeri aktivasyon gösterir. Hedef gen ekspresyonu için fosforile olan SMAD 2/3, SMAD 4 ile etkileşerek nükleusa geçerler. BMP-15' in ana yolağı SMAD üzerinden olmasına rağmen, BMP-15 etkisini non-SMAD yolağı (nuclear factor  $\kappa$ B, p38MAPK, SRC kinaz) üzerinden de gösterebilmektedir.

### 1.3. DİYABETES MELLİTUS

Diyabetes mellitus (DM), insülin salgısının mutlak veya göreceli eksikliği ya da insülin rezistansı ile oluşan, hiperglisemi ile kendini belli edip karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozuklukları ile karakterize olan kronik, metabolik bir hastalıktır (Yeşilot 2008). Retinopati, nöropati, nefropati, kardiyovasküler hastalıklara yatkınlık ve infertilite sorunları diyabetin sebep olduğu komplikasyonlar arasında ilk sıradadır (Quinn 2002). Genital siklusla bağlı olarak ovaryum ve uterusu mast hücresi dağılımının değiştiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Karaca 2007). Lin ve arkadaşları (2010), yaptıkları

çalışmada fare ovaryumunda diyabetin oosit gelişiminde gecikmeye neden olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada; anneksin V, Bax ve kaspaz-3 eksprese eden oosit miktarında yükselme saptanmış olup, diyabetin oositte apoptosis'ini arttırdığı ifade edilmiştir. Diyabetin sebepleri arasında genetik yatkınlık, beslenme alışkanlıkları (fast-food türü beslenme, yüksek enerjili diyetler), hareketsizlik ve çeşitli kimyasal ajanlara maruziyetler sayılabilir (American Diabetes Association 2003).

### **1.3.1. Diyabetes Mellitus' un Tipleri**

#### **1.3.1.1. Tip 1 Diyabet**

Tip 1 diyabet otoimmün hastalıktır. Pankreasın endokrin adacık beta hücrelerindeki harabiyetiyle oluşan insülin yetmezliği ile karakterize olduğu için hastaların hayatlarını devam ettirebilmesi veya diyabetik ketoasidozdan (DKA) korunması için insüline ihtiyaçları vardır (WHO 1999). Bu diyabet türü şiddetli hiperglisemi ile birlikte ani gelişen ve insülin ile tedavi olmazsa ilerleyerek ketoasidoza ve ölüme yol açan bir hastalıktır (Aral 1998).

#### **1.3.1.2. Tip 2 Diyabet**

İnsülin salgısındaki yetersizlikten, insüline dirençten veya her ikisinin bir arada olmasından dolayı ortaya çıkan diyabet türü Tip 2 diyabettir (Özbey ve ark 2003). Dokulardaki insülin hassasiyetinin azalması insülin direnci anlamına gelir. Normalde insülin, hücre yüzeylerindeki özel reseptörlerine bağlanıp glikoz metabolizmasında yer alan reaksiyonlar serisini başlatır. Tip 2 diyabette buna benzer hücre içi reaksiyonlar azalmaktadır. Böylece insülin, dokuların glikoz alımını uyarmasında ve karaciğer tarafından glikoz salınımının düzenlenmesinde daha az etkili hale gelir (Suzanne ve ark. 2010).

#### **1.3.1.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM)**

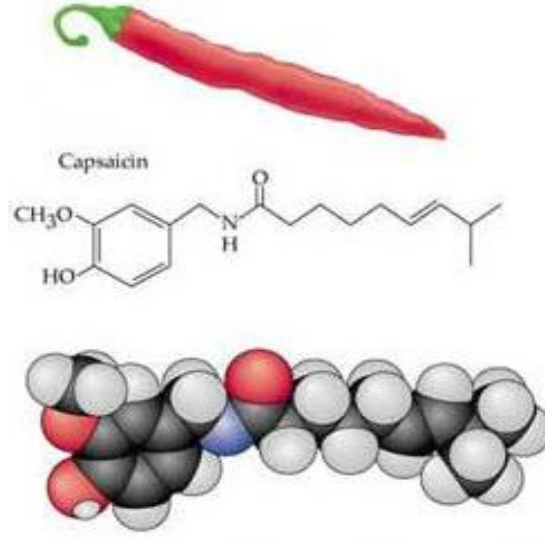
İlk olarak gebelikte tanısı konan, yani; gebelikte ortaya çıkan bir diyabet türüdür. Postpartum dönemde glukoz toleransı birçok kadında normale döner (Karakurt ve ark. 2009). Ailede diyabet öyküsünün olması, kadınlarda hamilelik yaşının 25'den büyük olması, hamilelikten önce aşırı kilolu olma durumu, önceki hamileliklerde gestasyonel diyabetes mellitus veya glukoz toleransı

bozukluğu tanımlanması ve hamilelik döneminde kan-glukoz seviyelerinin yüksek olması, gestasyonel diyabetes mellitus riskini arttıran faktörler arasındadır (Buchanan ve ark. 2005, Erdoğan ve ark. 2007).

#### **1.4. CAPSAİCİN**

İlk olarak 1846 yılında Tresh tarafından kırmızı biberin aktif bileşigi izole edilmiş ve capsaicin adı verilmiştir. Kimyasal yapı bakımından vanilloidlerle benzer olduğu için bu gruba dahil edilmiştir (Holzer 1991). Kimyasal yapısı 1919 yılında Nelson tarafından ortaya konmuştur (Nelson ve ark 1923).

Acı kırmızı biber, botanik biliminde Solanacea familyasına ait bir bitkidir. Capsicum annum olarak isimlendirilmektedir. Capsaicin; acı biberin etken maddesi olarak bilinmekte olup acı, yakıcı, beyaz ve kokusuz özellikte alkaloid (C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>) yapıda bir maddedir. Kırmızı biberlerin acılık dereceleri içerdikleri capsaicin oranına göre değişmektedir. Capsaicin'in biberdeki kuru ağırlığı ortalama 0.83-1.32 mg/g'dır (Lopez-Hernandez ve ark.). Capsicum annum; protein, askorbik asit, thiamin, kırmızı karotenoidler (capsantin, capsorubin), demir, nikotinik asit, fosfor, şeker, kalsiyum, su ve A, C, E vitaminlerini içermektedir. Limon suyuna oranla C vitamini taze biberde 4-6 misli daha fazladır (Furuse ve ark 1994). Capsaicinin türevi vanilloik asittir (Cordell ve ark. 1993). Vanilloidler endojen ve ekzojen olarak iki gruba ayrılır. Capsaicin ekzojen vanilloidler grubunda yer alır (Szallasi ve ark. 1990, Szallasi 2001). Vanilloidler periferel sinirlerde yer alırlar (Veronesi ve ark. 2002).



**Şekil 3:** Capsaisinin moleküler yapısı (<https://en.wikipedia.org/wiki/Capsaicin>) 2019

Kırmızı acı biber ile ilgili elde edilen en eski bilgiler Maya ve Azteklere dayanmaktadır. Yazıtlarından yemeklere acı biberi çeşni olarak kattıkları bununla beraber diş ağrıları ve bazı hastalıkların tedavilerinde kullandıkları anlaşılmaktadır. Meksika ve Hindistanda da inflamasyon, insanların diş ağrıları ve kabızlık tedavilerinde kırmızı acı biberden yararlanıldığı bildirilmektedir (Boyunağa ve ark.1995). Capsaicinin ağrı giderici etkisinin yanında, immun sistem (Panossian A. ve ark 1996), gastrointestinal sistem (GİS) (Zık ve ark 2007), kardiovasküler ve solunum sistemleri (Vaishnava ve ark 2003) gibi birçok sistem üzerine etkilidir. CAP'ın etkisi dozuna, uygulama şekline ve dokuya göre değişmektedir (Toth ve ark 1992). Sharma SK ve arkadaşlarına (2013) göre capsaicinin anti-kanser etkisinden dolayı pankreas, prostat, mide, kolon, meme, akciğer kanseri, lösemi, hepatosellüler karsinomada alternatif olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür. İnsanlarda öldürücü bir kanser çeşidi olan küçük hücreli akciğer kanserli farelere capsaicin uygulanması ile kanser hücrelerinin baskılandığı ve kanserin gerilediği görülmüştür (Brown ve ark. 2010).

### 1.5. STREPTOZOTOSİN (STZ)

Kimyasal adı 2-Deoksi-2-(3-Metil-3-Nitrozoüredio)-D-Glikopiranoz olan STZ, streptomycetes achromogenes tarafından sentezlenen geniş spektrumlu antibiyotiktir (Kanter ve ark. 2006). Rakieten ve arkadaşları (1963) tarafından STZ' nin diyabetojenik etkisinin varlığı tespit edilerek deneysel diyabet modeli oluşturmak için kullanılmıştır.

Deneysel diyabet modeli, laboratuvar hayvanlarında genel olarak pankreatik  $\beta$  hücrelerine karşı spesifik toksisite gösteren STZ ile oluşturulmaktadır. Pankreas  $\beta$  hücrelerinde STZ' nin oluşturduğu hasar sonucu gelişen hipoinsülinemi, hiperglisemi, tip 1 ve tip 2 diyabet modellerini oluşturmak için kullanılmaktadır (Kanter ve ark. 2006).

STZ nötral pH'da dekompoze olduğundan optimum stabilitesi için pH'sı 4-4.5 olan ortamda bulundurulup STZ çözündürülürken sitrat tamponu kullanılmalıdır (Murata ve ark 1999).

### 1.6. DİYABET, CAPSAİCİN ve BMP-15

Son yıllarda gelişmiş ülkelerde artan, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozukluğu ile seyreden kronik bir metabolizma hastalığı olan diyabeti Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) "salgın" olarak nitelendirmektedir (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en2013>).

Diyabetin kardiyovasküler riskini artırdığı (Öntürk ve ark 2007), retinopati ile körlük meydana getirdiği (<http://www.idf.org/complications-diyabetes> 2013), hamileliği olumsuz etkilediği bildirilmektedir (Küçük ve ark 2009). Diyabetin bu etkilerinden dolayı deneysel hayvan modeli oluşturularak diyabet incelenmektedir (Öntürk ve ark 2007). İnsüline bağımlı diyabetik prepubertal farelerin ovaryumlarında Cu/Zn SOD aktivitesinin azaldığı diyabetin dışı genital sistem üzerine etkisi ile ilgili çalışmalarda tespit edilmiştir (Powers ve ark 1996). Lin ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada fare ovaryumunda diyabete bağlı oosit gelişiminin gecikmeye neden olduğunu belirtmiştir. Aynı çalışmada; aneksin V, Bax ve kaspaz-3 eksprese eden oosit miktarında yükselme saptanmış olup, diyabetin oositte apoptosis'i arttırdığı ifade edilmiştir.



Capsaicinin anti-kanser etkisinden dolayı pankreas, mide, prostat, kolon, akciğer kanseri, meme, lösemi, hepatosellüler karsinomada alternatif olarak kullanılabileceği (Sharma ve ark 2013), pankreas kanser hücrelerinde ve ksenograaft tümör modellerinde, capsaicin, kanser hücre apoptozisine ve tümör regresyonuna sebep olduğu için alternatif olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Zhang ve ark 2013). Capsaicinin NF-KB ve TNF- $\alpha$  aktivasyonunu inhibe etmesi prostatik kanser hücrelerinde benzer etkilerinin varlığı tespit edilmiştir (Morı ve ark 2006). Capsaicinin, kardiyovasküler, gastrointestinal ve dermatolojik etkileri de birçok çalışmada belirtilmiştir (Sharma ve ark 2013). Capsaicinin lipid peroksidasyonunu arttırıp, yağ doku miktarı ile karaciğer ve serum trigliserid seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir. In vitro ortamda ise iskelet kaslarında glikojen metabolizmasını inhibe edici etkiye sahip olduğu izlenmiştir. Capsaicinin vücut ısısına, sindirim sistemine, kardiyovasküler sisteme etkileri olduğu belirtilmiştir (Erdost 2004).

Tütüncü ve arkadaşları (2010)'nın çalışmalarında, capsaicin reseptörü olan VR1'i uzun süre düşük doz capsaicin uygulamasının inaktive etmediği dolayısıyla sinir sonlarındaki nöropeptidlerin salınımının uyarılabildiği ve bu yol ile ovaryumda postnatal gelişme üzerine olumlu yönde etkisi olabileceği bildirilmiştir. Bununla beraber gelişmekte olan follikül yoğunluklarını artmasında ve follikül atrezisinin düşmesinde düşük doz capsaicin uygulamasının etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada; ovaryumlarda granüloza hücrelerinde, intersitisyel hücrelerde, teka follikül hücrelerinde ve korpus luteumdaki luteal hücrelerde VR1 ekspresyonun olduğu saptanmıştır.

Capsaicin; endokrin, parakrin-otokrin, immun ve sinir sistemini içeren kontrol mekanizması, dişi genital sistemin ovaryumlarında meydana gelen follikülogenezis ve atrezi olaylarını etkilemektedir (Oliveros ve ark 2001). Sensorik sinirler aracılığı ile VR1'in bu mekanizmaların işleyişinde etkili olduğu, transmitter madde salınımını uyardığı ve ovaryum follikülogenezis/atrezisine bu yolla katıldığı bildirilmektedir (Therriault ve ark 1979). Trujillo ve arkadaşları (2015), erişkin farelerin bursa ovaricaları içerisine CAP uyguladıkları çalışmanın sonucunda, ovaryum folliküler gelişiminin, duyu

sinirleriyle merkezi sinir sistemine iletilerek nöral ve endokrin yolların kullanılmasıyla gonadotropinlerin salımının oluştuğunu bildirmişlerdir.

Zık ve arkadaşlarının (2010), puberte öncesi ratlara günlük kırmızı biberden alınabilecek miktara eş değer dozda CAP uygulanmasında, CAP'ın ovaryum dokusunda follikül gelişimi üzerine etkisini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmalarında, CAP uygulanan grupta follikül atrezisinin kontrol grubuna oranla düşük olduğu bununla beraber proliferasyon faktörü olan Ki-67 ekspresyonunun ve follikül apoptozisini baskılayan NF-KB ve Xiap protein ekspresyonlarının özellikle 15 günlük CAP uygulamasında kontrol grubuna oranla yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak puberte öncesi ratlara uygun doz CAP uygulamasının, anti apoptotik özellikte NF-KB ve Xiap protein ekspresyonlarını granuloza hücrelerinde artırarak follikülleri atreziden koruyarak follikül gelişimini uyardığını ileri sürmüşler. Zık ve arkadaşlarının (2012) çalışmalarında CAP'a bağlı olarak, ovaryumda follikül gelişiminde önemli olan nitrik oksit sentaz (NOS)'ün izoformlarının ovaryum follikül tiplerinde ekspresyonlarının arttığını tespit ederek CAP'ın ovaryum follikül gelişiminde önemli olan NOS izoformları üzerinde de etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Granuloza hücre apoptozisi üzerine birçok büyüme faktörleri ve hormonlar etkilidir. Granuloza hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında TGF- $\beta$  süperailisi üyeleri önemli yer tutmaktadır. Granuloza hücreleri tarafından AMH, inhibin, aktivin, BMP 2, 5, 6 sentezlenirken, granuloza hücrelerinin düzenlenmesinde oositten sentezlenen GDF-9, BMP-6 ve 15 rol almaktadır. TGF- $\beta$  ailesinin diğer bir üyesi olan Nodal, granuloza hücrelerinde AKL-7 reseptörüne bağlanıp Akt üzerinden Smad 4'ü uyarır ve nükleusa giderek hedef proteinlerin transkripsiyonu ile granuloza hücrelerini apoptozisten korur (Gümüş ve ark 2013).

