

## Sıçan ovariumunda düşük doz capsaicinin NF-kB ve XIAP proteininin sentezlenmesi üzerine etkisi\*

Berrin ZİK, Cansel G. ÖZGÜDEN AKKOÇ, Şerife TÜTÜNCÜ

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı.

**Özet:** Capsaicin (CAP), kırmızı acı biberin acı bileşimidir. Yüksek doz CAP'ın ovarium üzerine etkisi bilinmesine rağmen, düşük doz CAP'ın etkisi bilinmemektedir. Sunulan çalışmanın amacı, günlük diyetle kırmızı acı biberden alacağımız miktardaki CAP'ın, ovarium follikül gelişiminde etkili olan X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) ve Nuclear Factor-kappaB (NF-kB) proteinlerinin sentezi üzerine etkisini ortaya koymaktır. Çalışmada 21 günlük 80 adet Sprague-Dawley ırkı dişi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar enjeksiyon periyoduna göre 4 gruba ayrıldı (6, 9, 12 ve 15 gün). Deney sonrasında ovarium kesitlerine immunohistokimyasal olarak XIAP ve NF-kB antikorları kullanılarak indirekt Streptavidin- Biotin- Peroksidaz yöntemi uygulandı. Ovarium dokusunda XIAP ve NF-kB immunreaksiyonu, ovarium yüzeyindeki sağlıklı tüm follikül sınıflarında gözlenirken, atretik folliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde boyanma gözlenmedi. Bununla birlikte oosit, ovarium yüzey epitel hücreleri ve intersitisyel hücrelerde de sentez belirlendi. XIAP ve NF-kB protein sentezlerinin birbirine bağımlı olarak geliştiği ve özellikle 15 gün CAP uygulanan grupta kontrol A ve kontrol B grubuna göre bu proteinlerin sentezinin yüksek olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak kısa süreli düşük doz CAP uygulamasının NF-kB yoluyla XIAP sentezini uyardığını ve follikülleri atreziden koruduğunu, dolayısıyla düşük doz CAP'ın ovarium follikül gelişiminin düzenlenmesine yardımcı olan faktörlerden biri olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: Capsaicin, NF-kB, ovarium follikülleri, sıçan ovarium, XIAP

### The effects of low dose capsaicin on NF-kB and XIAP proteins expression in rat ovary

**Summary:** Capsaicin (CAP) is pungent ingredient in red peppers. On the ovary, the effects of high dose capsaicin are well-established, although the effects of low doses are unknown. The goal of the present study was to investigate the effects of low dose of CAP, equal to getting from hot pepper in daily diet, on the expression of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) and transcription factor Nuclear Factor kappa B (NF-kB) proteins having important roles on ovarian follicular development. In this study, 80 immature female Sprague-Dawley rats (21 days old) were used. The rats were randomly allocated into 4 groups according to injection periods as followed 6, 9, 12, 15 days. At the end of the experiment, tissue samples were collected and ovary sections were stained with streptavidin-biotin technique using primary antibodies against XIAP and NF-kB. As a result, while positive XIAP and NF-kB immunoreactivity were observed in all healthy follicle stages in the ovary, no staining was observed in the granulosa and theca cells of the atretic follicles. Moreover, interstitial cells, ovarian surface epithelial cells and oocytes were also positively stained with XIAP and NF-kB. It was observed that the expression of XIAP and NF-kB protein were dependent on each other and particularly in 15 days injection group, these protein expressions in the experiment groups were significantly higher than both in control A and control B groups. As a result, short term-low dose CAP treatment induced XIAP expression via NF-kB activation and protected follicles from atresia. Consequently, it was thought that the low dose capsaicin may be one of the factors arranging the follicle development.

Key words: Capsaicin, NF-kB, ovary follicles, rat ovary, XIAP.

### Giriş

Capsicum bitki türüne ait olan kırmızı acı biber, dünyada sıkça kullanılan ve fazla miktarda tüketilen bir baharattır. Acı bibere acılığı veren etken madde, capsaicindir (CAP) (13). Kırmızı acı biberin gıda katkı maddesi ve ağrı giderici olarak kullanımı çok eski yıllara dayanmaktadır. CAP başlıca, sensorik sinirler üzerine yerleşen vanilloid receptor 1 (VR1) aracılığı ile sensorik sinir sonlarından vazodilatör etkili nöropeptid madde

olan substance P (SP) ve calcitonin gene-related peptid (CGRP)'in salınımını uyararak analjezik etki göstermektedir (6). CAP ağrı giderici etkisinin yanında, immun sistem (14), gastrointestinal (8, 26), kardiyovasküler ve solunum sistemleri (19, 25) olmak üzere pek çok sistem üzerine etki etmektedir. CAP'ın etkisi dozuna, uygulama şekline ve dokuya göre değişmektedir (17). Yapılan taramalarda CAP'ın organizmada pek çok metabolizma üzerine etkili olduğu görülmektedir, ancak capsaicinin

\* Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (TOVAG 104 O 372)

ovaryum üzerine etkisini inceleyen çok az çalışma vardır. Ovaryumu innerve eden CAP'a duyarlı sensorik sinir sonları, SP (15), CGRP ve vasoactive intestinal peptide (VIP) gibi nöropeptidler içerir (2, 10). SP ovaryumdaki kan damarların çevresinde fazla miktarda bulunur ve folliküllerin gelişiminin düzenlenmesine katılır (9). Moran ve ark. (11) yeni doğan sıçanlara yüksek dozda CAP uygulamasının ovaryum follikül sayısında ve gebelik oranında azalmaya, atretik follikül sayısında ise artışa neden olduğunu belirterek, ovaryum fonksiyonlarının düzenlenmesinde sensorik sinirlerin önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Ayrıca yine yüksek dozda CAP uygulamasının, çiftleşmede nöroendokrin refleksin bozulmasına ve dolayısıyla serviks uterinin sensorik uyarılmasının eksikliğiyle fertilité üzerine olumsuz etki yaptığı belirtilmiştir (12).

X-linked Inhibitor of Apoptosis Proteinin (XIAP) hücre içi önemli anti-apoptotik faktör olduğu, hücrelerde hücre ölümünü /apoptozisi baskıladığı bildirilmektedir (1, 5). Pek çok araştırmacı, ovaryumda *in vivo* ve *in vitro* follikül gelişiminde XIAP'nin gerekli olduğunu, gonadotropinlerle XIAP sentezinin arttığını ve apoptozisi baskıladığını, sonuç olarak follikül yaşamı için gerekli olduğunu belirtmişlerdir (21, 23). Ayrıca Wang ve ark. (22), Follicle-Stimulating Hormone (FSH)'nun XIAP sentezini Nuclear Factor kappa-B (NF-kB) yoluyla artırarak follikül gelişiminde etkili olduğunu, Delfino ve Walker (3) ise memeli testislerinde spermatogenezin düzenlenmesinde NF-kB'nin önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. CAP sadece ağrı giderici olarak ya da sensorik sinirlerin önemini belirlemek için araştırmacılar tarafından kullanılmamakta, ayrıca çoğu insan baharat içeren gıdalarla düşük doz CAP'ı uzun süre tüketmektedir. Yüksek doz CAP'ın ovaryum üzerine etkisi bilinmesine rağmen, düşük doz CAP'ın etkisi bilinmemektedir.

Sunulan çalışmanın amacı, günlük diyetle kırmızı acı biberden alınacak CAP'ın, ovaryum follikül gelişiminde etkili olan XIAP ve NF-kB proteinlerinin sentezi üzerine etkisini immunohistokimyasal yöntemle ortaya koymaktır.

### Materyal ve Metot

**Deneyisel uygulama:** Çalışmada Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 21 günlük 80 adet Sprague-Dawley ırkı dişi sıçan kullanıldı. Çalışmadaki tüm deneysel işlemler Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından onaylandı (2005/2). Hayvanlar 4 gruba ayrıldı ( 6, 9, 12 ve 15 günlük enjeksiyon grupları) ve her bir gruptaki hayvanlar; CAP enjekte edilen (deney grubu), hiçbir enjeksiyon yapılmayan (kontrol A grubu) ve CAP'ın salt etkisini görebilmek için CAP'ın eritildiği taşıyıcı solüsyonun enjekte edildiği (kontrol B grubu) olmak üzere 3 alt gruba ayrıldı. Her bir alt grupta capsaisin enjeksiyonu için 10; kontrol B için 5 ve kontrol

A için 5 sıçan kullanıldı. CAP, %10 tween 80, %10 ethanol ve %80 steril distile su içerisinde eritildi. Eritilen CAP, 0,5 mg/kg dozda toplam 0,3 ml içinde subkutan yolla deney grubundaki sıçanlara enjekte edildi. CAP, hayvanların vücut ağırlıklarındaki artış göz önüne alınarak, enjeksiyon öncesi her gün taze olarak hazırlandı. Deney sonunda, dokuların alınacağı gün hayvanlara enjeksiyon yapılmadı.

