



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**POSTNATAL GELİŞME DÖNEMLERİNDE CAPSAİCİNLİ YEMLE BESLENEN
FARE TESTİSLERİNDE GHRELİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL
EKSPRESYONU**

Tuncay İLHAN

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Hatice ERDOST

Bursa-2009

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	3
İNGİLİZCE ÖZET.....	4
GİRİŞ.....	5
GENEL BİLGİLER.....	9
GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
BULGULAR.....	25
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR.....	48
TEŞEKKÜR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	58

ÖZET

POSTNATAL GELİŞME DÖNEMLERİNDE CAPSAİCİNLİ YEMLE BESLENEN FARE TESTİSLERİNDE GHRELİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL EKSPRESYONU

Acı kırmızı biber, botanik biliminde Solanacea familyasına ait bir bitki olup, *Capsicum annuum* olarak bilinmektedir. Capsaicin, acı kırmızı biberin etken maddesidir. Ghrelin, öncelikli olarak midedeki endokrin X/A hücreleri tarafından üretilen polipeptid yapıda bir hormondur. Ghrelin, büyüme hormonunun salınımı, enerji dengesi, besin alımı ve vücut ağırlığının ayarlanmasında görev alır.

Çalışma materyalini 21 günlük 40 adet Swiss albino soyu erkek fareler oluşturdu. Fareler anneden ayrıldıkları 21'nci günden itibaren deney grubu (n: 20) % 0,02 oranında capsaicin içeren yem ile, kontrol grubu (n: 20) ise standart fare yemi ile beslendi. Gruplardaki tüm farelere dietileter anestezisi altında puberte (40 günlük) ve erişkin (75 günlük) dönemlerinde, servikal dislokasyon uygulandı. Testisleri çıkartılarak rutin doku takibine alındı. Capsaicin ilavesi yapılmış yemle beslenen farelerin testisleri puberte ve erişkin dönemlerde ghrelin peptidinin lokalizasyonu histolojik ve immunohistokimyasal analizler ile değerlendirildi.

Araştırmanın, puberte ve erişkin dönemlerinde özellikle deney grubunda seminifer kanal duvarında spermatogenik hücre serisinde artış saptandı. Ghrelin antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyama sonucunda fare testisinde çalışmamızda tüm gruplardaki Leydig ve Sertoli hücrelerinde immunopozitif reaksiyon ilk olarak gösterilerek literatür bilgisine katkı sağlandı. Spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerde reaksiyon görülmedi. Ghrelin reaksiyonu hem puberte hem de erişkin dönem deney grubu Leydig hücrelerinde, kontrol gruplarına oranla daha az boyanma yoğunluğunda saptandı.

Gerçekleştirilen bu çalışma, yeme düşük doz capsaicin ilavesinin, farelerin testis dokusu gelişimini olumlu yönde uyardığını, gonadlar ve gelişimi üzerinde ghrelinin de etkin rol oynadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Capsaicin, ghrelin, testis, fare

SUMMARY

Immunohistochemical Expression of Ghrelin in Mouse Testes Fed with a Diet Containing Capsaicin on Postnatal Development

Red hot pepper, known as *Capsicum annuum*, belongs to Solanacea family in botany. Capsaicin is the pungent extract of red hot pepper. Ghrelin is an acylated polypeptide hormone secreted predominantly by endocrine X/A cells of the stomach. Ghrelin acts as a regulator for GH release, energy balance, food intake and body weight.

Swiss albino male mice (n: 40), at the age of 21 days old, were used. After weaning at day 21, treatment group (n: 20) fed with diet containing 0.02 % capsaicin and control group (n: 20) fed with standard diet. In pubertal (day 40) and adult (day 75) periods, mice sacrificed by cervical dislocation under diethyl ether inhalation anesthesia. Testes from both groups removed and applied routine histological process.

Ghrelin peptid evaluated in testes of mice fed with capsaicin containing diet by histological and immunohistochemical methods in pubertal and adult periods. In this research, we determined that there was an increasing on the number of spermatogenic cells in tubules, in both pubertal and adult periods, specially for treatment group. At the end of the immunohistochemical staining, we confirmed that there was a positive reaction on Leydig and Sertoli cells of mouse testes but no reaction on spermatogenic cells. Immunohistochemical expression of ghrelin for mouse testes was first on lectures. Intensity of ghrelin reaction was less for treatment group compared to control group in both pubertal and adult periods. These results show that low dose capsaicin has a positive effect with ghrelin on testicular development.

This project shows that, low dose capsaicin containing diet stimulates the development of testes of mouse and ghrelin has an effective role on gonads.

Keywords: Capsaicin, ghrelin, testes, mouse.

GİRİŞ

Ghreltin, ilk kez 1999 yılında Kojima ve arkadaşları (1) tarafından farelerin midesinde tanımlanmıştır. Ghreltin, öncelikli olarak midedeki endokrin hücrelerden salgılanan polipeptid yapıda bir hormondur (1, 2). Midenin oksintik bezlerinde yer alan endokrin fonksiyonlara sahip X/A hücreleri tarafından üretilmekte ve 28 amino asit içermektedir (3). Ancak, insan ve ratlarda gen ekspresyonu ile yapılan incelemelerde, ghreltinin ve reseptörünün bağırsak, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, pankreas, plasenta, hipofiz, gonadlar ve beyin gibi geniş bir organ yelpazesinde mevcut olduğu gösterilmiştir (4-6).

Ghreltin, büyüme hormonu salgılatıcı reseptör (GHS-R)'ün endojen ligantıdır (7). Büyüme hormonunun salınımı, enerji dengesi, yiyecek alımı ve vücut ağırlığının ayarlanmasında görev alan ghreltin, etkisini büyüme hormonu salgılatıcı reseptör (GHS-R) tip 1a' ya bağlanarak gösterir (1). Reseptöre bağlanarak hipotalamustan büyüme hormonu salgılatıcı hormonun (GHRH) salınımını uyarır.

Somatotrop hormon, somatotropin gibi isimler de verilen büyüme hormonu, ön hipofizin somatotrop hücrelerinden salgılanır. Başta kemik, kıkırdak ve iskelet kası olmak üzere vücudun büyüme yeteneğinde olan bütün dokularının hücrelerine etkir. Hücrelerin hem büyümesini hem de mitoz bölünme ile çoğalmasını arttırarak çok sayıda hücrenin gelişimini sağlar. Ghreltinin büyüme hormonu salgılatıcı etkileri hem doku kültüründe, hem de ratlarda yapılan intraserebroventriküler (i.c.v.) ve intraperitoneal (i.p.) çalışmalarda gösterilmiştir (8,9). Ghreltin, GHRH salınımını arttırırken, somatostatin salınımını baskılamaktadır (10). Somatostatin büyüme hormonunun salınımını inhibe eder (11). Somatostatinin bu formu hipotalamustan salgılanmaktadır. Ayrıca diğer bir formu da pankreasta Langerhans adacıklarının Delta (D) hücrelerinden salgılanır (12).

Ekzojen olarak verilen ghreltin farelerde besin alımını arttırmakta, yağ kullanımını azaltmakta ve sonuçta yağ dokusu artışına neden olmaktadır. Ghreltinin yağ dokusunu ve iştahı arttırıcı etkilerinin büyüme hormonu üzerine olan etkilerinden bağımsız olduğu ve bunun, leptinin de aracı olduğu merkezi sinir sistemindeki özel nöronlar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (13).

Ghreltinin enerji depolarının boşalmasını ve kaşeksiyi önleyen bir hormon olduğu ve her öğün öncesi kan serum düzeylerindeki seviyesinin artması nedeniyle de iştahı uyardığı

düşünülmektedir (14). Farelerde açlığın ghrelin salınımını arttırdığı, karbonhidrat alımının ise ghrelin salınımını azalttığı gösterilmiştir (15). Ghrelinin enerji homeostazı üzerine etkileri,

merkezi sinir sisteminde hipotalamusta ortaya çıkmaktadır. Ghrelin hipotalamusta direkt olarak arkuat nukleus (ARC)'deki iştah uyarıcı olan Nöropeptid Y/Agouti-Related Peptide (NPY/AGRP) mekanizmasını uyararak enerji dengesini etkilemektedir. Dolayısıyla bu etkileri sadece periferel dokularda üretildiği yerlere bağımlı olmamaktadır (1).

Midede üretilen ghrelin ön hipofiz ve hipotalamustaki reseptörlerine (GHS-R tip 1a ve GHS-R tip 1b) ulaşarak büyüme hormonu salınımını uyarmakta ve enerji homeostazını düzenlemektedir. Beyinde hipotalamik nukleusta, hipokampusta, substansia nigra, ventral tegmental bölgede, dorsal ve median rafe çekirdeğinde ghrelin reseptörleri bulunmaktadır (16).

Ghrelinin merkezi sinir sistemi aracılığı ile reproduktif sistemin kontrol edilmesinde de rol oynadığı düşünülmektedir. Organizmanın gelişiminde ve vücut ağırlığının korunmasında anahtar rol oynayan birçok faktörün (GHRH, leptin, IGF gibi) testiküler fonksiyonların ayarlanmasında da etkin olduğu gösterilmiştir (17-19). Ayrıca ghrelin ve onun fonksiyonel reseptörü (GHS-R tip 1a), rat ve insanda immunreaktif olarak ve gen ekspresyonu sonucunda, reproduktif gelişimin kontrolünde önemli yeri olan hipotalamus bölgesinde bulunmuştur (1, 20, 21).