Birçok oositte GDF-9 ve BMP-15 (GDF9B)'in haberci ribonükleik asit (mRNA) ile proteininin varlığı belirlenmiştir. Bu nedenle proteinlerin oositten salınan parakrin faktörler olduklarını ve follikülogenez boyunca oosit granuloza hücre etkileşiminde etkili olduğu dolayısıyla da oosit gelişiminde önemli

oldukları düşünölmektedir (Dube ve ark. 1998). BMP-15 oosit kaynaklı bir büyüme faktörüdür. FSH'dan bağımsız olarak, BMP-15' in granölosa hücrelerinin sayıca artmasına neden olduğu izlenmiştir (Otsuka ve ark. 2000). FSH reseptör ekspresyonunu BMP-15' in baskıladığı ifade edilmiştir (Otsuka ve ark 2000). BMP-15' in bu etkisini FST tarafından karşı tepki oluşturduğu bildirilmiştir (Otsuka ve ark 2001). Follikül gelişimi sırasında oluşabilecek prematür luteinizasyonda BMP-15 yer almaktadır. BMP-15, BMP-6 ve GDF-9 ile beraber FSH tarafından indüklenen progesteron üretimini baskılar (Otsuka ve ark 2001).

Diyabetin yumurta sayısını azalttığı veya embriyonik gelişimde gecikmelere neden olduğu gösterilmiştir (Colton 2002). Diyabetin ovaryuma etkileri arasında; ovaryum ağırlığının azaldığı (Tesone ve ark. 1983), daha küçük çaplı follikülerin olduğu (Cox ve ark 1994), primer ve sekonder follikül sayılarının azaldığı (Garris 1984) atretik folliküllerin arttığı (Cox ve ark. 1994) belirtilmiştir. Oosit kaynaklı büyüme faktörü olan BMP-15 ovaryum follikül gelişiminde hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının düzenlenmesinde görevlidir (Otsuka ve ark 2000).

Diyabetik ve non-diyabetik ratlara uygulanan capsaicinin, rat ovaryumundaki BMP-15'in immunolokalizasyonu üzerine etkileri ayrıca diyabet oluşturulmuş ve capsaicin uygulanan rat ovaryumundaki histolojik ddeğişiklikler incelenmiştir.

## **2. MATERYAL VE METOD**

### **2.1. MATERYAL**

#### **2.1.1. Deneysel Hayvanı Materyali**

Deneyde ratlara yapılan uygulamalar için Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi KAÜ-HADYEK/2018-046 kodlu Etik Kurulu onayı alındı. 40 adet Sprague-Dawley ırkı sıçan kullanıldı. Çalışmada kullanılan ratlar STZ diyabet (n=10), sadece capsaisin uygulananlar (n=10), capsaisin uygulanan STZ diyabetli (n=10) ve kontrol (n=10) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Gruplara ayrılan ratların 2 hafta boyunca herhangi bir uygulama yapılmadan ortama adaptasyonu sağlandı. Çalışma süresince ratlar  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  ortam sıcaklığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda standart şeffaf rat kafeslerinde barındırılıp, standart rat yemi ve musluk suyu ile beslendi.

### **2.2. METOD**

#### **2.2.1. Deneysel Diyabet Oluşturulması**

Ratlara pH 4,5 deki 0.1 M sitrat tamponu içinde eritilen streptozotosin'in (STZ) 45 mg/kg intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonu ile deneysel diyabet oluşturuldu (Das ve ark. 1996). Deneysel diyabet oluşturulmadan önce denekler 8 saat aç bırakılıp, STZ uygulamasından 6 saat sonra yine standart rat yemi ve içme suyu vermeye devam edildi. STZ uygulamasından 72 saat sonra, 8 saatlik açlık sonrası ratların kuyruklarından alınan kanlarda glukometre ile kan şekeri düzeylerine bakıldı. Kan şekeri düzeyi 200 mg/dL'nin üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edilerek çalışmaya dahil edildi (Kanitkar ve Bhonde 2004).

#### **2.2.2. Canlı Ağırlık Ölçümü ve Kan Glukoz Değerlerinin Ölçümü**

Deneyin başlangıç zamanı 0 kabul edilerek, 0, 3 ve 14. günlerde tüm gruplardaki ratların canlı ağırlıkları hassas dijital terazi (Precisa- XB220A) ile ölçüldü. Ratların kan-glikoz değerleri ise 8 saatlik açlık sonrası 0, 3 ve 14. günlerde ölçüldü. STZ uygulamasından 72 saat sonra 8 saat aç bırakılan ratların orbital sinüslerinden hematokrit tüpü ile alınan kanda, kan- glikoz

değerleri el glukometresi (Accu- Chek- Go, Roche) kullanılarak ölçüldü. Kan glikoz değeri 200 mg/dl ve üzerinde olanlar diyabet kabul edildi (Kanitkar ve Bhonde 2004).

### **2.2.3. Capsaicin Uygulanması**

Capsaicin uygulamasına, diyabet oluşumunun teyit edildiği 3. günden sonra başlandı. 2 hafta boyunca hem diyabetik gruba hem de sadece capsaicin uygulanacak gruba her gün 1 mg/kg dozunda capsaicin, %10 ethanol, %1 Tween 20 ve %80 distile su ile çözdürüldükten sonra subkutan olarak uygulandı. Kontrol grubuna ise CAP yerine 1 mg/kg dozdaki %10 ethanol, %1 Tween 20 ve %80 distile su içeren karışım subkutan yolla uygulandı.

### **2.2.4. Histolojik İnceleme**

Çalışmada kullanılacak ratların ovaryum dokuları, 14. günde vücut ağırlıkları tartıldıktan sonra eter anestezi altında servikal dislokasyonla alındı. Ratların siklus yönü ile diöstrus aşamasında olduğu gözlemlendi. Alınan ovaryum dokusu örnekleri immunohistokimyasal ve histolojik çalışmalar için %10'luk formaldehitte ve bouin solüsyonlarında tespit edildi. Doku örnekleri sonrasında rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Krom-alum-jelatin ile kaplanmış lamlara hazırlanan parafin bloklarından 5 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) kalınlığında seri kesitler alındı. Hangi doku üzerinde çalışıldığını göstermek ve dolayısıyla dokuyu bütün olarak gözlemlemek amacı ile alınan kesitlere Crossman'ın üçlü boyaması (Triple Boyama), Hematoksilen & Eosin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları uygulandı (Luna 1968). Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus Bx53, Japan) değerlendirilerek gerekli görülen olgular fotoğraflandırıldı.

### 2.2.5. İmmunohistokimyasal İnceleme

BMP-15' in ovaryum dokusundaki immunolokalizasyonunu belirlemek için Avidin-biotin-peroksidaz kompleks (ABC) tekniği kullanıldı (Hsu SM. ve ark 1981). Alınan ovaryum dokusu örneklerinden hazırlanan parafin bloklardan 5 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) kalınlığında seri kesitler alındı. Ardından dokulardan alınan kesitlere deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemleri uygulandı. Sonrasında kesitler fosfat buffered salin (PBS) (0,1 M, PH, 7,2)'de çalkalanarak endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 0,1 M'lik PBS'te hazırlanmış % 3'lük  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'de 15 dk. süre ile inkube edildi. Kesitler daha sonra tekrar PBS ile (3x5 dk.) yıkandı. Ardından doku kesitleri spesifik olmayan bağlanmalarını engellemek amacıyla bloking solüsyon (Ultra V Blok, %10'luk) ile inkube edildi. Sonra kesitler 4 °C'de bir gece poliklonal anti BMP-15 (bs-6612R-Biotin) (1:75) antikor ile üretici firmanın önerisi doğrultusunda inkube edildi. İnkübasyonun ardından yine PBS te yıkandıktan sonra kesitlere biotinlenmiş sekonder antikor ilave edildi ve 30 dk. oda sıcaklığında tutuldu. PBS ile yıkama sonrası kesitler streptavidin horse radish peroksidaze ile (str.HRP) oda sıcaklığında 15 dk. süreyle inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan (3x5 dk) sonra kromojen uygulaması için DAB- $\text{H}_2\text{O}_2$  tekniği kullanıldı (Shu ve ark 1988). Sonrasında zıt boyama için 15 sn süre ile hematoksilin uygulandı. Devamında rutin histolojik işlemlerden (dehidrasyon, saydamlaştırma) geçirildikten sonra sabit preparat haline getirilen preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus Bx53, Japan) tek tek incelenerek fotoğrafları çekildi. Kesitlerde, boyanan hücrelerin boyanma derecesi kriter olarak semikantitatif bir yöntemle skorlama yapıldı. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), +1 (zayıf boyanma), +2 (orta boyanma), +3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi (Okihiro ve ark. 2000).

İmmunoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını tespit etmek amacı ile her 4 gruptan alınan ovaryum kesitleri bütün işlemler aynı olmak koşulu ile primer antikor ilave edilmeksizin (omission control) PBS'te tutuldu ve diğer işlemler aynen uygulandı.

### 2.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Gruplar arasında istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde Minitab 12 paket programında ANOVA analizi yapıldı. Gruplar arası immünohistokimyasal yoğunluğu Minitab 12 paket programında Kruskal-Wallis analizi ile tespit edildi.



### 3. BULGULAR

Çalışmamızda ratların canlı ağırlıkları, kan-glikoz değerleri, ovaryumlardaki folliküller (primer follikül, sekonder follikül, graaf follikülü), atretik follikül ve korpus luteum sayıları ile histolojik ve immunohistokimyasal bulgular değerlendirilmiştir.

#### 3.1. Canlı Ağırlık Bulguları

Grupların kendi aralarında değerlendirilen canlı ağırlık bulguları aşağıdaki tabloda verilmiştir (**Tablo 1**). 0, 3 ve 14. günlerde canlı ağırlık değerlendirmeleri yapılmıştır.

**Tablo 1.** Gruplara ait canlı ağırlıklarının değerlendirilmesi

a, b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiki olarak önemlidir. (P<0.001). A, B; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiki olarak önemlidir. (P<0,001). (-) :P>0,05, (\*\*): P<0,001

GRUPLAR	0.GÜN	3.GÜN	14.GÜN	F	P	
KONTROL	208,80±5,44	231,10±4,45	222,10±4,34 <sup>a</sup>	2,16	1,135	—
CAPSAİCİN	207,10±3,98	212,80±4,35	217,10±3,91 <sup>a</sup>	1,51	0,239	—
DİYABET	209,10±3,6 <sup>A</sup>	205,80±3,2 <sup>A</sup>	179,60±2,08 <sup>Bb</sup>	27,72	0,000	***
DİYABET + CAPSAİCİN	210,60±3,8 <sup>A</sup>	208,30±5,1 <sup>A</sup>	189,50±2,33 <sup>Bb</sup>	8,53	0,001	***
F	0,12	0,66	39,24			
P	0,950	0,579	0,000			
	—	—	***			

Kontrol grubu ile capsaicin grubunun canlı ağırlık ortalaması kendi içlerinde istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunmadı. Diyabet ve diyabet + capsaicinli grupların canlı ağırlık ortalamasının kendi içinde değerlendirilmesinde günlere göre istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark belirlendi (P<0.001). Gruplar arası canlı ağırlık ortalaması



değerlendirilmesinde ise istatistiksel olarak diyabet ve diyabet + capsaicinli grupların canlı ağırlık ortalaması kontrol ve capsaicinli gruplara oranla anlamlı bir fark tespit edilirdi ( $P < 0.001$ ). **Tablo 1'**de görüldüğü üzere diyabetli ve diyabet + capsaicinli gruplarda ortalama canlı ağırlıkta zamana bağlı olarak azalma olduğu tespit edildi.

### 3.2. Kan-Glikoz Değerleri

Deneyisel uygulamada tüm gruptaki deneklerin kan-glikoz değerleri 0, 3 ve 14. günlerde ölçüldü.

**Tablo 2.** Gruplara ait kan-glikoz değerleri (mg/dl).

a, b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiksel olarak önemlidir. A, B: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiksel olarak önemlidir. (-):  $P > 0.05$ , (\*\*):  $P < 0,001$

GRUPLAR	0.GÜN	3.GÜN	14.GÜN	F	P	
KONTROL	110,50±2,61	109,90±2,57 <sup>b</sup>	114,10±1,46 <sup>b</sup>	1,00	0,382	—
CAPSAİCİN	107,30±2,37	110,30±2,44 <sup>b</sup>	112,30±1,40 <sup>b</sup>	1,41	0,263	—
DİYABET	109,50±1,9 <sup>B</sup>	396,60±7,18 <sup>Aa</sup>	414,80±7,93 <sup>Aa</sup>	743,90	0,000	***
DİYABET + CAPSAİCİN	112,80±1,8 <sup>A</sup>	405,30±6,59 <sup>Ba</sup>	410,30±9,31 <sup>Ba</sup>	651,21	0,000	***
F	1,06	1049,21	777,48			
P	0,380	0,000	0,000			
	—	***	***			

Diyabet ve diyabet + capsaicin gruplarının kendi içlerinde deneyin başlangıcı olarak kabul edilen 0. gündeki ortalama kan-glikoz değeri ile 3 ve 14. günlerdeki ortalama kan-glikoz değerleri arasında istatistiksel düzeyde ( $P < 0.05$ ) anlamlı bir fark tespit edildi. (**Tablo 2**).

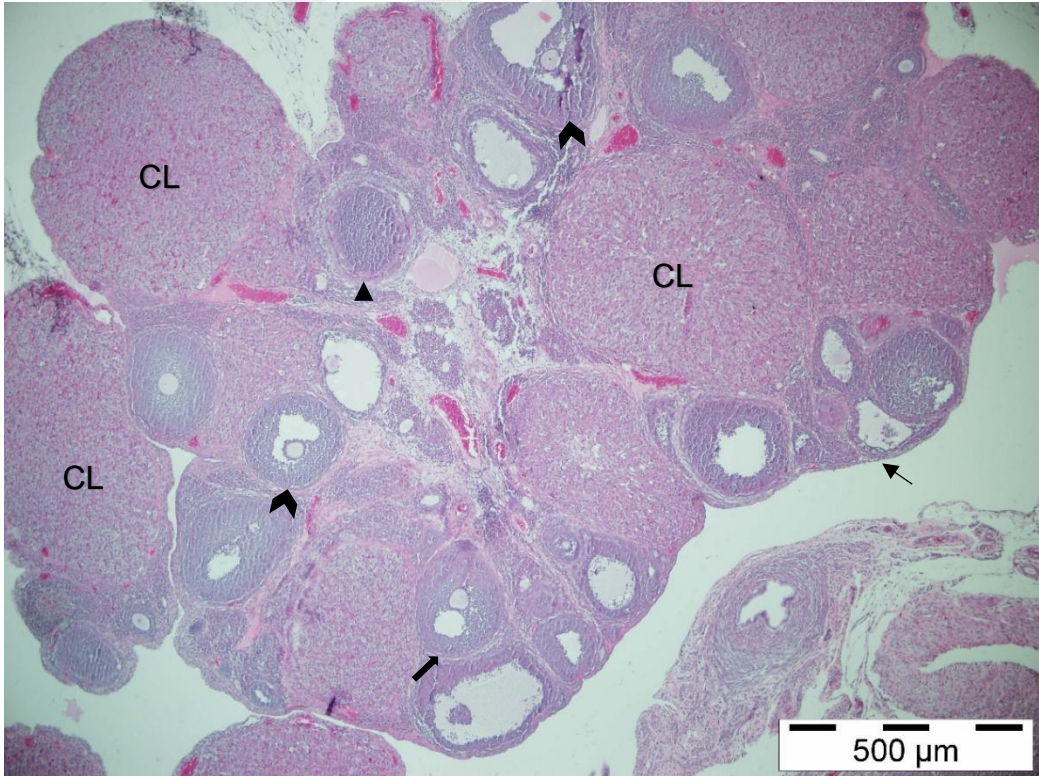
Ayrıca diyabet ve diyabet + capsaicin gruplarının kan glukoz düzeylerinin kontrol ve capsaicin gruplarına göre istatistiksel anlamda önemli fark

olduğu tespit edildi ( $P < 0,05$ ). Bu verilere göre, STZ uygulamasını takip eden 72 saatte diyabet ve diyabet + capsaicin gruplarında diyabet olduğu ve bir aylık çalışma sürecinin sonuna kadar kan-glikoz düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü.

