

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PUBERTE DÖNEMİNDE CAPSAICIN UYGULANAN
RAT TESTİSLERİNDE TRANSFORME EDİCİ GELİŞİM
FAKTÖRÜ BETA 2'NİN REAL-TIME PCR İLE GEN
EKSPRESYONU VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL
DAĞILIMI

Arş.Gör.Gökhan NUR

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr.Mümtaz NAZLI

2011-KARS

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

**PUBERTE DÖNEMİNDE CAPSAICIN UYGULANAN
RAT TESTİSLERİNDE TRANSFORME EDİCİ GELİŞİM
FAKTÖRÜ BETA 2'NİN REAL-TIME PCR İLE GEN
EKSPRESYONU VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL
DAĞILIMI**

Arş.Gör.Gökhan NUR

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr.Mümtaz NAZLI

Bu çalışma, KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2010-VF-21

2011- KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Arş.Gör.Gökhan NUR tarafından hazırlanmış olan “**Puberte Döneminde Capsaicin Uygulanan Rat Testislerinde Transforme Edici Gelişim Faktörü Beta 2'nin Real-Time PCR ile Gen Ekspresyonu ve İmmunohistokimyasal Dağılımı**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Adı Soyadı

İmza

Başkan : Prof.Dr.Nurhayat Yecan GÜLMEZ

.....

Üye : Prof.Dr.Kadir ASLAN

.....

Üye : Prof.Dr.Mümtaz NAZLI

.....

Üye : Prof.Dr.Şahin ASLAN

.....

Üye : Doç.Dr.Nejdet ŞİMŞEK

.....

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

Prof.Dr.Mehmet ÇİTİL
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu araştırma konusunun belirlenmesinde ve tezin yürütülmesinde bana her zaman yön ve destek veren değerli hocam ve danışmanım sayın Prof. Dr. Mümtaz NAZLI'ya, tezimin her aşamasında bölüm olanaklarını esirgemeyen bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ'e, tezimin genetik kısmının yorumlanmasında katkılarından dolayı sayın Prof.Dr. Hakan KOCAMIŞ'a, fikir ve deneyimlerinden yararlandığım sayın Prof.Dr. Şahin ASLAN, Doç.Dr. Ebru SARI KARADAĞ, Doç.Dr. Mahmut SÖZMEN ve Yrd. Doç. Dr. Turgay DEPREM'e, tez izleme komitesi ve tez savunma jüri üyesi sayın Prof.Dr. Kadir ASLAN'a, tez savunma jürimde olan Doç.Dr. Necdet ŞİMŞEK'e, destek ve yardımlarımdan dolayı sayın Öğr.Gör.Dr. Seyit Ali BİNGÖL, Arş.Gör.Cem ÖZİÇ, Arş.Gör. Serap KORAL TAŞCI, Öğr.Gör. Sevdâ Elish YILDIZ, Öğr.Gör. Taylan ÖZGÜR KAYA, Arş.Gör. Pınar AKSU ve Dr. Evren KOÇ'a, laboratuvar imkanlarını kullanarak tezimin moleküler genetik kısmının yapılmasını sağlayan Qiagen firması ve Biyolog Hüseyin PİŞKİN ile Seda YILDIRIM'a, çalışmanın yapılmasını maddi kaynak sağlayarak destekleyen Kafkas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonuna ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalındaki tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma katkılarından dolayı şükranlarımı sunarım.

Ayrıca eğitimimin her aşamasında maddi-manevi destek sağlayan, yol gösteren ve her zaman hoşgörüsüne sığındığım ailem ile ilgi, sabır ve desteğinden dolayı eşime ve doğumu ile hayatı benim için daha anlamlı kılan oğlum Ali'ye teşekkür ederim.

KISALTMALAR DİZİNİ

KISALTMA

AÇIKLAMA

TGF β	Transforme edici gelişim faktörü beta
TGF β_1	Transforme edici gelişim faktörü beta I
TGF β_2	Transforme edici gelişim faktörü beta II
TGF β_3	Transforme edici gelişim faktörü beta III
TGF β_4	Transforme edici gelişim faktörü beta IV
TGF β_5	Transforme edici gelişim faktörü beta V
CAP	Capsaicin
VR1	Vanilloid reseptör 1
PMSG	Gebe kısrak serum gonodotropini
SP	Substans P
CGRP	Kalsitonin gen ilişkili peptid
LH	Lüteinleştirici hormon
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü I
TGF	Transforme edici gelişim faktörü
TGF α	Transforme edici gelişim faktörü alfa
hCG	İnsan koryonik gonadotropini
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
TNF	Tümör nekroz faktör
EDS	Ethan dimetan sülfonat
InsI3	İnsülin benzeri faktör 3
Ley-IL	Leydig-İnsülin benzeri peptid
RLF	Relaksin benzeri faktör
ICSH	İnterstisyel hücre uyarıcı hormon
BMP	Kemik morfogenetik proteini
GDF	Büyüme ve farklılaşma faktörü
AMH	Anti-Müllerian hormon
GDNF	Glia kökenli nörotrofik faktör
MIC-1	Makrofaj inhibitörü sitokin 1
OP	Osteojenik protein

NTN	Neurturin
FSH	Folikül uyarıcı hormon
EGF	Epidermal büyüme faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
FSH-ir	Folikül uyarıcı hormon immun reaktif
LH-ir	Luteinleştirici hormon immun reaktif
NKA	Nörokinin A
NGF	Sinir büyüme faktörü
PGE2	Prostaglandin E2
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
Cp	Crossing noktası
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
CAG	Krom alum jelatin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
RT-PCR	Real-Time PCR
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
EGF	Epidermal gelişim faktörü
STZ	Streptozotosin
KHOAK	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
HER-2/neu	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü
HCS-2/8	İnsan kondrosarkoma hücresi
ECM	Ekstrasellüler matriks
DMSO	Dimetil sülfoksit
TRPV1	Transient receptor potential cation channel of vanilloid type1

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ	I
ŞEKİL DİZİNİ	II
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Erkek Genital Sistemi ve Testis	4
2.1.1. Testis	4
2.2. Capsaicin	7
2.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)	11
2.4. Vanilloid Reseptör 1 (VR1)	14
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Deney hayvanları ve Bakım Koşulları	16
3.2. Analizler için Kullanılan Makine-Teçhizat ve Kimyasallar	16
3.3. Deney Grupları	18
3.4. Histolojik Analiz	18
3.5. İmmunohistokimyasal Analiz	19
3.6. Real-Time PCR	19
3.6.1. RNA izolasyonu	20
3.6.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	21
3.6.3. cDNA Sentezi	22
3.6.4. Real-Time PCR	23
3.6.5. Primer Dizilerinin Hazırlanması	24
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz	26
3.7.1. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi	26
3.7.2. RT-PCR Bulguların Değerlendirilmesi	27
4. BULGULAR	28
4.1. Canlı Ağırlık Bulguları	28
4.1.1. CAP Grubunda Günlere Göre Canlı Ağırlık Karşılaştırılması	28
4.1.2. Sham Grubunda Günlere Göre Canlı Ağırlık Karşılaştırılması	29
4.1.3. Kontrol Grubunda Günlere Göre Canlı Ağırlık Karşılaştırılması	30
4.2. Testis Ağırlığı Bulguları	30
4.3. Histolojik Bulgular	31

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	35
4.5. Real-Time PCR Bulguları	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
6. ÖZET	52
7. ABSTRACT	53
8. KAYNAKLAR	54
9. ÖZGEÇMİŞ	67

I

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. TGF- β_2 Ailesi ve Alt Grupları	12
Tablo 2. Analizlerde Kullanılan Makine-Teçhizat ve Kimyasallar	16
Tablo 3. Hücrelerdeki TGF- β_2 İmmunoreaktivitesinin Derecelendirilmesi	19
Tablo 4. cDNA Sentezi İçin Kullanılan Karışımın İçeriği	22
Tablo 5. Real-Time PCR İçin Miks İçeriği.	23
Tablo 6. Real-Time PCR İçin Reaksiyon Koşulları	23
Tablo 7. TGF- β_2 ve GAPDH Primerlerinin Dizileri ve Tm Dereceleri	25
Tablo 8. Rat TGF- β_2 Geni Özellikleri	25
Tablo 9. Rat GAPDH Geni Özellikleri	26
Tablo 10. CAP Grubu İçinde Günlere Göre Canlı Ağırlık Karşılaştırılması	28
Tablo 11. Sham Grubu İçinde Günlere Göre Canlı Ağırlık Karşılaştırılması	29
Tablo 12. Kontrol Grubu İçinde Günlere Göre Canlı Ağırlık Karşılaştırılması	30
Tablo 13. Gruplar Arasında Testis Ağır. Canlı Ağırlığa Oranının Karşılaştırılması	30
Tablo 14. Kontrol, Sham ve CAP Gruplarında TGF- β_2 İmmunoreaktivite Yoğunluğu	36
Tablo 15. Gruplar Arasında GAPDH Geni Ekspresyon Karşılaştırılması	40
Tablo 16. Gruplar Arasında TGF- β_2 Geni Ekspresyon Karşılaştırılması	41
Tablo 17. Hedef ve Referans Gene Ait Kantitatif Değerler Kullanılarak Ortalama Gen Konsantrasyonları	43

II

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Capsaicin'in Yapısı.	7
Şekil 2. Real-Time PCR Reaksiyon Koşulları.	24
Şekil 3. Gruplar Arası Testis Ağırlığının Canlı Ağırlığa Oranının Karşılaştırılması.	31
Şekil 4. Kontrol Grubu Genel Görünüm.	32
Şekil 5. Sham Grubu Genel Görünüm.	32
Şekil 6. CAP Grubu Genel Görünüm.	33
Şekil 7. Kontrol Grubuna ait Hayvan Testislerinde Seminifer Tubul Kesitleri.	34
Şekil 8. CAP Grubuna ait Hayvan Testislerinde Seminifer Tubul Kesitleri.	35
Şekil 9. Negatif Kontrol Kesitinde İmmunoreaktivite.	36
Şekil 10. Kontrol Grubunda TGF- β_2 'ye ait immunoreaktivite.	37
Şekil 11. Sham Grubunda TGF- β_2 'nin immunoreaktivitesi.	37
Şekil 12. CAP Grubunda TGF- β_2 'nin immunoreaktivitesi.	38
Şekil 13. Standart Eğri (TGF- β_2).	39
Şekil 14. Standart Eğri (GAPDH).	39
Şekil 15. RNA Ürünlerinin Jel Görüntüsü.	40
Şekil 16. Gruplar Arasında GAPDH Geni Ekspresyon Karşılaştırılması.	41
Şekil 17. Real-Time PCR'da Yapılan Gen Amplifikasyon Yazılım Görüntüleri.	42
Şekil 18. TGF- β_2 mRNA Düzeyleri Yüzde Artış İlişkisi.	43

1. GİRİŞ

Acı kırmızı biber Solanacea familyasına dâhil olan bir bitki olup botanik biliminde *Capsicum annuum* olarak isimlendirilmekte ve etken maddesi capsaicin (CAP) olarak bilinmektedir. CAP yakıcı, acı, beyaz ve kokusuz özellikte bir alkaloid olup bu aktif komponent ilk olarak Tresh tarafından 1846 yılında izole edilmiştir (71, 117, 119).

CAP organizmada başta kardiovasküler, gastrointestinal ve solunum sistemleri olmak üzere pek çok sistemin histo-fizyolojileri üzerine etki göstermektedir. Özellikle bu etkilerinden dolayı tıp alanı ve ilaç sanayinde yaygın olarak kullanılmaya başlanılmıştır (56, 68, 124).

CAP'ın etkisi uygulama dozu ile şekline ve dokuya göre değişiklik göstermektedir (97, 103). Özellikle ameliyat sonrası CAP uygulaması nöropatik ağrılarda etkilidir. Ağrı duyusu ile CAP'ın doğrudan ilişkili olduğunu gösteren pek çok çalışma yapılmıştır. Sensorik sinirler üzerinde bulunan vanilloid reseptör 1 (VR1)'e bağlanan CAP, nöronda depolarizasyona ve nörotransmitter maddelerin, örneğin Substans P (SP) ve kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) salınmasına neden olmaktadır. Uygulamanın devam etmesi ile sensorik sinirlerden SP'nin salınımının tükenmesine ve sinirlerde desensitizasyon yaratarak ağrının ortadan kalkmasına dolayısıyla, nörotoksositeye sebep olmaktadır (15, 26, 71, 102, 113). Düşük konsantrasyonda CAP uygulanması immun sistemi uyarırken, yüksek dozu ise immun cevabı baskılar. Bu etki somatostatin ve SP salınımıyla bağlantılıdır. Düşük dozda verilen CAP, SP salınımını uyarır ve SP'de damar geçirgenliğini artırır ve sonuçta reaksiyon bölgesine T lenfositlerin göçü hızlanır, lenfokinlerin sentezi artar. Yüksek dozda verilen CAP ise SP salınımını azaltır ve dolayısıyla immun sistem üzerine baskılayıcı bir etki yapar (10, 46, 113).

Transforme edici gelişim faktörü beta (Transforming Growth Factor Beta/TGF- β), epitel hücre kültüründen 1980'lerin başında izole edilmiştir. TGF- β , epitel hücre kültürlerinde bulunan hücrelerde oluşturduğu fenotipik transformasyon nedeni ile bu adı almıştır (12, 99).

Hücre çoğalması açısından potansiyel bir inhibitör özelliği taşıyan TGF- β , çoğu mezenşimal, endoteliyal ve hemapoetik kök hücrelerde (hemositoblastlar) bu özelliği göstererek hücreyel çoğalmayı düzenler. TGF- β , hücre siklusunun G₁ fazında siklin-bağlı protein kinaz inhibitörü p15 üretimini uyararak ve hücre siklusu düzenleyicilerinden özellikle siklin-bağlı protein kinazlardan 2 ve 4 ile siklin A ve E'nin üretimini veya fonksiyonunu inhibe edip retinoblastoma genin (Rb) fosforilasyonunu azaltarak gösterir. Böylelikle hücreyel çoğalma inhibe edilerek hücreyel farklılaşma uyarılır veya apoptozis şekillenir. Kansersiz hücrelerde TGF- β sinyal iletim mekanizması zarar gördüğünden bu hücrelerde TGF- β 'ya karşı bir direnç gelişir ve hücre çoğalması kontrol edilemez **(11, 45)**.

TGF- β ailesine ait üyelerin, hücreler ile ekstraselüler matriks (ECM) arasındaki homeostazi sağladığı ve bu dengenin bozulması durumunda hastalıkların ortaya çıktığı belirlenmiştir **(11)**.

TGF- β , vücutta epitel, endotel, hematopoetik, nöral ve bağ dokuya ait hücreler tarafından üretilip; hücrelerin büyüme ve farklılaşmalarını, embriyonik gelişmeyi, yara iyileşmesini, seksüel gelişimi ve anjiyogenezi düzenler. TGF- β 'nın önemli görevlerinden biri de ekstraselüler matriksin üretimi ve depo edilmesidir. Ekstraselüler matriks iki şekilde üretilir. Birincisi; TGF- β fibroblastları ve diğer hücreleri uyararak ekstraselüler matriks proteinleri, integrinleri, fibronektinleri ve kollajenleri de içeren hücre adhezyon proteinlerinin üretimini artırır. İkincisi ise; ekstraselüler matriksin yıkımı sağlayan enzim üretimini azaltır **(11)**. TGF- β üretimindeki düzensizlikler akciğer, karaciğer ve böbreklerde fibrotik hastalıklara ayrıca arteroskleroza da neden olabilir **(12, 99)**.

Kapillar damar oluşumu defektine sahip farelerle yapılan bir çalışmada özellikle TGF- β_1 ya da TGF- β 'nın tip II reseptörünün bu defektin gelişimini önemli derecede azalttığı bildirilmiştir **(11)**. TGF- β , bütün lökositler tarafından üretilip, lökositlerin farklılaşmasını sağlarken aşırı çoğalmalarını ve aktive olmalarını da baskılar. TGF- β , lökositlerdeki adhezyon moleküllerini düzenler ve bu hücrelerde kemotaktik bir stimulan vazifesi görür **(11)**.

TGF- β 'ların bu özellikleri ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına karşın özellikle genital organlar üzerinde yapılan çalışma sayısı azdır. TGF- β_1 ve TGF- β_2 'nin fötal, neonatal, puberte ve erişkin rat testislerinde eksprese olduğu

bildirilmiştir. Föetal rat testislerinde TGF- β_1 ve TGF- β_2 hem sertoli hem de leydig hücrelerinde eksprese olurken, TGF- β_1 neonatal rat testislerinde sadece sertoli ile leydig hücrelerinde eksprese olmuştur (21, 93). Puberte dönemindeki rat testislerinde ise TGF- β_1 genç spermatid, sertoli ve leydig hücrelerinde, TGF- β_2 'nin de sadece leydig hücrelerinde eksprese olduğu saptanmıştır (88). Erişkin dönemdeki rat testislerinde TGF- β_1 sadece sertoli hücrelerinde ve genç spermatidlerde eksprese olmuş, buna karşılık TGF- β_2 ekspresyonuna ise hiçbir hücrede rastlanmamıştır ve bu faktörlerin testis organ kültürlerinde apoptozisi arttırmak suretiyle germ hücre sayısını düzenledikleri de belirlenmiştir (75, 122).

Bu çalışmada puberte dönemindeki ratlara capsaicin uygulanarak testislerdeki TGF- β_2 'nin gen ekspresyon düzeyi ve immunohistokimyasal lokalizasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Genital Sistemi

Erkek genital sistemi; eşey hücrelerini üreten testisler, bu hücreleri ileten kanallar (tubulus rektus, rete testis, duktuli eferentes, epididimis, duktus deferens), bu kanallara açılan yardımcı bezler (vezikula seminalis, bulbouretral bez, prostat) ve dış genital organ olan penisten ibarettir (120).

2.1.1. Testis

Testis, skrotum içerisine yerleşik bir çift organdır. Skrotum, testislerin ısını intra-abdominal ısının altında tutmayı sağlayan deriden bir kılıftır. İnce ve seyrek kıllı olan bu deri kılıf altında gevşek bağ doku bulunur (120). Organ kalın tunika albuginea ve skrotumun iç yüzeyini de örten ince tunika vaginalis ile kaplıdır (69). Tunika albuginea'dan organ içine uzanan bağ doku bölmeleri (septula testis), testis parenşimini her biri 1-4 kıvrımlı tubul içeren piramit şeklinde lopçuklara ayırır (24). Yetişkin rat testisi yaklaşık 20 adet seminifer tubulden oluşur ve her tubul 200-400 µm'lik bir çapa sahiptir. Bu kıvrımlı halkaların son uçları rete testis'e bağlanıp, rete testis'te spermatozoonu tubulustan epididimise taşır (69). Tubuluslar kıvrımlı bir yapıya sahip olduğundan, kesitlerde yuvarlak, oval ya da kıvrımlı bir görüntü verirler (120). Prenatal periyod boyunca abdomende gelişimini sürdüren testisler, doğuma az bir süre kala inguinal kanaldan geçerek skrotuma iner ve burada funikulus spermatikus ile asılı halde tutulurlar (114).

Testisleri çevreleyen tunika albuginea çok miktarda kollagen iplik ve az miktarda da elastik iplik içeren, kompakt, düzensiz bağ dokudan oluşan kalın bir kapsülden oluşmaktadır (3). Tunika albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturmaktadır. Tunika albuginea'dan organ içine çok sayıda giren ince fibröz bölmeler organı piramit biçimli lopçuklara ayırır. Tunika albuginea'dan içeriye uzanan bağ doku miktarında türler arasında farklılıklar olup, sıçan, fare ve köpek testisleri çok az intertubuler bağ dokuya sahiptir (106).

Testis, intersitisyum (intertubuler bölüm) ve tubulus seminiferus kontortuslar denen iki bölümden oluşur. Organ stromasını kan ve lenf damarlarından zengin olan intersitisyum oluşturur **(106)**. İntersitisyumda bulunan hücreler; fibroblastlar, farklılaşmamış bağ doku hücreleri, mast hücreleri, makrofajlar ve endokrin fonksiyona sahip leydig hücreleridir. Leydig hücreleri, puberte döneminde belirerek sekonder seks karakterlerini belirleyen testosteron hormonunu üretir. Bu hücreler steroid hormon sentezleyen hücrelere özgü organel ve enzimlerden zengindir, granülsüz endoplazma retikulumu ve tubulus tipi mitokondriyonlar steroid dehidrojenaz enzimi ile testosteronun öncüsü kolesterolü içerir **(6, 62, 105, 106)**.