Dişi ratlarda merkezi sinir sistemine intraserebroventriküler (i.c.v.) olarak uygulanan ghrelin, periyodik Luteinizan Hormon (LH) sekresyonunu baskılamıştır (22, 23). Bir başka çalışmada, erkek prepubertal ratlarda kanda hormon düzeylerine bakıldığında, intravenöz (i.v.) uygulanan ghrelinin LH sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Fernandez ve arkadaşları (24), prepubertal ratlara i.c.v. olarak verilen ghrelinin LH salınımını belirgin derecede azalttığını, Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) salınımını ise etkilemediğini bildirmişlerdir. Ayrıca doku kültürü çalışmalarında in vitro uygulanan ghrelinin ise her iki gonadotrop hormonun salınımını arttırdığı açıklanmıştır. Bilindiği gibi LH ön hipofizdeki gonadotrop hücrelerden salınır, Leydig hücrelerini etkileyerek bu hücrelerden testosteron oluşumunu ve salgılanmasını uyarır (12). Bu bilgiler ışığında ghrelinin spermatogenesis üzerinde dolaylı ve hipofiz üzerinde de LH salınımının ayarlanması açısından da doğrudan etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Ratlarda Leydig hücrelerinde (19), insanlarda Leydig ve Sertoli hücrelerinde (25), koyunlarda ise bu hücrelere ilave olarak özellikle seminifer tubuller içerisinde, germ hücrelerinde (26) ghrelin ekspresyonu görülmüştür. Bu çalışmalar, ghrelinin reproduktif

sistem üzerinde, özellikle Leydig hücrelerinden testosteron sentezinin ayarlanmasında, bir regülatör olarak görev alabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda kullanılan capsaicin (CAP), acı kırmızı biberin etken maddesidir. Acı kırmızı biber, Solanacea familyasına ait bir bitki olup, Capsicum annuum olarak tanımlanmaktadır (27, 28). CAP organizmada başta gastrointestinal, kardiovasküler ve solunum sistemleri olmak üzere pek çok sistem üzerinde etkilidir. Son yıllarda fizyolojik ve farmakolojik etkilerinden dolayı tıpta ve ilaç sanayisinde kullanımı yaygınlaşmıştır. CAP'ın etkisi, kullanılan doza, uygulama şekline ve hedef organa göre değişiklikler göstermektedir (29, 30). CAP başlıca sensorik sinirler üzerinde mevcut olan vanilloid reseptör 1 (VR1) aracılığı ile nöronlarda, nöronal eksitasyon, proinflamatuvar mediyatörlerin salınımı, reseptörün desensitizasyonu ve nöronal toksisiteyi içeren olaylar zincirini tetikler (31, 32). CAP'ın sensorik nöronlarda VR 1'e bağlanması ile nöropeptidlerin, örneğin substance P (SP), Calcitonin Gene Related Peptid (CGRP) salınımına neden olmaktadır. CAP uygulamasının devam etmesi sensorik sinirlerden SP'nin salınımının azalmasına ve ağrı duyusunun ortadan kalkmasına dolayısı ile nörotoksositeye neden olur (28, 31, 32). Ayrıca CAP'ın karbonhidrat metabolizmasını ve karaciğer enzimlerinin aktivitesini arttırdığı (33), lipid metabolizmasını uyararak yağ dokudaki lipidin yakılmasını kolaylaştırdığı (33), oksijen tüketimini arttırdığı, solunumu başlangıçta arttırdığı sonra azalttığı, serum glikoz ve insülin seviyesini arttırdığı, 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 belirtilmiştir (33-35).

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından rasyonlarına acı kırmızı biber ilavesi yapılan gelişmekte olan tavuk ve horozların reproduktif sistem organları ile hipofiz bezi incelenerek, acı kırmızı biberin olası etkileri değerlendirilmiştir (36-40). Araştırma sonucunda, hayvanların reproduktif sistem organlarının acı kırmızı biberli diyetle beslendiğinde, daha hızlı geliştiği saptanmıştır (37). Devamında yapılan bir başka araştırmada da (39, 40) hipofiz bezinde FSH ve LH immunreaktif hücrelerin acı kırmızı biberli rasyonla beslenme sonucunda etkilendiği ve birim alandaki hücre sayılarında artış saptandığı bildirilmiştir.

Erdost ve arkadaşları (41) tarafından hazırlanan ve Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen bir başka projede de, farklı yaş gruplarındaki erkek farelere (35 günlük, 50 günlük ve 75 günlük) birer haftalık sürelerle capsaicin 1mg/kg dozda subkutan (s.c.) enjeksiyonu yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda,

testisin histolojik yapısı değerlendirilerek, testiste VR1 ekspresyonu immunohistokimyasal metodla gösterilerek, kandaki LH ve testosteron düzeyleri değerlendirilmiştir. VR1

ekspresyonunun Leydig hücrelerinin sitoplazmasında görüldüğü ve serum LH ile testosteron seviyelerinin deney gruplarında kontrol gruplarına göre daha yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın devamında, bir doktora tez projesi (42) olarak da, testiste TGF- β_1 ve β_2 ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir. Deney grubu testislerinde tubulus seminiferus kontortuslarda primer spermatozoid yoğunluğunun fazla olduğu ve bununla birlikte TGF- β_1 ekspresyonunun Leydig hücrelerinde kontrol grubuna göre deney grubunda daha erken dönemde gözlenmeye başladığı bildirilmiştir (42).

Bu çalışmada puberte ve erişkin dönemlerinde, CAP ilavesi yapılmış yem ile beslenen farelerin testislerinde capsaicin ve ghrelin ekspresyonuna olan etkisinin immunohistokimyasal yöntemler ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Erkek Genital Sistemi

Erkek genital sistem; testisler, genital kanallar (duktus efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus) ve bu kanallara açılan yardımcı bezler (vezikula seminalis, bulbouretal bez, prostat) ve dış genital organ olan penisten ibarettir (43). Testisler spermatozoonların meydana getirilmesi (spermatogenezis) ve steroid yapıdaki hormonların üretilip salgılanmasından (steroidogenezis) sorumludurlar.

Testisler

Erkek üreme sisteminin esas fonksiyonel organları olan testisler, skrotum içinde asılı dururlar ve tubuler bileşik bez yapısındadırlar. Prenatal süreçte abdomende gelişimini sürdüren testisler, doğuma yakın bir zamanda inguinal kanaldan geçerek skrotuma inerler ve burada funikulus spermatikus ile asılı halde tutulurlar. Testisler, skrotumun içinde vücudun dışında yer alması nedeniyle vücut ısısının 2-3°C altında bir ısıya sahiptirler. Bu ısı ise sperm üretimi (spermatogenez) için gereklidir (43).

Testisler, tunika albuginea olarak adlandırılan çok miktarda kollagen iplik ve az miktarda da elastik iplik içeren, kompakt, düzensiz bağ dokudan oluşan kalın bir kapsül ile sarılıdır (44). Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Kan damarları, sinirler ve lenfatik damarlar testise bu bölgeden girer ve yine buradan organı terk eder. Mediastinum testisten organ içine giren ince fibröz bölmeler organı piramit biçimli lopçuklara ayırır. Her lopçuğun içinde tubulus seminiferus kontortus adı verilen tubuller ve bu tubullerin arasını dolduran gevşek bağ dokulu intersitisyum bulunur (45). Tunika albugineadan içeriye uzanan bağ doku miktarında türler arasında farklılıklar vardır. Örneğin, sıçan, fare ve köpek testisleri çok az intertubuler bağ dokuya sahiptirler (46).

Testis, tubulus seminiferus kontortuslar ve tubuller arası bölüm olan intersitisyum olmak üzere iki bölümden oluşur.

İntersitisyum

İntersitisyum kan ve lenf damarlarından zengindir ve organın stromasını oluşturur (46). İntersitisyumda çeşitli hücre tipleri vardır, en önemlisi Leydig hücreleri olup bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ doku hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur.

Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri, testisin intersitisyumunda yerleşmiş önemli somatik hücrelerdir. Sekonder seks karakterlerini belirleyen testosteron hormonunu üretilip salgılayan Leydig hücreleridir. Bu hücreler steroid hormon sentezleyen hücrelere özgü organel ve enzimlerden zengindir (46-49). Testosteron sentezi mitokondriyon ve granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası işbirliğine bir örnek oluşturur. Mitokondriyon sayısı puberte döneminde oldukça artar (48).

Fötal hayatın erken döneminde gelişen testiste çok sayıda Leydig hücresi bulunur. Plasental kökenli gonadotropinlerin kan yoluyla fötal testise ulaşır, Leydig hücrelerini uyarması sonucu Leydig hücreleri testosteron sentezlemeye başlar. Sentezlenen bu hormon erkek genital organlarının embriyolojik farklılaşmasında etkindir. Gebeliğin yarısında tam olarak gelişen Leydig hücrelerinde daha sonra dejenerasyon başlar, dolayısıyla testosteron düzeyi de giderek düşer. Doğumdan hemen sonra Leydig hücrelerinde atrofi hızlanır. Ancak pubertede hipofiz hormonlarından LH'nın etkisi ile Leydig hücreleri aktifleşir (48).

Tubulus seminiferus kontortus

Testisin paraneşimini oluşturan tubulus seminiferus kontortuslar kör uçlarla başlayan kıvrımlanmış, 150-300 µm çapında kanalcıklardır. Tubulus seminiferus kontortuslar fibröz bağ doku kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve germinal (seminifer) epitelden ibarettir (50).

Tubulus seminiferus kontortuslar spermatogenik (germinal, seminifer) hücrelerle birlikte Sertoli hücreleri diye adlandırılan destek hücrelerine de sahiptirler (49). Sertoli hücreleri seminifer tubul içinde germ hücreleri arasında yerleşmiş somatik hücrelerdir. Isı, radyasyon, toksik madde, beslenme yetersizliği, enfeksiyon gibi bir çok etkene karşı oldukça dayanıklıdırlar. İnsanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler (46). Sertoli hücreleri seminifer tubül membranından lumene kadar uzanan prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin arasındaki alanlarda spermatogenik serinin farklı olgunlaşma dönemindeki hücreler gelişir. Sertoli hücresinin apikal bölümünde, yaklaşık 10 adet gelişen

spermatid bulunabilir (46). Işık mikroskopik olarak Sertoli hücrelerinin sınırları zayıf olarak görülmektedir, çünkü bunların çok sayıda lateral uzantıları spermatogenik serideki hücreleri

çevreler (48). Oval, ökromatik nukleus genellikle bazalde yerleşmiştir ve belirgin bir nukleolusa sahiptir.

Bütün evcil memelilerin Sertoli hücreleri değişen miktarlarda lipid inkluzyonları ve glikojen içerir. Hücre yüzeyi spermatidler tarafından sık sık derince çentiklenir. Sertoli hücreleri, seminifer tubul epiteli içerisinde iki (bazal ve adluminal) kompartman şekillendirir. Bazal kompartmanda spermatogonyumlar ve mayozun erken leptoten fazındaki spermatositler bulunur. Bazal ve lateral yüzeylerde Sertoli hücreleri arasında tight junctionlar ve zonula okludens, bazalden adluminal kompartmanı sınırlandırır. Orijinal olarak kan testis bariyeri olarak adlandırılan bu bariyer seçici geçirgen özelliğe sahiptir ve hem spermatogenik serideki hücreleri immunolojik ve çevresel tehlikelerden korur hem de optimal spermatogenik bir çevre sağlar. Toksinlerin, zehirli maddelerin direkt olarak adluminal germ hücrelerini etkilemesi için ya bariyerin bozulması ya da Sertoli hücrelerinin içerisine girmesi gereklidir (46).

Spermatogenezis

Spermatogenezis, bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Spermatogonyum, spermatogonyum A ve spermatogonyum B olmak üzere ikiye ayrılır. Sıçanlarda ve farelerde üçüncü bir tip olan intermediate tip spermatogonyum da görülmektedir. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler ve yeni oluşan hücreler iki yol izleyebilirler; ya farklılaşmamış kök hücreler olan tip A spermatogonyumlar olarak kalırlar ya da mitoz bölünmeler boyunca farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar (48).