**Histolojik prosedür:** Her deneme grubu sonrasında, hayvanlar eter inhalasyonu ile uyutularak ovaryumları alındı. Ovaryumlar %10'luk tamponlanmış nötr formol solüsyonunda tespit edilerek parafinle bloklandılar.

**Immunohistokimyasal prosedür:** Parafin bloklardan alınan kesitler lizinli lamlara çekilerek, indirekt Streptavidin- Biotin- Peroksidaz kompleks yöntemi (18) ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

Immunohistokimyasal boyamada goat poliklonal XIAP (R&D-AF 8221) ve rabbit poliklonal NF-kB p65 (Santa Cruz, sc-109) primer antikor, sekonder antikor olarak XIAP için LSAB+ System –HRP (Dako-K0690), NF-kB p65 için Histostain Plus rabbit primary (Zymed kit: 85-6743) kit kullanıldı. Kesitler deparafinize edildikten sonra proteoliz için Sitrat Buffer (pH:6) solüsyonu içerisinde, 700 watt'lık devirde, 3X 5dk mikrodalga fırında ısıtma işlemine tabi tutuldu. Daha sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için, dokular %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda inkübe edildi. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkamayı takiben kesitler spesifik olmayan protein bağlanmalarını önlemek amacıyla XIAP için %5'lik bovine serum albumin (BSA), NF-kB için kit içerisindeki serum ile 60 dk. muamele edildi. Daha sonra kesitlere 1/300 (NF-kB) ve 1/500 (XIAP) dilüsyondaki primer antikorlar damlatılarak +4 °C'de 1 gece bekletildi. Bu arada negatif kontrol grubu dokuları üzerine sadece PBS solüsyonu damlatıldı. Kesitler biotinlenmiş sekonder antikor damlatılarak oda sıcaklığında 15 dk. bekletildi ve yıkamayı takiben streptavidin-HRP komplekste oda sıcaklığında 15dk. inkübe edildi. Son aşamada kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAP) kullanıldı ve hematoksilin ile zıt boyama yapılarak preparatlar entellan yapıştırıcı ile kapatıldı.

Tüm kesitler iki bağımsız gözlemci tarafından incelenerek, folliküllerde XIAP ve NF-kB antikorların boyanma şiddetine göre aşağıdaki skorlama yapıldı. Şiddetine göre; boyanma yok ise negatif (-), hafif şiddette boyanma var ise hafif şiddette (+1), orta şiddette boyanma mevcut ise orta şiddette (+2), şiddetli boyanma gözlemleniyse şiddetli (+3) boyanma olarak folliküller değerlendirildi ( 20). Şiddetine göre yapılan skorlama sonucu, gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel yönden incelendi.

**Folliküllerin morfolojik sınıflandırması:** Çalışmada folliküller, klasik follikül sınıflandırması göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır (16). Bu sınıflandırmada,

granuloza hücre şekli ve hücre katman sayısı göz önüne alınmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Follikül sınıflandırması.  
Table 1. The classification of follicles.

Follikül sınıfları	Adlandırma	Tanım
A	Primordial	tek katlı yassı granuloza hücre (GH) katmanı
B	Primer	tek katlı kübik (GH) katmanı
C	Sekonder	2-3 sıralı kübik (GH) katmanı
D	Küçük antral	$\leq 5$ sıralı kübik (GH) ve küçük antral boşluklu
E	Büyük antral	$5 \leq$ sıralı GH'li geniş antral boşluk, belirgin teka tabakalı
F	Graf	kumulus-oosit kompleksi, antral boşluk ve belirgin teka tabakalı