### 3.3. Histolojik Değerlendirme

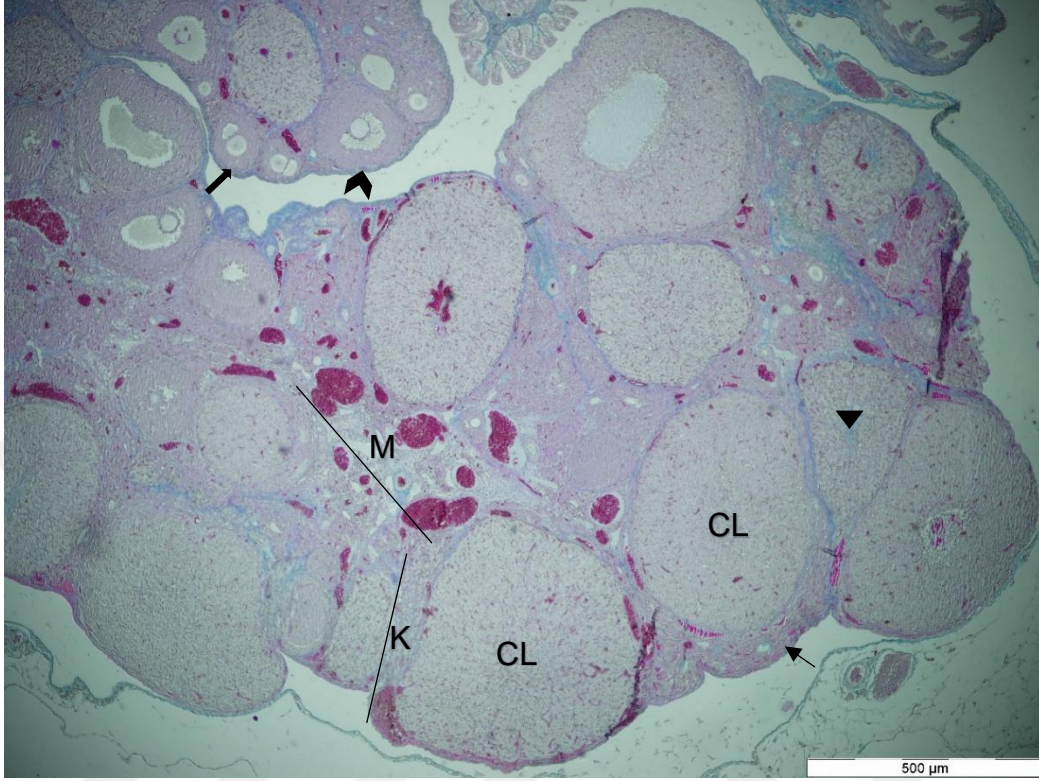
Tüm gruplardaki rat ovaryumlarından elde edilen kesitler Periyodic Asid Schiff (PAS), Crossman ul boyaması (triple boyama) ve Hematoksilin & Eosin (H&E) boyama yöntemleriyle boyandı ve ışık mikroskopunda alınan kesitler incelendi.

Ovaryumun histolojik yapısı incelendiğinde; ovaryum dokusunun etrafında germinatif epitel gözlemlendi (**Resim 1**). Yapısal olarak ovaryum dokusunun korteks ve medulla bölgeleri belirlenerek korteks bölgesinde folliküller (primer follikül, sekonder follikül, graaf follikülü, atretik follikül) tespit edildi (**Resim 1, Resim 2**).

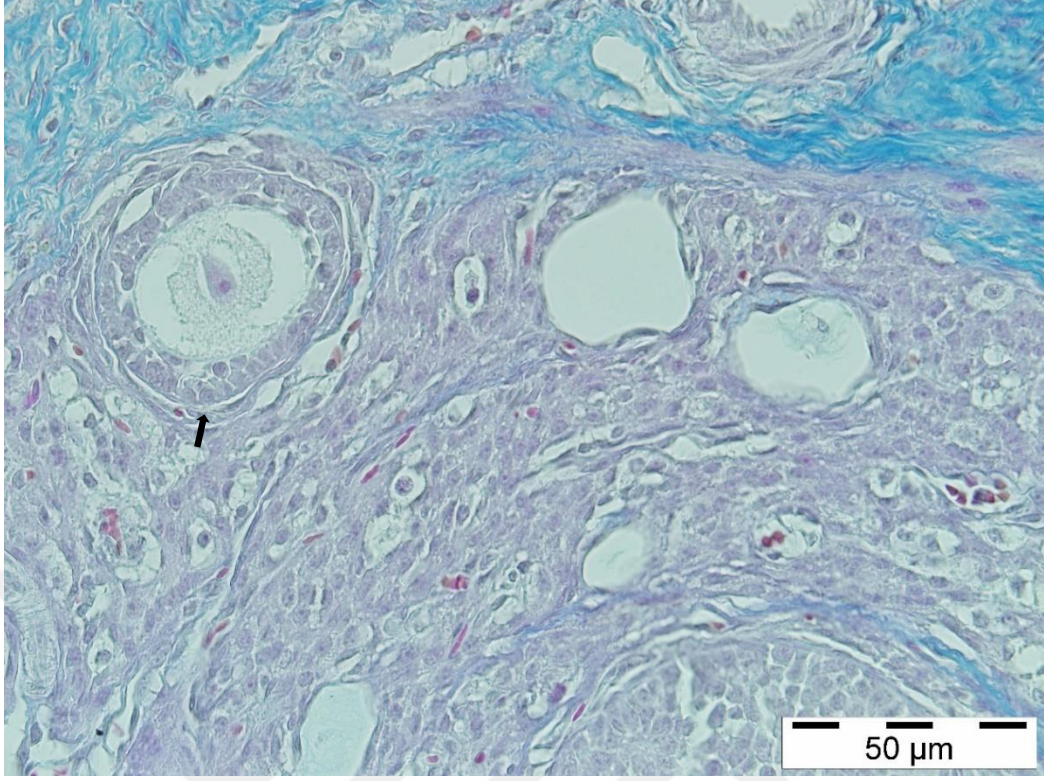


**Resim 1.** Capsaicin grubu genel görünüm. (**İnce ok:** Germinatif epitel, **kalın ok:** Sekonder follikül, **Ok başı:** Graaf follikülü, **CL:** Korpus luteum, **gen:** Atretik Follikül). H&E

Primer folliküllerin oositin etrafını çevreleyen çok katlı kübik epitel hücrelerden (granuloza hücrelerinden) oluştuğu gözlemlendi (**Resim 3**).



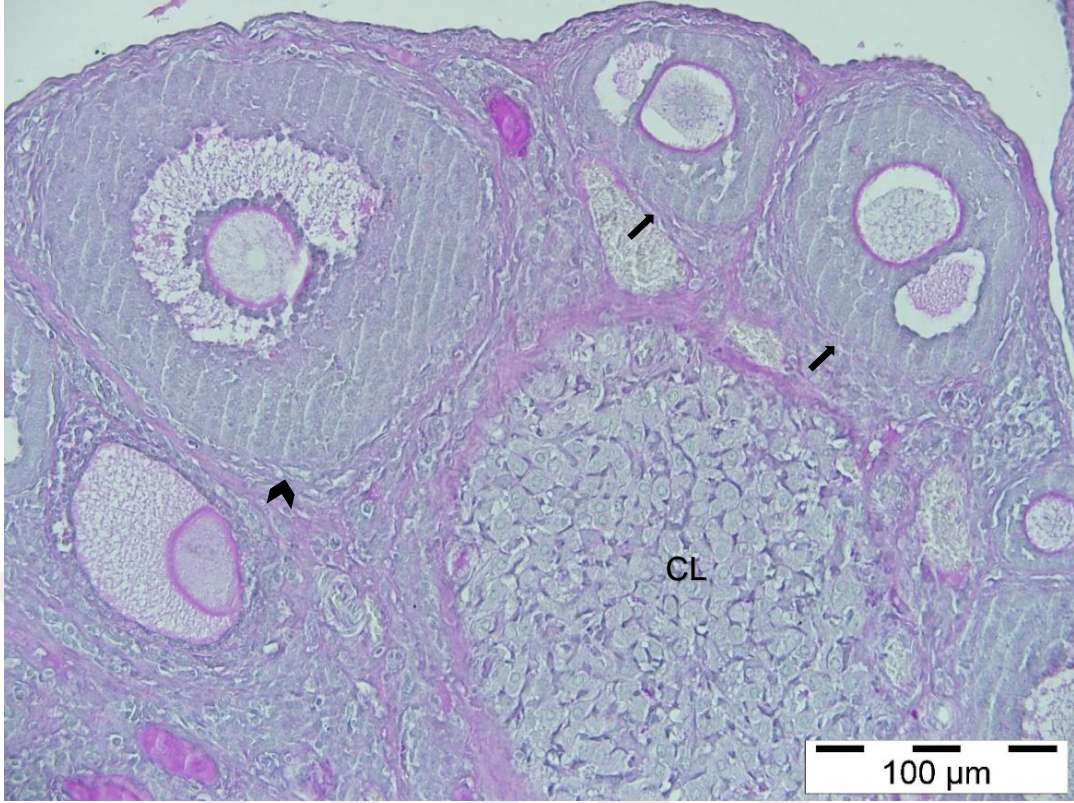
**Resim 2.** Kontrol grubu ovaryum dokusu genel görünümü (**İnce ok:** Germinatif Epitel, **Kalın Ok:** Sekonder follikül, **Ok başı:** Graaf follikülü, **CL:** Korpus luteum, **Üçgen:** Atretik Follikül, **M:** Medulla, **K:** Korteks). Triple boyama



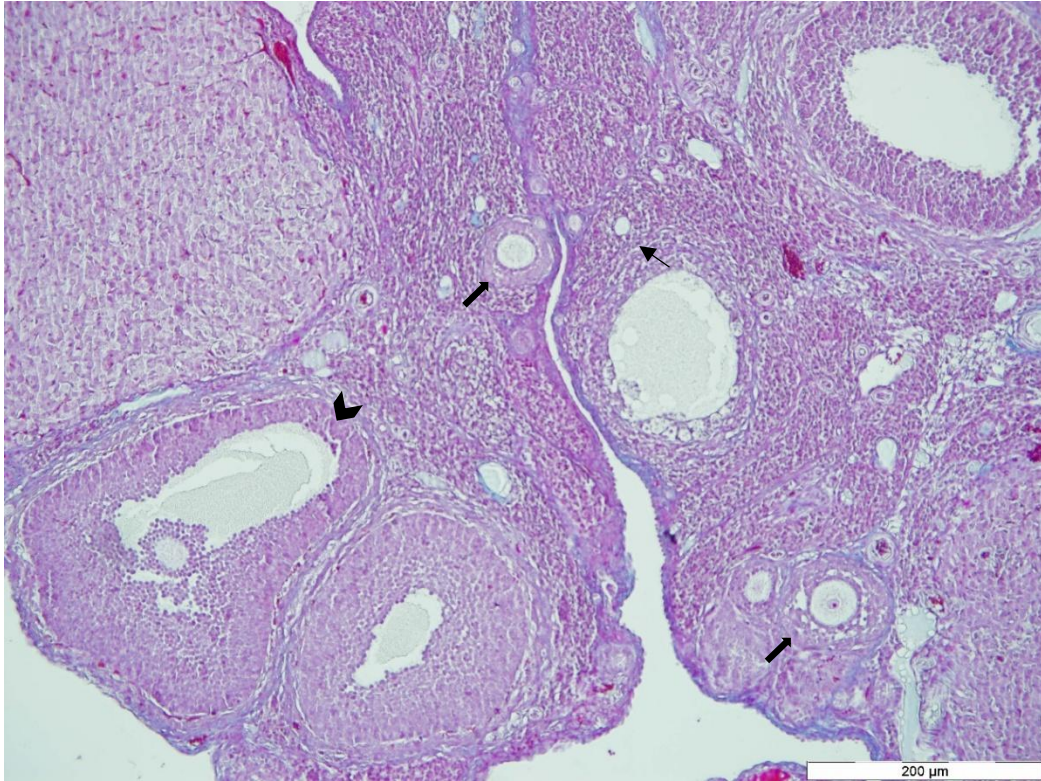
**Resim 3.** Kontrol grubu ovaryum dokusu primer follikül (**Ok**). Triple boyama

Sekonder folliküllerin oosit ve oositi çevreleyen birkaç katlı granuloza hücre tabakasından oluştuğu (**Resim 4, Resim 5**), primordiyal folliküllerin tek katlı epitel hücreleri ile çevrili olan oositten oluştuğu (**Resim 5**), graaf folliküllerin granuloza hücre katmanı içinde antrum boşluğu, kumulus ovoforus ve teka tabakası belirgin olarak gözlemlendi (**Resim 6, Resim 7**). İncelenen ovaryum dokusunda korpus luteumlar (**Resim 7**) tespit edildi.