Tip A spermatogonyumlar spermatogenik serinin kök hücreleridir. Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatositlere farklılaşan öncül (progenitor) hücrelerdir. Oluşumlarından sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Profazda, hücreler leptoten, zigoten, pakiten ve diploten safhalarını geçirerek diyakinez safhasına ulaşırlar. Daha sonra hücre metafaza girer ve kromozomlar takip eden anafazda iki kutba doğru giderler. Bu bölünmede profazın uzun sürmesi nedeniyle incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Spermatogenik seride en büyük hücreler primer

spermatozitlerdir ve bunlar nukleuslarında kromozomların kısalıp kalınlaşması sürecinin değişik safhalarının bulunması ile tanınırlar (48).

Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatozitler denilen daha küçük hücreler oluşur. Sekonder spermatozitler interfazda kısa süre kalan ve hemen II. mayoz bölünmeye

giren hücreler olduklarından, testis kesitlerinde gözlenmeleri zordur. Sekonder spermatozitlerin bölünmesi sonucunda da haploid sayıda kromozom içeren spermatidler oluşur. Fertilizasyonla bunlar normal diploid sayıya dönerler (48).

Spermatidler, diğer hücrelerden küçük boyutları, yoğunlaşmış kromatin taşıyan nukleusları ve seminifer tubüllerde lümen yakınında yerleşmeleri ile ayırt edilirler. Sertoli hücreleri arasındaki kompartmanların lumene en yakın bölümünde yer alan yuvarlak hücrelerdir. Daha sonra Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarına göç ederek burada, akrozom oluşumu, flagellum şekillenmesi, kromatin kondensasyonu ve fazla sitoplazmanın atılması olarak sıralanabilecek bir dizi yapısal değişikliğe uğrarlar. Bu aşamada spermatid çekirdeğini kopyalama yeteneğinde değildir. Bu farklılaşma süreci (spermiyogenez) sonunda seminifer tubül lumenine salınan olgun spermatozoon meydana gelir. Spermatozoonların seminifer tubül lumenine serbest bırakılması, spermiyogenezin son adımıdır.

Hormonal Mekanizma

Testisin spermatozoon oluşumunun gerçekleştiği yer olması dışındaki bir diğer önemli işlevi de androjenleri üretip salgılamasıdır. Hormonal mekanizma, hipotalamus, hipofiz ve testisler arasındaki karşılıklı etkileşimden ibarettir. Bu etkileşimde rol alan en önemli hormonlar, LH, FSH, testosteron, östrojenler, inhibin proteini ve androjen bağlayıcı protein (ABP)'dir.

Hipofiz ön lobundan salgılanan LH, Leydig hücreleri üzerinde bulunan kendisine özel yüzey reseptörlerine bağlanarak, testosteron hormonunun üretilmesini ve salgılanmasını sağlar. Bu etkisinden dolayı erkeklerde intersitisyel hücre stimüle edici hormon (ICSH) da denir. Testosteronun bir kısmı seminifer tubül epitelini ve Sertoli hücrelerini etkileyerek spermatogenezin gerçekleşmesinde ve tamamlanmasında rol oynar (12). Diğer kısmı ise dolaşıma karışarak insanlarda ses kalınlaşması, vücut ve yüz kıllarında artış gibi sekonder erkeklik özelliklerinin gelişmesini sağlar. Plazmadaki testosteron belirli bir düzeye ulaştığında hipotalamusdan gonadotropin salgılatıcı hormon (GNRH) salınımını azaltarak, feed-back mekanizması ile hipofizden LH salınımını da kısıtlar (48).

Hipofizin ön lobundan salgılanan FSH, direk olarak üzerinde kendisine özel reseptörler taşıyan Sertoli hücrelerini ve spermatogonyumları uyarır. Bu uyarım olmadan spermatogonyumlar spermatozoon olma yönünde gelişim gösteremezler. FSH aynı zamanda Sertoli hücrelerinden ABP ve östrojenlerin salgılanmasını uyarır. Böylece Sertoli hücresi testosteronu da kendine bağlayarak spermatogenezin sürekliliğini sağlar (12).

ABP, spermatozoon oluşumu için, hem testosteron hem de östrojenlere bağlanarak, tubulus seminiferus sıvısı içerisinde taşınmalarını ve testosteronun yüksek düzeyde yerel birikimini gerçekleştirir. Sonrasında da seminifer tubül sıvısı içerisinde genital boşaltım kanallarına doğru ilerler. Böylece duktuli efferentes ve duktus epididimis epitelleri de testosterondan yararlanarak işlevlerini sürdürürler (48).

Erkeklerde Sertoli hücrelerinden salınan inhibinin, testis işlevinin düzenlenmesinde önemli bir yeri vardır. FSH, LH ve spermatozoon oluşumunu büyük ölçüde denetler. Seminifer tubullerde spermatozoon üretimi yetersiz kaldığında ön hipofizden FSH salınımı belirgin olarak artar. Artan FSH Sertoli hücrelerini uyararak inhibin salınımına neden olur. İnhibin de negatif feed-back aracılığı ile ön hipofize etkir ve FSH üretimini kontrol eder. Seminifer tubullerin gelişip büyümelerine neden olur ve androjenlerden östrojen oluşumuna katkıda bulunur (12).

Östrojenler LH salınımını kısıtlayarak plazmadaki testosteron düzeyini düşürürken, inhibin de, bir yandan seminifer tubül hücrelerinin gelişip büyümelerine diğer yandan da androjenlerden östrojen oluşumuna katkıda bulunur.

LH , Leydig hücrelerini uyarır ve testosteron salınımını başlatır. Testosteron da hem seminifer epiteli besleyip spermatozoon oluşumu için gerekli olan yüksek düzeyi korur hem de genital kanal, eklenti bezleri ve dış genital organın normal büyüme ve gelişmelerini sağlar. Plazmadaki testosteron belirli bir düzeye ulaştınca, hipofizdeki gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınımı azaltılarak LH salınımı kısıtlanır. Dolayısıyla da testislerden androjen salınımı durur. Testosteronun FSH salınımını kısıtlayıcı bir etkisi yoktur (12).

Büyüme hormonu ve diğer hormonların çoğu temel metabolizma işlevlerinin denetimi için gereklidir. Büyüme hormonu özellikle spermatogonyumların ilk bölünmesini hızlandırır.

Capsaicin

Acı kırmızı biber, botanik bilimde Solanacea familyasına ait bir bitki olup, Capsicum annuum olarak bilinmektedir. CAP, acı kırmızı bibere acılığını veren etken maddesidir, ilk olarak Tresh tarafından 1846 yılında izole edilmiştir (27, 28, 51). CAP acı, yakıcı, beyaz ve kokusuz özellikte alkaloid yapıda bir bileşendir (Şekil 1). CAP'ın biberdeki

kronik obstruktif solunum hastalıklarında meydana gelen nörojenik yangılarda nöronlarda ortaya çıkar (61). Son zamanlarda klonlanmış olan sıçan VR-1'i CAP'ın bir ligand gibi bağlanmasıyla, asit ya da ısının etkisiyle aktive olan bir reseptördür (60). CAP başlıca sensorik sinirler üzerinde mevcut olan bu reseptör aracılığı ile nöronlarda, nöronal eksitasyon,

proinflamatuvar mediyatörlerin salınımı, reseptörün desensitizasyonu ve nöronal toksisiteyi içeren olaylar zincirini tetikler (31, 32).

CAP'ın immun sistem üzerine etkisi doza bağlı olarak değişir. Düşük konsantrasyonda CAP uygulanması immun sistemi uyarırken, yüksek dozu ise immun cevabı baskılar. Bu etki somatostatin ve SP salınımıyla ilgilidir. Düşük dozda verilen CAP, SP salınımını uyarır, damar geçirgenliğini artırır, dolayısıyla reaksiyon bölgesine T lenfositlerin göçü hızlanır. İmmunglobulinlerin ve T lenfositlerin sentezi artar. Yüksek dozda verilen CAP ise nöronlarda önce eksitasyon yapar sonrasında da aşırı eksitasyona bağlı sinirlerde desensitizasyon oluşur ve nöronlarda SP salınımını durur. Dolayısı ile immun sistem üzerinde ters etki meydana getirir (62, 63).

Caterina ve Julius (57) sensorik nöronlarda ağrının stimülasyonunda etkin proteinlerin belirlenmesi için VR1 ile ilgili dizinleri GenBank'dan araştırmışlardır. Reseptörün işlev görmeye başlamasıyla hücre içine katyon akışı tetiklenir, aksiyon potansiyeli başlar ve ardından baharatlı yiyeceklerle ilişkili olarak yanma duygusu oluşur (64, 65). Acı baharatlı yiyeceklerle alınan etken madde CAP, VR1'e bağlanarak sensorik sinir hücrelerinin membranında depolarizasyon şekillendirir ve membrandan hücre içine Ca^{+2} akışının oluşmasını sağlar. Uyarı daha sonra merkezi sinir sistemine gönderilerek baharatta bulunan acının duyusal olarak algılanması sağlanmış olur (64, 65).

Ağrı iletim yollarının aktivasyonuna ek olarak vanilloid reseptörler yangısal cevaba öncülük eden peptidlerin salınımını da tetikler. Vanilloid reseptörün alışılmamış bir karakteristik özelliği de, tehlikeli ısı artışına (hipertermi) cevap olarak capsaicine benzer şekilde dahili bir akım üretmesidir. Bu cevap sadece yüksek ısıda oluşur ve vanilloid reseptör antagonistleri ile bloke edilir. Tehlikeli ısı hissi (hipertermi) ile capsaicin reseptörü arasındaki ilişki, acı biber yendiğinde hissedilen ve aslında fiziksel olmayan yanma (ısı) hissini açıklayabilir (66).

Ghreltin

Ghrelin ismi, Hint-Avrupa dilleri ailesindeki gelişim anlamına gelen “grow” sözcüğünün kökü olan “ghre” ile salgılatma anlamına gelen “relin” sözcükleri birleştirilerek türetilmiştir (1). Wren ve arkadaşları tarafından iştah hormonu (appetite hormone) olarak da adlandırılmıştır (67). Ghrelin, ilk kez 1999 yılında Kojima ve arkadaşları (1) tarafından farelerin midesinde tanımlanmıştır. Ghrelin, temel olarak mide fundusundan salınan 28 amino asitlik (aa) lipopeptid yapıda bir hormondur ve büyüme hormonu salgılatıcı reseptör (GHS-R)’ün endojen ligantıdır (1, 7).