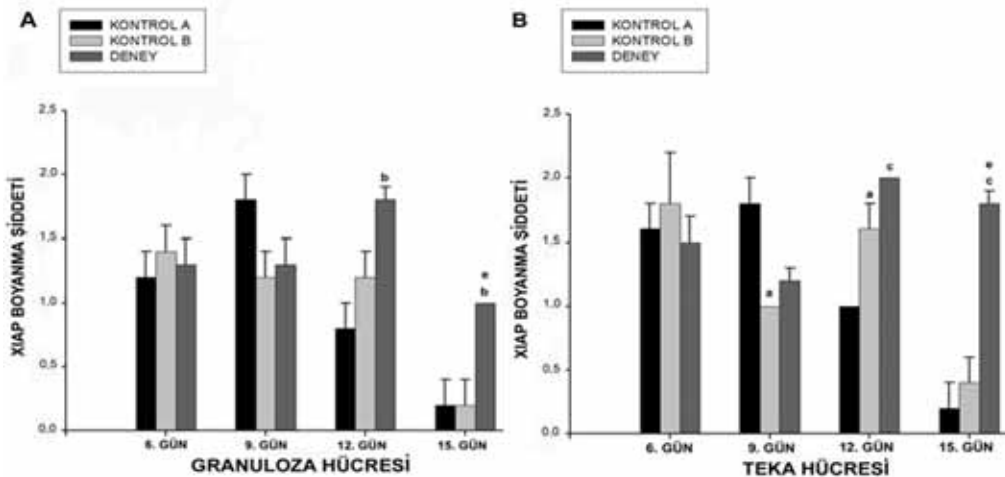
**İstatistiksel analiz:** Gruplar arasında istatistiksel farklılıklar Kruskal-Wallis analiz yöntemi ile araştırıldı. Gruplar arasındaki farklılığın hangi grup(lar) dan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile incelendi. Güven düzeyi; **a**, kontrol A 'dan farklı ( $p < 0.05$ ); **b**, kontrol A 'dan farklı ( $p < 0.01$ ); **c**, kontrol A 'dan farklı ( $p < 0.001$ ); **d**, kontrol B 'den farklı ( $p < 0.05$ ); **e**, kontrol B 'den farklı ( $p < 0.01$ ); **f**, kontrol B 'den farklı ( $p < 0.001$ ) simgesi kullanıldı.

## Bulgular

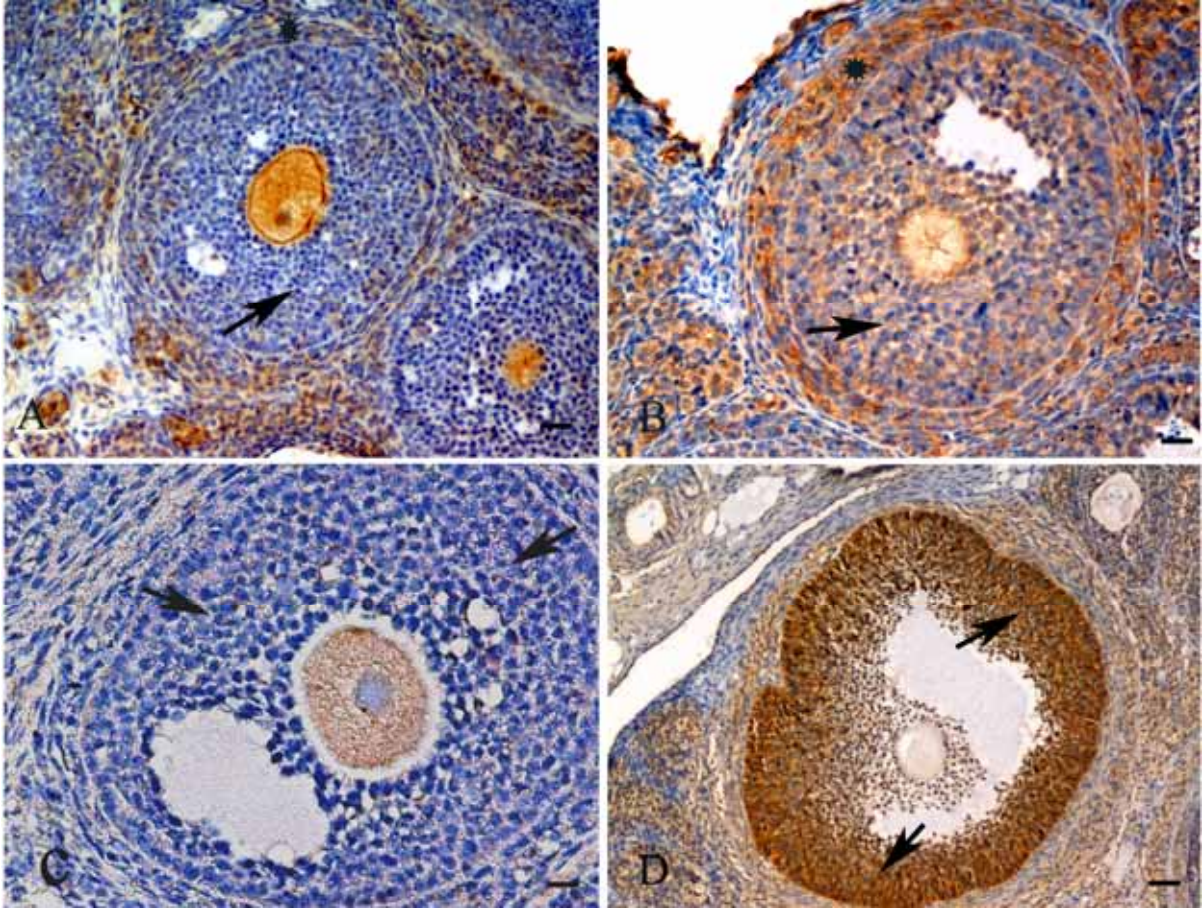
**XIAP değerlendirmeleri:** Ovaryum dokusundaki tüm follikül sınıflarında XIAP immunreaksiyonu granuloza ve teka hücrelerinde, oosit, ovaryum yüzey epitel hücreleri ve intersitisyel hücrelerde sitoplazmik boyanma şeklinde belirlendi. 6. günde, gruplar arasında XIAP boyanma şiddeti bakımından benzer reaksiyonlar gözlemlendi. Tüm gruplarda folliküllerin granuloza hücrelerinde ve