Leydig hücrelerinde luteinizasyon hormon (Luteinisation Hormone/LH) reseptörü vardır **(121)**. LH, leydig hücrelerinin farklılaşması ve fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için temel faktördür **(32)**. LH, doğrudan ya da dolaylı olarak büyüme destekleyen faktörlerin üretimini düzenleyerek leydig hücre proliferasyonunu uyarır. Leydig hücre proliferasyonu, yetişkin rat testislerinde az miktardadır **(121)**. Leydig hücrelerinde androjenler olarak adlandırılan erkek seks steroidlerinin (testosterone, androstenedione ve dehydroepiandrosterone) sentez ve sekresyonu sağlanır **(59, 90)**. Androjenler leydig hücrelerine yakın olan kapillar delikçiklerinden sistemik dolaşıma katılır. Testosteron, sistemik dolaşıma girdiğinde vücuttaki hedef organları etkiler **(59)**. Üretilen testosteronun bir kısmı da intersitisyel sıvı içerisine verilerek spermatogeneziste parakrin ve otokrin bir etki gösterir **(32, 69)**. Puberte ile birlikte leydig hücrelerince salgılanan testosteronun ana fonksiyonları arasında seksüel isteğin (libido) belirmesi, eklenik genital bezlerin fonksiyonunun sürdürülmesi, spermatogenezisin kontrolü, sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkması, hipofiz ve hipotalamusta negatif geri tepki ve genel anabolik etkiler olarak sayılabilir **(24, 59, 69)**.

Leydig hücreleri, insülin benzeri faktör 3 (Insl3) ya da leydig- insülin benzeri peptid (Ley-IL) olarak da bilinen relaksin benzeri faktör (RLF)'ü salgırlar **(1, 5, 66, 70)**.

Kör uçlarla başlayan kıvrımlanmış tubulus seminiferus kontortuslar, testisin parankimini oluşturan 200-400 µm çapında kanalcıklardır. Tubulus seminiferus kontortuslar fibröz bağ doku kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve germinal (seminifer) epitelden oluşmaktadır **(38)**. Tüm memeli türlerinde testiste tubulleri çevreleyen

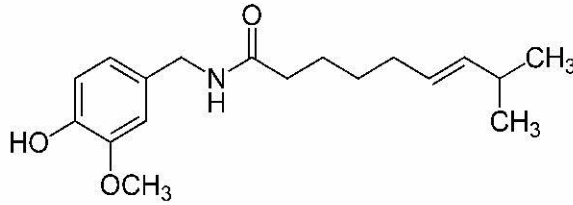
myoid hücreler vardır (24). Myoid hücreler, spermin tubullere ilerletilmesi ve sıvının hareketi için bir güç sağladığı ve Leydig hücrelerinin testosteron uyarısını sertoli hücrelerine aktararak androjen bağlayıcı protein (ABP) yapımına katkıda bulunduğu bildirilmektedir (106). Ayrıca büyüme faktörleri yanı sıra kollajen tip I, fibronektin, proteoglikanlar ve plazminojen-aktivatör-inhibitör ile bazı sekresyon ürünlerinin yapımında da rol aldığı tespit edilmiştir (38).

Tubulus seminiferus kontortuslar spermatogenik hücrelerin yanı sıra sertoli hücreleri diye adlandırılan destek hücrelerine de sahiptirler (105). Sertoli hücreleri seminifer tubul içinde germ hücreleri arasında yerleşik olan somatik hücrelerdir. Pubertal gelişim esnasında sertoli hücre bölünmesi durur. Erişkin sertoli hücre popülasyonu hayvanın yaşamı boyunca sabit olarak kalır (106). Sertoli hücrelerinin bazal bazal membrana ve apikal kısmı tubulus seminiferus kontortusların lumenine doğru uzanır. Işık mikroskopik olarak sertoli hücrelerinin sınırları, lateral uzantıların spermatogenik serideki hücreleri çevrelemesinden dolayı zayıf olarak görülmektedir (62). Ökromatik yapıdaki oval nükleus genellikle bazalde yerleşmiştir ve belirgin bir nükleolusa sahiptir. Nüklear membranda karakteristik uzunlamasına bir kıvrım görülebilir (6). Sertoli hücreleri tarafından üretilen proteinler germ hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve metabolizmasını düzenler. Germ hücrelerine destek sağlama ve fonksiyonlarını düzenleyerek spermatogenezin regülasyonunda önemli rol oynar (17, 35). Sertoli hücreleri tarafından salgılanan demir bağlayıcı özelliği olan transferin özellikle germ hücre maturasyonu ve bölünmesi için gereklidir. Ayrıca interlekin 1 (IL-1) ve interlekin 6 (IL-6) gibi sitokinlerde hücreler proliferasyonu ve farklılaşmayı düzenlerler (35). Sertoli hücreleri, androjen bağlayıcı protein (ABP) dışında, inhibin hormonu ile az miktarda da östrojen hormonu salgılar. İnhibin, hipofiz ön lobundan FSH hormonunun salgılanmasını önler (43, 69). Östrojen hormonu da Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronun, sertoli hücrelerinde östrojene çevrilmesiyle elde edilmektedir (43).

2.2. Capsaicin

Capsicum annuum olarak bilinen acı kırmızı biber botanik biliminde Solanacea familyasına ait bir bitkidir. Bu bitkinin etken maddesi olan CAP acı, yakıcı, beyaz ve kokusuz özellikte alkaloid ($C_{18}H_{17}NO_3$) yapıda bir maddedir. CAP; oranı, kırmızı biberin acılık derecesini belirlemekte ve biberdeki kuru ağırlığı ortalama 0.83- 1.32 mg /g civarında olmaktadır (71, 74, 119).

Bitkinin anavatanı Meksika olup, 1492 yılında Amerika'nın keşfi ile birlikte Avrupa'ya getirilmiştir. Acı kırmızı biberin kullanımı Azteklere kadar uzanmakta ve yazıtlarından bunu antimikrobiyal ve antihemolitik ajan olarak kullandıkları anlaşılmaktadır. Fransız botanikçi Turneyfort bitkiye latince *Capsicum* ismini vermiştir. Acı kırmızı biberin acılığını veren alkaloid yapıdaki bu bileşen ilk olarak Tresh tarafından 1846 yılında izole edilmiş ve Tresh bu bileşeni CAP olarak isimlendirdikten sonra bunun yapısının vanilloidler ile yakından ilişkili olduğunu bildirmiştir (117). Daha sonra Szallasi ve Blumberg vanilloidleri endojen ve ekzojen olarak iki gruba ayırmışlardır. Vanilloid etkenler, çoğunlukla periferel sinir sonlarında ve belirli tipte reseptörler ile etkileşime girmektedirler (49, 117).



Şekil 1. *Capsaicin*'in yapısı (117).

Kırmızı acı biber özellikle Hint ve Meksika mutfağında olmak üzere dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (117, 134). Ülkemizde en fazla Güney Doğu Anadolu Bölgesinde yaygın olarak yetiştirilmekte ve tüketilmektedir. Gıda katkı maddesi ve ağrı giderici olarak kullanımı çok eski yıllara dayanmaktadır.

CAP, organizmada başta gastrointestinal, kardiovasküler ve solunum sistemleri olmak üzere pek çok sistem üzerinde etki göstermektedir. Son yıllarda fizyolojik ve farmakolojik etkilerinden dolayı tıpta ve ilaç sanayisinde kullanımı

yaygınlaşmaktadır. CAP'ın organizmada etkisi, dozuna, uygulama şekline ve hedef organa göre değişiklikler göstermektedir (56, 68, 124).

CAP, başlıca sensorik sinirler üzerinde olan VR1 aracılığı ile nöronlarda; nöronal eksitasyon, proinflamatuvar mediyatörlerin salınımı, reseptörün desensitizasyonu ve nöronal toksisiteyi içeren olaylar zincirini tetikler (26, 102). CAP'ın VR1'e bağlanması nöropeptid maddelerin (SP, CGRP) salınımına neden olmaktadır. CAP uygulamasının devam etmesi durumunda sensorik sinirlerden SP'nin salınımını azalır ve buda ağrının ortadan kalkmasına dolayısı ile nörotoksisiteye neden olur (26, 71, 102). Ratlara kronik CAP uygulama sonucunda, medulla spinalislerindeki dorsal kornuda primer sensorik nöronlarda SP'nin spesifik ve etkileyici bir şekilde azaldığı görülmüş ve *capsaicin* uygulamasının devam etmesi halinde nöronların bir bölümünde önce uyarım ile başlayan sonra "*Capsaicin duyarsızlığı*" olarak kabul edilen etkilerin ortaya çıktığı bildirilmiştir (125). Janes'o-G'abor ve ark. (54) çalışmalarında, CAP'ın primer sensorik nöronları ve termoregülasyondan sorumlu olan hipotalamik nöronları aktive ettiğini ve bu sinirlerde oluşan hasarı azalttığını bildirmişlerdir.

Fizyologlar son iki yüzyılda yaptıkları çalışmalarda, CAP'ın topikal ya da sistemik uygulanmasının ardından ağrı kesici etkisinden başka, hipotansiyon ardından hipertansiyon, organlarda hiperaktivite sonrası refleks azalması, taşikardi, bronkokonstriksiyon, öksürük ve hipotermiyi takiben bradikardi şekillendiğini bildirmişlerdir (30, 56, 76).

CAP, doza bağlı olarak immun sistem üzerinde çeşitli etkiler göstermektedir. CAP uygulaması düşük konsantrasyonlarda immun sistemi uyarırken, yüksek dozu immun cevabı baskılar. Bu etkisini somatostatin ve SP salınımını uyararak gösterir. Düşük dozda verilen CAP, SP salınımını uyarır ve SP'de damar geçirgenliğini artırır ve sonuçta reaksiyon bölgesine T lenfositlerin göçü hızlanır, lenfokinlerin sentezi artar. Yüksek dozda verilen CAP ise SP salınımını duraklatır ve dolayısıyla immun sistem üzerine baskılayıcı etki yapar (10, 46, 113).

CAP'ın karbonhidrat metabolizmasını ve karaciğer enzimlerinin aktivitesini artırdığı (83), lipid metabolizmasını stimüle ederek yağ dokuda lipidlerin yakılmasını kolaylaştırdığı (83) ve oksijen tüketimini artırdığı saptanmıştır. Ayrıca, CAP'ın solunumu başlangıçta artırdığı sonra azalttığı ve serum glikoz-insülin seviyesini

arttırdığı belirlenmiştir. Çalışmalar göstermiştir ki capsaicin'in karaciğer glikojeninde hızlı bir azalmayla birlikte serum trigliseridlerinde dereceli artış sağladığı, dolaşım sisteminin fonksiyonuna yardımcı olduğu ve bunun sonucunda metabolizma üzerine genel uyarıcı etki yaptığı bildirilmiştir (73, 81, 83, 133).

Sindirim sistemi üzerinde CAP'ın anti-mikrobiyal ve anti-kanserojenik etkileri olduğu belirtilmiştir. Salmonella enteritis ile enfekte edilmiş kanatlılarda diyet ile verilen capsaicin'in iyileştirici etkisi olduğu bildirilmiştir (123).

Ratlarda, kalp operasyonlarında deri altı uygulanan CAP'ın (50 mg/kg) muhtemelen CGRP uyarılmasına bağlı olarak doku korunmasının arttığı saptanmıştır (136). CAP'ın uzun süreli kullanımının midede alkol, aspirin ya da stress gibi ajanlar ile oluşan lezyonların iyileşmesinde etkili olduğu bildirilerek, oluşacak hasarlara karşı da koruyucu rol oynadığı, bu durum üzerinde CAP'a duyarlı afferent nöronların etkin olduğu belirtilmiştir (124).

Pospisilova ve arkadaşları (100) küçük ensizyonlar oluşturdukları ratlara yüksek dozda CAP vererek capsaicin'in analjezik etkisini göstermişlerdir.

CAP, periferel sinirler üzerine kimyasal madde yanıkları ve normal yanıklar sonucu oluşan ağrıları gidermek amacıyla direkt olarak tedavi amaçlı kullanılmış ve CAP'ın periferel orjinli ağrıları gerçekten azalttığı belirtilmiştir (13, 55). CAP lokal olarak uygulandığında, nörojenik vasküler reaksiyonu azaltarak ve capsaicin'e duyarlı sinir fibrillerinin yenilenmesini sağlayarak ağrı eşiği şiddetini artırır. CAP'ın lokal olarak uygulanması deride hiçbir lezyon oluşturmazken, neonatal CAP uygulamaları sonucunda deride lezyon oluşumu gözlenmiştir (13, 80). İçinde %0.025- 0.075 oranında CAP içeren preparatlar herpes virus zonaları, diyabetik nöropati, torakotomi, mastektomi, amputasyon ağrıları ve ağrılı deri tümörleri gibi patolojik vakaların çoğunda geniş bir kullanım alanı bulmuştur (130, 131).

CAP'ın intranasal uygulamaları sonucunda kronik baş ağrıları tedavi edilebilmiştir. Ayrıca vanilloidlerin epidural ya da intratekal uygulamaları sonucunda da ağrı hissi kaybı şekillenmektedir (110).

Neonatal ratlara *capsaicin*'in sistemik olarak uygulaması sonucunda CAP'a duyarlı spinal ve kranial sensorik ganglionlarda, topikal uygulamaları sonucunda ise temporal peptiderjik ve nonpeptiderjik afferent sinir fibrillerinde lokal olarak kayıp

şekillenir (27). Perinöral olarak uygulanan *capsaicin* sonucunda CAP'a duyarlı sinir fibrillerinde duyu kaybı şekillenir (28).

Özer ve arkadaşları (95, 96) tarafından yapılan çalışmalarda, rasyonlarına acı kırmızı biber ilave edilerek beslenen civcivlerden puberte çağına gelmiş tavuk ve horozlarda karın içi yağlanmanın azaldığını, canlı ağırlık artışının yavaşladığını, tavukların ovaryumlarında folliküler gelişmenin daha hızlı olduğunu ve kontrol grubuna oranla deney grubu tavukların 11 gün önce ve iki kat daha fazla sayıda yumurta verdiklerini belirtmişlerdir. Erken yumurtlamaya paralel olarak rasyonunda acı kırmızıbiber olanların beslenenlerde yumurta kanalında epitelyal ve kassal gelişmenin kontrol grubuna göre daha erken olduğu gözlenmiştir. Deney grubu horozlarda ise deney grubunda testis ağırlığı, uzunluğu, genişliği ve seminifer tubullerde duvar kalınlığının arttığı belirlenmiştir. Üçüncü aydan itibaren seminifer tubullarda spermatogenik hücre serisinde tamamlanma, sertoli hücrelerinde fonksiyonel faza geçiş, tubul lumenlerinde spermatozoonların varlığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunda bu özellikler ancak bir ay sonra gözlenebilmiştir. Deney grubunda epididimal kanalda 3. aydan itibaren, kontrol grubunda ise bundan bir ay sonra spermatozoonlar tespit edilmiştir.

Erdost ve ark. (29), bir günlük yaştan beş aylık yaşa kadar diyetlerine düşük dozda acı kırmızıbiber ilave edilen tavuk ve horozların hipofiz bezinde FSH ve LH sentezinin ilk aylardan itibaren arttığını saptamışlardır. FSH-ir (Folikül Stimülan hormon immun reaktif) ve LH-ir (Luteinizan hormon immun reaktif) hücre aktivitesinde görülen artış, bu hormonların hedef organları olan gonad gelişimini etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Hipofiz ön lobunda hücreler arasında endokrin hücreler ile sinaptik ilişki içinde olan çok sayıda SP içeren fibriller olduğunu belirtmişlerdir. Bu fibrillerin hipofiz ön lob hormonlarının nöral kontrolünü sağladıkları düşünüldüğünde CAP'ın bu fibriller ve sistemler üzerindeki olası etkisinin de oldukça fazla olabileceği düşünülmüştür.

2.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)

TGF- β , 40'tan fazla sitokin içeren büyük bir ailedir. Bu aile TGF- β 'lar, Growth Differentiation Factor (GDF), Bone Morphogenetic Proteinler (BMP), Aktivinler, Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF), Anti- Müllerian Hormon (AMH), Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1), Osteogenic Protein (OP), Inhibin- α , Lefty A, Lefty B, Neurturin (NTN), Persephin, Artemin ve Nodal gibi sitokinler ve bunların alt gruplarından oluşmaktadır (Tablo 1) (99).

TGF- β 'lar organizmada epitel, endotel, hematopoietik, nöral ve bağ doku hücreleri tarafından üretilen çok fonksiyonlu ekstraselüler proteinlerdir. Günümüzde TGF- β ailesine ait üyelerin, hücrelerin büyümesini ve farklılaşmalarını, embriyonik gelişmeyi, yara iyileşmesini, anjiyogenezi ve seksüel gelişimi düzenlediği saptanmıştır (12, 99).

TGF- β ailesi, yapısal olarak birbirlerine benzer ancak değişik polipeptidler nedeni ile 5 alt grupta incelenirler. Bunlar sırasıyla TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 , TGF- β_4 ve TGF- β_5 'tir. TGF- β_1 , TGF- β_2 ve TGF- β_3 memelilerden izole edilirken, TGF- β_4 ve TGF- β_5 kuş ve Afrika pençeli kurbağa (*Xenopus laevis*)'da izole edilmiştir. TGF β_1 hematopoietik, endotel ve bağ doku hücrelerinde eksprese edilirken, TGF- β_2 nöral ve epitelyum hücrelerde, TGF- β_3 mezenşimal hücrelerde eksprese edilmiştir (33).

TGF- β ailesi hemen hemen bütün hücrelerde bulunan yüksek affiniteli hücre yüzey reseptörlerine bağlanmaktadır. Hücre yüzeyinde 2 tip TGF- β reseptörü olup, bunlar 65 kDa ağırlığında olan tip I ve 85-90 kDa ağırlığında olan tip II reseptörleridir. Öncelikle hücre yüzeyinde bulunan tip II reseptörüne bağlanan TGF- β , daha sonra tip II reseptörün tip I reseptörünü fosforlaması ve fosforlanan tip I reseptörünün hücre içinde bulunan ve sinyal iletiminden sorumlu Smad proteinlerini etkileyerek hücre yüzeyindeki TGF- β 'dan gelen sinyalleri hücre çekirdeğine iletir (87, 88).

Testiküler fonksiyonlar, luteinizasyon hormonu (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) gibi gonadotropinlerin yanı sıra bunlarla birlikte insulin-like growth factor-insülin benzeri büyüme faktörü- (IGF) ve epidermal growth factor-epidermal büyüme faktörü- (EGF), TGF- β gibi sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin de kontrolü

altındadır. Memeli testislerinde yapılan çalışmalarda TGF- β_1 , TGF- β_2 ve TGF- β_3 izole edilmiş ve bu büyüme faktörlerinin testiküler fonksiyonları parakrin/otokrin yolla düzenlediklerini göstermişlerdir (136) .

Tablo 1. TGF- β ailesi ve alt grupları (99).