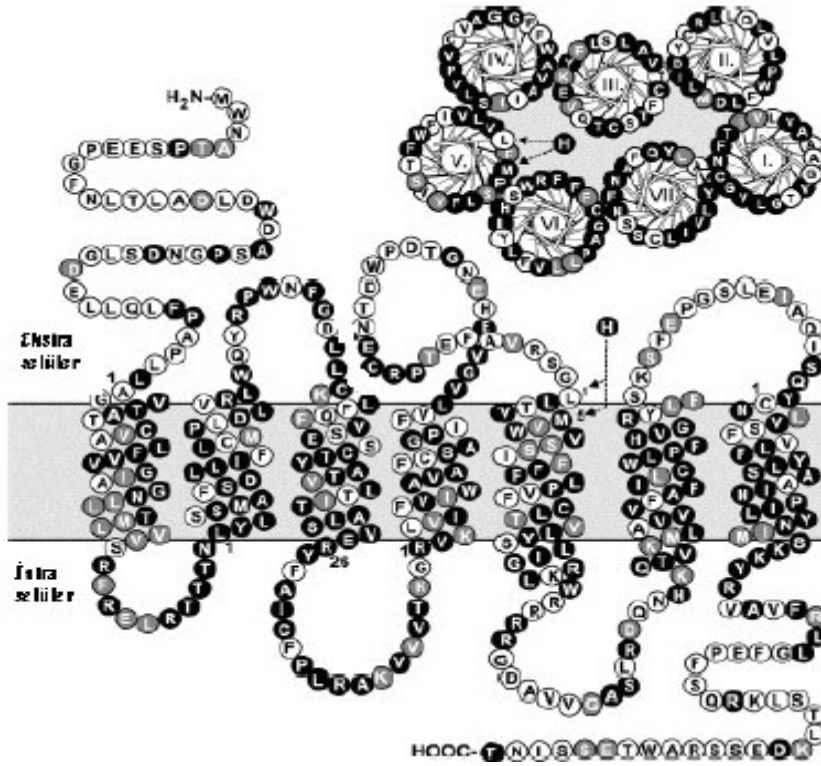
Memelilerde ghrelin homologları insan, sıçan (1), köpek, koyun, domuz, sığır, rhesus maymunu (68) ve farelerde (2) de tanımlanmıştır. Moleküler ağırlığı yaklaşık 3300 Dalton olan memeli ghrelinleri birbirine tamamen benzer değildir. İnsan ghrelini N-terminal ucundaki 3. aa olan Serine bağlı oktanil grubu adı verilen sekiz karbonlu bir yağ asidi içermektedir (Şekil 2). Fare ve sıçan ghrelini de aynı yapıya sahiptir ve insanda olduğu gibi 117 amino asitten oluşur. Ancak birbirlerinden sadece iki amino asit bakımından farklıdır. Yarılanma ömrü 15-20 dakika olan ghrelin (69); vücut sıvılarında ve dokularda iki formda bulunmaktadır. İnsan, rat ve farede, ghrelin geni 5 farklı exon (gen parçası)’dan oluşur. Bu 5 exon’un birleşmesi ile 117 aminoasitten oluşan ve moleküler ağırlığı 13 kDa olan pre-proghrelin molekülü şekillenir. Ghrelin bu yapıda 2’nci ve 3’üncü exon’dan meydana gelir. 23 aminoasitten oluşan 1’nci exon kodlamaya katılmaz ve sonrasında artık kısım olarak ayrılır. Kalan parça artık 94 aminoasite sahiptir ve proghrelin olarak isimlendirilir. Proghrelin molekülü de ayrılmaya uğrar ve sonucunda 28 aminoasitten oluşan ghrelin molekülü ile 66 aminoasitten oluşan C-terminal parçası (C-ghrelin) ortaya çıkar. Son hali ortaya çıkan 28 aminoasitlik ghrelinin, 3’üncü aminoasiti olan Serin’e n-oktanil grubu bir yağ asidi bağlanarak, ghrelinin, büyüme hormonunun da salınımını sağlayan aktif formunu meydana getirir. Bu formu, aktif ya da açıl ghrelin olarak adlandırılır. Yağ asidi bağlanmamış formu ise des-açıl ghrelin olarak isimlendirilir. Organizmada, dolaşımda bulunan ghrelinin sadece yaklaşık % 20’si açıl ghrelindir. Proghrelinden geriye kalan 66 aminoasitlik C-ghrelinden ise, organizmada ghrelinin antagonisti olarak davranan ve G proteine bağlı reseptör (GPR) ailesinden GPR39’a bağlanarak etkisini gösteren ‘obestatin’ sentezlenir (70).

Farklı memeli türlerindeki 28 aminoasitlik ghrelin peptidleri arasında, moleküler N-terminal ucundaki 10 aminoasit açısından tam bir özdeşlik söz konusudur. Bu özdeşliğin muhtemelen, 3’üncü aminoasitin açılmesi için bir çeşit ‘enzimatik ayakizi’ olduğu düşünülmektedir. C-terminal ucunda kalan 18 aminoasitlik bölge için ise bu özdeşlikten bahsetmek zordur (70-72).



Şekil 2: İnsanda ghrelinin yapısı.

Ghrelinin etkisini GHS-R tip 1a'ya bağlanarak gösterir (1). Reseptöre bağlanarak hipotalamustan büyüme hormonu salgılatıcı hormonun (GHRH) salınımını uyarır. Yapılan çalışmalar ile büyüme hormonu salgılatıcı reseptörlerin iki tip olduğu tespit edilmiştir: Uzun yapılı olan GHS-R tip 1a ve kısa yapılı olan GHS-R tip 1b'dir (73). GHS-R tip 1a fonksiyonel olarak aktiftir ve sinyal taşıyan tiptir (Şekil 3). Buna karşılık, GHS-R tip 1b transmembran alanları 6 ve 7 den yoksun olduğundan ligand bağlama ve sinyal iletimi kapasitesi yoktur. Ancak GHS-R tip 1b'inde de ghrelinin hedef dokular üzerinde etkinliğini göstermesinde, GHS-R tip 1a ile etkileşim içinde olması muhtemeldir (74).



Şekil 3: Ghrelin reseptörü (GHS-R 1a).

Salgı granüllerinin ultrastrüktürel karakterleri baz alınarak, midenin glanduler mukozasında farklı tiplerde hücreler tanımlanmıştır (75). İnsan ve rat midesinde başlıca 7 tip endokrin hücre tanımlanmıştır : enterokromaffin-benzeri (ECL) hücreler, P hücreleri, D hücreleri, enterokromaffin (EC) hücreler, X/A hücreleri, D1 hücreleri ve granülsüz hücreler (76). Midedeki X/A hücreleri Davis tarafından 1954 yılında keşfedilmiştir (77). Bu hücrelerin içindeki granüller ise ghrelinin keşfine kadar gizemini korumuştur. Kojima ve arkadaşları tarafından sıçanların midesinden büyüme hormonu salgılatıcı özelliğe sahip ghrelin keşfedildikten sonra, X/A hücrelerinin içlerindeki granüller, moleküler teknikler kullanılarak açıklanmış ve bu hücrelerin ghrelinin sentezinden sorumlu olduğu görülmüştür.

İnsanlarda dolaşımdaki ghrelin seviyesi gün içinde açlık halinde yükselmekte, tokluk durumunda ise azalmaktadır. Gün içinde en yüksek seviyesi gece 2 ile 4 saatleri arasındadır (78). Açlık ghrelin seviyesini arttırmaktadır; gıda alımını takiben 60-120 dk. içinde ise ghrelin seviyesi düşmektedir (79).

Bütün omurgalı hayvanlarda ghrelinin ana sentez yeri midedir (71). Midenin fundus bölgesi, piloris bölgesine göre daha fazla ghrelin sentezlemektedir. Doku hibridizasyonu ve immunohistokimyasal analizler, midenin mukozal tabakasının belirli bölgelerinde ghrelin pozitif hücreler olduğunu ortaya koymuştur (3). Dolaşımdaki ghrelinin büyük bir kısmı mideden, % 30'u ise ince bağırsak, meme (69, 80, 81) ve tükürük bezi gibi değişik organlardan kaynaklanmaktadır (69, 82, 83). Pankreasın α ve β hücrelerinde diğer hormonların yanı sıra ghrelin de sentezlenmektedir (84).

Lateral hipotalamus, ARC, ventromediyal nukleus (VMN), dorsomediyal nukleus (DMN), paraventriküler nukleus (PVN) ve üçüncü ventrikülün endodimal tabakasındaki çekirdekler arası boşlukta ghrelin ekspresyonu yapılmıştır (85). Ghrelin mRNA'sının böbrekte özellikle glomerulusta bulunduğu bildirilmiştir (86). Kondrositlerde de ghrelinin sentez ve sekresyonunun olduğu gösterilmiştir (87). Aynı zamanda tükürüğün serumdan daha fazla hormon içerdiği de rapor edilmiştir (82).

Ghrelinin Etkileri

Ghrelinin keşfinin ardından yapılan çalışmalar, organizmada bir çok sistem üzerine etkili olduğunu göstermiştir. Büyüme hormonu salgılatıcı etkisi, iştah ve yemek yeme üzerine olan etkisi, karbonhidrat metabolizması üzerine olan etkisi, gastrointestinal etkileri, fizyolojik

etkileri, kardiyovasküler etkileri, hücre proliferasyonuna etkileri ve reproduktif sistem üzerine olan etkileri özellikle üzerinde çalışılan konulardır (6, 88-92).

İştahın beyin tarafından kontrol edildiği ve yemek yemenin merkezi sinir sisteminde ve özellikle hipotalamustaki kompleks mekanizmalar tarafından düzenlendiği kabul edilmektedir (93). Ghrelin iştah üzerine olan etkisini farklı şekillerde gösterebilmektedir (1). Midede sentezlenerek kan dolaşımı ile hipotalamik ARC'a ve beynin diğer bölümlerine kan-beyin bariyerini aktif transport ile geçerek ulaşp iştahı etkilemektedir. Bunun dışında, periferal olarak sentezlenen ghrelin, vagal afferent sinir uçlarını uyarmakta, bu da GHS-R ekspresyonuna neden olarak vagal bağlantısı olan nukleus solitarius yoluyla hipotalamusu uyarmaktadır. Aynı zamanda ghrelin hipotalamusta lokal olarak sentezlenmekte ve direkt olarak ARC'deki Nöropeptid Y/Agouti-Related Peptide (NPY/AGRP) ve diğer hücreleri uyarmaktadır (1).

Kardiyovasküler etkisi açısından bakıldığında, kalp ve aortada da ghrelinin mRNA'sı olduğu bildirilmiştir (6). İntravenöz ghrelin enjeksiyonu yapılan gönüllü deneklerde ghrelinin kan basıncını azalttığı, kardiyak indeksi ve hacmi arttırdığı belirtilmiştir (5, 6, 90). Ayrıca ghrelin, arterlerdeki endotelin-1'in damar daraltıcı etkisini de ortadan kaldırmaktadır (90).