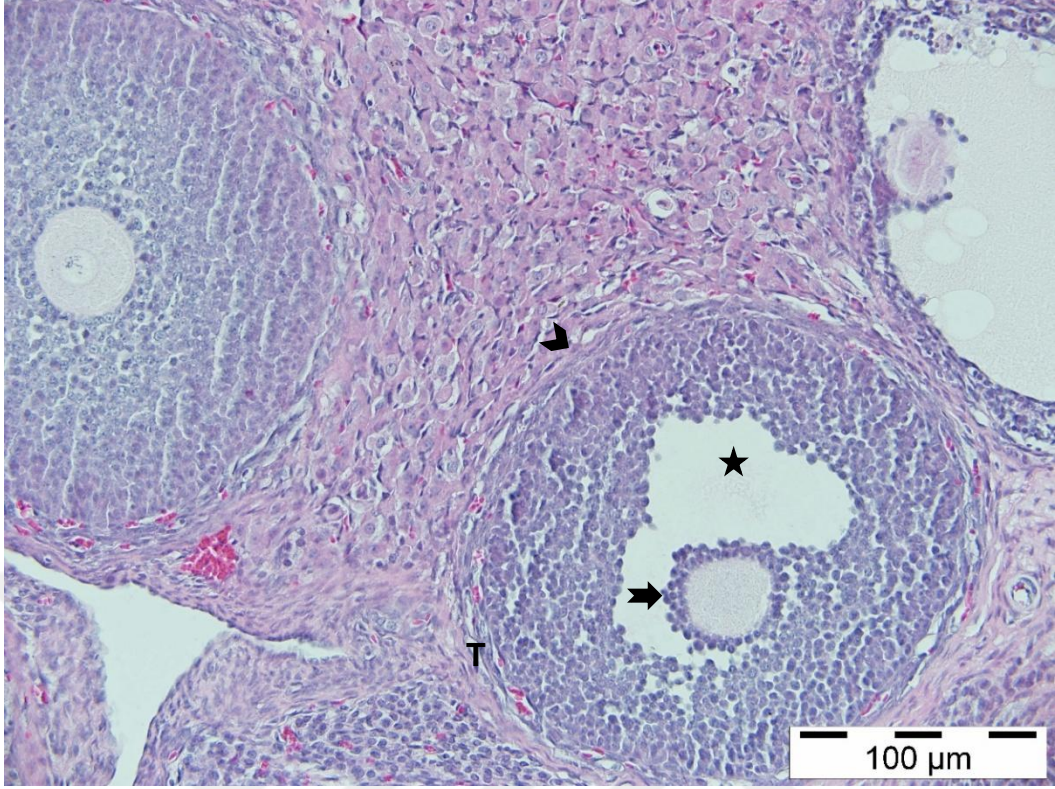
Kontrol ve capsaisin gruplarında histolojik değişiklikler gözlemlenmedi. Diyabetik ratların ovaryumunda bulunan bazı follikül epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler ve disorganizasyon gözlemlendi (**Resim 8**) ayrıca bazı folliküllerin follikül epitel hücrelerinde yıkımlanma ve dejeneratif değişiklikler ile birlikte antrumda yıkımlanmış hücre döküntüleri tespit edildi (**Resim 9**).



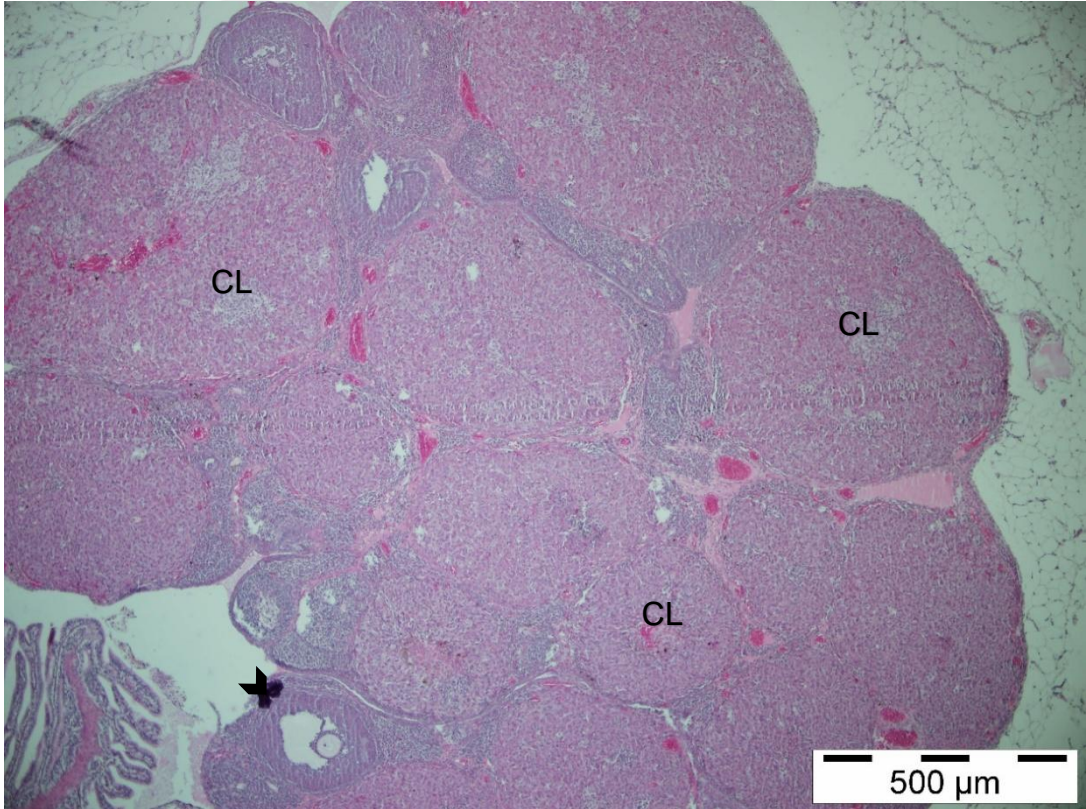
**Resim 4:** Kontrol grubu genel görünüm (**Ok:** sekonder follükül, **ok başı:** graaf follükülü,**CL:** korpus luteum). PAS boyama.



**Resim 5.** Kontrol grubu ovaryum dokusu. **İnce ok:** primordiyal follükül, **kalın ok:** sekonder follükül, **ok başı:** graaf follükülü. Triple boyama.



**Resim 6:** Capsaicin grubu ovaryum dokusu. **Ok başı:** graaf follikülü, **yıldız:** antrum, **ok:** kumulus ovoforus, **T:** teka tabakası. H&E.



**Resim 7:** Diyabet grubu ovaryum dokusu **ok başı:** graaf follikülü, **CL:** korpus luteum. H&E.

Foliküller (primer, sekonder, graaf, atretik) ve korpus luteum sayıları için yapılan değerlendirme **tablo 3' te** verilmiştir.

Primer follikül sayısı kontrol grubuna göre capsaicin ve diyabet grubunda azalmış, diyabet + capsaicin grubunda çok az bir farkla artış göstermiştir. Fakat sayısal olarak farklılık görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Sekonder follikül sayısı olarak diyabet ve diyabet + capsaicin gruplarında kontrol grubuna göre azalma varken capsaicin grubunda artış olmuştur. Sayısal olarak gözlemlenen değişimin istatistiksel olarak önemi bulunmamıştır.

**Tablo 3:** Follikül sayılarının değerlendirilmesi.

a, b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiki olarak önemlidir.

(-):  $P > 0,05$ , (\*\*):  $P < 0,01$

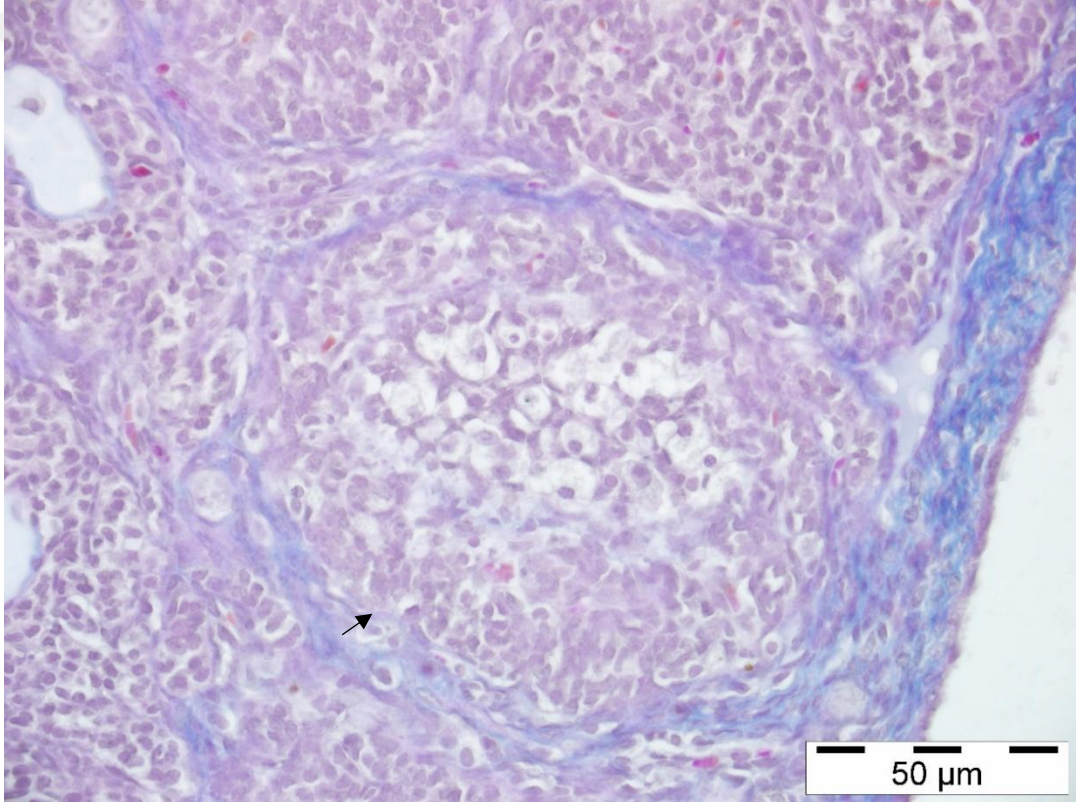
	<b>PRİMER FOLLİKÜL</b>	<b>SEKONDER FOLLİKÜL</b>	<b>GRAAF FOLLİKÜLÜ</b>	<b>ATRETİK FOLLİKÜL</b>	<b>CORPUS LUTEUM</b>
<b>KONTROL</b>	3,41±0,40 <sup>a</sup>	2,35±0,43 <sup>a</sup>	0,93±0,15 <sup>a</sup>	3,97±0,53 <sup>a</sup>	6,94±0,69 <sup>a</sup>
<b>CAPSAİCİN</b>	2,71±0,47 <sup>a</sup>	2,77±0,49 <sup>a</sup>	0,93±0,07 <sup>a</sup>	3,94±0,33 <sup>a</sup>	6,94±0,81 <sup>a</sup>
<b>DİYABET</b>	2,06±0,33 <sup>a</sup>	1,77±0,28 <sup>a</sup>	0,53±0,13 <sup>a</sup>	2,94±0,41 <sup>a</sup>	8,88±0,93 <sup>a</sup>
<b>DİYABET + CAPSAİCİN</b>	3,35±0,44 <sup>a</sup>	1,82±0,27 <sup>a</sup>	1,20±0,26 <sup>b</sup>	3,94±0,29 <sup>a</sup>	4,94±0,44 <sup>b</sup>
<b>F</b>	2,38	1,56	2,64	1,58	4,74
<b>P</b>	0,078	0,209	0,058	0,202	0,005
	-	-	-	-	**

Graaf follikül sayısı gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol grubuna oranla diyabet grubunda azalma, diyabet + capsaicin grubunda artış

bulunmaktadır. Capsaicin grubunun ise sayısal oranı değişmemiştir. Bu oranlar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

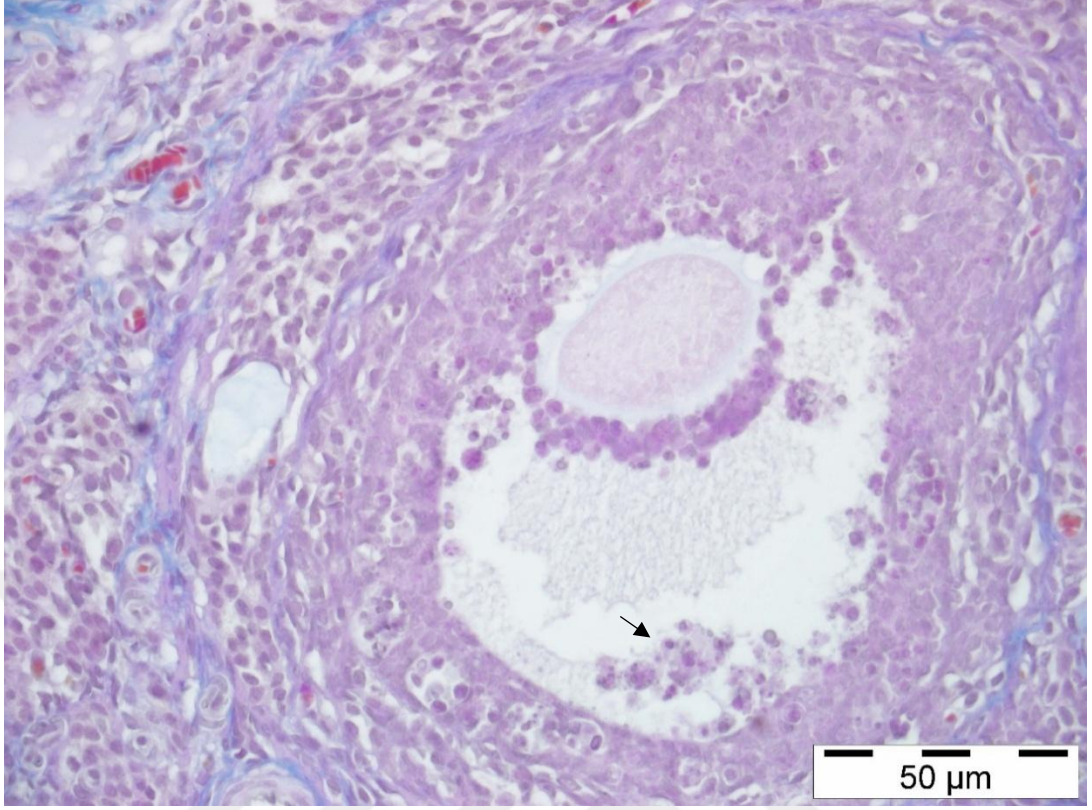
Atretik follikül sayısı capsaicin grubu ve diyabet + capsaicin gruplarında kontrol grubuna göre çok az bir farkla azalış varken diyabet grubunda anlamlı olarak sayısal azalma vardır. Sayısal olarak gözlemlenen azalışın istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edildi.

Korpus luteum sayıları açısından kontrol ve capsaicin grupları ve diyabet grupları arasında fark bulundu. Ancak diyabet + capsaicin ile diğer gruplar arasında istatistiki açıdan önemli fark bulundu.