AMH: anti-Müllerian hormon, BMP: Bone morphogenetic hormon

CDMP: Cartilage derived morphogenetic hormon

GDF: Growth differentiation factor, GDNF: Glial derived neurotrophic factor

MIC-I: Macrophage inhibitory cytokine-1, OP: Osteogenetic protein

<u>TGF- β'lar</u>	<u>BMP/GDF</u>	<u>Activin</u>	<u>Diğerleri</u>
TGF- β_1	BMP-2	Activin β_A	AMP
TGF- β_2	BMP-4	Activin β_B	Inhibin- α
TGF- β_3	BMP-5	Activin β_C	Lefty A
TGF- β_4	BMP-6	Activin β_E	Lefty B
TGF- β_4	BMP-7/OP-1		GDNF
TGF- β_5	BMP-8a/OP-2		Neurturin
	BMP-8b/OP-3		Persephin
	BMP-14/GDF-5/CDMP-1		Artemin
	BMP-13/GDF-6/CDMP-2		MIC-1/GDF-15
	BMP-12/GDF-7/CDMP-3		Nodal
	GDF-1		
	GDF-3		
	BMP-9/GDF-2		
	BMP-10		
	BMP-11/GDF-11		
	GDF-8/Myostatin		
	BMP-3/Osteogenin		
	BMP-3b/GDF-10		
	GDF-9		
	GDF-9B/BMP-15		
	BMP-16, -17, -18		

TGF- β 'nın ftal leydig hcrelerinde steroidogenezi düzenlediği belirlenmiştir. TGF- β_1 , doğumdan puberte dönemine kadar sadece leydig hücrelerinde LH'nın antagonisti değil aynı zamanda sertoli hücrelerinde de FSH'nın da antagonistidir (75). Puberteye ulaşmamış domuz testislerinden elde edilen sertoli hücrelerinde yapılan bir çalışmada TGF- β_1 'in FSH salınımını engellediği belirlenmiştir (85). TGF- β 'nın düşük konsantrasyonları (~0,06-0,4 ng/ml) ftal domuz leydig hücrelerinde LH salınımını uyararak leydig hücrelerinden testosteron üretimini arttırırken yüksek konsantrasyonları (~2,5-10ng/mL) testosteron salınımını inhibe eder. Ftal rat leydig hücrelerinde ise TGF- β_1 'in 1ng/mL dozu ise LH salınımını uyararak testosteron üretimini %75 arttırmaktadır. Bu alışmalar sonucunda TGF- β 'nın miktarına bağlı olarak testis leydig hücrelerinde steroidogenezi hem arttırmakta hem de azaltmakta olduğunu göstermiştir (8, 75).

Pubertenin başlangıcı için leydig hücrelerinin proliferasyonu önemlidir. Leydig hücrelerindeki sayıca artış testosteron üretiminde bir dalgalanma meydana getirir. Ratlarda, olgunlaşmamış leydig hücrelerinin proliferasyonu doğumdan sonraki 14. günde başlar, 21. ve 28. günler arasında hücre sayısında dikkat çekici bir artış görülür. Yapılan bir çalışmada (75), 10 günlük ratlardan elde edilen leydig hücrelerinde, TGF- β_1 'in LH salınımını inhibe ettiği ve leydig hücrelerinde DNA sentezini durdurduğu gözlenilmiştir. Bu veriler ışığında TGF- β_1 'in sadece steroidogenezi düzenlemekle kalmadığı ayrıca leydig hücrelerinde DNA sentezini de kontrol altında tuttuğu saptanmıştır (65). Ayrıca ftal ve neonatal ratlarda yapılan bir çalışmada (93), TGF- β_1 ve TGF- β_2 'nin gonositlerin proliferasyonu sırasında bu hücrelerin mitotik aktivitesini bozmadan apoptosise neden oldukları bildirilmiştir.

TGF- β 'ların gen transkripsiyonunu stimüle ettiği ve ekstrasellüler protein sentezini (ECM) arttırdığı bildirilmiştir (75). TGF- β tarafından uyarılan fibroblastlar tip I, tip III, tip IV, tip V kollajen ve fibronektin sentezler. TGF- β_1 , ECM protein sentezi üzerine sertoli hücrelerinde de benzer etkilere sahiptir. TGF- β_1 sertoli hücrelerinde proteoglikanların sentezlenmesine neden olur ve anabolizmayı düzenlerler. TGF- β_1 , kollajen ekspresyonunun düzenlenmesi dışında *in vivo* alışmalarda germ hücrelerinin göçü sırasında proteolizisi sınırladığı düşünülen ve Sertoli hücrelerince salgılanan plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1)'i stimüle ettiği gösterilmiştir (79, 104, 129).

TGF- β , mezenşimal prekürsör hücreler için mitojendir. LH veya insan koryonik gonadotropin (human chorionic gonadotropin-hCG) varlığında hem TGF α hem de TGF β –TGF α 'den daha az- leydig hücrelerinde mitozu uyarır **(41, 121)**.

TGF- β_1 , peritübüler hücrelerin kontraktilesini ve hücre şeklini düzenlemekte ve embriyogenez sırasında primordial germ hücrelerinin göçü sırasında kemotrofik etkiye sahiptir **(75)**.

Yapılan pek çok çalışma, testislerde her bir TGF- β izoformunun tek bir görevi olduğunu göstermiştir. Örneğin pubertenin başlangıcında TGF- β_1 LH ve FSH gibi gonadotropinlerin salınımını duraksatarak testis gelişimini, TGF- β_2 germ hücrelerinin çoğalmasını ve TGF- β_3 spermatogenik hücre farklılaşmasını düzenlemektedir. **(67, 75, 88)**.

2.4. Vanilloid Reseptör 1 (VR1)

Vanilloidler, çoğunluğu periferel sinirlerde yer alan ve vanilloid reseptör (VR) olarak tanımlanan reseptörlerle etkileşim halindedir. Vanilloidler ekzojen ve endojen olarak ikiye ayrılmakta ve CAP ekzojen vanilloidler sınıfına girmektedir **(14, 116, 117)**. CAP'ın, organizmada spesifik olarak bağlandığı reseptör CAP reseptörü ya da vanilloid reseptör 1 (VR1) olarak adlandırılmaktadır. VR1, ~95 kDa ağırlığında ve 426 aminoasit içeren bir proteindir. VR1, TRP (Transient Receptor Potential) ailesi içinde yer alan bir iyon kanal reseptörüdür **(14)**.

VR1, CAP tarafından 43°C in üzerindeki sıcaklıkta ve düşük pH da (pH \leq 5) oluşan membran depolarizasyonu ve iyon kanallarının açılması sonucu aktive edilmektedir. VR1, ilk olarak sadece santral sinir sistemindeki nöronlarda ortaya konmuşken, son zamanlarda yapılan çalışmalar VR1'in mast hücreleri, derideki keratinositler ve idrar kesesi epitel hücreleri ile düz kas hücreleri, sitoplazmik membran, endoplazmik retikulum, incebarsak villusları, gastrik epitel hücreleri ve koroner arterlerin perivasküler kıvrımları gibi nöron içermeyen çeşitli hücrelerde de bulunduğunu göstermişlerdir **(36, 37, 84, 135)**.

VR1, sensorik nöronlarda nöropeptidlerin salınımında rol oynar. CAP'ın VR1'e bağlanmasıyla Na^+ , Ca^+ ve K^+ iyonlarının hücre içine akışı gerçekleşmektedir. Bu durumda nöronda depolarizasyon ve nöropeptid maddelerin, örneğin nörokinin A (NKA), SP ve CGRP'in salgılanmasına neden olmaktadır (37).

CAP'ın düşük dozlarda gastrik mukozayı, asit ve alkol gibi maddelerin oluşturduğu hasarlara karşı koruduğu da tespit edilmiştir (118). CAP doku hasarlarını farklı mekanizmalar aracılığı ile de önlemektedir. Bu mekanizmalardan ilkinde göre; CAP primer sensorik nöronlardan CGRP'in ekspresyonunu uyararak damarlarda gevşeme şekillenir ve oluşan hiperemi ile doku hasarı önlenir. Diğer mekanizmaya göre; CAP'ın CGRP ekspresyonunu arttırması sonucunda prostaglandin E2 aktive olur ve buda salgı yapan hücreleri uyararak koruma mekanizmasını harekete geçirir (42, 107). Pothoulakis ve arkadaşları (101) VR1'in gastrointestinal sistemde primer sensorik nöronları uyararak yangı ve hipermotilitenin gelişmesine neden olduğunu ve burada aracı rolünü SP'nin oynadığını saptamışlardır.

VR1 çeşitli patolojik olguların başlamasında etkili bir kontrol mekanizmasıdır (15, 126). Bir kısım yapılan çalışma ile yangı, aşırı ağrı hassasiyeti ve viseral hiperrefleks gibi patolojik durumların gelişmesinde VR1'in etkili olduğu gösterilmiştir (4, 23). CAP'ın ağrı ve yangıyı arttırdığı, fakat buna karşın lokal uygulamaları sonucunda da yangıya bağlı aşırı ağrı hassasiyetini azattığını bildiren çalışmalar vardır (19). CAP reseptörünün yangıya bağlı olarak gelişen aşırı ağrı hassasiyetinin gelişmesindeki etkilerine bakılmış; bu mekanizma ile ilgili olarak iki hipotez üzerinde durulmuştur. Birinci hipoteze göre; sinir büyüme faktörü (NGF), bradikinin, ATP ya da prostaglandin E2 (PGE2) gibi yangı ajanları yangı süresince eksprese edilir ve bunun sonucunda primer sensorik nöronların periferel uçlarından yangıdan sorumlu reseptörlerin ekspresyonu gerçekleşir. Yangıdan sorumlu reseptörlerin aktivasyonu ile hücre içi iletilerin (PKA-Protein kinaz A, PKC-Protein kinaz C, PLC- Fosfolipaz C) oluşması tetiklenir ve TRPV1 (transient receptor potential cation channel of vanilloid type 1) iyon kanalları boyunca oluşan yüksek reseptör eşliğini azaltır (18, 72, 115, 127). İkinci hipotez ise; endojen ligandların reseptör aktivitesini etkilediği ile ilgilidir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Deney Hayvanları ve Bakım Koşulları

Çalışma, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında ve Qiagen-ATQ Biyoteknoloji firması Ankara laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma materyali olarak Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden sağlanan puberte dönemindeki 50 günlük, 30 adet Sprague Dawley ırkı erkek ratlar kullanıldı. Ratların, *adlibitum*, pelet şeklinde standart rat yemi ile beslenerek, içme suyunu serbest olarak tüketmeleri sağlandı. Ratlar, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda, 20-22°C sıcaklık ve ortalama % 45-60 nem içeren ortamda bakıldı.

Çalışmadaki tüm deneysel işlemler Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar no: 08.01.2010/01).

3.2. Analizler için Kullanılan Makine-Techizat ve Kimyasallar

Tablo 2. Analizlerde kullanılan makine-techizat ve kimyasallar.

Makine-Techizat/Kimyasal	Marka	Kod/Model
Rotor-gene Q	Qiagen	Q serisi
Histostain-Plus Kit (AEC-150)	Invitrogen	859943
TGFBETA2 (V)	Santa Cruz	SC-90
Vision Mount	Thermo/Lab Vision	TA-125-UG
Capsaicin	Fluka	21750
Tween-20	Merck	M822184.050
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
RT-Std/Reverse transcription kit	Qiagen	4900588
HK-SY-RA-600/Rat SYBRgreen housekp(600)	Qiagen	4900594
SY-RA-600/Custom RT PCR primer kit(600)	Qiagen	4900577
PRECISION/Precision Mastermix 12.5ml	Precision	4900573
Sample Tubes CB (2ml)	Qiagen	990382

50µl Filtered Sterile Tips (960)	Qiagen	990532
TRI-Reagent for DNA, RNA and protein	Fluka	93289
Eppendorf Tüp-mikrosantrifüj p.p (1.5 ml)	İsolab	078.03.002
Ethidium bromide aqueous solution	Sigma	E1510
Mikropipet ucu (100-1000µl)	Usascientific	S1111-2021
6 x Loading dye (1ml)	Promega	G190A
Gelatine (500 gr.)	Merck	1040700500
Potassium chromiun (III) sülfate, $KCr(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ (1 kg)	Merck	K-2830535
Sodium azide (100 gr.)	Merck	M1066880100
50002/SeaKem Le Agarose (100g)	Seakem	4900469
Dimethyl sülfokside	Merck	M102952.250
Paraffin (46-48°C)	Merck	M107151.100
Paraffin (56-58 °C)	Merck	M107337.100
Eosin Y-Solution %0.5 Aqueous	Merck	M109844.100
Xylene	Riedel	16446
Ethanol absolut %99.8	Riedel	32221
Formaldehide solution %37	Riedel	15512
Methanol free from acetone, extra pure	Riedel	24229
Hematoxylin (C.I.75290) cryst.	Merck	M104302.002
Methylenblau (1 gr.) CH_3CH_2OH	Merck	M457250
Fuchsin (25 gr.) $C_{20}H_{20}ClN_3$	Merck	M1052310025
Diethyl ether	Merck	M100926.500
Sitrik asit	Carlo Erba	403727
Sodyum hidroksit (1 kg.)	Merck	M1064621000
Borik asit	Merck	M1001651000
Tris-Base	Merck	M648310

3.3. Deney grupları

Puberte dönemindeki ratlar, deneme (n:10), sham (n:10) ve kontrol (n:10) olarak 3 gruba ayrıldı. Deneme grubundaki ratlara, 1 mg/kg/gün dozdaki CAP %10 etanol içinde çözdürüldü ve %1 Tween 20 ile distile su ilave edildikten sonra subkutan olarak 0.3 cc. insülin enjektörü ile enjekte edildi. Sham grubundaki ratlara, 0.3 cc %10 etanol, %1 Tween 20 ve distile sudan oluşan taşıyıcı solüsyon hazırlanarak subkutan olarak enjekte edildi. Kontrol grubundaki ratlara ise herhangi bir enjeksiyon yapılmadı.

Deneme ve Sham grubuna 1 haftalık enjeksiyondan sonra 1 hafta ara verildi ve süre bitiminde tüm çalışma gruplarındaki ratlar canlı vücut ağırlıkları tartıldıktan sonra dietil eter anestezisi altında servikal dislokasyonla öldürüldü. Ratlardan alınan testis dokusunun tartımları yapıldı. Alınan testis dokusu histoloji, immunohistokimya ve genetik analiz için iki kısma ayrıldı.

3.4. Histolojik Analiz

Servikal dislokasyon ile öldürülen ratlardan alınan testisin bir kısmı histolojik ve immunohistokimyasal analizlerde kullanılmak üzere Formaldehit ve Bouin solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen bu dokular rutin olarak dereceli alkol serilerinden, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek parafinde bloklandı ve bloklardan önceden krom alum jelatin (CAG) ile kaplanmış lamlara 4 µm'lik seri kesitler alındı. Lam üzerindeki doku kesitleri Crossman üçlü boyaması (Triple Boyama) (20) ile boyandı. Boyama işlemi sonunda doku kesiti üzerine 1 damla entallen damlatılıp üzeri lamelle kapatıldı.

3.5. İmmunohistokimyasal Analiz

İmmunohistokimya; belli bir dokuda bulunan antijenlerin gösterilmesi amacıyla işaretlenmiş antikörlerin kullanılmasıdır. Belirli antijenler içeren doku kesiti, bu antijenlere karşı işaretlenmiş antikörler içeren bir solüsyonda inkübe edildiği zaman, antikörler spesifik olarak antijenlere bağlanır. Böylece antijen-antikör komplekslerinin yerleşimleri ya ışık (immunohistokimya) ya da elektron mikroskopla (ultrastrüktürel immunositokimya) gözlenebilir.

Parafin bloklardan alınan 4 µm'lik kesitlerde TGF-β₂'nin varlığı immunohistokimyasal yöntemlerden indirekt streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi (48) kullanılarak gösterildi. İşlem sonunda kesitler kurularak su bazlı yapıştırıcı damlatılıp lamelle kapatıldı. Işık mikroskopunda preparatlar incelendikten sonra fotoğrafları çekildi. Hücrelerdeki TGF-β₂ immunoreaktivitesi, renklerin koyuluk derecesine göre, birbiriyle mukayese edilerek belirlendi. Derecelendirilmede kullanılan semboller Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Hücrelerdeki TGF-β₂ immunoreaktivitesinin derecelendirilmesi.

Hücredeki Reaksiyon Yoğunluğu	Semboller
Çok yoğun	+++
Orta derecede yoğun	++
Az yoğun	+
Reaksiyon yok	0

3.6. Real-Time PCR

Polimeraz zincir reaksiyonunda, temel olarak mekanizma yüksek sıcaklıkta yapısı bozulmayan bir DNA polimeraz kullanılarak, bir Thermo Cycler (ısı düzenleyici) yardımıyla DNA replikasyonunu in vitro ortamda tekrarlanması sonucu DNA'nın çoğaltılmasını sağlamaktır. Tüm Real-Time PCR sistemleri, reaksiyondaki PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan belirleyici bir floresan boyadan alınan boya miktarı arasındaki orantı esasına dayalı olarak çalışır. Floresan boya

miktarının ölçümü esasına dayanan bu sistemlerde belli bir diziye bağlı kalmadan tüm çift iplikli DNA molekülüne bağlanan floresan boyalar ya da belirlenmiş bir PCR ürünü üzerindeki spesifik bir diziye bağlanabilen oligonükleotit hibridizasyon problemleri kullanılır.

Deney süresi sona erdiğinde her bir gruba ait ratlar servikal dislokasyon uygulandıktan sonra testis dokusunun bir kısmı Real-Time PCR çalışmaları için TRI-Reagent içine konarak homojenize edildi ve +4 °C de çalışma başlangıcına kadar saklandı.

3.6.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için spin column teknolojisi kullanıldı.

1. TRI-Reagent içinde homojenize edilerek +4 °C de saklanan dokular 4 dakika 10000 rpm de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Doku üzerine 600 µl. buffer RLT + 6 µl. mercaptoethanol (β -ME) konuldu ve vortekslendi.
2. Ependorf tüpündeki doku 4 dakika 14000 rpm. de santrifüj edildi ve süpernatant kısmı başka bir ependorf tüpüne alındı. İçinde süpernatant olan tüpe 600 µl. %70 lik etanol eklendi ve vortekslendi.
3. Ependorf tüpü içerisindeki süpernatantın 700 µl. si kolonlara (RNeasy mini spin colon 2 ml) yüklendi. Daha sonra 20 saniye 10000 rpm. de santrifüj edildi ve alttaki toplama tüpünde kalan süzüntü döküldü. Süpernatantın geri kalanı tekrar kolonlara yüklendi ve yeniden 20 saniye 10000 rpm. de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpü değiştirildi ve kolon altına yenileri konuldu. Kolonlara 700 µl. buffer RW1 eklendi. Böylece kolon istenmeyen parçalardan temizlenmiş oldu. Sonra 20 saniye 10000 rpm. de santrifüj edildi.
5. Kolon altındaki toplama tüpü döküldü ve tekrar kolon altına yerleştirildi ve kolon üzerine 500 µl. buffer RPE eklenip 20 saniye 10000 rpm. de santrifüj edildi.
6. Tekrar toplama tüpü döküldü, kolon altına yerleştirildi ve kolon üzerine 500 µl. buffer RPE eklenip 2 dakika 10000 rpm. de santrifüjlendi.

7. Alttaki toplama tüpü döküldü, kolon altına yerleştirildi ve kuruması için 1 dakika 15000 rpm. de santrifüj edildi.
8. Alttaki toplama tüpü atıldı ve kolon yeni temiz bir ependorf tüpü içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 50 µl. RNase Free Water tam orta kısma gelecek şekilde dikkatlice eklendi ve 1 dakika 10000 rpm. de santrifüj edildi.
9. Spin kolon atılır ve bunun altındaki ependorf tüpünde ise total RNA elde edildi.

3.6.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla RNA'nın izole edildiği tüpten 2 µl. alıp üzerine 1998 µl. Nükleaz Free (NF) eklenir ve vorteksledikten sonra spektrofotometride 260 nm. ve 280 nm. dalga boyunda optik dansite veya nanodropta doğrudan ölçülebilir. Spektro ölçümleri 260/280 dalga boyunda >1.7 ise RNA miktarı ve saflığı iyidir.

Aşağıdaki formül 260 nm. dalga boyunda elde edilen değerler yardımıyla 1 µl. de bulunan nanogram (ng) cinsinden RNA miktarını vermektedir.

$$40 \times 260 \text{ nm. de absorbasyon miktarı} \times \text{dilasyon faktörü (1000)}$$

Örnek: Herhangi bir numunenin 260 nm. deki absorbasyon miktarı 0.620 ise;

$$40 \times 0.620 \times 1000 = 24.8 \text{ ng.}$$

Numunelerimizdeki RNA miktarı nanodropta ölçülerek tespit edildi. Total RNA stoğundan 1 µl. alınıp nanodropta ölçülerek 1 µl. RNA stoğunda kaç ng. RNA olduğu anlaşılabilir.