intersitisyel hücrelerinde zayıf boyanma gözlenirken, oosit sitoplazmasında ve yüzey epitel hücrelerinde şiddetli, teka hücrelerinde ise orta şiddette boyanma belirlendi. 6. günde gruplar arasında granuloza ve teka hücrelerinde XIAP immunreaksiyon şiddeti bakımından istatistiksel farklılık gözlenmedi ( $p > 0.05$ ) (Şekil 1A, B). 9. günde granuloza hücrelerinde XIAP sentezi bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık gözlenmezken ( $p > 0.05$ ), teka hücrelerinde kontrol A ile kontrol B arasında  $p < 0.05$  düzeyinde istatistiksel farklılık belirlendi (Şekil 1A, B). 12. günde deney grubunun granuloza ve teka hücrelerinde immunreaksiyonun diğer gruplara göre şiddetli olduğu gözlemlendi (Şekil 2A, B). Granuloza hücrelerinde, deney grubu ile kontrol A grubu arasında  $p < 0.01$  düzeyinde, teka hücrelerinde ise  $p < 0.001$  düzeyinde istatistiksel önem belirlendi (Şekil 1A, B). 15. günde ise, deney grubundan oldukça farklı olarak hem kontrol A hem de kontrol B grubunda immun reaksiyon şiddetinin azaldığı belirlendi. Deney grubunda reaksiyon, folliküllerin teka katmanında ve granuloza hücrelerinde oldukça belirgindi. Granuloza hücrelerinde boyanma şiddeti bakımından deney grubu, kontrol A ve kontrol B ile  $p < 0.01$  düzeyinde, teka hücrelerinde ise kontrol A ile  $p < 0.001$ , kontrol B ile  $p < 0.01$  düzeyinde istatistiksel önem gösterdi (Şekil 1A, B).

**NF-kB değerlendirmeleri:** NF-kB immunreaksiyonu, ovaryum yüzeyindeki sağlıklı tüm follikül sınıflarında gözlenirken, atretik folliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde boyanma gözlenmedi. İmmunreaksiyon başlıca granuloza hücrelerinde, oositte, intersitisyel hücrelerde ve bazı folliküllerin teka hücrelerinde sitoplazmik ve çekirdek boyanması şeklinde belirlendi. Tüm gruplarda intersitisyel hücrelerdeki reaksiyon şiddeti, granuloza hücrelerine göre zayıftı. A, B, C follikül sınıflarının oosit ve granuloza hücrelerindeki boyanma, diğer follikül sınıflarına göre daha şiddetliken, bazı gruplarda büyük