**Resim 8:** Diyabet grubu follikül epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler ve disorganizasyon (ok). Triple boyama





**Resim 9:** Diyabet grubu antrumda yıkılmış hücre döküntüleri (ok). Triple boyama

### 3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

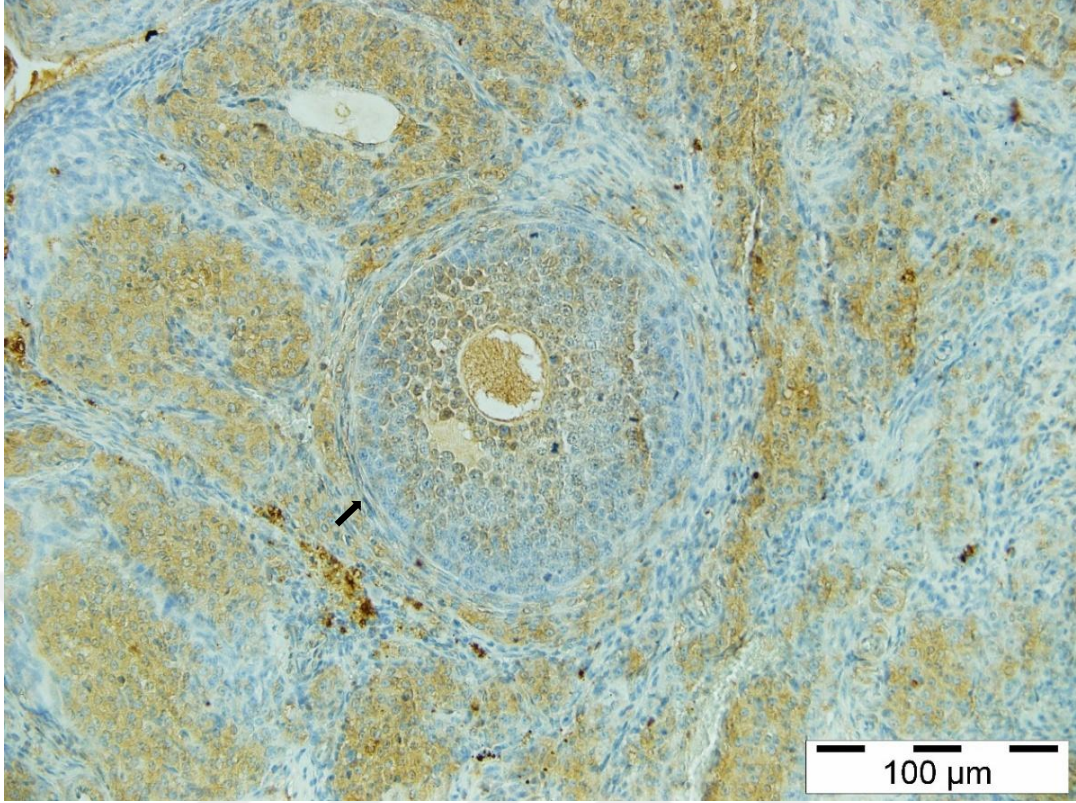
Tüm gruplara ait ovaryum dokuları BMP-15 immunoreaktivitesi yönünden incelendi. **Tablo 4**'te görüldüğü gibi BMP-15 immunreaktivitesinin kontrol, diyabet, capsaicin ve diyabet + capsaicin gruplarında benzer bölgelerde olduğu, folliküllerin (primer, sekonder, graaf) oositlerinde, granuloza hücrelerinde ve olgun folliküllerin (sekonder, graaf) folliküler sıvısında olduğu tespit edildi (**Resim 10, Resim 11, Resim 12**). Ayrıca ovaryumun medulla katmanında ve folliküller arasında bulunan intersitisyel hücrelerde immunoreaktivite tespit edildi (**Resim 13, Resim 14**)

**Tablo 4:** Gruplara ait ovaryum dokusunda BMP-15 immunoreaktivite yoğunluğunun değerlendirilmesi. (-= İmmunoreaktivite yok += Az yoğun, += Orta derecede yoğun, +++= Çok yoğun)

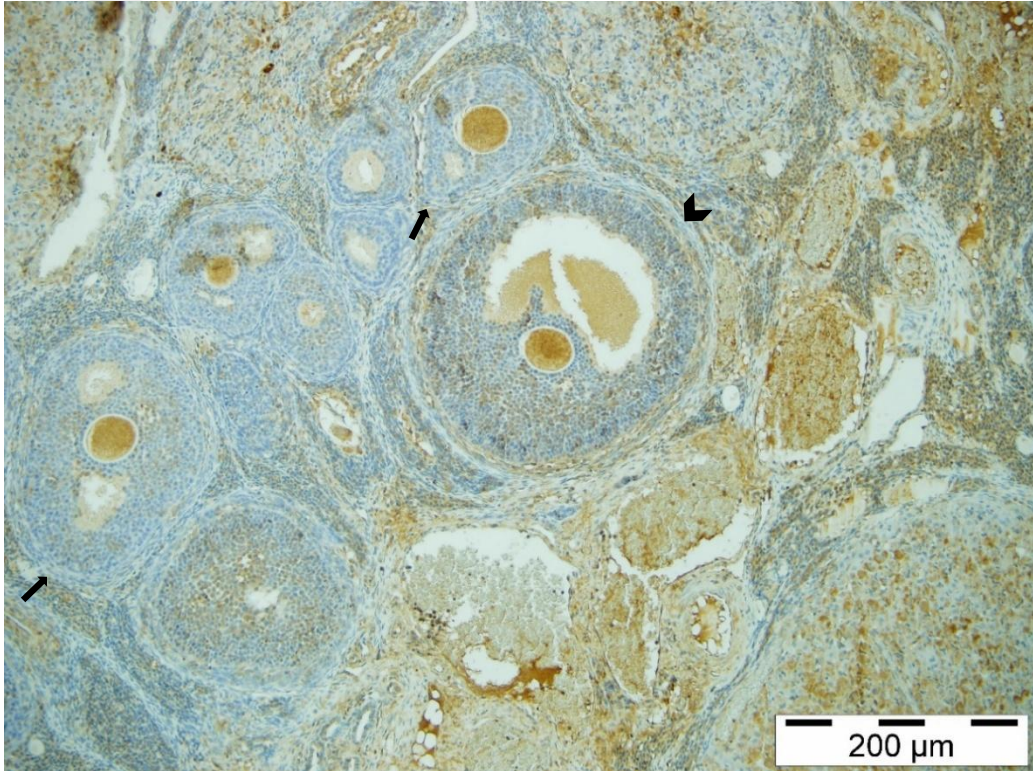
GRUPLAR	KONTROL	DİYABET	CAPSAİCİN	DİYABET + CAPSAİCİN
OOSİT	+++	+++	+++	+++
GRANULOZA HÜCRELERİ	++	+	+++	+++
ANTRUM	-	+	++	+
KORPUS LUTEUM	+++	++	+++	+++

BMP-15 immunoreaktivitesine ovaryum dokusunda korteks bölgesinde, follikül granuloza hücrelerinde, oositlerde, graaf follikül antrumunda, korpus luteum içerisinde tek tek hücrelerde rastlandı (**Resim 11**)

Oositlerde bulunan immunoreaktivitenin tüm gruplarda benzer olduğu belirlendi. Granuloza hücrelerindeki immunoreaktivitenin en yoğun capsaicin ve diyabet + capsaicin gruplarında, kontrolde orta düzeyde diyabette ise en düşük düzeyde immunoreaktivite görüldü (**Resim 10**). Antrumda kontrolde immunoreaktivite görülmedi fakat diyabet ve diyabet + capsaicin gruplarında benzer düzeyde, capsaicinde yüksek düzeyde immunoreaktivite görüldü (**Resim 12**)



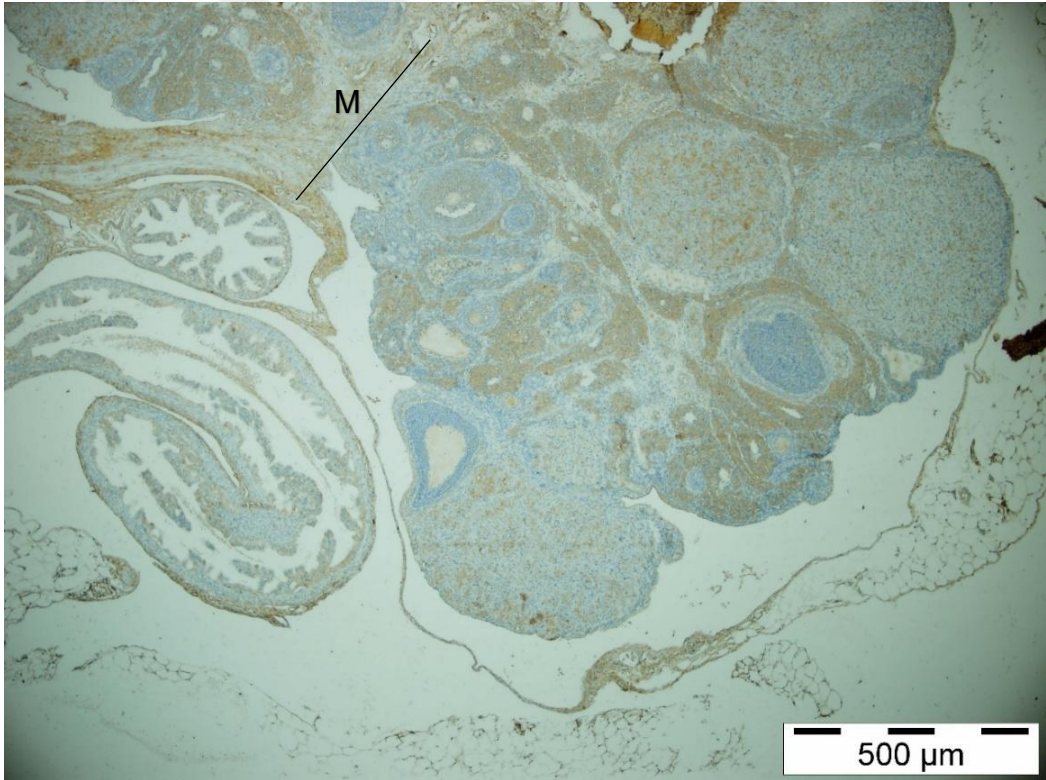
**Resim 10.** Capsaicin grubu BMP-15 immunoreaktivitesi. **Ok:** Sekonder follikül.



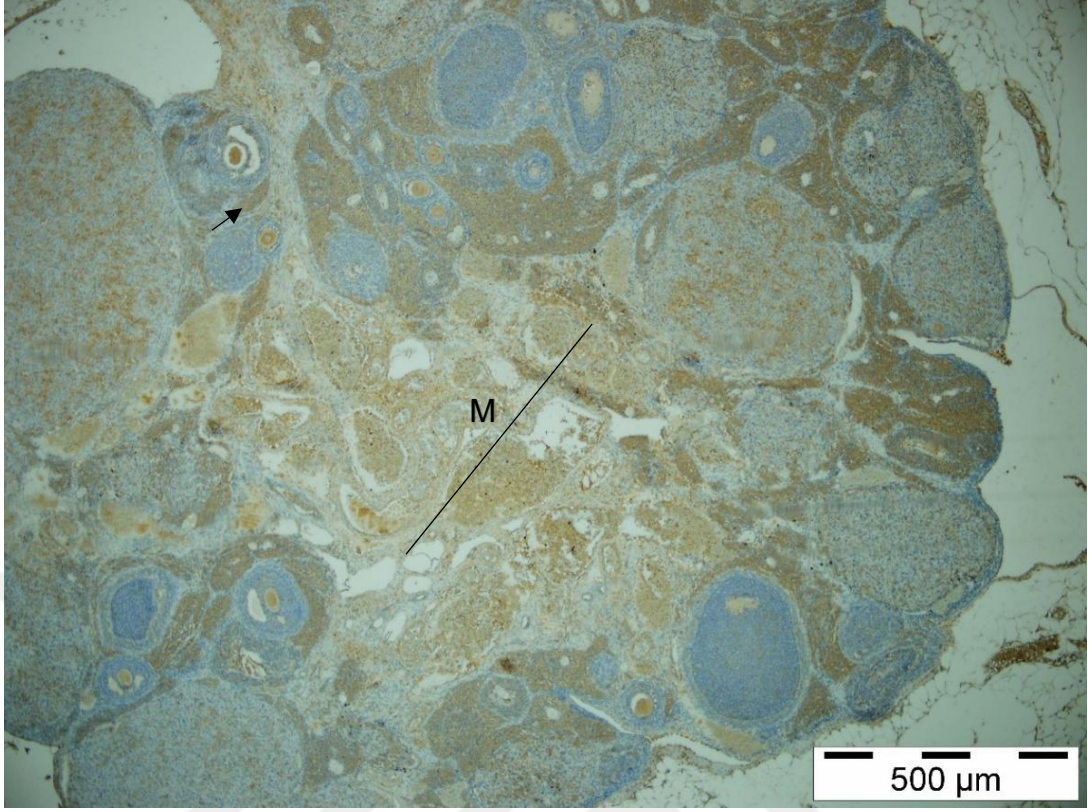
**Resim 11.** Diyabet grubu BMP-15 immunoreaktivitesi. **Ok:** Sekonder follikül,  
**Ok başı:** Graaf follikülü.