3.6.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için 0.2 ml.lik ependorf tüplerine;

<u>Karışım</u>	<u>Miktar</u>
RNA template (2 ng.-2 µg.)	9 µl.
Random nanomerprimer mix	1 µl.

eklendi. Sonra, thermal cycler da 65 °C de 5 dakika bekletildi. cDNA sentezi için, aşağıda gösterildiği gibi toplam hacim 10 µl. olacak şekilde mastermix hazırlandı.

Tablo 4. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği.

<u>Karışım</u>	<u>Miktar</u>
qScript 10x buffer	2 µl
dNTP mix 10 mM of each	1 µl.
DTT 100 mM	2 µl.
RNase/DNase free water	4 µl.
qScript enzyme	1 µl.
Toplam	10 µl.

Hazırlanan mastermix den her ependorf tüpüne 10 µl. eklendi. Sonra tekrar thermal cycler a konuldu ve cDNA elde edildi;

55 °C	20 dakika
75 °C	15 dakika

3.6.4. Real-Time PCR (RT-PCR)

Liyoflize haldeki primer protokole uygun şekilde RNase/DNase free water la sulandırıldı. Primerlerin daha iyi çalışması için 56 °C de 5 dakika bekletildi.

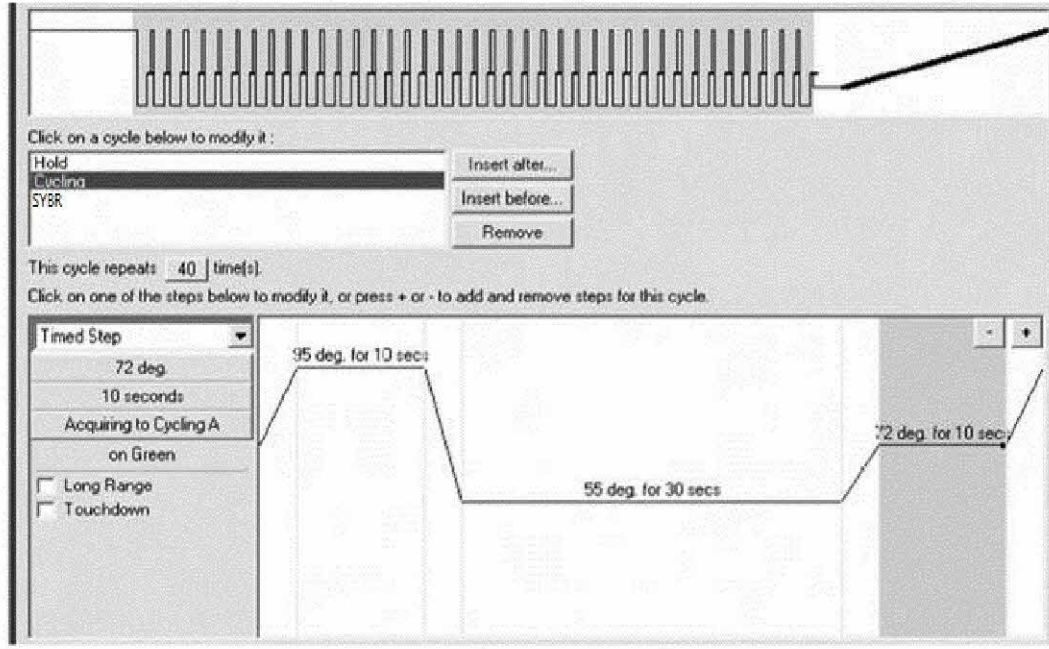
Tablo 5. RT-PCR için miks içeriği.

Karışım	Miktar
2x qPCR sybergreen mastermix	10 µl.
PCR Grade water (RNase/DNase free water)	4 µl.
Reconstituted primer mix (TGFβ2 ve GAPDH)	1 µl.
<hr/>	
cDNA	5 µl.
Toplam	20 µl.

Toplam 20 µl. RT-PCR miks içeriği öncelikle enzim aktivasyonunun sağlanması için thermal cycler'da 95 °C de 5 dakika bekletildi. Daha sonra RT-PCR miks içeriği aşağıdaki koşullarda reaksiyonu gerçekleştirildi:

Tablo 6. RT-PCR reaksiyon koşulları.

50 Siklus		
Denatürasyon (Denaturation)	10 s.	95 °C
Bağlanma (Annealing)	30 s	55°C
Uzama (Extension)	10 s	72°C



Şekil 2. RT-PCR reaksiyon koşulları.

3.6.5. Primer Dizilerinin Hazırlanması

SYBR green tekniği, özgül gen ekspresyonu kantitasyonunda sıklıkla kullanılan bir tekniktir (44). PCR tüpünde polimerize olan çift zincirli PCR ürününe katılan ve araya giren bir floresan boya olan SYBR green boyasının ürün miktarı ile orantılı floresans vermesi prensibine dayanmaktadır. SYBR green tekniği ile gen ekspresyonu kantitasyonu için uygun primer seçimi en önemli noktadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü vermemesi gereklidir. Benzer şekilde RNA izolasyonu sırasında sıklıkla gözlenen genomik DNA kontaminasyonu SYBR green tekniğinin başarısını etkileyen bir diğer durumdur. cDNA amplifikasyon primerlerinin farklı ekzonlardan seçilmesi, ampikon uzunluklarının kısa tutulması (120-250 baz), primerlerin bağlandığı ekzonların uzak seçilmesi PCR reaksiyonu koşullarının olası bir DNA kontaminasyonunda DNA dizisini çoğaltmaması için optimize edilmesi gereklidir

(elongasyon-uzama- süresinin kısıtlı tutulması). Bu prensipler göz önüne alınarak kullanılan primerler, NCBI Gene veri tabanı erişim numaraları (132) ve amplicon uzunlukları Tablo 7 da verilmiştir.

Tablo 7. Çalışmada kullanılan TGF- β_2 ve GAPDH primerlerinin dizileri ve Tm dereceleri (132).

Gen	No		Oligonükleotid Dizisi	Tm
TGF- β_2	GI: 311324	Forward	ATCGATGGCACCTCCACATATG	66
		Reverse	GCGAAGGCAGCAATTATGCTG	64
GAPDH	GI: 10190788	Forward	AGCCCAGAACATCATCCCTG	62
		Reverse	CACCACCTTCTTGATGTCATC	62

Çalışmada kullanılan TGF- β_2 ve GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz) geninin kimyasal ve moleküler özellikleri Tablo 8 ve Tablo 9'de gösterilmiştir (132).

Tablo 8. Rat TGF- β_2 geni özellikleri (132).

TGF- β_2 geninin özellikleri	
Lokus	NC_005112
Tanımlama	Rattus norvegicus Transforme Edici Gelişim Faktörü Beta 2 (TGF- β_2), mRNA
Organizma	Rattus norvegicus Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus
Mol-Type	mRNA
Kromozom	13
Lokasyon	13q26
Gen tipi	Protein kodlayan
Sembol	TGF- β_2
Görev	Transforme Edici Gelişim Faktörü-Beta Reseptörüne bağlanır. Hücre büyüme ve proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Gelişme sırasında mezenşimel-epitel hücre interaksyonuna neden olabilir.

Tablo 9. Rat GAPDH geni özellikleri (132).

GAPDH geninin özellikleri	
Lokus	NC_005103
Tanımlama	Rattus norvegicus Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), mRNA
Organizma	Rattus norvegicus Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus
Mol-Type	mRNA
Kromozom	4
Lokasyon	4q42
Gen tipi	Protein kodlayan
Sembol	GAPD, GAPDH
Görev	D-gliseraldehit 3-fosfat, fosfat ve NAD(+)’in 3-fosfo-D-gliserol fosfat ve NADH’a dönüşümünü katalize eder. Ayrıca apoptozise katkıda bulunur.

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz

İstatiksel değerlendirmede SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 12.0 (111) paket programı kullanıldı.

3.7.1. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlar istatiksel olarak tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Anlamlılık eşik değeri olarak $p < 0.005$ kullanıldı.

3.7.2. Real-Time PCR Bulgularının Değerlendirilmesi

Testis örneklerinden ölçülen TGF- β_2 gen ifadesi düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Anlamlılık eşik değeri olarak $p < 0.005$ kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Canlı Ağırlık Bulguları

Çalışma başladıktan sonra, tüm gruplar 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 14. günde toplam 9 kez tartıldı. Tartımlar sonucunda elde edilen veriler, çalışma boyunca grup içinde istatistiksel olarak analiz edildi.

4.1.1. CAP Grubunda Günlere Göre Canlı Ağırlık Karşılaştırması

CAP grubu içinde günlere göre canlı ağırlık ortalaması artmış olmasına rağmen günlere göre bu artış hızı az ve istatistiki düzeyde $p < 0,05$ göre anlamlı değildir (Tablo 10). CAP grubu canlı ağırlığı ortalaması, 0. gün ile karşılaştırıldığında 7. günde % 9.26, 14. günde ise ağırlık 7. güne kıyasla % 1.42 oranında azalarak % 9.05 oranında artmıştır.

Tablo 10. CAP grubu içinde günlere göre canlı ağırlık karşılaştırması.

Gün	N	Canlı ağırlık (g)	0. güne göre yüzde artış	SD	F
0. gün	10	144,68	-	23,65	0,32
1. gün	10	149,98	3,66	25,84	
2. gün	10	150,63	4,08	26,51	
3. gün	10	150,65	4,28	23,53	
4. gün	10	151,73	4,91	22,72	
5. gün	10	154,45	6,77	23,59	
6. gün	10	156,54	8,22	23,87	
7. gün	10	158,02	9,26	24,65	
14. gün	10	157,78	9,05	26,65	

* $p < 0,05$ (SD: Standart sapma, F: F değeri)

4.1.2. Sham Grubunda Günlere Göre Canlı Ağırlık Karşılaştırması

Sham grubu içinde günlere göre canlı ağırlık ortalaması düzenli bir artış kaydetmektedir. Ancak bu artış istatistiki düzeyde $p<0,05$ göre anlamlı değildir (Tablo 11). Sham grubu canlı ağırlığı ortalaması, 0. gün ile karşılaştırıldığında 7. günde %11,1, 14. günde ise %17,46 oranında artmıştır.

Tablo 11. Sham grubu içinde günlere göre canlı ağırlık karşılaştırması.

Gün	N	Canlı ağırlık (g)	0. güne göre yüzde artış	SD	F
0. gün	10	140,42	-	31,70	0,53
1. gün	10	146,56	4,41	30,47	
2. gün	10	148,16	5,55	32,37	
3. gün	10	148,69	5,98	29,20	
4. gün	10	149,89	6,84	30,12	
5. gün	10	153,54	9,40	31,86	
6. gün	10	155,52	10,76	30,81	
7. gün	10	156,13	11,10	29,23	
14. gün	10	164,87	17,46	27,34	

* $p<0,05$ (SD: Standart sapma, F: F değeri)

4.1.3. Kontrol Grubunda Günlere Göre Canlı Ağırlık Karşılaştırması

Kontrol grubu içinde günlere göre canlı ağırlık ortalaması düzenli bir artış kaydetmektedir. Bu artış istatistiki düzeyde $p<0,05$ göre 0. ve 14. günler arasında anlamlı bir fark oluşturmaktadır (Tablo 12). Kontrol grubundaki canlı ağırlığı ortalaması, 0. gün ile karşılaştırıldığında 7. günde %13,69, 14. günde ise %25,60 oranında artmıştır.

Tablo 12. Kontrol grubu içinde günlere göre canlı ağırlık karşılaştırması.

Gün	N	Canlı ağırlık (g)	0. güne göre yüzde artış	SD	F
0. gün	10	159,27*	-	22,69	2,55
1. gün	10	163,76	2,82	23,87	
2. gün	10	165,50	3,95	24,40	
3. gün	10	166,78	4,71	24,03	
4. gün	10	170,15	6,84	23,81	
5. gün	10	175,15	9,92	24,21	
6. gün	10	177,73	11,62	23,76	
7. gün	10	181,03	13,69	25,21	
14. gün	10	200,10*	26,06	26,45	

*p<0,05 (SD: Standart sapma, F: F değeri)

Üç grubunda canlı ağırlık ortalamaları 0. güne göre karşılaştırıldığında CAP grubu % 9.05, sham grubu % 17.46 ve kontrol grubu % 25.60 oranında artmıştır.

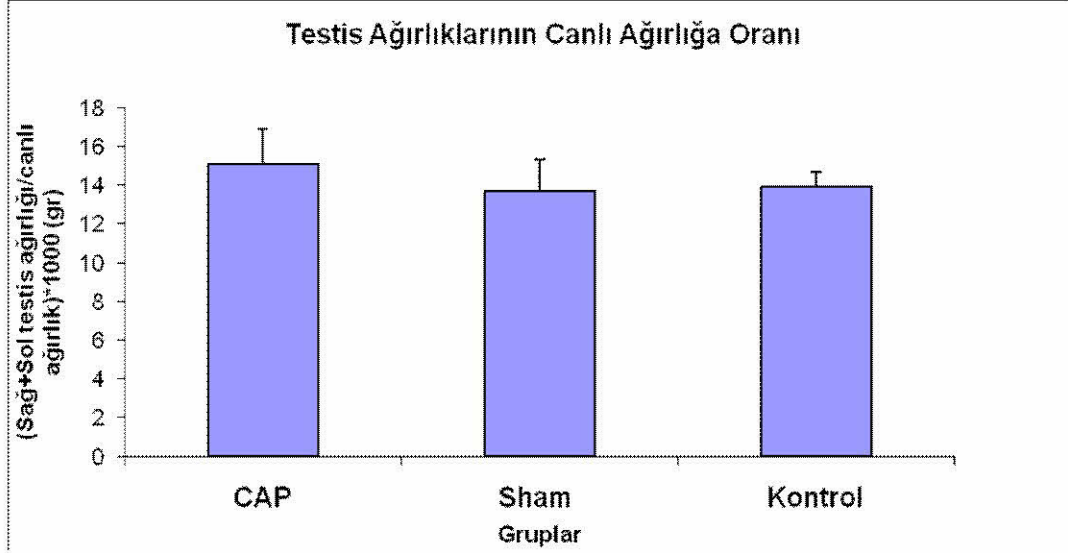
4.2. Testis Ağırlığı Bulguları

Deney sonunda 14. günde tüm gruptaki hayvanların canlı ağırlıkları tartıldı ve servikal dislokasyon yoluyla öldürülerek testisleri alındı. Testis tartımları sonucunda elde edilen verilerle gruplar arasında, testis ağırlığının canlı ağırlığa oranının istatistiksel analizi yapıldı. Gruplar arasında testis ağırlıklarının canlı ağırlığa oranı bakımından istatistiksel bir önem görülmedi (Tablo 13, Şekil 3).

Tablo 13. Gruplar arasında testis ağırlıklarının canlı ağırlığa oranının karşılaştırılması.

Gruplar	N	(Sağ+Sol testis ağırlığı/canlı ağırlık)*1000 (gr)	SD	F
CAP	10	15,072	1,834	2,51
Sham	10	13,673	1,645	
Kontrol	10	13,907	0,805	

*p<0,05 (SD: Standart sapma, F: F değeri)

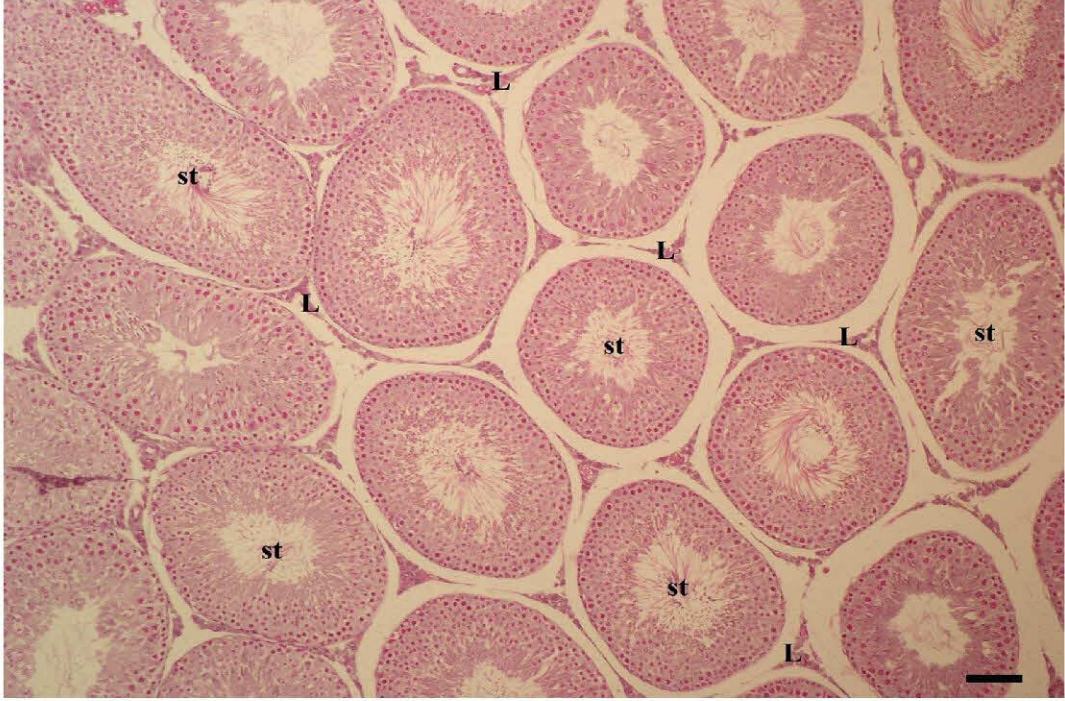


Şekil 3. Gruplar arasında testis ağırlıklarının canlı ağırlığa oranının karşılaştırılması.

* $p < 0.05$

4.3. Histolojik Bulgular

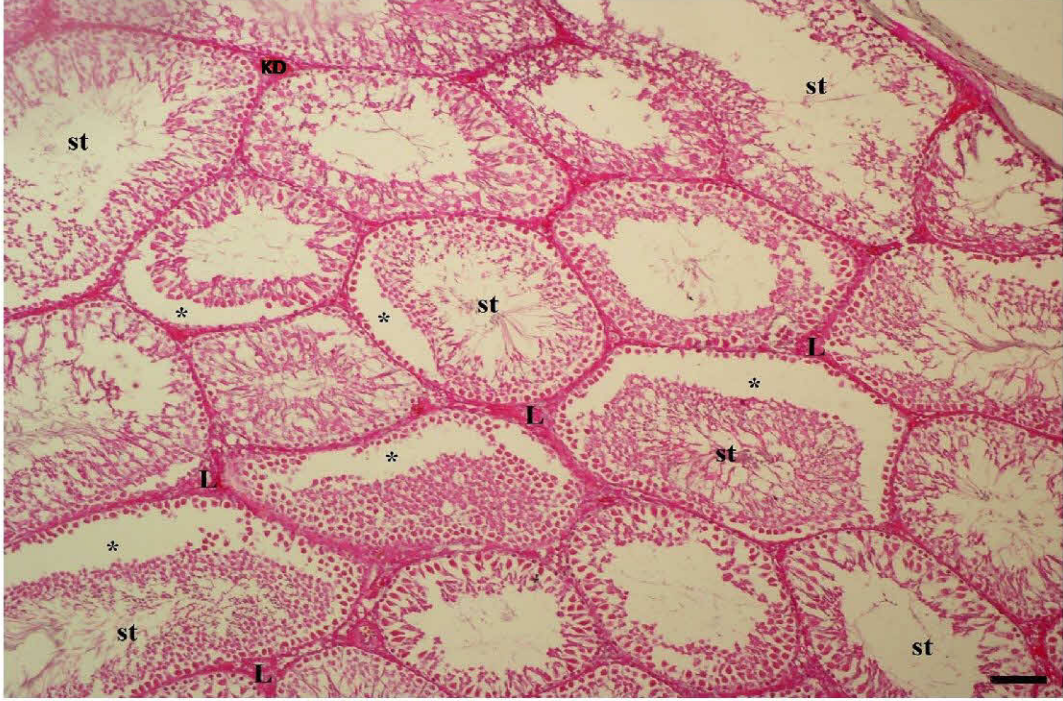
Her üç gruba ait testis dokuları Crossman'ın üçlü boyama yöntemi (20) ile boyanıp incelendiğinde testislerin tunika albuginea tarafından çevrili olduğu gözlemlendi. Tunika albugineanın altında yuvarlak ve düzgün yapıda tubulus seminiferus kontortusların olduğu, tubulu çevreleyen ince bazal membranın hemen altında ise tek sıra halinde myoid hücrelerin bulunduğu görüldü. İnterstisyel alanların incelemesinde leydig hücreleri ve kan damarları görüldü (Şekil 4, 5, 6).