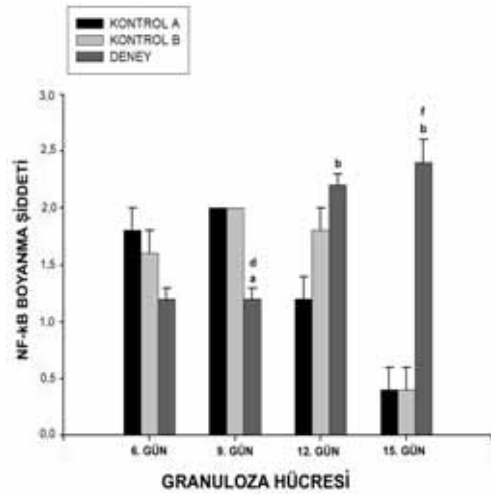
Şekil 1. Folliküllerin granuloza hücrelerinde (A) ve teka hücrelerinde (B) XIAP boyanma şiddeti. a, kontrol A 'dan farklı ( $p < 0.05$ ); b, kontrol A 'dan farklı ( $p < 0.01$ ); c, kontrol A 'dan farklı ( $p < 0.001$ ); e, kontrol B 'den farklı ( $p < 0.01$ ).  
Figure 1. Staining intensity of XIAP in the granulosa cells (A) and theca cells (B) of follicles a, different from control A ( $p < 0.05$ ); b, different from control A ( $p < 0.01$ ); c, different from control A ( $p < 0.001$ ); e, different from control B ( $p < 0.01$ ).



Şekil 2. 12. günde granuloza hücrelerinde (oklar) ve teka hücrelerinde (yıldız) kontrol A (A) grubuna göre deney grubunda (B) şiddetli XIAP immunreaksiyon. Bar: 50µm. 15. günde granuloza hücrelerinde kontrol B (C) grubuna göre deney grubunda (D) şiddetli NF-kB immunreaksiyon (oklar). Bar: 100µm.

Figure 2. On 12 day, strong XIAP immunreaction in the experimental group (B) to control A group (A) in the granulosa cells (arrows) and theca cells (star). Bar: 50µm. On 15 day, strong NF-kB immunreaction in the experimental group (D) to control B group (C) in the granulosa cells (arrows). Bar: 100µm.

antral folliküllerin sadece lumene bakan granuloza hücrelerinde boyanma gözlemlendi. Gruplar arasında NF-kB boyanma farklılıkları belirlendi ve gruplar arasındaki NF-kB boyanma şiddetindeki bu farklılık, XIAP boyanma şiddetindeki farklılığa benzer olarak, 15. günde daha belirgin tespit edildi. 6. günde NF-kB boyanma şiddeti bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık gözlemlenmedi ( $p>0.05$ ) (Şekil 3). 9. günde deney grubunda boyanma şiddeti, kontrol A ve kontrol B grubuna göre zayıf şiddette gözlemlendi ( $p<0.05$ ) (Şekil 3). 12. günde ise, kontrol A ve kontrol B grubunda NF-kB immunreaksiyonu, deney grubuna göre zayıftı (Şekil 3). Deney grubu ile kontrol A grubu arasında immunreaksiyon şiddeti bakımından istatistiksel farklılık belirlendi ( $p<0.001$ ). 15. günde deney grubundan oldukça farklı olarak, hem kontrol A hem de kontrol B grubunda tüm follikül sınıflarının granuloza hücrelerinde ve oosit sitoplazmasında çok zayıf şiddette immunreaksiyon gözlemlendi (Şekil 2 C,D). Deney grubunun granuloza hücrelerinde immunreaksiyon şiddeti, kontrol A ile  $p<0.01$ , kontrol B ile  $p<0.001$  düzeyinde istatistiksel önem gösterdi (Şekil 3).



Şekil 3. Folliküllerin granuloza hücrelerinde NF-kB boyanma şiddeti. a, kontrol A'dan farklı ( $p<0.05$ ); b, kontrol A'dan farklı ( $p<0.01$ ); d, kontrol B'den farklı ( $p<0.05$ ); f, kontrol B'den farklı ( $p<0.001$ ).

Figure 3. Staining intensity of NF-kB in the granulosa cells of follicles. a, different from control A ( $p<0.05$ ); b, different from control A ( $p<0.01$ ); d, different from control B ( $p<0.05$ ); f, different from control B ( $p<0.001$ ).

### Tartışma ve Sonuç

Ovaryum dokusunda XIAP immun lokalizasyonu, başlıca sağlıklı folliküllerin granuloza ve teka hücre sitoplazmalarında gözlenirken, reaksiyon şiddeti granuloza hücrelerine göre teka hücrelerinde daha şiddetli belirlendi. Atretik folliküllerin teka hücrelerinde ise XIAP immunreaksiyon gözlenmedi. Deney grubunda diğer gruplara göre 15. günde XIAP reaksiyonu daha şiddetliydi.