**Resim 12.** Diyabet+Capsaicin grubu BMP-15 immunoreaktivitesi. **Ok:** Sekonder follikül, **Ok başı:** Graaf follikülü



**Resim 13.** Kontrol grubu BMP-15 immunoreaktivitesi. **M:** Medulla

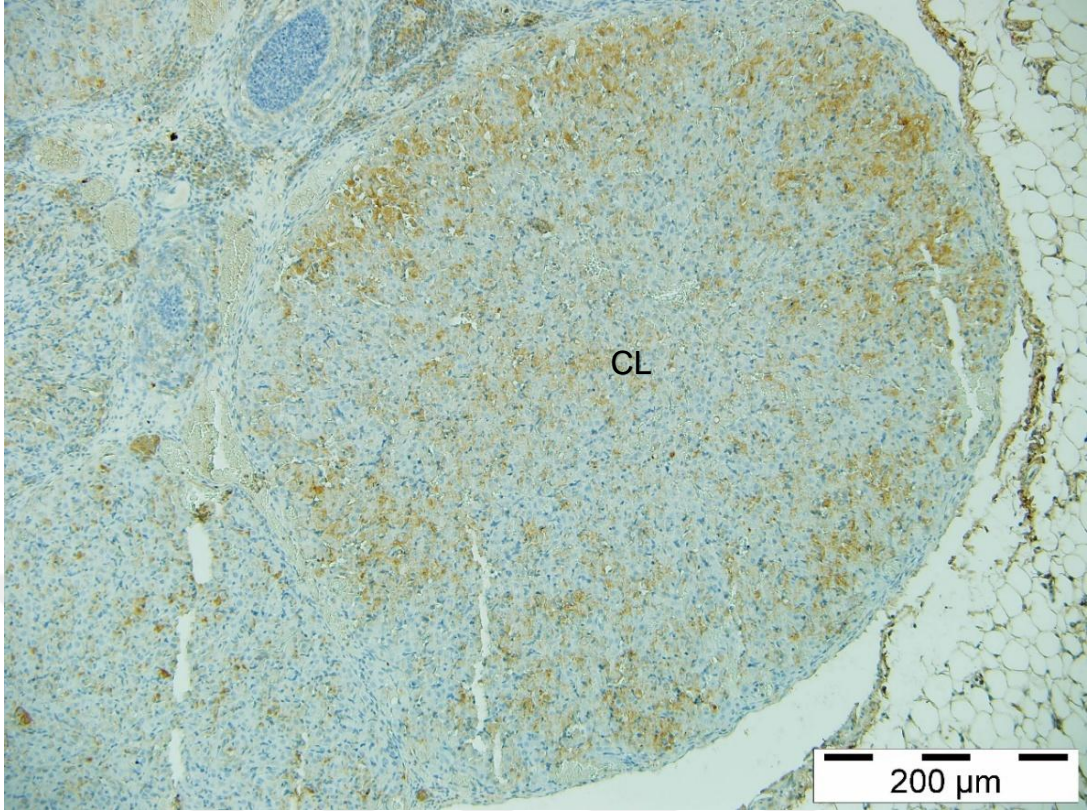


**Resim 14.** Diyabet grubu BMP-15 immunoreaktivitesi. **M:** Medulla, **Ok:** İntersitisyel hücreler

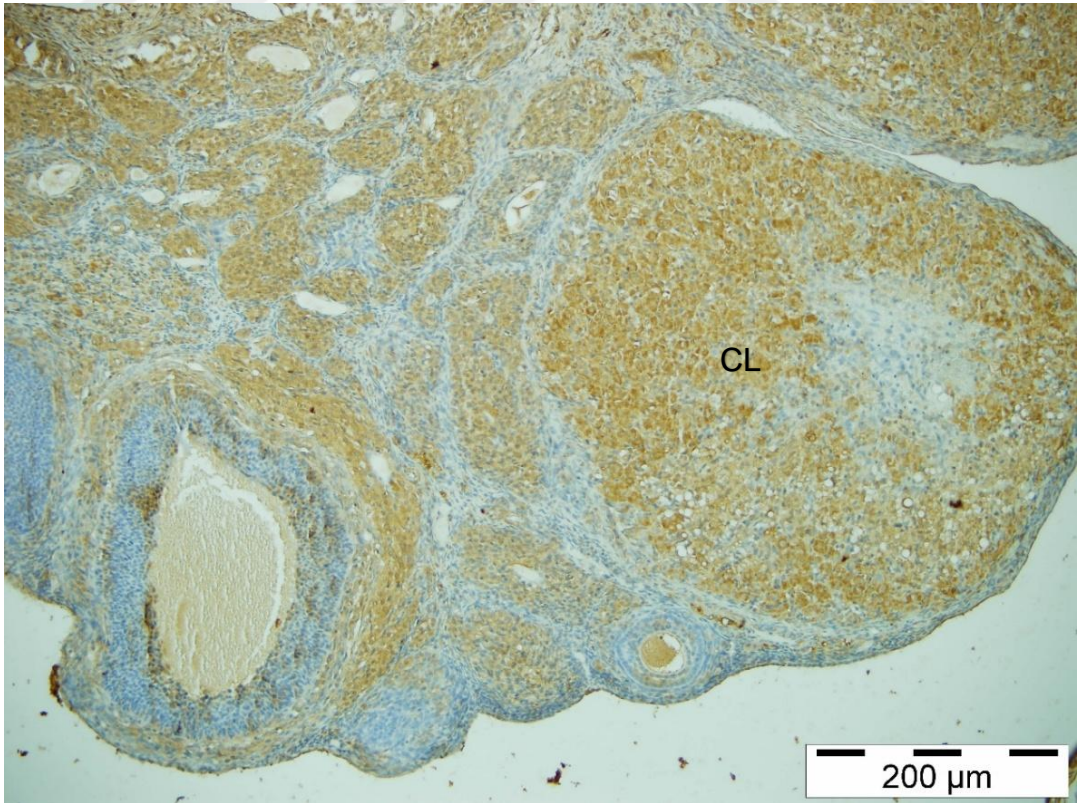
Ovaryum dokusunda bulunan korpus luteumların gruplar arası BMP-15 immunoreaktivitesinin incelenmesinde kontrol, capsaicin ve diyabet+capsaicin gruplarında yoğun immunoreaktivite gözlemlenirken, diyabet grubunda ise daha düşük düzeyde immunoreaktivite izlendi (**Resim 15, Resim 16**).

Ayrıca kontrol grubunun bazı korpus luteumlarının orta kısmında bulunan hücreler zayıf immunoreaktivite gösterirken (**Resim 17**) diyabet grubundaki bazı korpus luteumların orta kısmındaki hücreler kontrol grubuna göre daha yoğun düzeyde immunoreaktivite gösterdiği tespit edildi (**Resim 18**).

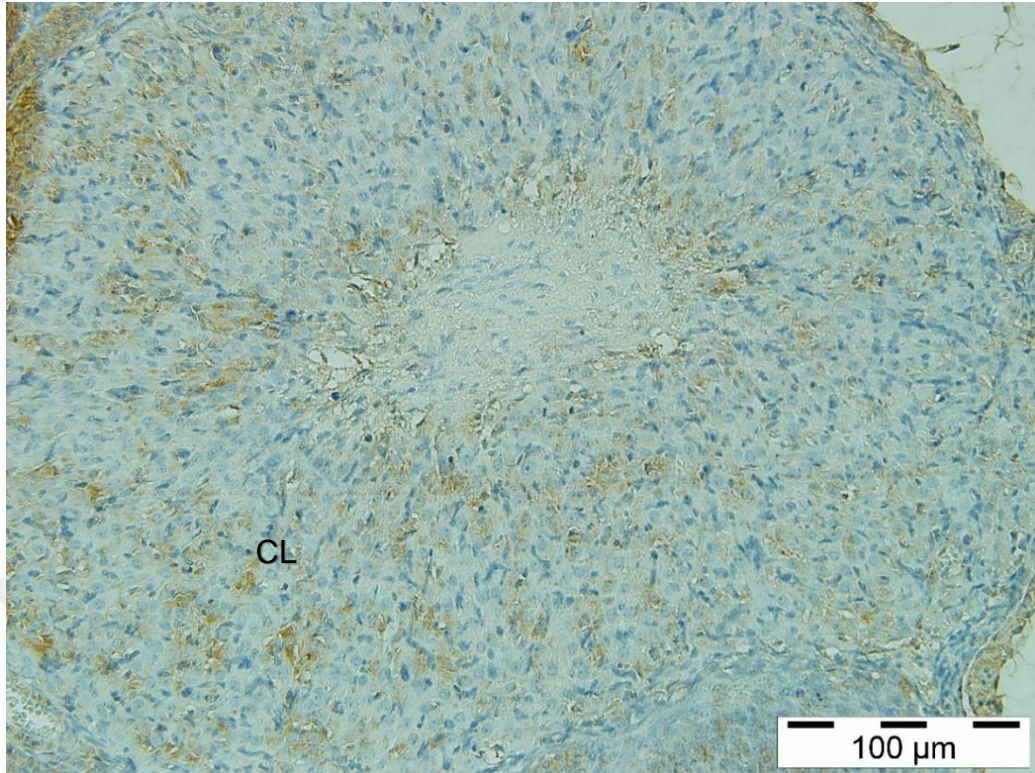
Foliküller arasında bulunan intersitisyel hücrelerde (**Resim 13**) ovaryumun medulla bölgesinde (**Resim 14**) bütün gruplarda eşit düzeyde immünoreaktivite görülmüştür.



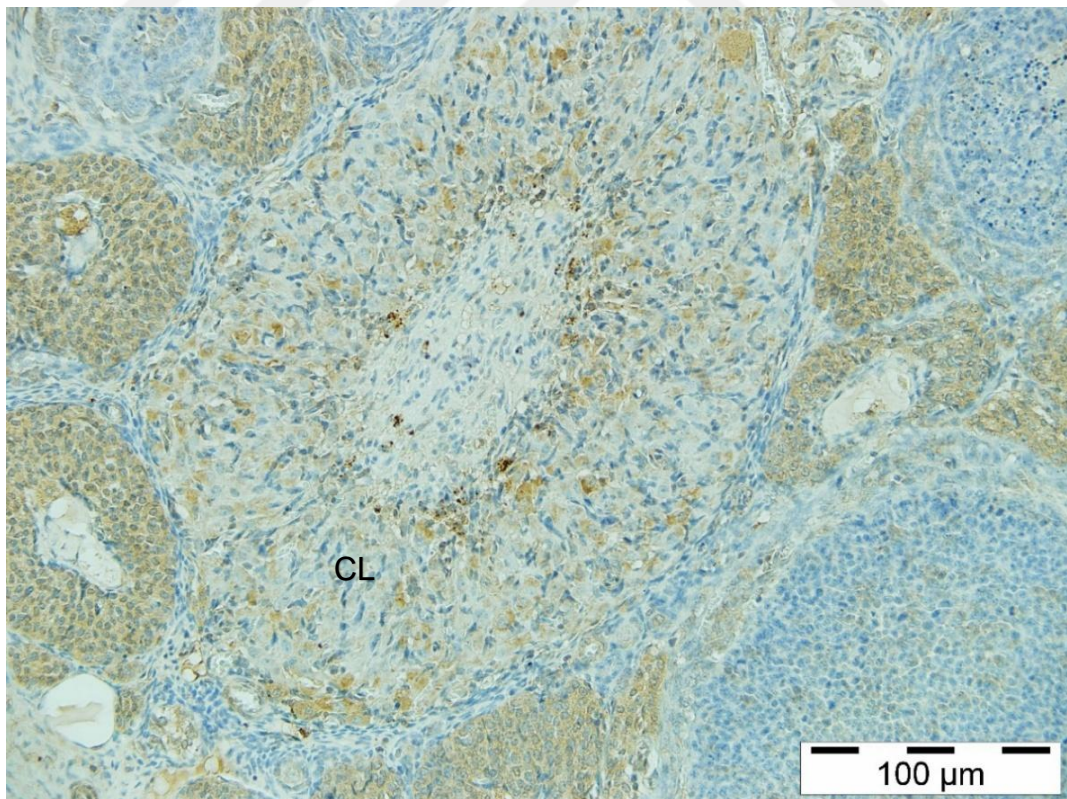
**Resim 15.** Diyabet grubu BMP-15 immunoreaktivitesi. **CL:** Korpus luteum



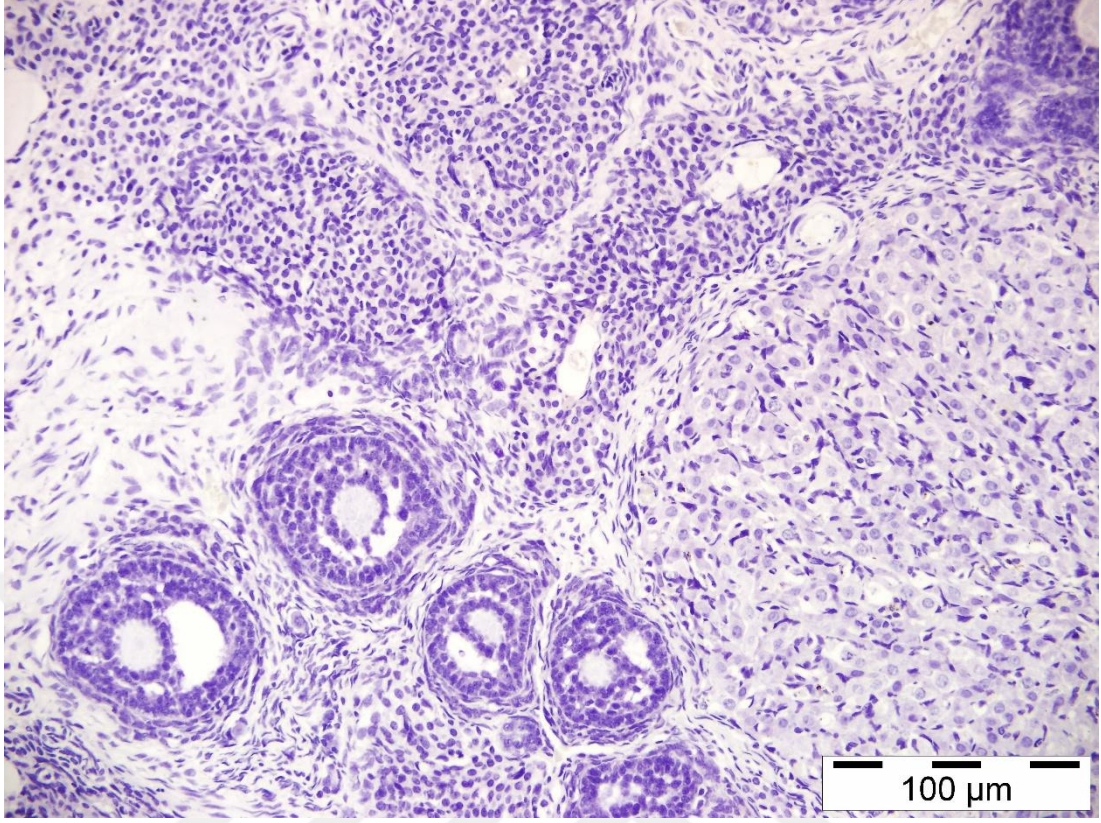
**Resim 16.** Capsaicin grubu BMP-15 immunoreaktivitesi .**CL:** Korpus luteum



**Resim 17.** Kontrol grubu BMP-15 immunoreaktivitesi .CL: Korpus luteum



**Resim 18.** Diyabet grubu BMP-15 immunoreaktivitesi. CL: Korpus luteum.



**Resim 19.** Negatif boyama



#### 4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda diyabetik ve non-diyabetik ratlara capsaicin uygulamasının ovaryumda BMP-15 immunoreaktivitesi üzerine etkisi ile rat ovaryumunda meydana gelen histolojik değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Diyabetes mellitus; kan glikoz düzeyinde artışa, bireylerde kilo kayıplarına neden olan, bireylerin karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasını etkileyen metabolik hastalıktır (Vardı ve ark 2003, Karaca ve ark 2010).

Hayiroğlu (2013) STZ ile diyabet oluşturduğu sıçanlarda diyabetik gruplarda vücut ağırlıklarının anlamlı derecede azaldığını tespit etmiştir. Farklı bir çalışmada ise STZ ile diyabet oluşturulan farelerin vücut ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark tespit etmedikleri bildirilmiştir (Grover ve ark. 2001). Sarkarat (2016) deneysel diyabet oluşturulmuş uterus dokusunda yaptığı çalışmada diyabetik gruplarda deney sonunda deney başlangıcına göre anlamlı derecede canlı ağırlık kayıpları olduğunu tespit etmiştir.

Yaptığımız çalışma sonucunda STZ ile diyabet oluşturduğumuz ratlarda vücut ağırlığı bakımından birçok çalışmaya ( Vardı ve ark. 2003, Karaca ve ark. 2010, Hayiroğlu 2013, Sarkarat 2016) paralel olarak diyabet oluşturulan ratların canlı ağırlıklarının azaldığı bulundu. Farklılığın cinsiyet farklılıkları ve farklı deneysel dönemlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Capsaicinin vücut ağırlığı ile ilgili farklı çalışmalar bulunmaktadır (Agarwal ve Bhide 1988, Jang ve ark. 1992, Özfiliz ve ark 2002). Agarwal ve Bhide (1988) ise Syrian Golden Hamsterlere ağız boşluğuna 20/4g uyguladıkları capsaisinin, deneme gruplarında canlı ağırlık artışının kontrollere göre az olduğu tespit edilmiştir.

Özfiliz ve ark (2002) capsaicin ile ilgili yaptıkları çalışmada çalışmanın üç aylık süreçte canlı ağırlık artışı ortalamasının deneme gruplarında kontrole göre fazla olduğu, son iki ayda ise kontrol grubunda deneme grubuna göre

fazla olduğunu tespit ederek gruplar arasındaki bu farklılığın istatistiki açıdan önemli olmadığını bildirmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada B6C3F1 ırkı erkek sıçanların rasyonuna %0,5-1,0-2,5-7,5-10 oranlarında kırmızı acı biber ilave edilerek kontrol grupları ile karşılaştırıldığında canlı ağırlık değişiminde istatistiki açıdan önemli olmadığını bildirmişlerdir (Jang ve ark. 1992).

Yaptığımız çalışmamızda bazı çalışmalara (Jang ve ark. 1992, Özfiliz ve ark 2002) paralel olarak capsaicin grubu canlı ağırlıklarının ortalamasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Yapılan literatür taramalarında (Agarwal ve Bhide 1988, Jang ve ark. 1992) sonuçların farklı olması capsaicinin dozuna, kullanılan hayvan türlerine göre değişebileceğini düşünmekteyiz.

Diyabetin ovaryum üzerine etkileri arasında; ovaryum ağırlığının azaldığı (Tesone ve ark. 1983), folliküler çapın daha küçük olduğu (Cox ve ark 1994), primer ve sekonder folliküllerde follikül sayılarının azaldığı (Garris 1984) atretik follikül oranının arttığı (Cox ve ark. 1994) yönünde bildirimler olmuştur.