Ghrelin'in büyüme hormonu (GH) ile ilişkisi öncelikli olarak araştırılmıştır (10, 88). GH salınımı iki farklı yolla gerçekleşmektedir: Birincisinde büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) kendi reseptörü (GHRH-R) vasıtasıyla hipofiz içerisine girip, intrasellüler cAMP seviyesini yükselterek GH salınımı uyarır. İkincisinde ise GHRH ya da ghrelin, hipofiz membranında bulunan büyüme hormonu salgılatıcı reseptör (Growth Hormone Secretagogues Receptor, GHS-R) vasıtasıyla hipofiz içine girer ve fosfolipaz C aktivasyonu sonucu intrasellüler Ca^{+2} iyonu derişiminin yükseltmesiyle GH salınımı uyarılır (1).

Ghrelin, büyüme hormonu salınımını hem in vitro hem de in vivo şartlarda doza bağımlı olarak arttırmaktadır (1, 94-96). İnsan ve köpeklere ghrelinin intravenöz verilmesi büyüme hormonu salınımını uyarmaktadır (72). Ghrelin, büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) salınımını arttırırken somatostatin salınımını azaltmaktadır. Bu hormon memeliler dışındaki, balıklar ve kanatlılarda da büyüme hormonu salınımı arttırmaktadır (97-99). Ghrelin ve GHRH'in birlikte verilmesi sinerjik olarak büyüme hormonu salınımını arttırmaktadır (88). Özetle tek tek verilmesine göre birlikte verilmesi büyüme hormonun salınımını daha da fazla arttırmaktadır. Büyüme hormonu salgılatıcı özelliği ile vagus siniri arasında da bir bağlantı bulunmaktadır. Vagus siniri kesildiğinde ya da capsaicin gibi bir

madde ile bloke edildiğinde ghrelin verilmesine rağmen büyüme hormonu salınımı aşırı derecede azalmaktadır (100).

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Bakım Koşulları

Çalışma, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi ve Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma materyalini 21 günlük, 40 adet Swiss albino soyu erkek fareler oluşturdu. Hayvanlar ad lubitum, pelet şeklinde fare yemi ile beslenip, içme suyunu serbest olarak tüketti ve 12 saat aydınlık /12 saat karanlık periyodunda, 21 -23 °C sıcaklık ve % 50-60 nem içeren ortamda bakıldı.

Deney grubu için M. Barboros Denizeri (M.B.D.) Deney Hayvanları Yem Sanayi'inde % 0,02 oranında CAP içeren pelet yem hazırlatıldı. Fareler capsaicin içeren yem ile beslenen deney ve standart fare yemi ile beslenen kontrol olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Deney grubu fareler süttten kesildikleri 21. günden itibaren capsaicin içeren fare yemi, kontrol grubu fareler ise yine 21. günden itibaren standart fare yemi ile beslendi. Çalışmadaki tüm deneysel uygulamalar Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Komitesi tarafından onaylandı (Karar No: 31.01.2007 / 5).

Deney Planı

Fareler puberte (40 günlük) ve erişkin (75 günlük) olmak üzere 2 döneme ayrıldı. Kendi içlerinde de deney (n: 10) ve kontrol (n: 10) olmak üzere iki alt grup halinde bakım ve besleme gerçekleştirildi. Gruplardaki farelerin, her gün canlı vücut ağırlıkları ve tükettikleri yem miktarı tartılarak kaydedildi. Yem tüketiminin hesaplanması için hayvanlara her gün belli miktar yem verildi (25 gr/gün/fare). Günlük olarak farelere verilen yemlerden kalan miktar tartılarak, tüketilen yem miktarı hesaplanıp, önlerindeki yem tekrar her fare için 25 gr'a tamamlandı. Deney ve kontrol gruplarındaki farelere puberte (40 günlük) ve erişkin (75 günlük) dönemlerine geldiklerinde, canlı ağırlıkları tartıldıktan sonra, dietil eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapılarak farelerin testisleri çıkartılıp hassas terazide tartımları gerçekleştirildi. Tüm gruplara ait fare testislerinde immunohistokimyasal prosedüre uygun histolojik takip yapıldı ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 4-5µ'luk

kesitlerde normal histolojik yapının incelenmesi için Crossmon'un üçlü boyama yöntemi (101) kullanıldı.

Tablo1: Çalışmada kullanılan fare yemi içeriği.

Kuru Madde	% 88
Ham Protein	% 23
Ham Selüloz	% 5
Ham Kül	% 8
Kalsiyum	% 1,1
Fosfor	% 0,9
Sodyum	% 0,5
Lysine	% 1,3
Methionin	% 0,45
Metabolik Enerji (kcal/gr)	3100

Kontrol grubu farelere doğrudan bu yem karışımı verilirken, deney grubu farelere, bu içeriğe % 0,02 oranında capsaicin (Sigma-V9130) ilavesi yapılmıştır.

Gereçler

Antikor sulandırma solüsyonu

Primer antikorların istenilen konsantrasyonda sulandırılmasında hazır antikor sulandırma solüsyonu (Zymed, 00-3118, antibody diluent reagent solution) kullanıldı.

Protein Bloklama Solüsyonu

Zymed firmasına ait, kullanıma hazır, 85-6743 kod numaralı Histostain® Plus Rabbit Primary Kit'in bloklama solüsyonu kullanıldı.

Primer Antikor

Çalışmada, Phoenix firmasına ait H-031-31 kodlu Rabbit Anti-Ghrelin (Rat, Mouse) poliklonal antikor kullanıldı. Antikor 1:2000 oranında antikor sulandırma solüsyonu (Zymed, 00-3118) ile hazırlandı.

Sekonder Antikor

Zymed firmasına ait, kullanıma hazır, 85-6743 kod numaralı Histostain® Plus Rabbit Primary Kit'in biotinli sekonder antikorunu kullanıldı.

Streptavidin Peroksidaz

Zymed firmasına ait, kullanıma hazır, 85-6743 kod numaralı Histostain® Plus Rabbit Primary Kit'in HRP-Streptavidin peroksidazı kullanıldı.

Kromojen

Labvision firmasına ait, TA-125-HDS kodlu 3'3-diaminobenzidine hydrochloride (DAB) substrate ile aynı firmaya ait TA-012-HDC DAB kromojen kullanıldı.

Bu solüsyon immunohistokimyasal boyama sırasında taze olarak, 1 ml DAB substrat içerisine 1 damla DAB kromojen eklenerek hazırlandı ve hazırlandıktan sonra en geç 10 dakika içerisinde kullanıldı.

İmmun Boyamada Kullanılan Solüsyonlar

Alkol-Eter Solüsyonu

Boyamalar sırasında kullanılan lamların temizliği için 1:1 oranında karıştırılmış alkol-eter solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyonda 15 dakika süreyle bekletilen lamlar bir tülbent ile silinmiştir.

Poly-L-lysine Solüsyonu

İmmunohistokimyasal boyamalarda kullanılacak olan lamlar, distile su içerisinde % 10'luk Poly-L-lysine (Sigma P 8920) solüsyonu hazırlandıktan sonra 5-10 dakika bekletilip 37 °C'lik etüvde bir gece kurutuldu. Ertesi gün kesitler bu lamlara çekildi.

Phosphate Buffered Saline (PBS) Solüsyonu

İmmunohistokimyasal boyamalar sırasında bütün yıkamalarda PBS solüsyonu kullanıldı.

* Sodyum Klorür (Merck,1.064.0100) --- 7,2 g,

* di-Sodyum Hidrojen Fosfat (Merck, 1.06586.0500) --- 1,43 g,

* Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat (Merck, 1.06346.0100) --- 0,43 g

1 lt distile su içinde eritilerek hazırlandı.

Hidrojen Peroksit Solüsyonu

Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak üzere distile su içerisinde % 3'lük hidrojen peroksit (Merck 1.08600.1000) solüsyonu hazırlandı.

İmmunohistokimyasal Boyama Prosedürü

İmmunohistokimyasal boyama tüm preparatlara aynı protokol uygulanarak, tek bir kişi tarafından gerçekleştirildi. Eter-alkolde temizlenen ve poly-L-lysine ile kaplanmış olan lamlara 4-5 μ 'luk kesitler çekildi.

Tüm kesitlere aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Preparatlara ksilol ile deparafinizasyon yapıldı (3x5 dakika).
2. Sonrasında sırasıyla, absolu (2x5 dakika), % 96'lık (5 dakika), % 80'lik (5 dakika) ve % 70'lik (5 dakika) alkollerden geçirildi. Daha sonra preparatlar distile suda 1 dakika yıkandı.
3. Antijen retrieval için preparatlar mikrodalga fırında, 700 Watt da, 2x5 dakika olmak üzere tutuldu.
4. PBS ile yıkama yapıldı (3x5 dakika).
5. Preparatlardaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için % 3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika tutuldu.
6. PBS ile yıkama yapıldı (3x5 dakika).
7. Lamaların üzerindeki kesitlerin çevresi Pappen ile çizildi.
Bundan sonraki aşamalarda kesitlerin kurumasını önlemek amacı ile kesitler nemli bir ortam içerisine (humidity chamber) konuldu.
8. Kesitler spesifik olmayan boyanmayı önlemek üzere bloklama solüsyonu ile oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
9. Boyama sırasında her kesitten bir normal bir de negatif kontrol preparatı hazırlandı.
10. Normal preparatlar, 1:2000 oranında sulandırılmış antikor (ghrelin) ile, negatif kontrol preparatları ise antikor sulandırma solüsyonu ile 45 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
11. PBS ile her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kere yıkandı.
12. Preparatlar sekonder antikor ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
13. PBS ile her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kere yıkandı.

14. HRP-Streptavidin ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
15. PBS ile her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kere yıkandı.
16. Bütün preparatlar hazırlanan DAB kromojeni ile 3 dakika inkübasyona bırakıldı.
17. Distile su içinde 5 dakika yıkandı.
18. Harris hematoksilende 10 saniye tutuldu.
19. Akarsuda yıkandı.
20. Distile suda yıkandı.
21. Hızlı bir şekilde seri alkollerden geçirilerek ksilolde parlatıldı.
22. Entellan ile kapatıldı.