Şekil 4. Kontrol grubu, testis kesiti genel görünüm, üçlü boyama, st: tubulus seminiferus kontortus, L: Leydig hücreleri. (Bar: 50µm).



Şekil 5. Sham grubu, testis kesiti genel görünüm, üçlü boyama, st: tubulus seminiferus kontortus, L: Leydig hücreleri. (Bar: 50 µm).



Şekil 6. CAP grubu, testis kesiti genel görünüm, üçlü boyama, **st:** tubulus seminiferus kontortus, **L:** Leydig hücreleri. *****: Seminifer tübül hücre tabakaları arası boşluklar. **KD:** Kan damarı. (Bar: 50 µm).

Kontrol grubuna ait hayvanların testislerinden alınan kesitlerde bağ doku ve seminifer tübülün düzenli yapısının korunduğu (Şekil 7) gözlenirken, CAP uygulanan gruptaki testis dokusunda, bazı tubullerde hücre tabakaları arasında boşluklar, tübül duvarında invaginasyon ve seminifer tübül bütünlüğünde bozulma tespit edildi.



a.



b.

Şekil 7 a, b. Kontrol grubuna ait hayvanların testislerinin seminifer tübüllerinde spermatogonyum (sp), primer spermatozit (ps), sekonder spermatozit (ss), sertoli hücresi (s), sperm (>), olgun spermatozit (>>) ve leydig hücreleri (L). Üçlü boyama. (Bar: 50µm).



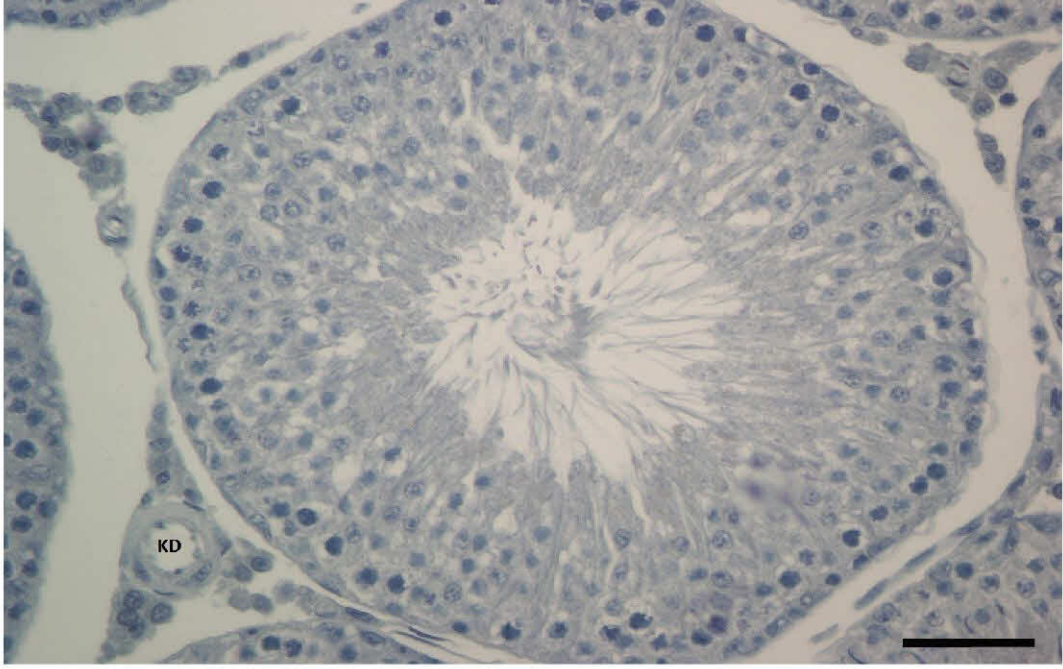
Şekil 8. CAP grubuna ait hayvanların testis seminifer tübüllerinde spermatogonyum (sp), primer spermatosit (ps), sertoli hücresi (s), seminifer tubul hücreleri arasında boşluklar (v) ve leydig hücreleri (L). Üçlü boyama. (Bar: 50µm).

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

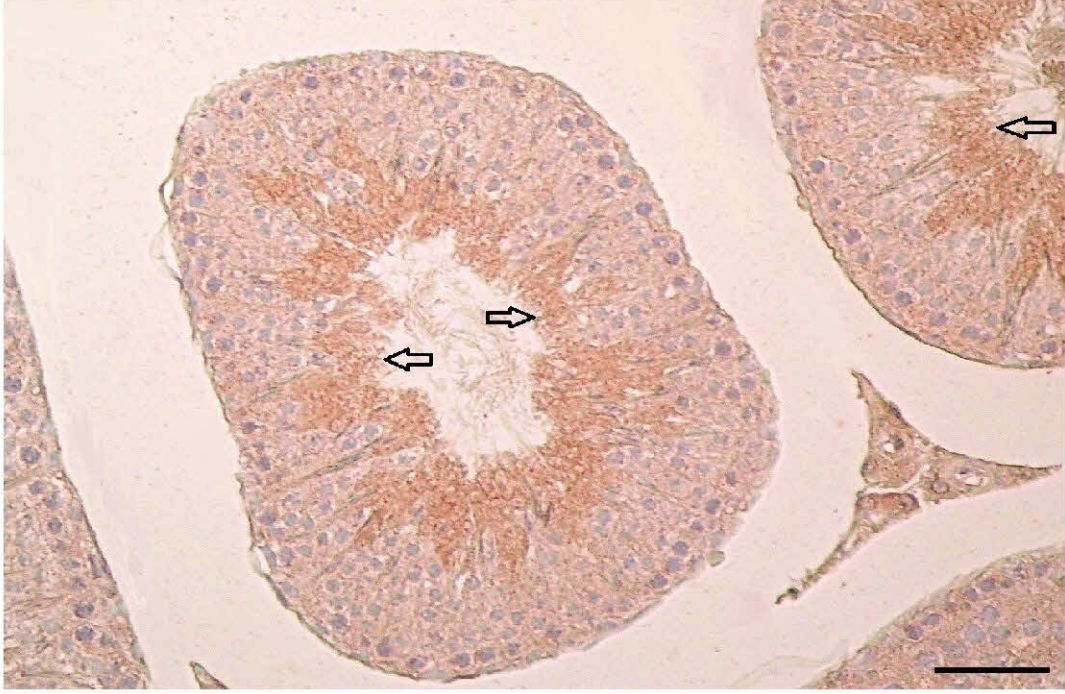
İmmunohistokimyasal olarak indirekt streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi (48) kullanıldı. Sadece sekonder antikorun uygulandığı negatif kontrol preparatlarında hiçbir boyanma görülmedi (Şekil 9). TGF- β_2 ekspresyonu kontrol, sham ve CAP gruplarına ait testis preparatlarında değerlendirildi (Şekil 10, 11, 12). TGF- β_2 , tüm deney ve kontrol gruplarında olgun spermatidlerde immunoreaktivite göstermiştir. Her üç gruptaki immunoreaktivite birbirleri ile karşılaştırıldığında benzer yoğunlukta olduğu görüldü (Tablo 14).

Tablo 14. Kontrol, sham ve deney gruplarında TGF- β_2 immunoreaktivite yoğunluğu. (+++) çok yoğun, (++) orta derecede yoğun, (+) az yoğun, (0) reaksiyon yok.

İmmun reaksiyon gösteren yapı	Kontrol grubu	Sham grubu	CAP grubu
Olgun spermatid	++	++	++



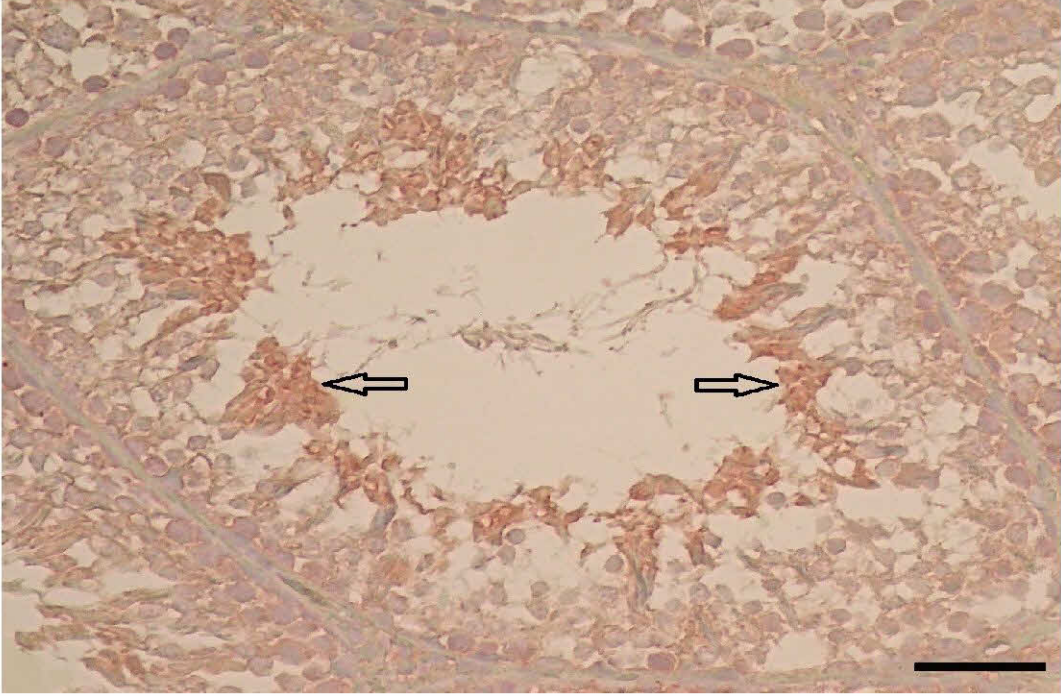
Şekil 9. Negatif Kontrol Kesitinde İmmunoreaktivite (yalnızca sekonder antikor uygulanmış testis kesiti), KD: Kan damarı, Bar: 50 μ m.



Şekil 10. Kontrol grubunda TGF- β_2 'ye ait immunoreaktivite, \Rightarrow : olgun spermatid. Bar: 50 μm .



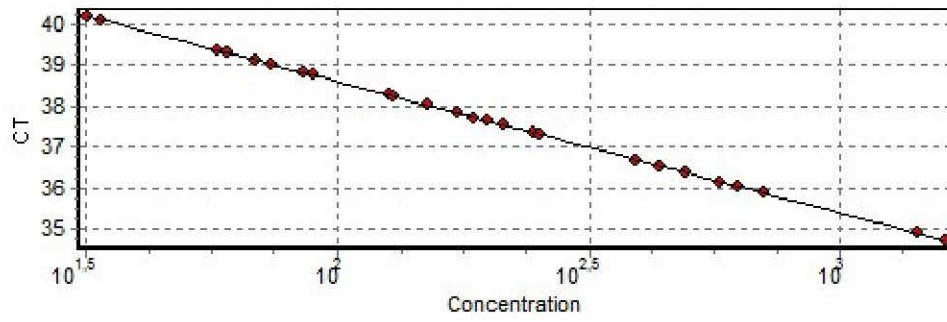
Şekil 11. Sham grubunda TGF- β_2 'nin immunoreaktivitesi, \Rightarrow : olgun spermatid, Bar: 50 μm .



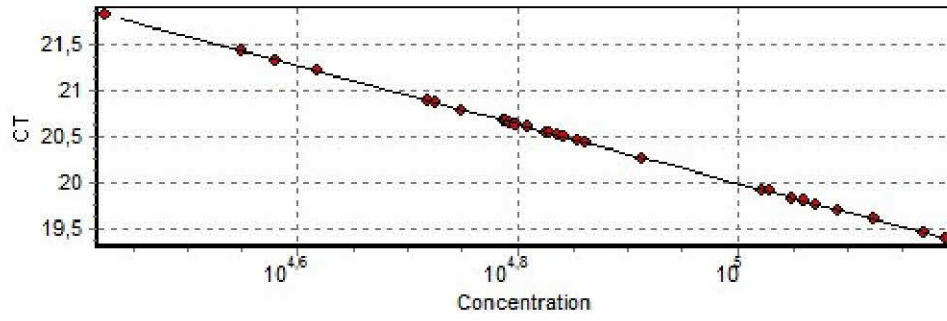
Şekil 12. CAP grubunda TGF- β_2 'nin immunoreaktivitesi, \Rightarrow : olgun spermatid.
Bar: 50 μ m.

4.5. Real-Time PCR Bulguları

Puberte döneminde CAP verilen rat testislerinde, TGF- β_2 nin gen ekspresyon düzeyleri; CAP, sham ve kontrol gruplarında RT-PCR tekniğiyle analiz edilmiş ve referans gen olarak kullanılan GAPDH ile normalize edilmiştir. Floresan boya olarak seçilen Sybr Green'in DNA dizisine özgül olmayan bir şekilde bağlanabileceğinden dolayı primer seçimi ve deneylerin optimizasyonu çok dikkatli bir şekilde yapılmıştır (Şekil 13, 14).

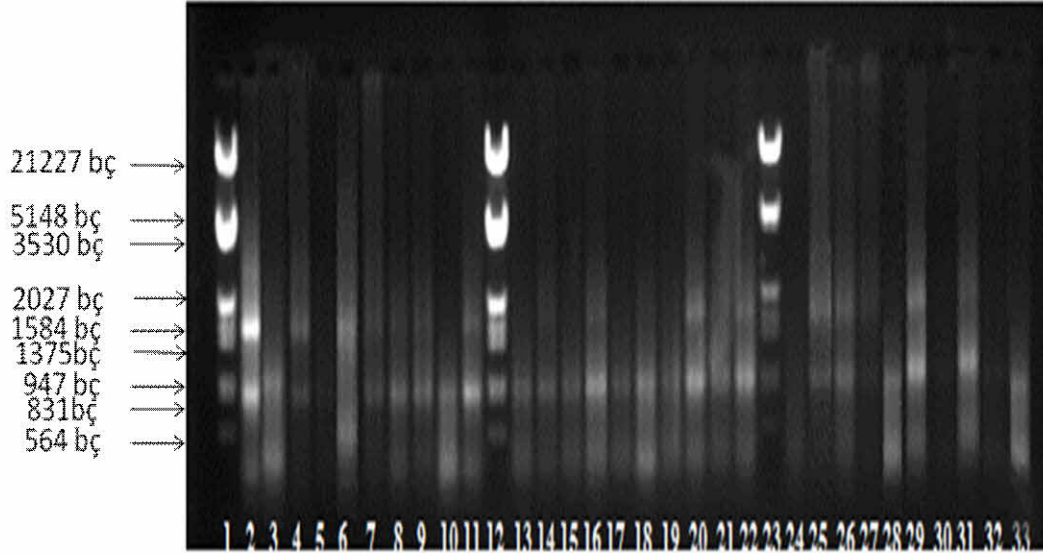


Şekil 13. Standart eğri (TGF-β₂).



Şekil 14. Standart eğri (GAPDH).

Total RNA elde edildikten sonra RNA kalitesi için tüm numunelerin nanodropta yapılan ölçümlerinde 260/280 dalga boyu oranlamasında RNA değerleri 1.9-2.2 arasında ölçülmüş bu değer >1.7 değerinden büyük olduğundan, RNA miktarı ve saflığının iyi olduğu anlaşılmıştır. RNA kalitesine elektroforetik olarak bakılarak, elektroforez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi ile incelenerek görüntüsü alındı (Şekil 15).



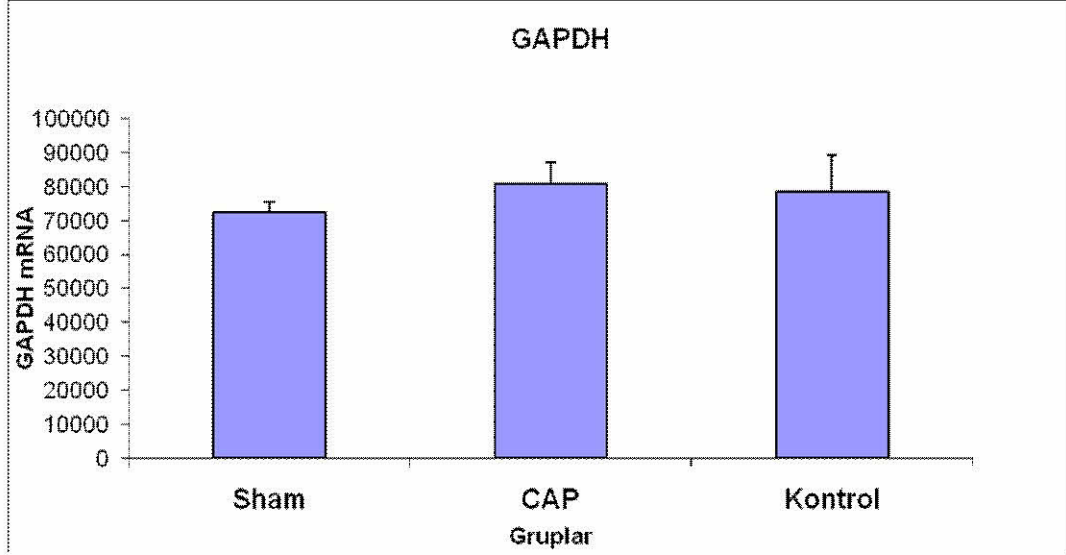
Şekil 15. RNA ürünlerinin jel görüntüsü. Sırasıyla 1. kuyucuk marker, 2-11. kuyucuklar CAP, 12. kuyucuk marker, 13-22. kuyucuklar sham, 23. kuyucuk marker, 24-33. kuyucuklar kontrol grubu. (Marker: *Lambda Hind III*)

Gruplar, testis dokusu GAPDH geni ekspresyon düzeyi bakımından istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak $p < 0,05$ e göre anlamlı fark bulunmadı (Tablo 15, Şekil 16).

Tablo 15. Gruplar arasında GAPDH geni ekspresyon karşılaştırılması.

Gruplar	N	GAPDH mRNA	SD	F
CAP	10	80,660	6,465	3,27
Sham	10	72,307	3,100	
Kontrol	10	78,338	10,917	

* $p < 0,05$ (SD: Standart sapma, F: F değeri)



Şekil 16. Gruplar arasında GAPDH geni ekspresyon karşılaştırılması. * $p < 0,05$

Gruplar arasında, testis dokusunda $TGF\beta_2$ geni amplifikasyon sonuçlarının karşılaştırılması yapılmıştır (Tablo 16).