Garris (1984) çalışmasında; kontrol hamsterlara kıyasla orta düzey (160-350 mg/dl kan glikozu) ve yüksek düzey ( $\geq 350$  mg/dl kan glikozu) diyabetik hamsterlarda toplam primer ve sekonder follikül sayısında azalma olduğunu bildirmiştir. Bunun yanı sıra yüksek düzey diyabetik hamsterlarda kontrollere göre tersiyer follikül sayısında önemli bir değişiklik olmadığı, atretik ile sekonder follikül yüzdesinin yüksek oranda arttığı tespit etmiştir. Chang ve ark. (2005) ise Akita farelerinde kontrol grubuna göre ovaryum dokularında görülen büyük, antral, orta/küçük folliküller ile korpus luteum sayılarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Shima ve ark (2011) ise STZ ile diyabet oluşturulan rat ovaryumlarında primordial, primer, sekonder ve tersiyer follikül sayılarının azaldığı, atretik follikül sayısında ise artma olduğu yönünde bildirimler yapmışlardır.

Bizim çalışmamızda ise birçok çalışmanın aksine primer, sekonder, graaf follikül ve korpus luteum sayısında artış (Garris 1984, Chang ve ark

2005, Shima ve ark 2011), bazı çalışmalara paralel olarak atretik follikül sayısında artış (Shima ve ark 2011) meydana gelmiştir. Follikül sayılarında meydana gelen bu farklılığın STZ' nin uygulanma dozu (Garris 1984), deneyde kullanılan hayvan türünün farklı olmasından (Garris 1984, Chang ve ark. 2005) kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Fraunhofer ve arkadaşları (2018) çalışmalarında diyabetik farelerde, yumurtalık histolojisi, folliküler apoptozis ile ilişkili güçlü dejenerasyon, belirgin granüloza hücre düzensizliği ve antral follikülde anormal oosit morfolojisi olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada ise Yıldız (2014) tarafından kontrollere göre korpus luteumlarda vakuollerin, intersitisyel alanlarda ise; hidropik dejenerasyon alanlarının diyabet gruplarında arttığı belirtilmiştir. Korpus luteum vakuolizasyonunun diyabet+mısır yağı ve diyabet+likopen gruplarında kontrol+mısır yağı grubuna göre anlamlı şekilde fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca diyabet+mısır yağı grubunda; intersitisyel alanlarda hidropik dejenerasyonun kontrol+mısır yağı grubuna göre önemli oranda arttığı bildirilmiştir.

Bazı çalışmalarla çok az benzerlik gösteren (Fraunhofer ve ark. 2018, Yıldız 2014) araştırmamızda diyabetik ratların ovaryumunda bulunan bazı follikül epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler ve disorganizasyon gözlemlendi ayrıca bazı folliküllerin follikül epitel hücrelerinde yıkımlanma ve dejeneratif değişiklikler ile birlikte antrumda yıkımlanmış hücre döküntüleri tespit edildi.

Capsaicinin, kardiyovasküler, gastrointestinal ve dermatolojik etkileri birçok çalışmada belirtilmiştir (Sharma ve ark 2013).

Alatriste ve ark. (2013) kobaylara, yüksek dozda CAP uygulamasının, puberteyi geciktirdiğini ve ovaryumdaki preantral ve antral folliküllerin sayısını azalttığını bildirmişlerdir. Moran ve ark. (2003) tarafından capsaicinin yumurtlama ve hamilelik üzerine etkisi üzerine yaptıkları çalışmalarında yeni doğan sıçanlara yüksek dozda CAP uygulanmasının gebelik oranında ve ovaryum follikül sayısında azalmaya ancak atretik follikül sayısında artışa neden olduğu bildirilmiştir. Zık ve ark. (2010) da sıçanlara düşük doz CAP'ın (0.5 mg/kg) uygulanmasıyla folliküllerin atreziden korunduğu, follikül

gelişiminin ve granuloza hücre proliferasyonunu yönünde bildirimlerde bulunmuşlardır. Düşük doz CAP'ın ovaryum üzerine olumlu yönde etkilerinin olabileceği sınırlı sayıda yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Tütüncü ve ark. 2011, Zık ve ark. 2010).

Özgüden ve ark. (2018) yaptıkları çalışmalarında deney grubundaki (CAP (Sigma M2028) enjekte edilen) hayvan ovaryumlarında, graaf folliküllerin sayısının kontrol gruplarına göre daha fazla olduğu, kontrol A (hiçbir enjeksiyon yapılmayan) ve kontrol B (CAP'ın eritildiği taşıyıcı solüsyonun enjekte edildiği) grubuna ait ovaryumlarda ise, gelişmekte olan folliküllerin çok sayıda olduğu, graaf folliküllerin sayısının ise deney grubuna göre daha az olduğu ayrıca her üç gruptaki ovaryum dokusunda korpus luteum gözlemlenmediği belirtilmiştir.

Yaptığımız çalışmada capsaicinin ovaryum dokusunda bulunan folliküler üzerine etkisi incelendiğinde primer follikül sayısı bazı çalışmalara paralel olarak (Alatrıste ve ark. 2013) azalırken bazı çalışmaların tersine (Alatrıste ve ark. 2013) sekonder follikül sayısı artmıştır. Bunun yanı sıra bazı çalışmalardan (Özgüden ve ark. 2018) farklı olarak graaf follikül sayısı, atretik follikül sayısı (Moran ve ark. 2003) ve korpus luteum sayıları (Özgüden ve ark. 2018) değişmemiştir.

Capsaicinin diyabetli ovaryumda etkisini inceleyen bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Ancak capsaicinin farklı diyabetik dokular üzerine olan etkisi ile ilgili çalışmalarda ise; Guillot ve arkadaşarı (1996) capsaicin duyarlı sinirlerin diyabetik sıçanlarda glukoz toleransının düzenlenmesini araştırdıkları çalışmalarında diyabetik sıçanlarda capsaicin kullanımının, insülin sekresyonunu değiştirmeden glukoz toleransını düzenlediği bildirmişlerdir. Ayrıca, topikal capsaicin uygulamasının diyabetik nefropatiyi olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Webster ve ark. 2011). Deprem ve ark. (2014) 45 mg/kg STZ uyguladıkları ve 200 ml üzeri olanları diyabetik gruba 1mg/kg capsaicin uygulamasının diyabetik sıçanların karaciğerlerinde GPx1 ekspresyonunda azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise capsaicinin diyabetin oluşturduğu hasarı gidermede olumlu yönde etkilediğini belirledik. Diyabet grubunda primer, sekonder, graaf ve atretik follikül sayılarında diğer gruplara göre istatistiğe yansımaya da bir düşüş olduğu görüldü. Capsaicinde diyabete göre primer, sekonder, graaf ve atretik follikül açısından diyabetten daha yüksek bulundu. Capsaicin verilmesinin diyabette azalmış olan follikül sayısında istatistiğe yansımaya da genel bir artışa yol açtığı görüldü.

TGF- $\beta$  süper ailesinin bir üyesi olan ve oositlerde X'e bağımlı gen tarafından eksprese edilen BMP-15 aynı zamanda GDF-9B olarak da bilinir (Otsuka ve ark 2000). BMP-15 proteini oositlerin olgunlaştırılmasını ve folliküllerin gelişmesini homodimer bir yapı olarak ya da GDF-9 ile heterodimer bir yapı oluşturarak gerçekleştirmektedir (Carabatsos ve ark. 1998, Otsuka ve ark. 2000).

Silva ve ark (2004) keçi yumurtalıklarında GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonunu araştırdıkları çalışmalarında BMP-15' i 1:50 oranında inkube ettikleri ve hem GDF-9 hem de BMP-15 proteinlerinin, primordiyal follikül aşamasından itibaren oositlerde tespit edildiğini, GDF-9 ve BMP-15 immunoreaksiyonunu, granülosa hücrelerinde, primer ve sekonder folliküllerde gözlemlediklerini ancak primordiyal folliküllerde gözlemediklerini bildirmişlerdir. Aynı çalışmalarında bazı küçük antral folliküllerde kumulus ve granuloza hücrelerinde GDF-9'un zayıf, BMP-15' in ise daha belirgin bir immunreaksiyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Büyük antral folliküllerde kumulus ve mural granuloza hücrelerinin, GDF-9 için güçlü bir reaksiyon gösterirken, kumulus hücrelerinde BMP-15' in immunreaksiyon göstermediği, fakat mural granuloza hücrelerinin güçlü bir reaksiyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. GDF-9 ve BMP-15 yönü ile antral folliküllerde GDF-9 boyaması hariç, teka hücrelerinde reaksiyon görülmediğini tespit etmişlerdir. Corpus luteumda GDF-9 proteini ve mRNA ekspresyonu tespit edilirken BMP-15 proteini ve mRNA bu bölgelerde gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Sun ve arkadaşlarının (2010) memeli ovaryum folliküllerinde GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonunu araştırdıkları çalışmalarında oositlerde granuloza hücrelerinde ve olgun folliküllerin folliküler sıvısında eksprese edildiği

belirtilmişlerdir. Aynı çalışmada domuz ovaryumunda ise BMP-15, primordiyal follüküllerde ve çekirdekte sitoplazmada olduğundan daha yüksek bulunduğu, BMP-15 ayrıca granuloza hücrelerinin hücreler arası maddesinde zayıf immünreaktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca sekonder ve graaf follüküllerin hem oositleri hem de granuloza hücreleri BMP-15 immünreaktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada BMP-15'in rat ovaryumunda immunohistokimyasal lokalizasyonunun birçok çalışmaya paralel olarak follüküllerin (primer, sekonder, graaf) oositlerinde, granuloza hücrelerinde, olgun follüküllerin (sekonder, graaf) antrum boşluğunda (Silva ve ark. 2004, Sun ve ark 2010) farklı düzeylerde BMP-15 immünohistokimyasal lokalizasyonu gözlemlendi. Ayrıca corpus luteumlarda da (Sun ve ark 2010) değişik düzeylerde BMP-15 reaksiyon gösterdiği tespit edildi.

Sonuç olarak çalışmamızda follükül sayıları diyabet+capsaicin grubunda diyabet grubuna göre artış olması capsaicinin olumlu etkisinden kaynaklandığını düşündürdü. İmmunohistokimyasal incelemeler sonucu BMP-15 immunoreaktivitesinin diyabet grubunun granuloza hücrelerinde az yoğun olduğu görüldü. Korpus luteumlarda immunoreaktivitenin diyabet grubunda kontrol, capsaicin ve diyabet + capsaicin gruplarına göre az yoğun olduğu görüldü. Çalışmamızda diyabetin follükülleri olumsuz yönde etkilediği için BMP-15 immunoreaktivitesinin bu durumdan etkilendiği ve bundan dolayı kontrole göre diyabette daha az immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. Yapılan bu çalışmada bütün sistemleri etkileyen capsaicinin, diyabet hastalığında BMP-15' in ovaryum dokusundaki immunohistokimyasal lokalizasyonunu araştırarak en sık araştırılan hastalıklardan biri olan Diyabetes Mellitus hastalığında capsaicin kullanımının etkilerini göstermek ve ovaryum üzerine yapılan çalışmalara yeni bir bakış açısı kazandıracağını düşünmekteyiz.

## 5. KAYNAKLAR

Abraham L, Kierszenbaum MD. Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş. Çeviri: Prof. Dr. Ramazan Demir, Palme Yayıncılık, s.565-66. 2006.

Agarwall, R. C., Bhide, S. V. Histopathological Studies on n Torleliy of Chili (Capsaisin) in Syrian Golden .Hamsters. indian J. Exp. Biol. 26,(377-382). 1988.

Alatrste V, Herrera-Camacho I, Martinez 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; 1(3): 29-37. 2013.

American Diyabetes Association. Report of the expert commitee on the diagnosis and classifiication of diyabetes. Diyabetes Care;26(1):5-20. 2003.

Aral Y. Endokrinoloji ve metabolizma hastalıklarında temel tedavi. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; p. 255-328. 1998.

Boyunağa, H., Çelik, C.: Kırmızı Acı Biber (Capsaisin) , Bitkisel İlaç Kaynağı mı? Bilim Teknik TÜBİTAK. 331, 99-100. 1995.

Brown, K. C., Witte, T. R., Hardman, E., Luo, H., Chen, Y. C., Carpenter, B., Lau, J. K., Dasgupta, P.: Capsaicin displays anti-proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models via the E2F pathway. Plos. One. 5(4):1243, 2010.

Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diyabetes mellitus. J Clin Invest; 115(3):48591. 2005.

Bükülmez O, Arici A. Over fizyolojisi. Kisisçi HA. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ankara: Günes Kitabevi. 1129-1145, 1996.

Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM and Albertini DF, Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor 9 deficient mice. Dev Biol. 204;373-384. 1998.

Chang AS, Dale AN, Moley KH. Maternal diyabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. Endocrinology; 146(5):2445–2453. 2005.

Colton SA, Pieper GM, Downs SM. Altered meiotic regulation in oocytes from diyabetic mice. Biol Reprod 67:220–231. 2002

Cordell GA, Araujo OE: Capsaicin: Identification, Nomenclature, and Pharmacotherapy. The Annals of Pharmacotherapy; 27: 330-336. 1993.

Cox NM, Meurer KA, Carlton CA, Tubbs RC, Mannis DP. Effect of diyabetes mellitus during the luteal phase of the oestrous cycle on preovulatory follicular function, ovulation and gonadotrophins in gilts. Journal of Reproduction and Fertility; 101(1):77 86. 1994.

Das AV , Padayatti PS , Paulose CS : Effect of leaf extract of *Aegle marmelose* (L.) Correa ex Roxb. On histological and ultrastructural changes in tissues of streptozotocin induced diyabetic rats. *Ind. J. Exp. Biol.* 34: 341 – 345. 1996.

Deprem T., Yıldız S.E., Sari K., Bingol S.A., Tasci S.K., Aslan S., Sozmen M., Nur G.: Distribution of glutathione peroxidase 1 in liver tissues of healthy and diyabetic rats treated with capsaicin. Accepted February 26, 2014.

Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ and Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. Mol Endocrinol; 12: 1809-1817. 1998.

Elvin JA, Matzuk MM. Mouse models of ovarian failure. *Reviews of Reproduction*. 3: 183-195. 1998.

Ergün L, Şimşek N, Bayraktaroğlu AG, Ergün E, *Histoloji atlası uygulama kılavuzu*. In: Ergün L. (Eds). 1. Baskı. Ankara: Fenomen Yayıncılık; p. 100-104. 2012.

Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. *Özel histoloji*. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 175-85. 2007.

Erdost H. Capsaicin. *Uludağ Univ. J. Fak. Vet. Med.*,23:149-155.2004.

Fraunhofer NA, Meilerman Abuelafia A, Aquino Barrientos M, Cimerman KV, Olmos MF, Chuluyan E, Barrios M.: Long-term apoptosis-related protein expression in the diabetic mouse ovary. *PLoS ONE* 13(9): e0203268. 2018.

Furuse, M., Nakajima, S-I., Miyagawa, S., 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.

Garris DR. Effects of progressive hyperglycemia on ovarian structure and function in the spontaneously diabetic chinese hamster. *The Anatomical Record* 210(3):485-489. 1984.

Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*. 14(2): 1559-177. 2008.

Girgin A, Alabay B, Liman N, Özfiliz N, Gülmez N ve ark. *Veteriner Özel Histoloji*. Editör: Prof. Dr. Aytekin Özer, Nobel Yayın Dağıtım, 1. Baskı, s.219-231. 2008.

Grover JK, Vats V, Rahi SS, Dawar R. Traditional Indian ant-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 76: 233-8, 2001.