XIAP'nin fizyolojik rolü tam olarak bilinmemesine rağmen, hücre içi önemli anti-apoptotik faktör olduğu, Caspase-3'ü (1), Caspase-7'yi (4), ayrıca bax/sitokrom C yolunu Caspase-9'u (5) baskılayarak düzenlediği, hücrelerde hücre ölümünü /apoptozisi baskıladığı bilinmektedir. Pek çok araştırmacı, ovaryumda *in vivo* ve *in vitro* follikül gelişiminde XIAP'nin gerekli olduğunu, gonadotropinlerle XIAP sentezlenmesinin arttığını ve apoptozisi baskıladığını sonuç olarak follikül yaşamı için gerekli olduğunu bildirmektedir (21, 23). Ayrıca hücrelerde XIAP protein içeriğindeki azalmanın, hücrelerin apoptozisinde artışa neden olacağı prokaspazların aktivasyonunu uyarak apoptotik olayları indükleyeceği bildirilmektedir (1). Asselin ve ark. (1), granuloza hücrelerine gonadotropin uygulanmasında, hücrelerde XIAP ve fosforlanmış Akt protein içeriğinin arttığını ve fosforlanmış Akt üzerinden gerçekleştirdiği mekanizmayla XIAP'nin, hücre apoptozisini baskıladığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda XIAP'nin kontrol A ve B ye göre 12 ve 15 günlük CAP uygulaması sonrasında fazla sentezlendiği gözlenmiştir. Dolayısıyla 12 ve 15 günlük CAP uygulaması sonrasında, CAP'ın follikülleri apoptozisden koruduğu ve bunu da hücre içerisinde XIAP içeriğindeki artışla sağladığını düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamızda özellikle 15 günlük CAP uygulanmasında folliküllerin granuloza hücrelerinde XIAP'ye benzer olarak NF-kB sentezinin de arttığı gözlemlendi. NF-kB hücre gelişimi, farklılaşma ve apoptozise katılan genlerin protein sentezini etkileyen önemli bir transkripsiyon faktördür (3). Genital sistemde bu transkripsiyon faktörünün fizyolojik rolü, aktivasyonu ve sentezlenmesi üzerine çok az bilgi vardır. Delfino ve Walker (3) memeli testislerinde NF-kB'nin belli dönemlerde Sertoli ve germ hücrelerinde nükleer yerleşimini gözlemişler ve spermatogenezisin düzenlenmesinde NF-kB'nin önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca fare meme bezlerinde NF-kB'nin gelişime bağlı olarak gebelikte arttığı, laktasyon süresince azaldığı (7) bildirilmektedir. Rat ovaryum granuloza hücrelerinde NF-kB'nin, tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) ile indüklenen apoptozise karşı hücreleri koruduğu da bildirilmiştir (24). Wang ve ark. (22) *in vitro* olarak granuloza hücreleriyle yaptıkları çalışmada FSH'nin NF-kB aktivasyon yoluyla XIAP sentezini arttırdığı, folliküler gelişmeyi hızlandırıp, apoptozisi baskıladığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda XIAP ve NF-kB protein

ekspresyonlarının özellikle deneyin 15 gününde deney grubunda yüksek olması, araştırmacılarında belirttiği gibi (22, 24) bu iki proteinin birbirine bağımlı olarak geliştiğini göstermektedir.

Sonuç olarak kısa süreli düşük doz CAP uygulamasının NF-kB yoluyla XIAP sentezini uyardığını ve follikülleri atreziden koruduğunu, ayrıca düşük doz CAP'ın ovaryum follikül gelişiminin düzenlenmesine yardımcı olan faktörlerden biri olabileceği ve bu etkisini nöropeptidlerin salınımını artırarak gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz. Bu çalışmanın bulgularına dayanılarak, bir sonraki planlanan çalışmada, genital sistemde sinirsel innervasyonda etkili olan nöropeptidlerin immunohistokimyasal olarak sentezide incelenerek, düşük doz CAP uygulamasının genital sistem üzerine etkileri daha detaylı olarak ortaya konulmaya çalışılacaktır.