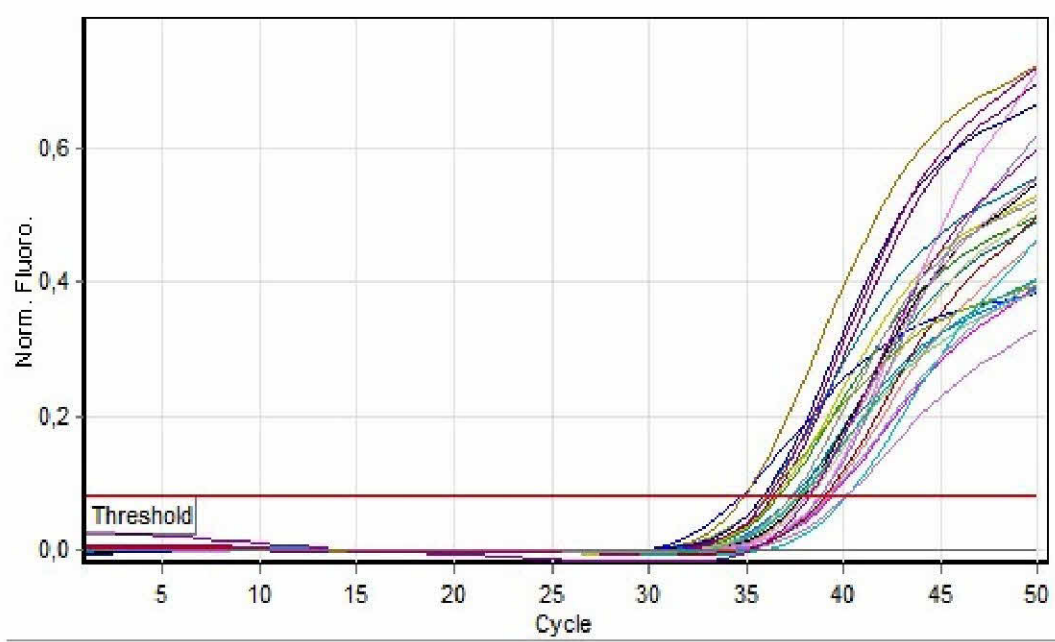
Tablo 16. Gruplar arasında $TGF-\beta_2$ geni ekspresyonu karşılaştırması ($TGF-\beta_2$ normalize: $TGF-\beta_2$ mRNA/GAPDH mRNA)

Gruplar	N	$TGF\beta_2$ Normalize	SD	F
CAP	10	0,0032*	0,00032	185,44
Sham	10	0,0060*	0,00034	
Kontrol	10	0,0076*	0,00076	

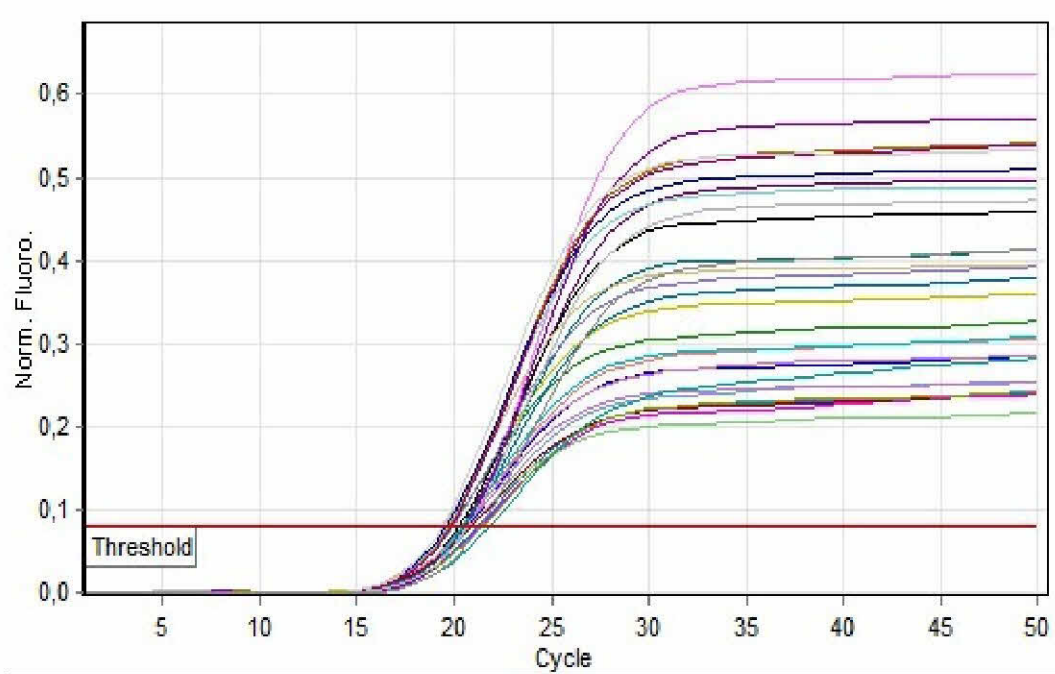
* $p < 0,05$ (SD: Standart sapma, F: F değeri)

GAPDH geninin amplifikasyon sonuçları incelendiğinde CAP grubunda, sham ve kontrol grubuna göre nisbi bir artış olmuştur. Her üç grubunda GAPDH amplifikasyon değerleri ortalamaları birbirine yakındır, yani ortalama aynı miktarda eksprese olmuşlardır ve aralarında $p < 0,05$ e göre anlamlı bir istatistiki fark yoktur. $TGF-\beta_2$ amplifikasyon sonuçları referans gen ile normalize edildikten sonra incelendiğinde, CAP ve sham grupları ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna göre azalmıştır. CAP grubunda kullanılan capsaicin ve sham grubunda kullanılan capsaicin çözücülerinin $TGF-\beta_2$ gen ekspresyonunu azalttığı anlaşılmaktadır. Her üç grup arasında istatistiki olarak $p < 0,05$ e göre anlamlı fark vardır (Tablo 16). Hedef ve referans gene ait kantitatif değerler kullanılarak ortalama gen konsantrasyonları

hesaplanmıştır (Tablo 17). Real-Time PCR'da yapılan gen amplifikasyon yazılım görüntüleri Şekil 17'de gösterilmiştir.



a



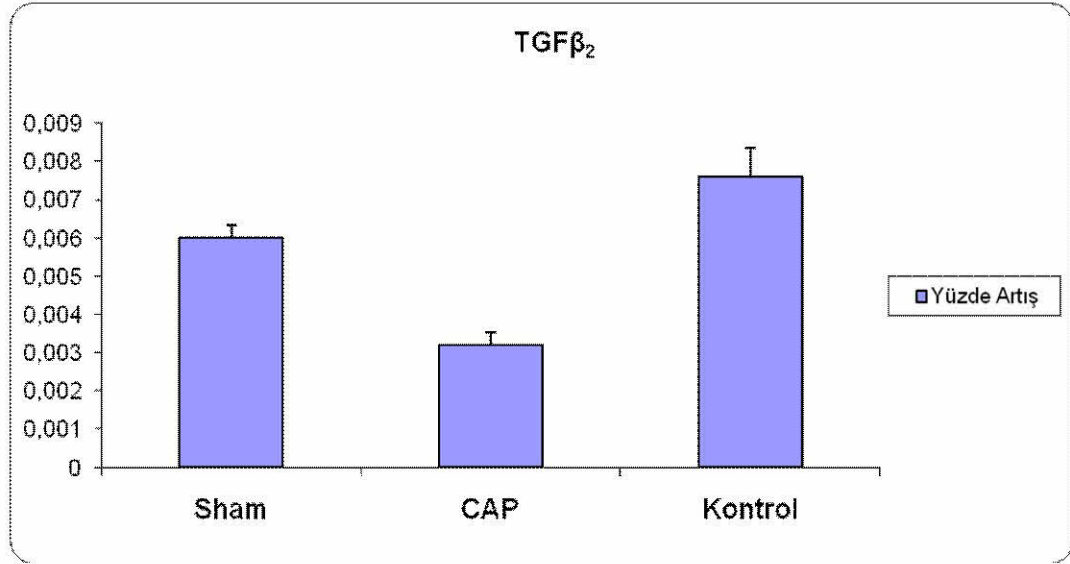
b

Şekil 17 **a, b**. Real-Time PCR'da yapılan gen amplifikasyon yazılım görüntüleri; **a**. TGF- β_2 geninin amplifikasyonu, **b**. GAPDH geninin amplifikasyonu.

Tablo 17. Hedef ve referans gene ait kantitatif değerler kullanılarak ortalama gen konsantrasyonları.

Gruplar	TGF β_2 konsantrasyonu	GAPDH konsantrasyonu	Relatif konsantrasyon
CAP	264,9	82,660	0,0032
Sham	436,3	70,407	0,0060
Kontrol	596,1	78,239	0,0076

TGF- β_2 geni için, gruplar arası mRNA düzeyleri artış ilişkisi relatif konsantrasyona göre yapılmıştır (Şekil 18).



Şekil 18. TGF- β_2 mRNA düzeyleri yüzde artış ilişkisi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada puberte döneminde CAP uygulanan rat testislerinde TGF- β_2 nin gen ekspresyon düzeyi ve immunohistokimyasal lokalizasyonu incelendi.

Traurig ve ark. (128), yeni doğan ratlara uyguladıkları capsaicin ile bu canlılarda vücut gelişimi, seksüel olgunluk ve fertilizasyon üzerinde puberte zamanında gecikme, fertilitede ve vücut ağırlıklarında azalma gibi etkiler gerçekleştiğini bildirmişlerdir. İlhan'ın (53) yaptığı çalışmada, farelerin postnatal gelişme dönemlerinde yapılan CAP uygulaması ile günlük yem tüketimlerinde, deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış olduğu ancak bu yem tüketim artışına paralel olarak canlı ağırlık artışının olmadığı bildirilmektedir. Park ve ark. (98), rasyonlarına % 0,02 CAP ilave edilen 6-7 haftalık ratların yem alımının azaldığı ve buna bağlı olarak beyindeki birçok bölgede nöropeptid Y (NPY) ekspresyonunun zayıfladığı ve bunun yiyecek alımının kontrolüyle ilgili olan hipotalamustaki NPY'nin capsaicin tarafından olumsuz etkilendiğini bildirmişlerdir. Oktay ve Olgun (92), erişkin tavukların yemlerine acı kırmızı biber ilave ederek 81 gün süreyle beslemişler ve sonuçta yumurta sarısının renginin koyulaştığını, yumurta veriminin, yemden yararlanmanın ve kuluçka üretiminin ise etkilenmediğini gözlemişlerdir.

Srinivasan ve ark. (112), yedi hafta boyunca fare yemlerine % 2 CAP ilave ederek hayvanları beslemişlerdir. Uygulamanın ilk dört haftasında hayvanlarda kilo artışı görülürken, beşinci haftadan itibaren kilolarında bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Furuse ve ark. (31), diyetlerine acı kırmızı biber ilave ettikleri erişkin yumurtacı tavuklarda karın içi yağ miktarında azalma, yumurta performansında ise % 3 oranında artış olduğunu bildirmişlerdir. Sambaiah ve ark. (108) ile Oh ve ark. (91), ratlarla yaptıkları çalışmalar, CAP'ın non-steroid yağ asitlerini mobilize ettiğini ve bu suretle ana enerji kaynağı olarak kullanılmasını sağladığını tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada kullandığımız CAP'a bağlı olarak diğer çalışmalardaki bulgulara paralel olarak (53, 98, 108, 112, 128) deney gruplarında yem alımında artış ve bu artışın aksine canlı ağırlık kazancında yavaşlama gözlenmiştir.

Kawada ve ark. (63, 64) capsaicin kullandıkları çalışmalarında kullanılan maddeye bağlı olarak adrenal medulladan kateşolaminlerin salınması ve bunların santral sinir sistemini uyarması sonucunda enerji ve lipit metabolizmasının artırılması yoluyla sıçanlarda obezitenin azaltıldığını belirtmişlerdir. Elde ettiğimiz bulgular, capsaicin'in canlı ağırlık kazancını olumsuz yönde etkilediğini tespit eden araştırmacıların (63, 64, 83, 91, 95, 108, 112) bulguları ile benzerlik göstermektedir. Özellikle CAP grubundaki artışın, sham ve kontrol grubuna göre az olması capsaicin'in canlı ağırlık artış hızında yavaşlamaya yol açtığı ve bu etkisini capsaicin'in daha önce bilim adamlarınca yapılan çalışmalardan elde edilen karbonhidrat metabolizmasının ve karaciğer enzimlerinin aktivitesinin artması, lipit metabolizmasını uyararak yağ dokudan lipidin mobilizasyonunu sağlaması, karın içi yağlanmayı azaltması (63, 64, 95, 96) ve oksijen kullanımını artırması (73, 81, 83, 133) etkilerinden kaynaklanabileceği kanısındayız.

Özer ve ark. (96), yaptıkları çalışmada yemlerine % 1 oranında acı kırmızı biber ilave edilen ve bir günlük yaştan itibaren beslenen horozlarda, kontrol grubuna göre deney grubu hayvanlarının testis ağırlıklarında artış ve seminifer tübül epitelinin daha erken gelişim gösterdiğini gözlemişlerdir. Çalışmamızda kullanılan ratların testis ağırlıklarının canlı ağırlığa oranlaması yapıldığında, Özer ve ark. (96) çalışmasına paralel olarak CAP grubunda testis ağırlığında, istatistiki anlamda ($p < 0.05$) önemi olmayan bir artış gözlenmiştir.

Ratlarda, CAP'ın erkek üreme sistemine indirekt etkisinin incelendiği bir çalışmada, flutamid ile oluşturulan kriptorşid testislerin inişi incelenmiş ve deneklere doğum sonrasında tek doz olarak subkutan yolla CAP enjeksiyonu yapılarak testislerin morfolojisine bakıldığında CAP'ın testislerin normal konumuna ulaşmasında hiçbir olumlu etkisinin olmadığı, bunun yanı sıra testislerde gelişim malformasyonlarına yol açtığını bildirilmiştir (109). Çalışmamızda oluşturulan kontrol, sham ve CAP gruplarından elde edilen testislerin makroskopik görünüm açısından incelemesinde gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol grubu testislerinde, seminifer tübüllerin normal görünümde ve spermatogenetik aktivitenin olduğu gözlendi. Sham grubunda da kontrol grubuna yakın mikroskopik bulgular tespit edildi. Kontrol ve sham gruplarındaki seminifer tübüllerin olağan görünümde

olması spermatogenik hücrelerin birbirleri ve sertoli hücreleri ile olan bağlantılarının normal ve testiküler fonksiyonların düzenli olmasından kaynaklandığı kanısındayız.

Tüm gruplarda interstisyel alanların leydig hücreleri ve kan damarlarından oluştuğu görüldü. Kontrol grubundan elde edilen testis kesitlerinde bağ doku ve seminifer tübülün düzenli yapısının korunduğu gözlenirken, CAP grubunda ise seminifer tubullerin bir kısmında tubul bütünlüğünde bozulma, bazı tubullerde ise seminifer tübül hücre tabakaları arasında boşluklar görülmektedir. Hücreler arasında düzensiz boşlukların, bazı tubullerde sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreler arasında var olan bağlantılarda zayıflama ve germinal hücre kaybından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Erdost ve ark. (29), yapmış oldukları çalışmada rasyonlarına acı kırmızı biber eklenen tavuk ve horozların hipofiz bezinden ilk aylardan itibaren FSH ve LH sentezinin arttığı saptanmış, hipofizde endokrin hücreleri ile ilişki içinde olan çok sayıda SP içeren fibriller bulunması CAP'ın doğrudan hipofize etki ettiğini ve bundan dolayı da deney grubundaki horoz ve tavukların gonad gelişimini kontrol grubu hayvanlardan daha önce başlattığını bildirmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular sonucu özellikle kullanılan CAP'ın sensorik sinir sonlarından SP ve CGRP salınımını uyararak (47) sinirsel innervasyondan oldukça zengin olan testis dokusu üzerinde etki yapmış olabileceği kanısındayız.

TGF- β 'larla ilgili yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda (51, 88, 122), puberte dönemindeki ratlarda TGF- β_1 'i leydig hücrelerinde ve genç spermatidlerde gözlerken, erişkin rat testislerinde TGF- β_1 sadece leydig hücrelerinde reaksiyon gösterdiği ve bu reaksiyonun şiddetinin leydig hücrelerinde yaşla beraber azaldığını tespit etmişlerdir. Jung ve ark. (61), testiküler gelişim ve fonksiyonda TGF- β 'ların önemli rol oynadığını belirtmektedir. İn vitro çalışmalarda (75), yüksek konsantrasyondaki TGF- β_1 'in LH salınımını inhibe ederek testesteron üretimini durdurduğu ve spermatogenezisi düzenlediğini saptamışlardır. Yapılan bazı çalışmalarda TGF- β_1 'in erişkin dönemdeki ratların genç spermatidlerinde immun reaksiyon vermediği saptanmıştır (51, 88, 122). Akkoç'un (2) yaptığı çalışmada, postnatal gelişme dönemlerinde capsaicin uygulanan fare testislerinde TGF- β 'nın immunohistokimyasal ekspresyonunda; TGF- β_1 ekspresyonu, leydig hücreleri ve

genç spermatidlerde görülmüştür. Leydig hücrelerinde TGF- β_1 'in ekspresyonu, 35 günlük kontrol grubunda reaksiyon olmazken, deney grubunda reaksiyonun zayıf, 50 günlük kontrol grubunda reaksiyon şiddetli, deney grubunda reaksiyon orta şiddetli, 75 günlük kontrol grubunda reaksiyon orta şiddetli, deney grubunda ise şiddetli immun reaksiyon gözlenmiştir. Genç spermatidlerde ise 35 günlük kontrol ve deney grubunda reaksiyon zayıf, 50 ve 75 günlük kontrol ve deney gruplarında ise orta şiddetli reaksiyon gözlenmiştir. TGF- β_2 ekspresyonu ise leydig hücreleri ile olgun spermatidlerde gözlenmiş ve leydig hücrelerindeki ekspresyonun yaşa bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. 35, 50 ve 75 günlük kontrol ve deney gruplarında leydig hücrelerindeki reaksiyon şiddeti aynı yoğunlukta iken 75 günlük kontrol ve deney grubunda olgun spermatidlerdeki reaksiyon şiddeti diğer günlere göre istatistiksel bir fark oluşturmayacak şekilde arttığını bildirmektedir. Teerds ve ark. (122), Olaso ve ark. (94) ile Ingman ve ark. (51) TGF- β_2 'in immunoreaktivitesini puberte dönemindeki ratlarda sadece leydig hücrelerinde, erişkin dönemdeki ratlarda ise hem leydig hücrelerinde hem de olgun spermatidlerde saptamış, ayrıca reaksiyon şiddetinin leydig hücrelerinde yaşa bağlı olarak azaldığını belirtmişlerdir. Jung ve ark. (61) yaptıkları çalışmada TGF- β_2 ekspresyonunun testislerdeki olgun spermatidlerde yaşa bağlı olarak arttığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda ise bazı araştırmaların bulgularına paralel olarak (2, 51, 61, 94, 122) TGF- β_2 'nin ekspresyonu olgun spermatidlerde görülmüştür.

TGF- β_2 geni, ratta 13. kromozomun 13q26 bölgesinde lokalizedir. Hücre büyüme ve proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Gelişme sırasında mezensimal-epitel hücre interaksiyonuna neden olabilir (132). TGF- β ailesinin tüm üyeleri organizmadaki nerdeyse tüm hücrelerde bulunan yüksek affiniteli hücre yüzey reseptörlerine bağlanır. Hücre yüzeyinde 2 farklı TGF- β reseptörü vardır. Bunlardan tip I olarak adlandırılanı 65 kDa ağırlığında, tip II ise 85-90 kDa ağırlığındadır. TGF- β öncelikle hücre yüzeyindeki tip II reseptörüne bağlanır ve bağlanma sonucunda tip II reseptörü tip I reseptörünü fosforlar ve fosforlanan tip I reseptörü hücre içinde bulunan ve sinyal iletiminden sorumlu Smad proteinlerini harekete geçirerek hücre yüzeyindeki TGF- β 'dan gelen sinyalleri hücre çekirdeğine iletir (87, 94).

Günümüzde pek çok araştırmacı kesin ve güvenilir sonuç vermesi açısından Real-Time PCR yöntemini gen ekspresyonlarında kullanmaktadır (16, 25, 39, 50, 57, 77).

Mahmoud ve ark. (77), CAP'ın etkilerini araştırdıkları çalışmalarında immun tepki ile bağlantılı olan major histocompatibility complex II (MHC-II) ekspresyonuna kemirici makrofaj kültüründe bakmışlardır. CAP'ın (0.1-10 μ M), interferon (IFN)- γ (100 ünite/ml) eklenmiş peritoneal makrofaj kültüründe MHC II mRNA ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Bunun interferon (IFN)- γ dozuna bağlı olarak CAP'ın MHC II transaktivator (CIITA) mRNA ekspresyonunu inhibe etmesinden dolayı olduğunu belirtmişlerdir. İnterferon (IFN)- γ ile uyarılmış makrofaj kültürüne CAP ilavesi ile MHC II ekspresyonunda azalma olmasına karşın makrofaj tarafından üretilen nitrik oksit düzeylerinde değişme olmamıştır. CAP'ın CIITA transkripsiyonunu aşağı regüle etmesinden dolayı MHC II ekspresyonu baskılanmakta fakat NO üretimi bundan etkilenmemektedir. Bunun sonucunda CAP'ın spesifik genlerin regülasyonunu düzenleyerek immun bozukluklarda immunofarmakolojik bir rol üstlenerek yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Haan ve ark. (39), streptozotosin (STZ) ile yaptıkları bir çalışmada, diabet oluşturdukları farelerde katalazın ekspresyonunu real-time PCR ile incelemiş ve diabetik grupta katalaz mRNA düzeyinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Real-Time PCR metodu, özellikle klasik olan diğer metodların sonuçlarını desteklemektedir. Janina ve ark. (57), meme kanseri tanısı konulmuş hastaların parafin bloklara gömülü dokularından elde edilen DNA ile yaptıkları real-time PCR analizinde, insan epidermal büyüme faktör reseptörü (HER-2/neu) geni için 210 hastanın 41'inde amplifikasyon tespit edildiğini ve aynı gen bölgesi için yaptıkları immunohistokimyasal analizde ise 210 hastanın 70'inde protein ekspresyon düzeyinde artış olduğunu bildirmişlerdir.