Guillot E , Coste A , Angel I : Involvement of CAP-sensitive nerves in the regulation of glucose tolerance in diabetic rats . *Life Sci.* 59 : 969 – 977 . 1996.

Guyton AC, Hall J E. *Tıbbi Fizyoloji*. Çavuşoğlu H (Çev). 10. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri; 2001.

Gümüş B, Kılıç S, Zülfkaroğlu E. Role of apoptosis-related factors in follicular atresia. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 5(5): 54-63, 2013.

Gürsoy E, Ergin K. *Dişi üreme sistemi atlası*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 4 15. 2007.

Hayiroğlu A.E: Streptozotocin İle Denysel Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Östrus Siklusunun Değişik Evrelerinde Ovaryum ve Uterus Dokularında Mast Hücrelerinin Dğılımının Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi, Edirne,2013.

Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews*, 43(2): 143-201, 1991.

Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29:577-580,1981.

Jang, J. J., Devor, D. E., Logsdon, D. L., Ward, J.M.: A Four Week Feeding Study of Ground Red Chilli (*Capsicum annum*) in Male B6C3F1 Mice, *Fd. Chem. Toxic. (England)*, 30 (9), 783-787. 1992.

Junqueira LC, Carneiro J. *Dişi üreme sistemi (çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S.)*. Temel Histoloji Text and Atlas. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; s.435-42. 2009.



Kanitkar M, Bhonde R.: Existence of islet regenerating factors within the pancreas. *Rev. Diyabetes Stud.* 1: 185 – 192. 2004.

Kanter, M., Uysal, H., Karaca, T., & Sagmanligil, H. O. Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic  $\beta$ -cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diyabetic rats. *Archives of toxicology*, 80(6), 362-369. 2006.

Karaca T, Yörük M, Yörük İH, Uslu S. Effects of extract of green tea and ginseng on pancreatic beta cells and levels of serum glucose, insulin, cholesterol and triglycerides in rats with experimentally streptozotocin-induced diyabetes: A histochemical and immunohistochemical study. *J Anim Vet Advan*;9(1):102–7. 2010.

Karaca T, Yörük M, Uslu S. Distribution and quantitative patterns of mast cell in ovary an uterus of rat. *Arc Med Vet*;39(2):135–9. 2007.

Karaöz E. Özel histoloji. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Basımevi; p. 216229. 2002.

Karakurt F, Çarlıoğlu A, Kasapoğlu B, Gümüş ĞN. Gestasyonel diyabetes mellitus tanı ve tedavisi. *Yeni Tıp Dergisi*; 26: 134-8.2009.

Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş. Demir R. (Çeviri Editörü) Ankara: Palme Yayıncılık; s.570-80. 2006.

Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara: Palme Yayıncılık, s. 576-575. 2006.

Knight PG, Claire G . Focus on TGF- $\beta$  signaling. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*; 132: 191-206.2006.

Krause WJ. Essantials of human histology. 2nd Ed. USA: Little, Brown and Company; p. 353-369. 1996.

Küçük F, Gürer F, Bayçu C, Hassa H. Streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetin blastosist, embriyonik kök hücreleri gelişimi ve in vitro spontan histogenezise etkileri. *AÜBTD*;10(1):169-78.2009.

Lin S, Lin K, Li W, Zhou X, Huang T: Maternal diyabetes increases apoptosis in mice oocytes, not 2-cell embryos. *Endocrine* ;37(3):460-466. 2010.

Lopez-Hernandez J., Oruna-Concha M.J., SimalLozane J., Gonzales-Castro M.J., VarquezBlanco M.E., Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in cayenne pepper and pardon peppers by HPLC. *Deutsche Lebensmittel- Rundschau*, 92: 393- 395.

Lorenz PL. Influence of growth factors on the time-dependent meiotic progression of the bovine oocytes during their in-vitro maturation. *Rev Esp Fisiol*; 51: 77-83. 1995.

Luna LG.: Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd. ed., McGraw-Hill Book Co. New York. Pp. 72 – 100. 1968.

Marsh AT. Oocyte-Follicle Interactions. *M Med Sci.* 2011.

Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev*, 58: 44-50.2012.

Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nature Medicine*. 8(S1): 33-40. 2002.

McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*; 21(2): 200-14. 2000.

McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL et al. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 163: 11-20. 2000.

Mescher AL. *Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap* (çeviri: S. Solakoğlu). *Dişi Üreme Sistemi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; s. 449-478. 2015.

Michael H. Ross, W.P., *Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molacular Biology*. 6th edition ed. Vol. LWW.: 6th edition. 2011.

Moore RK, Shimasaki S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol Cell Endocrinol*. 234(1-2):67-73. 2005.

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*; 73(16): 2113-25. 2003.

Mori A, Lehmann S, O'Kelly J, Kumagai T, Desmond JC, Pervan M, McBride WH, Kızakı M, Koeffler HP. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Research*, 66(6): 3222-3229, 2006.

Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S. Sitespecific DNA methylation and apoptosis: induction by diyabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol*; 57: 881-887.

Nelson EK, Dawson LE. The constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum. *Journal of the American Chemical Society*, 45 (9): 2179-2181, 1923.

Nilsson E E and Skinner M K Bone morphogenetic protein4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*; 69: 126572. 2003.

Ojeda SR. *Female Reproductive Function*. Editor: JEASRO G, *Textbook of Endocrine Physiology*, Fourt Edition, Oxford University Press, New York, page 215216, 2000.

Okihiro M.S.Hinton D.E.:Partial hepatectomy and bile duct ligation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) histologic, immunohistochemical and enzyme histochemical characterization of hepatic regeneration and biliary hyperplasia. *Toxicologic pathology*, 28:342-356, 2000.

Oktem O and Oktay K The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci*; 1127: 1- 9.2008.

Oliveros L., Forneris M., Aguado L., Sec-retion from neuropeptide-treated splenocytes modifies ovarian steroidogenesis. *Medicina*, 61: 35-39. 2001.

Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S: Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*. 275(50):39523-39528. 2000.

Otsuka F, Moore RK, Iemura S, Ueno N, Shimasaki S: Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun*.289(5):961-966.2001.

Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter temel histoloji*. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviri Editörleri) Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; s. 399-415. 2009.

Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. *Gen Tıp Derg* .17(4):231-6. 2007.

Özbey N, Orhan Y. *Diyabetes mellitus*. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evi, 4. 2003.

Özgül Akkoç C.G., Asmaz E.D., İlhan T., Zık B.: Düşük Doz Capsaicin Uyulanan Sıçanların Ovaryumlarında TGF-Beta 1'in İmmunohistokimyasal Yerleşimi. 15(3), 238-246, 2018.

Özfiliz N., Erdost H., Yağcı A.. Tavuklarda Kırmızı Acı Biberli Rasyonla Beslemenin Böbreklere Olan Etkisinin Histolojik Yönden Üncelenmesi. 26. 885-890. T.BÜTAK. 2002.

Panossian A, Gabrielian E, Wagner H: Dosedependent reversible effects of capsaicin on interleukin- 1 a production is associated with the metabolism of arachidonic acid (leukotriene B4 and prostaglandin E2) as well as nitric oxide production in human leucocytes. *Phytomedicine*, 3, 169-174. 1996.

Powers RW, Chambers C, Larsen WJ. Diyabetes-mediated decreases in ovarian superoxide dismutase activity are related to blood-follicle barrier and ovulation defects. *Endocrinology*;137(7):3101-3110. 1996.

Rakietyen N, Rakietyen ML, Nadkarni MV. Studies on the diyabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*, 29:91-8. 1963.

Ross M.H., Pawlina W., *Histology A Text and Atlas, Fourth Edition*, Lippincott Williams & Wilkins Company, Baltimore, 2003.

Ross M.H. *Histology: A text and Atlas. (4.Baskı)*. Philadelphia: Lippincott William&Wilkins, 2011.

Ross M.H. ve Pawlina W. *Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology. 7th edition*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2016.

Sadler TW. *Langman's Medical Embryology, 7th edn*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.

Sarkarat T.: Deneysel diyabet oluşturulmuş sıçan uterus dokusunda östrojen reseptör dağılımının immünohistokimyasal olarak incelenmesi. Edirne – 2016.

Schoenwolf C, Bleyl B, Brauer R, et al. *Larsen's Human Embryology. Fourth Edition. Chapter 1*. 2009.

Sharma SK, Vij AS, Sharma M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *European Journal of Pharmacology*, 720(1-3): 55-62, 2013.

Shima H, Naeem E, Hassan M, Hossein N. Aloe vera gel protects ovarian structure in diyabetic rat. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*;3(3):197-203. 2011.

Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The Bone Morphogenetic Protein System In Mammalian Reproduction. *Endocrine*, 25(1):72-101. 2004.

Shu S, Ju G, Fan L.: The glucose oxidase-dan-nickel in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience Lett*. 85: 169-171, 1988.

Silva J.R.V., Van Den Hurk R., Van Tol H.T.A., Roelen B.A.J., And Figueiredo J.R: Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15), and BMP Receptors in the Ovaries of Goats. 70:11–19.2004.

Sun R. Z., Lei L., Cheng L., Jin Z. F., Zu S. J., Shan Z. Y., Wang Z. D., Zhang J. X., Liu Z. H.: Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. 41:325–332.2010.

Su1 YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit1 JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP-15 and GDF-9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, 135:111121.2008.

Suzanne C, O'Connell S, Brenda GB, Hinkle JL, Cheever KH. Brunner & Suddarth's Textbook of Medical-Surgical Nursing 10th edition. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

Szallasi A, Blumberg PM: Resiniferatoxin and Its Analogs Provide Novel Insights into the Pharmacology of the Vanilloid (Capsaicin) Receptor. *Life Sciences* ; 47:1399-1408. 1990.

Szallasi A: Vanilloid Receptor Ligands: Hopes and Realities for the Future. *Drugs and Aging* 18: 561-573. 2001.

Tanyolaç A. Özel histoloji. 3. Baskı. Ankara: Yorum Basım Yayın; p.144-157. 1999.

Tanyolaç A. Özel histoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi, 96-151. 1993.

Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Ankara: Antıp AŞ yayınları; 2002.

Tesone M, Ladenheim RG, Oliveira-Filho RM, Chiauzzi VA, Foglia VG, Charreau EH. Ovarian dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*;174(1):123-130. 1983.

Therriault E., Otsuka M., Jessel T. Capsaicin-evoked release of Substance P from primary sensory neurones. *Brain Research*, 170: 209-213. 1979.

Thompson FN, Duke's Physiology of Domestic Animals (Twelfth edition). In Reece WO, Ed; Cornell University Press, pp; 677-703. 2004.

Toth B, Gannett P: Carcinogenicity of lifelong administration of capsaicin of hot pepper in mice. *In Vivo*, 6, 59-63.1992.

Trujillo A, Morales L, Domínguez R. The effects of sensorial denervation on the ovarian function, by the local administration of capsaicin, depend on the day of the oestrous cycle when the treatment was performed. *Endocrine*, 48(1): 321-328, 2015.

Tütüncü Ş., Özfiliz N., Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the rat ovaries on different sexual development period. *Revue De Medicine Veterinaire*, 161, 6, 272-276. 2010.

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*; 162(10): 460-7. 2011.

Vaishnava P, Wang DH: Capsaicin sensitizes sensory nerves and blood pressure regulation. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 1, 177-88.2003.

Vardı N. Uçar M, İraz M, ve ark. Deneysel diyabetin sıçan endokrin pankreasında oluşturduğu morfolojik değişiklikler. *T Klin J Med Sci*;23: 27-32. 2003.

Veronesi B, De Haar C, Roy J, Oortgiesen M: Particulate Matter Inflammation and Receptor Sensitivity are Target Cell Specific. *Inhalation*.2002.

Vitt U A, McGee E A, Hayashi M, and Hsueh A J In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*; 141: 3814- 20. 2000.

Yeşilot Ş. Diyabetik Ratlarda Aspirin ve Nimesulid'in Diyabete Bağlı Doku Hasarı Üzerine Olan Etkileri (tez). Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.

Yıldız M.: Deneysel Diyabet Oluşturulan Dişi Ratların Genital Sistemindeki Değişiklikler ve Bu Değişiklikler Üzerine Likopenin Etkileri. Aydın-2014.

Zhang JH, Lai FJ, Chen H, Luo J, Zhang RY, Bu HQ, Wang ZH, Lin HH, Lin SZ. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in apoptosis induced by capsaicin in the human pancreatic cancer cell line PANC-1. *Oncology Letters*, 5: 43-48, 2013.

Zık B, Özgüden C, Tütüncü Ş, İlhan T: Expression of vanilloid receptor-1 in the duodenum of the capsaicin treated rat. *Bull Vet Inst Pulawy*, 51, 149-153. 2007.

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*; 161(6): 288-94.2010.

Zık B, Özgüden Akkoç Cg, Tütüncü Ş. Sıçan ovaryumunda düşük doz capsaicinin NF-kB ve XIAP proteininin sentezlenmesi üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 57, 223-228, 2010.

Zık B, Altunbas K, Tutuncu S, Ozden O, Ozguden-Akkoc Gc, Peker S, Sevimli A. Effects of capsaicin on nitric oxide synthase isoforms in prepubertal rat ovary. *Biotechnic & Histochemistry*, 87(3): 218-225, 2012.

Quinn L. Mechanism in the development of type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs*;16(2):1-16. 2002.

World Health Organization. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation;1-49. 1999.

Webster LR , Peppin JF , Murphy FT , Lu B , Tobias JK , Vanhove GF: Efficacy, safety, and tolerability of NGX- 010, CAP 8% patch, in an open-label study of patients with peripheral neuropathic pain . *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93 : 187 – 197. 2011.

## 6. EKLER



KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
(KAÜ-HADYEK)

Sayı: 2018/046  
Konu: Araştırma

26.04.2018

Sayın Doç. Dr. Turgay DEPREM  
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi – KARS

Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KAÜ-HADYEK)'nce değerlendirilip çalışma onayı istenen **KAÜ-HADYEK/2018-046** Kodlu ve "**Capsaicin Uygulanan Diyabetik ve Non-Diyabetik Ratların Ovaryumunda BMP-15'in İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu**" adlı araştırmanızın KAÜ-HADYEK yönergesi ilkelerine uygun olarak planlandığı anlaşılmış ve projenin 12 ay süreli ve KAÜ-HADYEK/2012-05 kodlu araştırma kapsamında daha önce alınıp uygun koşullarda saklanan 40 adet rat dokusu üzerinde yürütülmesinin hayvan kullanım etiği ve mevzuatı açısından "**UYGUN**" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Saygılarımla.

Prof. Dr. İsa ÖZAYDIN  
KAÜ-HADYEK Başkanı

EK:

1. Etik Kurul Kararı (1 Adet)

Yazışma Adresi

Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(KAÜ-HADYEK) Başkanlığı  
Kafkas Üniversitesi Rektörlüğü, 36100 KARS

Tel: 0 474 2251158 – 2426836  
Faks: 0 474 2251161  
E-Posta: hadyek@kafkas.edu.tr

## **7. ÖZGEÇMİŞ**

1985 yılında Erzurum Pasinler ilçesinde doğdum. İlköğretim, orta okul ve lise eğitimimi Pasinler' de tamamladıktan sonra 2005-2007 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Bayburt Meslek Yüksekokulu Muhasebe bölümünde eğitimimi tamamladım. 2008 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde eğitimime başlayarak 2012 yılında mezun oldum.