İmmunohistokimyasal Boyama

Parafin bloklardan alınan 4-5 μ 'luk kesitlerde ghrelinin varlığı immunohistokimyasal yöntemlerden indirekt strepteavidin-biotin-kompleks yöntemi kullanılarak gösterildi. İmmunohistokimyasal olarak ghrelinin ile boyanan kontrol ve deney gruplarına ait testis preparatlarının değerlendirmeleri, testis dokusunda ghrelinin pozitif reaksiyon veren hücrelerin saptanması, reaksiyonun karakterine (diffuz ya da granüler), boyanan hedef hücrelerdeki reaksiyon yoğunluğuna ve hücresel düzeyde boyanma özelliklerine bakılarak yapıldı. Her bir hayvandan alınan testis kesitleri için, kesit başına 50 adet pozitif Leydig hücresi ve 10 adet Sertoli hücresi sayılarak reaksiyon şiddetleri, zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) ve şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 1'den 3'e kadar değerler verilerek yapıldı. Sonuçların aritmetik ortalaması alındı.

İstatistiksel Analizler

Deney ve kontrol gruplarına ait canlı ağırlık ortalamaları, testis ağırlıkları ve immunohistokimyasal boyamalardan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri t-testi kullanılarak (102) Sigma Stat programında yapıldı.

BULGULAR

Çalışmamız süresince kontrol ve deney grubunu oluşturan farelerde ölüm görülmemiştir. Yine her iki gruptaki farelerin genel durumlarında herhangi bir değişiklik olmamasına karşın, CAP ilavesi yapılmış yem ile beslenen deney grubu farelerde kontrol grubundakilere oranla aşırı hareketlilik gözlenmiştir.

Morfolojik ve Morfometrik Bulgular

Kontrol ve deney grubu hayvanların her gün tartımları yapılarak canlı ağırlıkları tespit edilmiştir. Çalışmanın başlangıcındaki ağırlıkları ile puberte ve erişkin dönem sonundaki ağırlıkları karşılaştırılıp, aradaki fark çalışma süresince farelerin canlı ağırlık kazançları olarak kabul edilmiştir. Puberte ve erişkin dönemlerde, kontrol gruplarında canlı ağırlık kazancının deney gruplarına oranla daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu farklılık kullanılan istatistik programı sonucunda da önemli bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo 2 , Şekil 4).

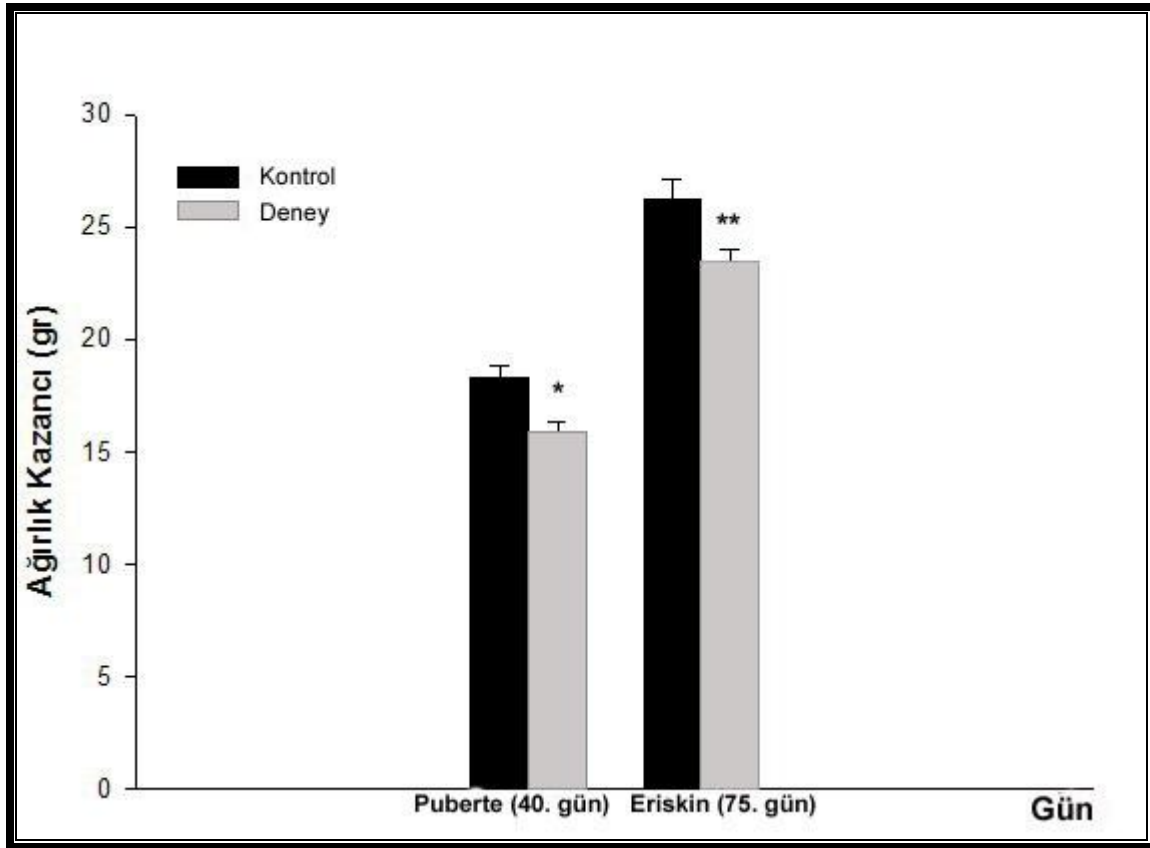
Kontrol ve deney gruplarına ait testisler arasında makroskopik görünüm açısından bir farklılık görülmemiştir.

Tablo 2: Kontrol ve deney gruplarına ait her farenin ortalama canlı ağırlık kazancı (g).

	n	Kontrol (x ± SE)	Deney (x ± SE)
Puberte (40 gün)	10	18,33 ± 0,51	15,85 ± 0,53 *
Erişkin (75 gün)	10	26,26 ± 0,86	23,49 ± 0,48 **

* Puberte dönemi, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,05$

** Erişkin dönem, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,01$



Şekil 4: Puberte (40 gün) ve erişkin dönem (75 gün) gruplardaki ortalama canlı ağırlık kazancı.

* Puberte dönemi, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,05$

** Erişkin dönem, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,01$

Kontrol ve deney gruplarına ait farelerin, deney süresince yem tüketimlerinin ortalaması alınarak, bir farenin ortalama yem tüketimi Tablo 3 ve Şekil 5’de gösterilmiştir.

Yem tüketimlerine bakıldığında, deney grubunu oluşturan farelerin kontrol grubuna göre daha

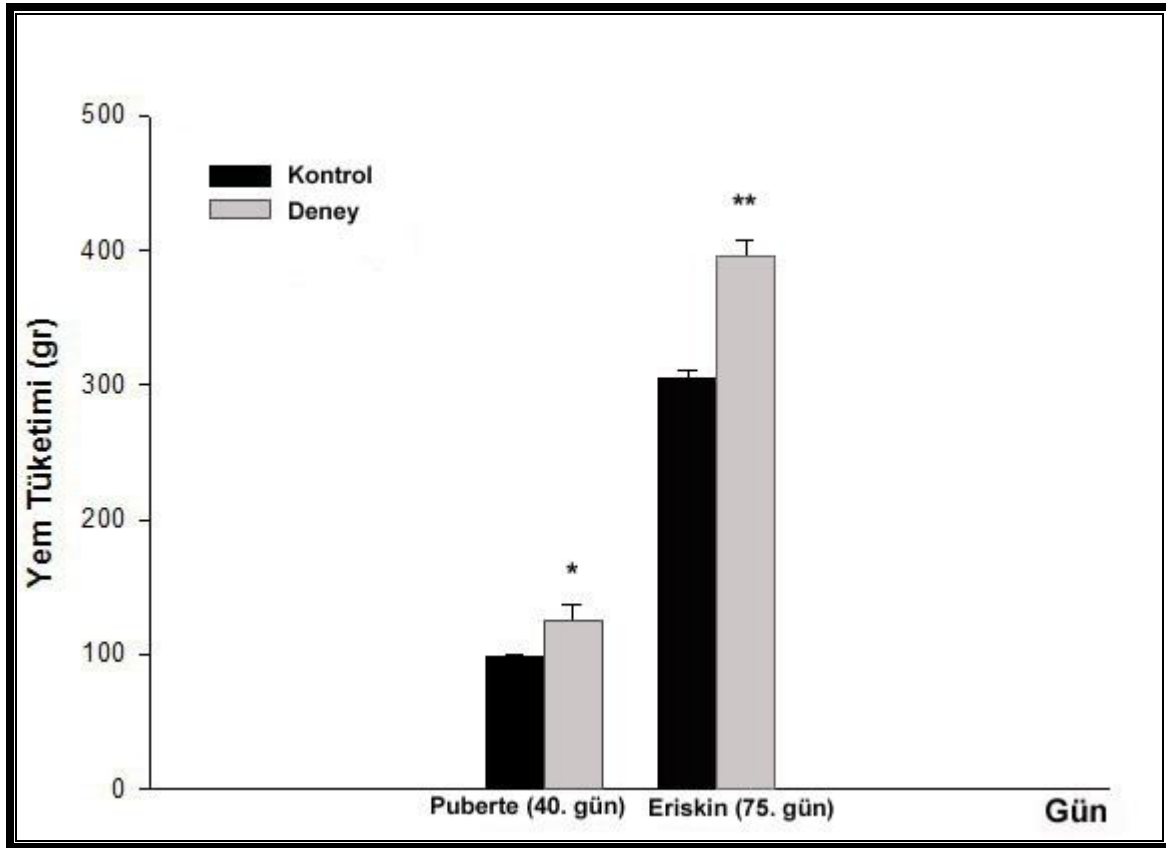
fazla yem tükettikleri görülmüştür. Bu farklılık istatistiki olarak puberte döneminde $p < 0,05$ saptanırken erişkin dönemde $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Tablo 3: Kontrol ve deney gruplarına ait bir farenin ortalama yem tüketimi (g).

	n	Kontrol (x ± SE)	Deney (x ± SE)
Puberte (40 gün)	10	97,5 ± 1,96	124,5 ± 12,97 *
Erişkin (75 gün)	10	305,7 ± 5,01	395,8 ± 11,5 **

* Puberte dönemi, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,05$

** Erişkin dönem, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,01$



Şekil 5 : Puberte (40 gün) ve erişkin (75 gün) gruplara ait bir farenin deney süresince ortalama yem tüketimi.