Caterina ve ark. (16), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK) tanısı konulmuş hastaların dokularından elde edilen DNA ile HER-2/neu geninin ekspresyonuna Real-Time PCR ve immunohistokimyasal metodla bakmış ve Real-Time PCR analizinde hastaların % 22 sinde amplifikasyon görülürken, immunohistokimyasal yöntemde hastaların % 23 ünde ekspresyonu görülmüştür. Bu Real-Time PCR ve immunohistokimyasal çalışma sonuçlarının birbirini

desteklediğini göstermiştir. Çalışmamızda da TGF- β_2 ekspresyonu, Real-time PCR ve klasik metod sonuçlarının birbirini desteklediği çalışmalardakine (16, 57) paralel olarak tüm gruplardan elde edilen testis dokusunun Real-Time PCR ve immunohistokimyasal analizlerinde gerçekleşmiştir.

Malagarie-Cazenave ve ark. (78), CAP ile muamele edilmiş prostat hücrelerinde IL-6 sekresyonunu inceledikleri çalışmalarında CAP eklenen ve eklenmemiş grupta androjene hassas LNCaP hücrelerinde IL-6 sekresyonunu oldukça az miktarda tespit etmişlerdir. Bunun aksine androjene dirençli PC-3 hücrelerinde IL-6 sekresyonun CAP dozuna bağlı olarak stimüle edildiğini belirtmişlerdir. PC-3 hücrelerinde IL-6 sekresyonunda artış olsada 10 μ M. ve 20 μ M. lik CAP dozunun kullanıldığı gruplara kıyasla 1 μ M. CAP kullanılan grupta RWPE-1 kontrol grubuna göre önemli bir istatistiki fark ($p < 0.05$) oluştuğunu saptamışlardır. CAP etkilerinin geniş kapsamlı araştırılması için yine androjene dirençli diğer bir hücre hattı olan DU-145 hücreleri kullanılmış ve 10 μ M. verilen grupta IL-6 sekresyonunda önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Her iki hücre hattında (PC-3, DU-145) IL-6 sekresyonundaki artışın TRPV1 reseptör antogonisti capsazepine ile inhibe edilmesiyle IL-6 sekresyondaki artışın her iki hücre hattında farklı dozlarda gerçekleşmesinin hücrelerdeki capsaicin reseptörü olan TRPV1 etkinliğine bağlı olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda da CAP grubunda TGF- β_2 ekspresyon düzeyindeki azalmaların bir nedeninin de Malagarie-Cazenave ve ark. (78) yapmış oldukları çalışmadaki bulgulara paralel olarak bu maddenin bağlandığı reseptör olan TRPV1 in etkinliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

CAP'ın dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözündürülerek erkek farelere intra peritoneal yolla 1.8 ve 7.5 mg/kg dozda enjekte edilmiş ve uygulamadan sonra testiste kısa süreli radyoaktif deneylerle DNA biyosentezi incelenerek, kullanılan her iki dozda testiste DNA sentezinin inhibe edildiği ve bundan da germ hücrelerindeki genetik materyalin etkilendiği bildirilmiştir (89). Çalışmamızın Real-Time PCR kısmında testis dokusundaki TGF- β_2 ekspresyon düzeyi gruplar arasındaki fark açısından değerlendirilmiş ve TGF- β_2 amplifikasyon değerlerinin referans gen GAPDH ile normalize edilmesi ile bu oran CAP grubunda 0.0032, sham grubunda 0.0060 ve kontrol grubunda 0.0076 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda seminifer tubul bütünlüğünün korunması, spermatogenik hücre hatlarının normal ve sertoli

hücreleriyle olan bağlantılarının olağan olması bu grupta TGF- β_2 ekspresyonunun normal seviyede bulunmasını sağlarken, sham grubunda CAP enjeksiyonu yerine sadece bu maddenin çözücülerini barındıran taşıyıcı solüsyon enjekte edilmesine rağmen kontrol grubuna kıyasla TGF- β_2 ekspresyonunun azalması muhtemelen enjeksiyon ve her enjeksiyon öncesi ratların dietil eter anestezisine maruz kalmaları sonucu oluşan oksidatif strese kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Özellikle CAP grubunda TGF- β_2 ekspresyon düzeyi kontrol grubuna kıyasla oldukça azalmıştır. Bunun nedeninin kullanılan madde ve miktarına bağlı olarak CAP'ın testis üzerindeki etkilerinden kaynaklandığı, bu etkilerin sensorik sinir sonlarından nörotransmitter madde salınımını uyararak (47) hipofizdeki hormonal sekresyon miktarlarında oluşturduğu değişim ile bu hormonların testislerde olası etkileri sonucu hedef hücrelerde gen ekspresyon değişimleri ile TGF- β_2 ekspresyonunda azalmaya sebep olmasından kaynaklanabilir.

CAP'ın testiste DNA sentezini inhibe ettiği ve bunun sonucunda germ hücrelerindeki genetik materyalin etkilendiğini belirten çalışmalar (109) CAP'ın testiste bu tür bir etki sonucu TGF- β_2 ekspresyonunda değişimlere yol açtığı fikrini kuvvetlendirmektedir. Yapılan bir çalışmada (82), A 303 ve A 304 spermatogenik kök hücre hatlarında CAP'ın 150 μ M, 200 μ M ve 250 μ M konsantrasyonları ile 24 ve 48 saatlik kültürlerinin yapılması ve anti-activated caspase-3 antikorunu ile immunohistokimyasal boyama yapıldıktan sonra apoptotik hücre sayısında doza bağlı olarak bir artışın meydana geldiği saptanmıştır.

CAP, apoptozu indükleyerek birçok ölümsüz ve kötü huylu hücre hattının büyümesini baskılar. Bu indüksiyonun hücrelerde intrasellüler reaktif oksijen türlerinin üretimini artırılması şeklinde olabileceği belirtilmiştir (9, 40). CAP kanser hücrelerinde de apoptoza neden olabilir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda kullanılan CAP'ın bazı prostat kanser hücrelerinde apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (86). Doğal CAP'ın lösemi hücrelerinin büyümesini engellediği (52), insan hepatoma HepG2 hücrelerinde (22) ve akciğer kanser hücrelerinde (7) apoptoza neden olduğu bildirilmiştir. CAP'ın insan melanoma hücrelerindeki apoptoz miktarını arttırmak amacıyla kaspazla aktive edilen DNaz inhibitörünün ekspresyonunu baskıladığını (34), hücre içi antiapoptotik Bcl-2 oranını azalttığı ve hepatokarsinoma hücrelerindeki kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı (60) bildirilmiştir. Çalışmamızda

kontrol ve sham grubunda seminifer tubullerin normal görünümde olmasına karşın CAP grubunda bazı tubullerde apoptoz sonucu hücre ölümlerinin artmasına bağlı olarak vakuollerin oluşmuş olabileceği düşüncesindeyiz.

CAP'ın doza bağlı olarak, dıştan gelen madde ve ajanlara karşı oldukça hassas olan spermatogenik hücreler üzerinde hasar veya ölüme yol açması, sertoli hücre membranının bütünlüğünün bozulması sonucu bu hücrelerin germ hücreleriyle olan bağlantılarında oluşabilecek bozukluklar (58) sonucuda spermatogenik hücre kayıpları gerçekleşebilecek, sertoli hücrelerinde meydana gelecek yapısal bozukluklar sonucu bu hücreler tarafından üretilen protein seviyelerindeki azalmalar özellikle germ hücrelerinin proliferasyon, farklılaşma ve metabolizmasında bozukluklara ve nihayetinde TGF- β_2 ekspresyon düzeylerinde istatistiki anlamda ($p<0,05$) azalmalara sebep olacağı kanısındayız.

Real-Time PCR ve immunohistokimyasal analizlerden elde edilen bulgulara göre, CAP'ın uygulanan dozda TGF- β_2 ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla azalmanın olması ile testiküler fonksiyonlarda değişimlere, tubullerde yukarıda sayılan bazı olguların ortaya çıkması ise seminifer tubullerde yapısal bozukluklara ve büyüme faktörlerinin ekspresyon düzeylerinde değişimlere yol açtığı sonucunu ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışması ile capsaicin uygulanan rat testislerinde TGF- β_2 nin Real-Time PCR ile gen ekspresyon düzeyindeki değişiklikler, histolojik görünümü ve immunohistokimyasal lokalizasyonu gösterilmiştir.

6. ÖZET

Çalışmamızda puberte döneminde capsaicin uygulanan rat testislerinde Transforme Edici Gelişim Faktörü Beta-2 (TGF- β_2)'nin Real-Time PCR ile gen ekspresyonu ve immunohistokimyasal lokalizasyonu incelenmiştir.

Çalışmada her grupta 10'ar adet Sprague-Dawley cinsi rat olmak üzere capsaicin (CAP), sham ve kontrol grupları oluşturulmuştur. CAP grubundaki ratlara, 1 mg/kg dozdaki capsaicin % 10 etanol içinde çözüldürüldü ve % 1 Tween 20 ile distile su ilavesi yapıldıktan sonra subkutan olarak enjekte edildi. Sham grubuna, 0.3 cc. % 10 etanol, % 1 Tween 20 ve distile sudan oluşan taşıyıcı solüsyon subkutan yolla enjekte edildi. Kontrol grubundaki ratlara herhangi bir enjeksiyon yapılmadı. CAP ve sham grubundaki ratlara 1 hafta boyunca yapılan enjeksiyondan sonra 1 hafta beklenildi ve süre sonunda tüm gruplardaki ratlar dietil eter anestezisi altında servikal dislokasyonla öldürüldü.

Ratların canlı ağırlık artışları, CAP grubunda % 9.05, sham grubunda % 17.46 ve kontrol grubunda ise % 25.60, testis ağırlığının canlı ağırlığa oranlamasında, CAP grubu 15.072, sham grubu 13.673 ve kontrol grubu ise 13.907 olarak belirlenmiştir.

Testis kesitleri histolojik görünüm açısından değerlendirildiğinde; sham ve kontrol grubunda bağ doku ve seminifer tübülün düzenli yapısının korunduğu ancak CAP grubunda tübül hücre tabakaları arasında boşluklar, tübül hücre duvarında invaginasyon, tübül bütünlüğünde bozulma ve bağ dokuda parçalanmalar gözlenmiştir.

Tüm gruplarda TGF- β_2 immunoreaktivitesi olgun spermatitlerde gözlenmiş, ayrıca her üç grupta da immunoreaktivite birbirine benzer yoğunlukta bulunmuştur.

Real-Time PCR analizinde; tüm gruplardaki TGF- β_2 amplifikasyon değerleri referans gen olan GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz) ile normalize edildiğinde, bu oran CAP grubunda 0.0032, sham grubunda 0.0060 ve kontrol grubunda 0.0076 olarak gözlenmiş ve elde edilen bulgular sonucunda CAP grubunda TGF- β_2 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla önemli bir azalma gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Capsaicin, TGF- β_2 , Testis, Real-Time PCR, İmmunohistokimya.

7. ABSTRACT

In our study, gene expression and immunohistochemical localization of transforming growth factor beta-2 with Real-time PCR was analysed in the testes of rats, which were administered capsaicin at the pubertal ages.

In this study, thirty Sprague-Dawley rats were divided into the three groups, were called capsaicin, sham and control groups. 1mg/kg dose of capsaicin dissolved in % 10 ethanol and after addition of 1% Tween 20 with distilled water it was injected by subcutaneously. Carrier solution, which includes 0.3 cc. %10 ethanol, %1 Tween 20 and distilled water, was injected by subcutaneously. Any injection to rats in the control group was not performed. Rats existed in the sham and CAP groups were injected during one week. After one week waited, all rats were sacrificed by cervical dislocation under the diethyl ether anaesthesia.

Live weight gain of rats is determined as % 9.05 in the group of CAP, %17.46 in the sham group and % 25.60 in the control group while the rationing of testicular weight to the live weight 15.072 in the group of CAP, 13.673 in sham group and 13.907 in the control group. In terms of histological appearance of testicular sections, it was observed that sham and control groups maintained the structure of connective tissue and seminiferous tubule while CAP groups, gaps among the tubule cells, invagination in the tubule cell wall, tubular integrity degradation, breakdowns in the connective tissue were also monitored.

TGF- β_2 immunoreactivity was observed in mature spermatids of all groups; moreover, immuno reactivities in the groups were found to be similar in intensity. In the analysis of Real-Time PCR, when TGF- β_2 amplification values in all groups normalized with the reference gene GAPDH, that ratio was observed as 0.0032 for CAP group, 0.0060 for sham group and 0.0076 for control group and as the result of obtained findings, a significant decrease was determined for CAP group compared with TGF- β_2 expression to the control group.

Keywords: Capsaicin, TGF- β_2 , Testes, Real-Time PCR, Immunohistochemistry.

8. KAYNAKLAR

1. Adham, I.M., Emmen, J.M.A., Engel, W.: The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 160 (1): 11-16, 2000.
2. Akkoç, C.G.: Postnatal gelişme dönemlerinde capsaicin uygulanan fare testislerinde transforming growth factor β 'nın immunohistokimyasal ekspresyonu. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Bursa, 2007.
3. Artan, M.E.: Histoloji. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 1.baskı, Rek. no: 3496, Dek. no: 9, İstanbul, 1988.
4. Avelino, A., Dinis, P., Charrua, A., Nagy, I., Yaqoob, M., Cruz, F.: The Endogenous TRPV1 ligand anandamide increases in the rat inflamed urinary bladder and may contribute to inflammatory pain. *Social neuroscience*, 33: 603-8, 2003.
5. Bamberger, A.M., Ivell, R., Balvers, M., Kelp, B., Bamberger, C.M., Riethdorf, L., Loning, T.: Relaxin-like factor (RLF): A new specific marker for leydig cells in the ovary. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 18 (2): 163-8, 1999.
6. Banks, W.J.: Applied veterinary histology. 2nd edition, Williams&Wilkins Press, Baltimore, page 489–505, 1985.
7. BBC News, “How spicy foods can kill cancers”, <http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/6244715.stm>. Retrieved on January 09 2007.
8. Benahmed, M., Sordoillet, C., Chauvin, M.A., Deperetti, E., Morera, A.M.: On the mechanisms involved in the inhibitory and stimulating actions of transforming growth factor-beta on porcine testicular steroidogenesis: An in vitro study. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 67: 155-164, 1989.
9. Bernatchez, P.N., Soker, S., Sirois, M.G.: Vascular endothelial growth factors effect on endothelial cell proliferation, migration and plutelet-activating factor synthesis is FLK-1-1 dependent. *J Biol Chem.*, 274, 31047-31054, 1999.
10. Biggs, D.F., Ladenius, R.C.: Capsaicin selectively reduced airway responses to histamine, Substance P, and vagal stimulation. *European Journal of Pharmacology*, 175: 29-33, 1990.
11. Blobe, C.G., Schiemann, W.P., Lodish H.F.: Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England Journal of Medicine*, 342: 1350-8, 2000.

12. Bondestam, J.: Ligands & signaling components of the transforming growth factor beta family. Helsinki University Biomedical Dissertations No. 17, Helsinki, page 9-12, 2002.
13. Carpenter, S.E., Lynn, B.: Vascular and sensory responses of human skin to mild injury after topical treatment with *capsaicin*. British Journal of Pharmacology, 73: 755- 758, 1981.
14. Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeit, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D.: Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science, 288 (5464): 306-13, 2000.
15. Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D.: The Capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature, 389: 816-24, 1997.
16. Caterina, P., Monica, F., Antonio, M., Barbara, C., Monica, M., Fiamma, B., Massimo, R., Guido, C., Silvano, B.: HER2/neu alterations in non-small cell lung cancer: A comprehensive evaluation by Real-Time Revers Transcription-PCR, fluorescence in situ hibridizadion, and Immunohistochemichemistry. Clinical Cancer Research, 9: 3645-3652, 2003.
17. Caviglia, D., Scarabelli, L., Palmero, S.: Effects of carnitines on rat sertoli cell protein metabolism. Horm. Metab. Res, 36, 221-225, 2004.
18. Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D.: Bradykinin and nerve growth factor release the *capsaicin* receptor from PtdIns (4,5) P2-mediated inhibition. Nature, 411: 957-962, 2001.
19. Coderre, T.J., Grimes, R.W., Melzack, R.: Autotomy following sciatic and saphenous nerve sections: sparing of the medial toes after treatment of the sciatic nerve with *capsaicin*. Experimental Neurology, 91: 355-365, 1986.
20. Crossmann, G.A.: A modification of Malloy's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. Anat Rec, 69:33-8, 1937.
21. Cupp, A.S., Kim, G., Skinner, M.K.: Expression and action of transforming growth factor beta (tgfbeta-1, tgfbeta-2, and tgfbeta-3) during embryonic rat testis development. Biology of reproduction, 60: 1304-13, 1999.

22. Czaja, M.J.: Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.*, 4, 759-767, 2002.
23. Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Aatkinson, K., Hughes, S.A., Rance, K., Grau, E., Harper, A.J., Pugh, P.L., Rogers, D.C., Bingham, S., Randall, A., Sheardown, S.A.: Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405: 183-187, 2000.
24. Dellmann, H.D, Brown, E.M.: Textbook of veterinary histology. 3rd Edition, Lea&Febiger, Philadelphia, s: 282–308, 1987.
25. Dickson, C., Webster, D.R., Johnson, H., Millena, A.C., Khan, S.A.: Transforming growth factor- β effects on morphology of immature rat leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 195, 65-77, 2002.
26. Durga, P.M., Nau, C.: Desensitization of capsaicin- activated currents in the Vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic amp-dependent protein kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 50080-90, 2003.
27. Dux, M., Sa'ntha, P., Jancso', G.: *Capsaicin*-sensitive neurogenic sensory vasodilatation in the duramater of the rat. *The Journal of physiology*, 552: 859- 867, 2003.
28. Dux, M., Sann, H., Schemann, M., Jancso', G.: Changes in fibre populations of the rat hairy skin following selective chemodenervation by *capsaicin*. *Cell Tissue Research*, 296: 471- 477, 1999.
29. Erdost, H., Yakışık, M., Özfiliz, N., Zık, B., Çavuşoğlu, İ., Kahveci, Z., Noyan, S.: Acı kırmızı biberli rasyonla beslenen tavuk ve horozlarda hipofiz ve epifiz bezlerinin yapısal özellikleri U. Ü. Araştırma Fonu, Proje No:2000/12, Bursa, 2000.
30. Fuller, R.W, Dixon, C.M., Barnes, P.J.: Bronchoconstrictor response to inhaled *capsaicin* in humans. *Journal of Applied Physiology*, 58: 1080-1084, 1985.
31. 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. *Japanese Poultry Science*, 31(1): 45-52, 1994.
32. Ge, R.S., Dong, Q., Sottas, C.M., Chen, H., Zirkin, B.R., Hardy, M.P.: Gene expression in rat leydig cells during development from the progenitor to adult. *Biol. Reprod.*, 104, 037499, 2005.