### Kaynaklar

1. Asselin E, Mills GB, Tsang BK (2001): *XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells*. Cancer Res, **61**, 1862-1868.
2. Calka J, McDonald JK, Ojeda SR (1988): *The innervation of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide*. Biol Reprod, **39**, 1215-1223.
3. Delfino F, Walker WH (1998): *Stage-specific nuclear expression of NF-kB in mammalian testis*. Mol Endocrinol, **12**, 1696-1707.
4. Deveraux QL, Reed JC (1999): *IAP family proteins: 320 suppressors of apoptosis*. Genes Dev, **13**, 239-252.
5. Deveraux QL, Roy N, Steinicke HR, Van A, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC (1998): *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. EMBO J, **17**, 2215-2223.
6. Fitzgerald M (1983): *Capsaicin and sensory neurons: a review*. Pain, **15**, 109-130.
7. Geymayer S, Doppler W (2000): *Activation of NF- $\kappa$ B p50/p65 is regulated in the developing mammary gland and inhibits STAT5-mediated-casein gene expression*. FASEB, **14**, 1159-1170.
8. Jensen-Jaorlim E, Gajdzik L, Haberl I (1998): *Hot spices influence permeability of human intestinal epithelial monolayers*. J Nutr, **128**, 577-581.
9. Kannisto P, Ekblad E, Helm G, Owman C, Sjöberg NO, Stjernquist M, Sundler F, Walles B (1986): *Existence and coexistence of peptides in nerves of the mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry*. Histochemistry, **86**, 25-34.
10. Klein CM, Burden HW (1988): *Substance P and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactive nerve fibers in relation to ovarian postganglionic perikarya in para and prevertebral ganglia: evidence from combined retrograde tracing and immunocytochemistry*. Cell Tissue Res, **252**, 403-410.
11. Moran C, Morales L, Selene Razo R, Apolonio J, Quiroz U, Chavira R, Dominguez R (2003): *Effects of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy*. Life Sci, **73**, 2113-2125.

12. **Nance DM, King TR, Nance PW** (1987): *Neuroendocrine and behavioral effects of intrathecal capsaicin in adult female rats*. Brain Res Bull, **18**, 109–114.
13. **Oh TW, Ohta F** (2003): *Dose-dependent effect of capsaicin on endurance capacity in rats*. Br J Nutr, **90**, 515-520.
14. **Panossian A, Gabrielian E, Wagner H** (1996): *Dose-dependent reversible effects of capsaicin on interleukin-1 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.
15. **Papka RE, Cotton JP, Traurig HH** (1985): *Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat*. Cell Tissue Res, **242**, 475–490.
16. **Pedersen T, Peters H** (1968): *Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary*. J Reprod Fertil, **17**, 555-557.
17. **Toth B, Gannett P** (1992): *Carcinogenicity of lifelong administration of capsaicin of hot pepper in mice*. In Vivo, **6**, 59-63.
18. **True LD** (1990): *Principles of immunohistochemistry*. 16-22, In: True LD, (ed), Atlas of Diagnostic Immunohistopathology. Gower Medical Publishing, New York.
19. **Vaishnava P, Wang DH** (2003): *Capsaicin sensitive-sensory nerves and blood pressure regulation*. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, **1**, 177-88.
20. **Vaskivuo TE, Ottander U, Oduwole O, Isomaa V, Vihko P, Olofsson JI, Tapanainen JS** (2002): *Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression*. Mol Cell Endocrinol, **194**, 191-200.
21. **Wang Y, Asselin E, Tsang BK** (2002): *Involvement of TGF $\alpha$  in the regulation of rat ovarian X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and follicular growth by FSH*. Biol Reprod, **66**, 1672-1680.
22. **Wang Y, Chan S, Tsang BK** (2002): *Involvement of inhibitory nuclear factor-kB (NF-kB)-independent NFkB activation in the gonadotropic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis expression during ovarian follicular development in vitro*. Endocrinology, **143**, 2732–2740.
23. **Wang Y, Rippstein PU, Tsang BK** (2003): *Role and gonadotrophic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein expression during rat ovarian follicular development in vitro*. Biol Reprod, **68**, 610–619.
24. **Xiao CW, Ash K, Tsang BK** (2001): *Nuclear factor-kB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor induced apoptosis*. Endocrinology, **142**, 557–563.
25. **Yu SM, Lin KH** (2002): *Morphological alterations in the trachea of capsaicin-pretreated rat during postnatal development*. Zool. Stud, **41**, 13-22.
26. **Zık B, Özgüden C, Tütüncü Ş, İlhan T** (2007): *Expression of vanilloid receptor-1 in the duodenum of the capsaicin treated rat*. Bull Vet Inst **Pulawy**, **51**, 149-153.

Geliş tarihi: 16.04.2009 / Kabul tarihi: 16.11.2009

#### Yazışma adresi

Prof. Dr. Berrin Zık  
Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı  
16059 Bursa Tel:0224 2941265  
Email: bzik@uludag.edu.tr