* Puberte dönemi, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,05$

** Erişkin dönem, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,01$

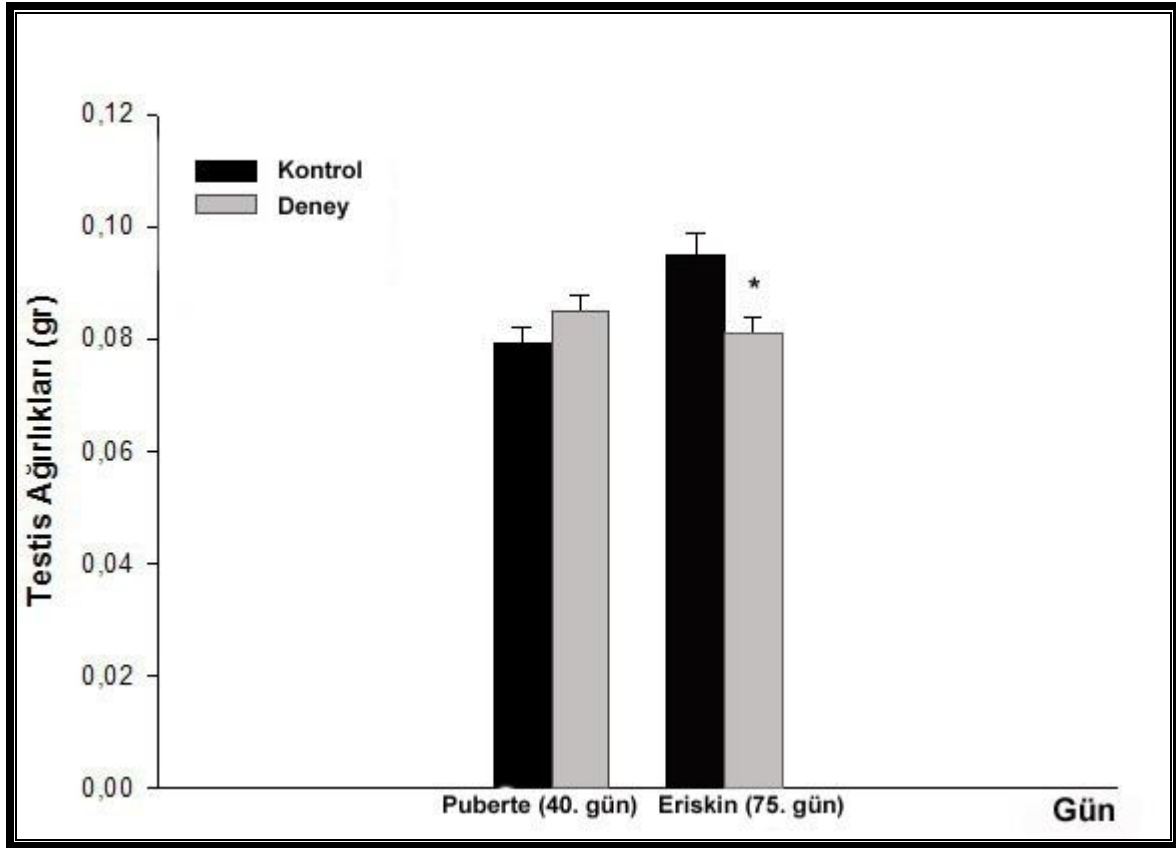
Kontrol ve deney grubuna ait farelerin, puberte ve erişkin dönem testis ağırlıkları Tablo 4 ve Şekil 6'da gösterilmiştir. Puberte döneminde testis ağırlık ortalamalarında deney grubunun değerleri kontrol grubuna oranla daha fazla çıkmasına karşın istatistiki bir önem

görülmemiştir. Erişkin dönemde kontrol ve deney grupları arasında testis ağırlık farklılığı $p < 0,05$ düzeyinde istatistiki bir önem göstermiş ve kontrol grubunun testislerinin daha ağır olduğu görülmüştür.

Tablo 4: Kontrol ve deney gruplarına ait farelerin ortalama testis ağırlıkları (g).

	n	Kontrol ($x \pm SE$)	Deney ($x \pm SE$)
Puberte (40 gün)	10	$0,079 \pm 0,003$	$0,084 \pm 0,003$
Erişkin (75 gün)	10	$0,095 \pm 0,004$	$0,081 \pm 0,003$ *

* Erişkin dönem, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,05$.



Şekil 6: Puberte (40 gün) ve erişkin (75 gün) gruplardaki ortalama testis ağırlıkları.

* Erişkin dönem, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,05$.

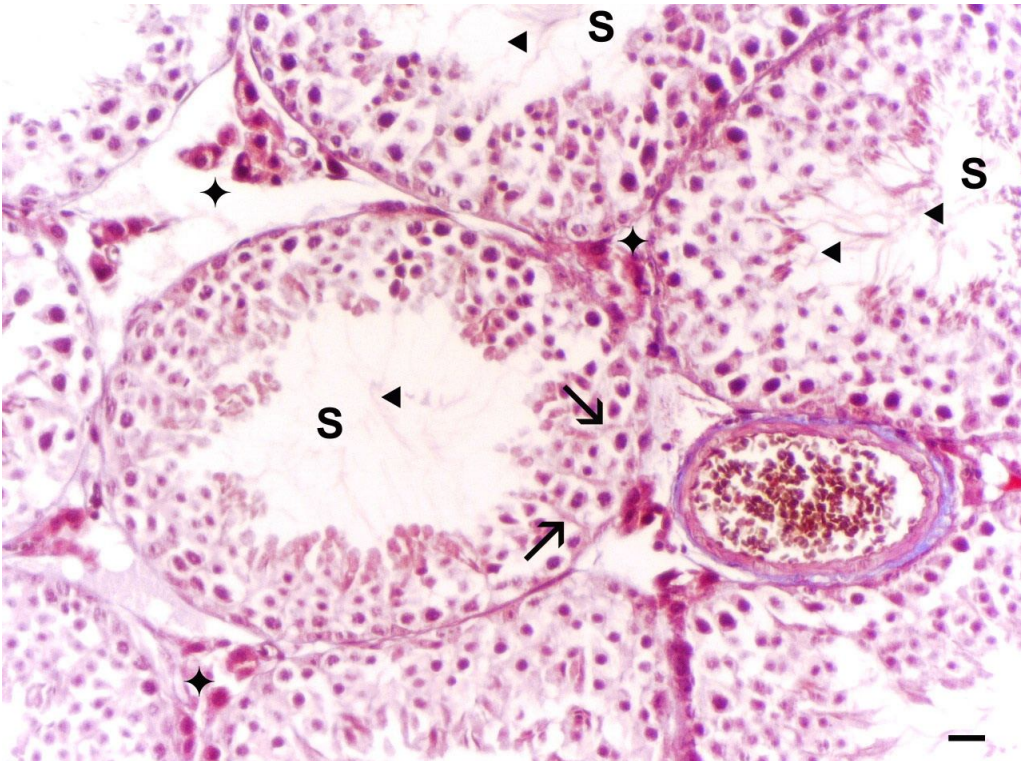
Histolojik Bulgular

Kontrol ve deney gruplarına ait puberte ve erişkin dönemdeki farelerin testis dokuları üçlü boyama yöntemi (101) ile boyanarak histolojik yönden değerlendirildi (Şekil 7-10). Normal histolojik bulgular dışında testis yapısında herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmadı.

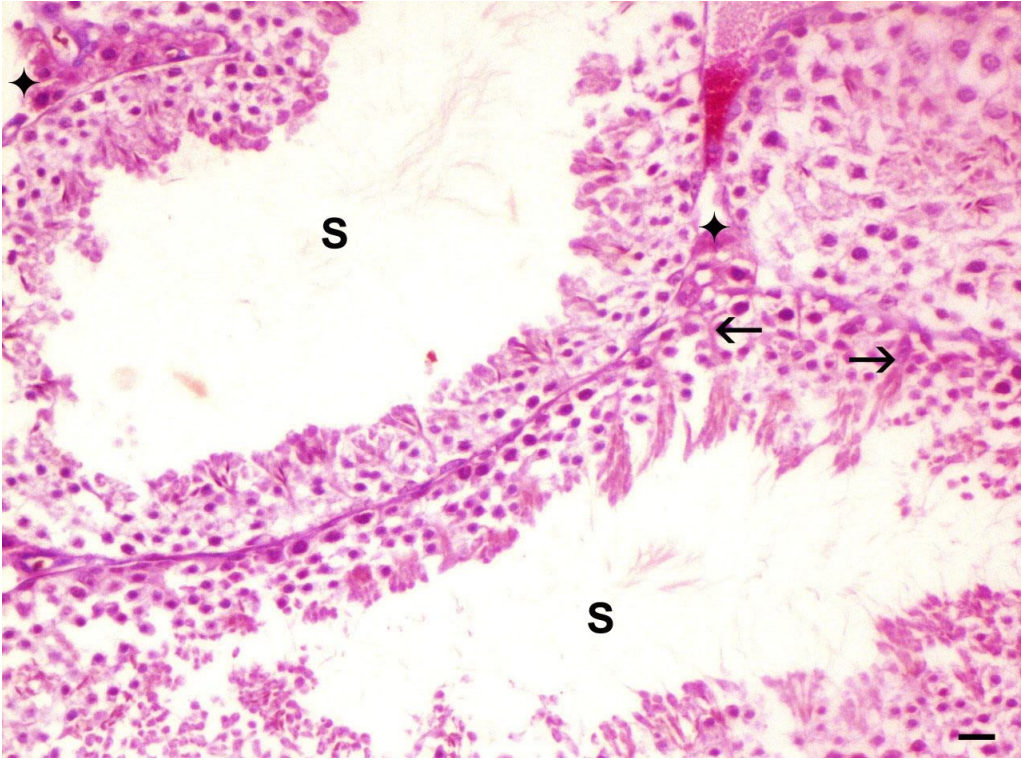
Kontrol ve deney gruplarında testislerde tubuler gelişim, puberte ve erişkin dönemlerde karşılaştırılmıştır (Şekil 7-14). Puberte dönemi deney grubunda Sertoli hücresi uzamınca maturasyon fazındaki spermatogenik seriyi oluşturan hücre yoğunluğunda ve mitotik aktivitede gözle görülür bir artış saptanmıştır. Özellikle primer spermatositlerde heterokromazinin kontrole oranla daha yoğun olduğu görülmüştür (Şekil 7, 8, 11, 12). Bunun yanı sıra, puberte dönemi deney grubunun tubulus lumenlerinde daha çok sayıda spermatozoon izlenmiştir (Şekil 7, 8). Erişkin dönemde gelişmekte olan spermatositler tubulus duvarında özellikle deney grubunda, daha yoğun bir yerleşim gösterirken, kontrol grubundaki tubüllerde bu yoğunluk görülmemiştir (Şekil 9, 10, 13, 14).