33. Gnessi, L., Fabbri, A., Spera, G.: Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: An integrated system with hormones and local environment. *Endocrine Reviews*, 18: 541-609, 1997.
34. Gong, X.F., Wang, M.W., Ikejima, T.: Mechanisms of capsaicin-induced apoptosis of human melanoma A375-S2 cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.*, 27, 401-403, 2005.
35. Guitten, N., Brouazin-Jousseume, V., Dupaix, A., Jegou, B., Chenal, C.: Radiation effect on rat sertoli cell function in vitro and in vivo. *Int J Radiat Biol*, 75, 327-333, 1999.
36. Gulbenkian, S., Barroso, C.P., Cunha, S.A., Edvinsson, L.: The Peptidergic innervation of human coronary and cerebral vessels. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 100 (Suppl 1): 317-327, 1995.
37. Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X., Elde, R.: Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): Relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *The European Journal of Neuroscience*, 11: 946-958, 1999.
38. Gürsoy, E., Koptakel, E.: *Embriyoloji Atlası*. 1. baskı, Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas, sayfa 6–30, 1997.
39. Haan, J.B., Stefanovic, N., Paterson, D.N., Scurr, L.L., Croft, K.D., Mori, T.A., Hertzog, P., Kola, I., Atkins, R.C., Tesch, G.H.: Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol Renal Physiol*. 289, 544-551, 2005.
40. Hanai, J., Dhanabal, M., Karumanchi, S.A., Albanese, C., Waterman, M., Chan, B.: Eudostation causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin DI. *J Biol Chem.*, 277, 16464-16469, 2002.
41. Handagama, C., Ariyaratne, S.: Differentiation of the adult leydig cell population in the postnatal testis. *Biol. Reprod.*, 65: 660-671, 2001.
42. Harada, N., Okajima, K., Uchiba, M., Katsuragi, T.: Contribution of *capsaicin*-sensitive sensory neurons to stress-induced increases in gastric tissue levels of prostaglandins in rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 285: 1214-1224, 2003.

43. Hassa, O., Aşti, R.N.: Embriyoloji. 3. Baskı, Yorum basın yayın, s: 07-10, Ankara, 1997.
44. He, T., Xing, Y., Zhao, Q., Ai, M.: Interaction between İnos and COX-2 in hypoxia-induced retinal neovascularization in mice. *Arch. Med. Res.*, 39 (2): 261-263, 2007.
45. Hedger, M.P., Meinhardt, A.: Cytokines and the immune-testicular axis. *Journal of Reproductive Immunology*, 58: 1-26, 2003.
46. Helme, R.D., Eglezo, A., Dandie, G.W.: The effect of Substance P on the regional lymph node antibody response to antigen stimulation in capsaicin pretreated rats. *Journal of Immunology*, 139: 3470- 73, 1987.
47. Holzer, P.: Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacology Review*, 43(2): 143-201, 1991.
48. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal Histochemistry & Cytochemistry*, 29: 577-580, 1981.
49. Hudson, L.J., Bevan, S., Wotherspoon, G., Gentry, C., Fox, A., Winter, J.: VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *European Journal of Neuroscience*, 13: 2105-2114, 2001.
50. Ignatz, R.A., Massague', J.: Transforming growth factor b stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 261, 4337-4345, 1986.
51. Ingman, W.V., Robertson, S.A.: Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays*, 24: 904- 14, 2002.
52. Ito, K., Nakazato, T., Yamato, K., Miyakawa, Y., Yamada, T., Hozumi, N., Segawa, K., Ikeda, Y., Kizaki, M.: Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res.*, 64, 1071–1078, 2004.

- 53.** İlhan, T.: Postnatal gelişme dönemlerinde capsaicinli yemle beslenen fare testislerinde ghrelinin immunohistokimyasal ekspresyonu. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Bursa, 2009.
- 54.** Jancsó-Gábor, A., Szócsányi, J., Jancsó, N.: Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by *capsaicin* in rats. *Journal Physiology*, 208: 449-459, 1970.
- 55.** Jancsó, G., Lynn, B.: Possible use of *capsaicin* in pain. *The Clinical Journal of Pain*, 3: 123-126, 1987.
- 56.** Jancsó, G., Such, G.: Effects of *capsaicin* applied perineurally to the vagus nerve on cardiovascular and respiratory functions in the cat. *The Journal of Physiology*, 341: 359-370, 1983.
- 57.** Janina, K., Anna-Maria, T., Pal, K., Nora, U., Aniko, K., Gaor, L., Zsuzsa, S.: Detection of HER-2/neu gene amplification in breast carcinomas using quantitative Real-Time PCR- A comparison with immunohistochemical and FISH results. *Pathology Oncology Research*, 12, 197-204, 2006.
- 58.** Jedlińska-Krakowska, M., Bomba, G., Jakubowski, K., Rotkiewicz, T., Jana, B., Penkowski, A.: Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *J. Reprod. Dev.*, 52, 203-209, 2006.
- 59.** Johnson, K.E.: *Histology and cell biology*. 2nd Ed., Harwal Publishing Company, s: 295-304, USA, 1991.
- 60.** Jung, M.Y., Kang, H.J., Moon, A.: Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 down-regulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett.*, 165, 139-145, 2001.
- 61.** Jung, J.C., Park, G.T., Kim, K.H., Woo, J.H., An, J.M., Kim, K.C., Chung, H.Y., Bae, Y.S., Park, J.W., Kang, S.S., Lee, Y.S.: Differential expression of transforming growth factor-beta in the interstitial tissue of testis during aging. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92: 92-98, 2004.
- 62.** Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.: *Basic histology (Temel Histoloji)*. Çeviren: Aytikin, Y., Barış Kitabevi, 6. baskı, sayfa 495-516, İstanbul, 1993.
- 63.** Kawada, T., Hagihara, K., Iwai, K.: Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J Nutr.*, 116, 1272-1278, 1986.

64. Kawada, T., Sakabe, S., Watanabe, T., Yamamoto, M., Iwai, K.: Some pungent principles of spices cause the adrenal medulla to secrete catecholamine in anesthetized rats. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 188, 229-233, 1988.
65. Khan, S.A., Mirsafian, M., Howdeshell, K., Dorrington, J.H.: Transforming growth factor- β inhibits DNA synthesis in immature rat leydig cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 148: 21-28, 1999.
66. Klonisch, T., Kauffold, J., Steger, K., Bergmann, M., Leiser, R., Fischer, B., Klonisch, S.H.: Canine relaxin-like factor: Unique molecular structure and differential expression within reproductive tissues of the dog. *Biol. Reprod.*, 64: 442-450, 2001.
67. Konrad, L., Albrecht, M., Renneberg, H., Aumuller, G.: Transforming growth factor-beta2 mediates mesenchymal-epithelial interactions of testicular somatic cells. *Endocrinology*, 141: 3679-86, 2000.
68. Kress, M., Gutimann, C., Averbeck, B., Reeh, P.W.: Calcitonin gene related peptid and prostaglandin E2 but not substance P release induced by antidromic nevre stimulation from rat skin in vitro. *Neuroscience*, 89: 303-10, 1999.
69. Krinke, G.J.: *The Laboratory Rat*. 1 st Ed, Academic Press, s: 150-152, 311-312, Switzerland, 2000.
70. Kumagai, J., Hsu, S.Y., Matsumi, H., Roh, J.S., Fu, P., Wade, J.D., Bathgate, R.A., Hsueh, A.J.: INSL3/leydig insulin-like peptide activates the lgr8 receptor important in testis descent. *J. Biol. Chem.*, 277 (35): 31283-6, 2002.
71. Lembeck, F.: Columbus, capsicum and capsaicin: Past, present and future. *Acta Physiology of Hungary*, 69: 265-73, 1987.
72. Liang, Y.F., Haake, B., Reeh, P.W.: Sustained sensitization and recruitment of rat cutaneous nociceptors by bradykinin and a novel theory of its excitatory action. *The Journal of physiology*, 523: 229-239, 2001.
73. Lim, K.: Dietary red pepper ingestion increases carbohydrate oxidation at rest and during exercise in runners. *Medical Science Sports Exercise*, 29: 355-61, 1997.
74. Lopez-Hernandez, J., Oruna-Concha, M.J., Simal-Lozane, J., Gonzalescastro, M.J., Varquez-Blanco, M.E.: Determination of *capsaicin* and *dihydrocapsaicin* in cayenne pepper and pardon peppers by HPLC. *Deutsche Lebensmittel- Rundschau*, 92: 393- 395, 1996.

75. Lui, W.Y., Lee, W.M., Cheng, C.Y.: TGF-Betas: Their role in testicular function and sertoli cell tight junction dynamics. *International Journal of Andrology*, 26: 147-160, 2003.
76. Maggi, C.A., Santicioli, P., Meli, A.: The effects of topical *capsaicin* on rat urinary bladder motility in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 103: 41-50, 1984.
77. Mahmoud, M.E., Nikami, H., Shiina, T., Takewaki, T., Shimizu, Y.: Capsaicin inhibits IFN- γ -induced MHC class II expression by suppressing transcription of class II transactivator gene in murine peritoneal macrophages. *International Immunopharmacology*, 10, 1, 86-90, 2010.
78. Malagarie-Cazenave, S., Olea-Herrero, N., Vara, D., Morell, C., Diaz-Laviada, I.: The vanilloid capsaicin induces IL-6 secretion in prostate PC-3 cancer cells. *Cytokine*, 54, 330-337, 2011.
79. Massague, J., Cheifetz, S., Endo, T., Nadal-Ginard, B.: Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 8206–10, 1986.
80. McMahon, S.B., Lewing, G., Bloom, S.R.: The Consequences of longterm topical *capsaicin* application in the rat. *Pain*, 44: 301-310, 1991.
81. Meinyk, A., Himms-Hagen, J.: Resistance to aging-associated obesity in capsaicin-desensitized rats one year after treatment. *Obesity Research*, 3: 337-44, 1995.
82. Mızrak, Ş.C.: Capsaicin'in in vitro ortamda erişkin sıçan spermatogenik hücre hatlarında proliferasyona ve bu süreçte gözlenen apoptozise etkileri. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Bursa, 2003.
83. Monsereenusorn, Y.: Subchronic toxicity studies of capsaicin and capsicum in rats. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 41: 95-110, 1983.
84. Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Ferrermontiel, A.: Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 25665-25672, 2004.

- 85.** Morera, A.M., Esposito, G., Ghiglieri, C., Chauvin, M.A., Hartmann, D.J., Benahmed, M.: Transforming growth factor beta 1 inhibits gonadotropin action in cultured porcine sertoli cells. *Endocrinology*, 130: 831-6, 1992.
- 86.** Mori, A., Lehmann, S., O'Kelly, J., Kumagai, T., Desmond, J.C., Pervan, M., McBride, W.H., Kizaki, M., Koeffler, H.P.: Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent. p53 mutant prostate cancer cells, *Cancer Res.*, 66, 3222-3229, 2006.
- 87.** Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., Heldin, C.H.: Smad regulation in TGF-Beta signal transduction. *Journal of Cell Science*, 114: 4359-69, 2001.
- 88.** Mullaney, B.T., Skinner, M.K.: Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Molecular Endocrinology*, 7: 67-76, 1993.
- 89.** Nagabhushan, M., Bhide, S.V.: Mutagenicity of chili extract and capsaicin in short-term tests. *Environmental Mutagenesis*, 7, 881-888, 1985.
- 90.** Nozu, K., Dufau, M.L., Catt, K.J.: Estradiol receptor-mediated regulation of steroidogenesis in gonadotropin-desensitized leydig cells. *J. Biol. Chem.*, 256 (4); 1915-1922, 1981.
- 91.** Oh, W., Ohta, F.: Dose-dependent effect of capsaicin on endurance capacity in rats. *British Journal of Nutrition*, 90, 515-20, 2003.
- 92.** Oktay, E., Olgun, H.: Kırmızı biberin new hampshire tavuklarında yumurta verimi, yumurta kalitesi ve kuluçka verimine etkisi, IV. Bilim Kongresi Bildiri Kitabı, Ankara, sayfa 1-6, 1973.
- 93.** Olaso, R., Gautier, C., Levacher, C., Durand, P., Saez, J., Habert, R.: The immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 2 in the fetal and neonatal rat testis. *Molecular and Cell Endocrinology*, 7: 165-172, 1997.
- 94.** Olaso, R., Pairault, C., Habert, R.: Expression of type I and II receptors for transforming growth factor beta in the adult rat testis. *Histochemical Cell Biology*, 110: 613-8, 1998.
- 95.** Özer, A., Erdost, H., Zik, B.: Histological investigations on the effects of feeding a diet containing red hot pepper on the reproductive organs of the chicken. *Phytotherapy Research*, 19: 501-505, 2005.

96. Özer, A., Zik, B., Erdost, H., Özfiliz, N.: Histological investigations on the effects of feeding a diet containing red hot pepper on the reproductive organs of the cock. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30: 7-15, 2006.
97. Panossian, A., Gabrielian, E., Wagner, H.: Dose-dependent reversible effects of capsaicin on interleukin-1 α 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.
98. Park, E.S., Jo, S., Yi, S.J., Kim, J.S., Lee, H.S., Lee, I.S., Seo, K.M., Sung, J.K., Lee, I., Yoon, Y.S.: Effect of capsaicin on cholecystokinin and neuropeptide Y expressions in the brain of high-fat diet fed rats. *Journal of Veterinary Medical Science*. 66(2): 107-114, 2004.
99. Piek, E., Heldin, C., Dijke, P.T.: Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *The FASEB Journal*, 13: 2105-18, 1999.
100. Pospisilova, E., Palecek, J.: Post-Operative pain behavior in rats is reduced after single high-concentration *capsaicin* application. *Pain*, 125: 233-243, 2006.
101. Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., Lamont, J.T., Jaffer, A., O'Keane, J.C., Snider, R.M., Leeman, S.E.: CP-96, 345, A substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to clostridium difficile toxin A but not cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 947-951, 1994.
102. Rashid, M.H., Inoue, M., Kondo, S., Kawashima, T., Bakoshi, S., Ueda, H.: Novel expression of vanilloid receptor 1 on capsaicin-insensitive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. *Journal of Pharmacology*, 304: 940-8, 2003.
103. Ritter, S., Dinh, T.T.: Capsaicin induced neuronal degeneration: Silver impregnation of cell bodies, axons, and terminals in the central nervous system of the adult rat. *Journal of Comparative Neurology*, 271: 79-90, 1988.
104. Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K.: Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 4167-71, 1986.
105. Ross, M.H., Kaye I.G., Pawlina, W.: *Histology a text and atlas*. 4th edition, Lippincott Williams & Wilkins Press, USA, page 690-4, 2003.

- 106.** Russell, LD., Ettl, R.A, Hikim, A.P.S., Clegg, E.D.: Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, page 1-160, USA, 1990.
- 107.** Saeki, T., Ohno, T., Kamataki, A.K., Mizuguchi, S., Katori, M., Saigenji, K., Majima, M.: Mild irritant prevents ethanol-induced gastric mucosal microcirculatory disturbances through actions of calcitonin gene-related peptide and PGI₂ in rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286: 68-75, 2004.
- 108.** Sambaiah, K., Satyanarayana, M.N.: Influence of red pepper and capsaicin on body composition and lipogenesis in rats. *Journal of Bioscience*, 4(4): 425-430, 1982.
- 109.** Shono, T., Hutson, J.M.: Capsaicin increases the frequency of cryptorchidism in flutamide-treated rats. *Journal of Urology*, 152, 763-765, 1994.
- 110.** Sicuteri, F., Fusso, B.M., Marabini, S., Campagnolo, V., Maggi, C.A., Geppetti, P., Fanciullacci, M.: Beneficial Effect of *Capsaicin* Application to the Nasal Mucosa in Cluster Headache. *The Clinical Journal of Pain*, 5: 49-53, 1989.
- 111.** SPSS 12.0 Windows and Smart Viewer, 2003.
- 112.** Srinivasan, M.R., Satyanarayana, M.N.: Influence of capsaicin, curcumin and ferulic acid in rats fed high fat diets. *Journal of Bioscience*, 12(2): 143-152, 1987.
- 113.** Stanisz, A.M., Befus, D., Bienenstock, J.: Differential effects of vasoactive intestinal peptide, Substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *Journal of Immunology*, 136: 152-156, 1986.
- 114.** Stevens, A., Lowe, J.: Human histology, C.V. Mosby Press, 2nd edition, London, page 309-325, 1997.
- 115.** Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H., Mizumura, K.: Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *Journal of Neurophysiology*, 88: 544- 548, 2002.
- 116.** Szallasi, A., Blumberg, P.M.: Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (*capsaicin*) receptor. *Life Science*, 47: 1399-1408, 1990.
- 117.** Szallasi, A., Blumberg, P.M.: Vanilloid (*capsaicin*) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews*, 51: 159-211, 1999.

- 118.** Szolecsányi, J., Mozsik, G.: Effects of *capsaicin* on the development of gastric mucosal damage by different necrotizing agents and of gastric cytoprotection by PGI₂ atropine and cimetidine on rats. *Acta Physiologica Hungarica*, 64: 287-291, 1984.
- 119.** Takahata, K., Chen, X., Monobe, K., Tada, M.: Growth inhibition of capsaicin on hela cells is not mediated by intracellular calcium mobilization. *Life Sciences*, 64: 165-71, 1999.
- 120.** Tanyolac, A.: Özel histoloji. 3. Baskı, Yorum basın yayını, s: 132-143, Ankara, 1999.
- 121.** Teerds, K.J., Boer-Brouwer, M., Dorrington, H.J., Balvers, M., Ivell, R.: Identification of markers for precursor and leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. *Biol. Reprod*, 60 (6): 1437-45, 1999.
- 122.** Teerds, K.J., Dorrington, J.H.: Localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 during testicular development in the rat. *Biology of Reproduction*, 48: 40-5, 1993.
- 123.** Tellez, G.I., Jaeger, L., Dean, C.E., Corrier, D.E., Deloach, J.R., Williams, J.D., Hargis, B.M.: Effect of prolonged administration of dietary *capsaicin* on salmonella enteritidis infection in leghorn chicks. *Avian Diseases*, 37: 143-148, 1993.
- 124.** Teng, C.H., Kang, J.Y., Wee, A., Lee, K.O.: Protective action of *capsaicin* and chilli on haemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in the rat. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 13: 1007-1014, 1998.
- 125.** Theriault, E., Otsuka, M., Jessel, T.: *Capsaicin*-evoked release of substance P from primary sensory neurones. *Brain Research*, 170: 209-213, 1979.
- 126.** Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D.: The Cloned *capsaicin* receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21: 531-543, 1998.
- 127.** Tominaga, M., Wada, M., Masu, M.: Potentiation of *capsaicin* receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 6951-6956, 2001.

- 128.** Traurig, H.H., Saria, A., Lembeck, F.: The effects of neonatal capsaicin treatment on growth and subsequent reproductive function in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327: 254-259, 1984.
- 129.** Varga, J., Rosenbloom, J., Jimenez, S.A.: Transforming growth factor beta causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochemistry Journal*, 1: 597-604, 1987.
- 130.** Westerman, R.A., Roberts, R.G., Kotzmann, R.R., Westerman, D.A., Delaney, C., Widdop, R.E., Carter, B.E.: Effects of topical *capsaicin* on normal skin and affected dermatomes in herpes zoster. *Clinical and Experimental Neurology*, 25: 71-84, 1988.
- 131.** Wist, E., Risberg, T.: Topical *capsaicin* in treatment of hyperalgesia, allodynia and dysesthetic pain caused by malignant tumour infiltration of the skin. *Acta Oncologica*, 32: 343, 1993.
- 132.** www.ncbi.nlm.nih.gov
- 133.** Yoshioka, M.: Effects of red-pepper diet on the energy metabolism in men. *Journal Nutrition Science Vitaminol*, 41: 647-56, 1995.
- 134.** Young-Soon, S.: More than spice: *Capsaicin* in hot chilli peppers makes tumor cells commit suicide. *Journal of the National Cancer Institute*, 94: 1263-1265, 2002.
- 135.** Zhang, Y., Xiang, B., Li, Y., Wang, Y., Wang, X., Wang, Y.N, Wu, L., Yu, G.: Expression and characteristics of vanilloid receptor 1 in the rabbit submandibular gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 345: 467-773, 2006.
- 136.** Zhou, F.W., Li, Y.J., Deng, H.W.: Early and delayed protection by *capsaicin* against reperfusion in jury in rat hearts. *Acta Pharmacologica Sinicia*, 20: 912-916, 1999.

9. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Hatay ili Antakya ilçesinde doğdu. İlköğretim ve lise öğretimini Antakya'da tamamladı. 1999 yılında okumaya hak kazandığı Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2003 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 2003 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2005 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalına, 2006 yılında ise Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2007 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Öğrenimine başladı. Halen Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.