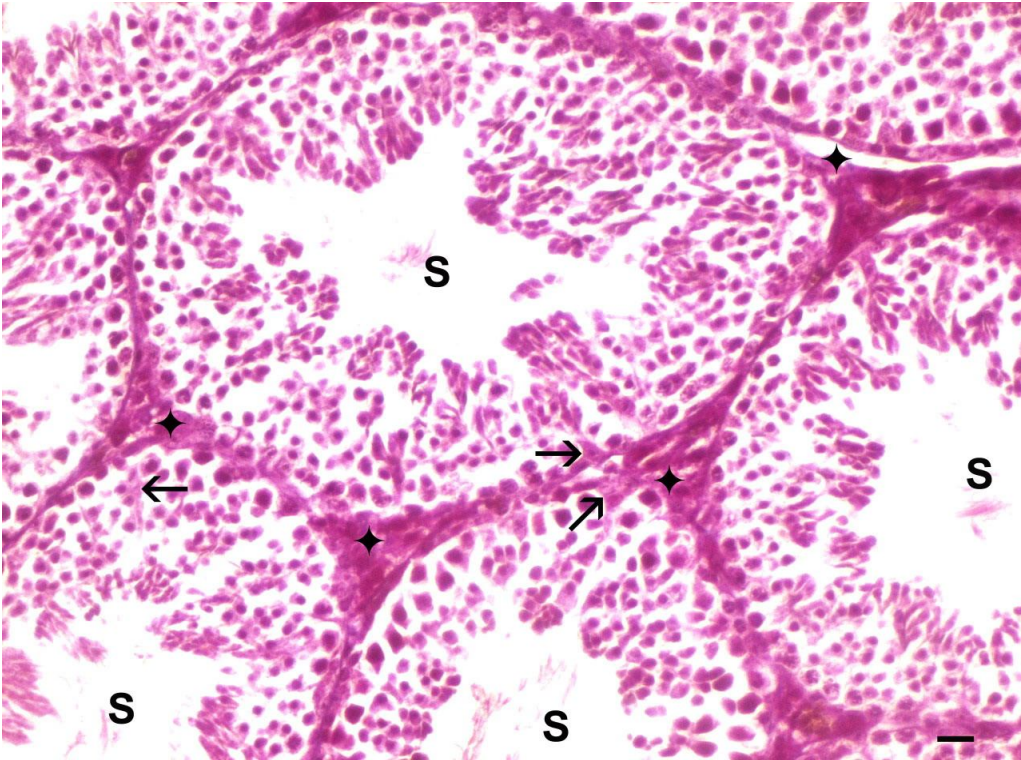
Şekil 7: Kontrol grubu puberte dönemi, testis dokusu, seminifer tubuller (S), spermatozoonlar (◄), Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→), üçlü boyama. Bar 50µm.



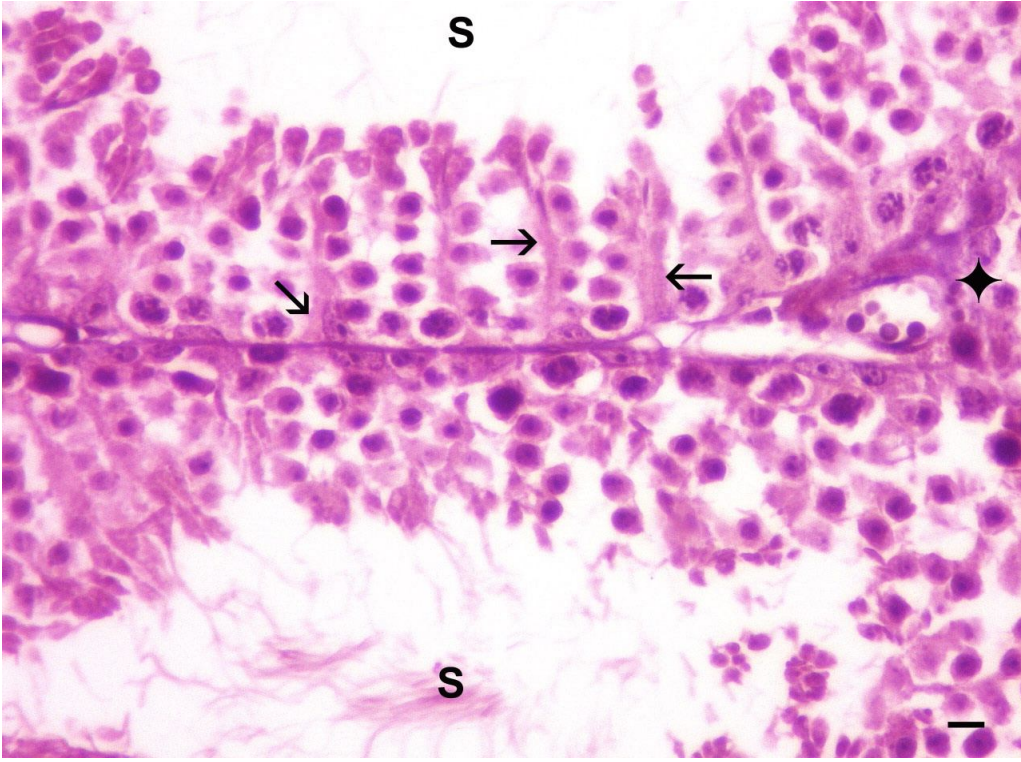
Şekil 8: Deney grubu puberte dönemi, testis dokusu, seminifer tubuller (S), spermatozoonlar (◄), Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→), üçlü boyama. Bar 50µm.



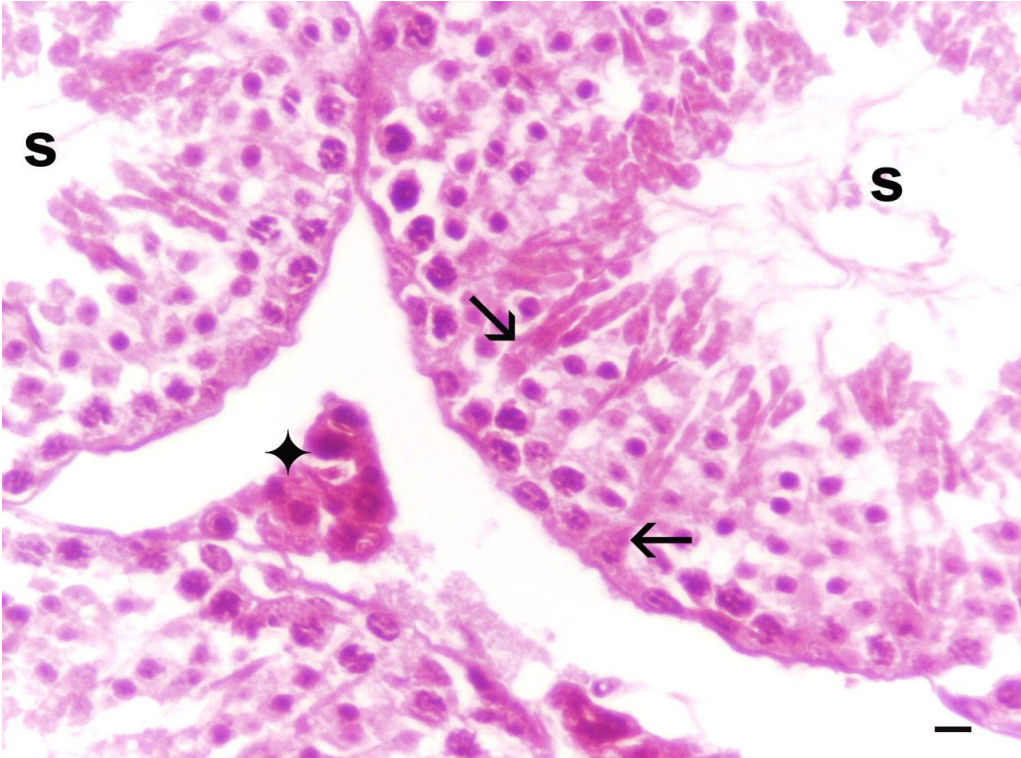
Şekil 9: Kontrol grubu erişkin dönem, testis dokusu, seminifer tubuller (S), Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→), üçlü boyama. Bar 50µm.



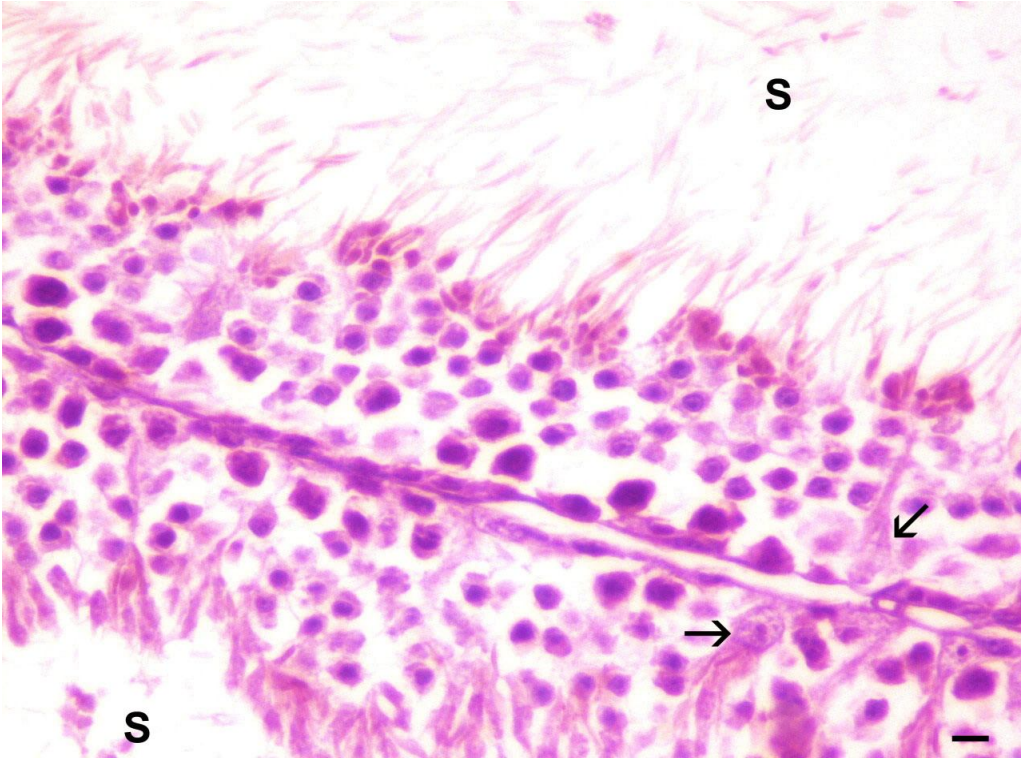
Şekil 10: Deney grubu erişkin dönem, testis dokusu, seminifer tubuller (S), Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→), üçlü boyama. Bar 50µm.



Şekil 11: Kontrol grubu puberte dönemi, testis dokusu, seminifer tubuller (S), Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→), üçlü boyama. Bar 25µm.



Şekil 12: Deney grubu puberte dönemi, testis dokusu, seminifer tubuller (S), Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→), üçlü boyama. Bar 25µm.



Şekil 13: Kontrol grubu erişkin dönem, testis dokusu, seminifer tubuller (S), Sertoli hücreleri (→), üçlü boyama. Bar 25µm.

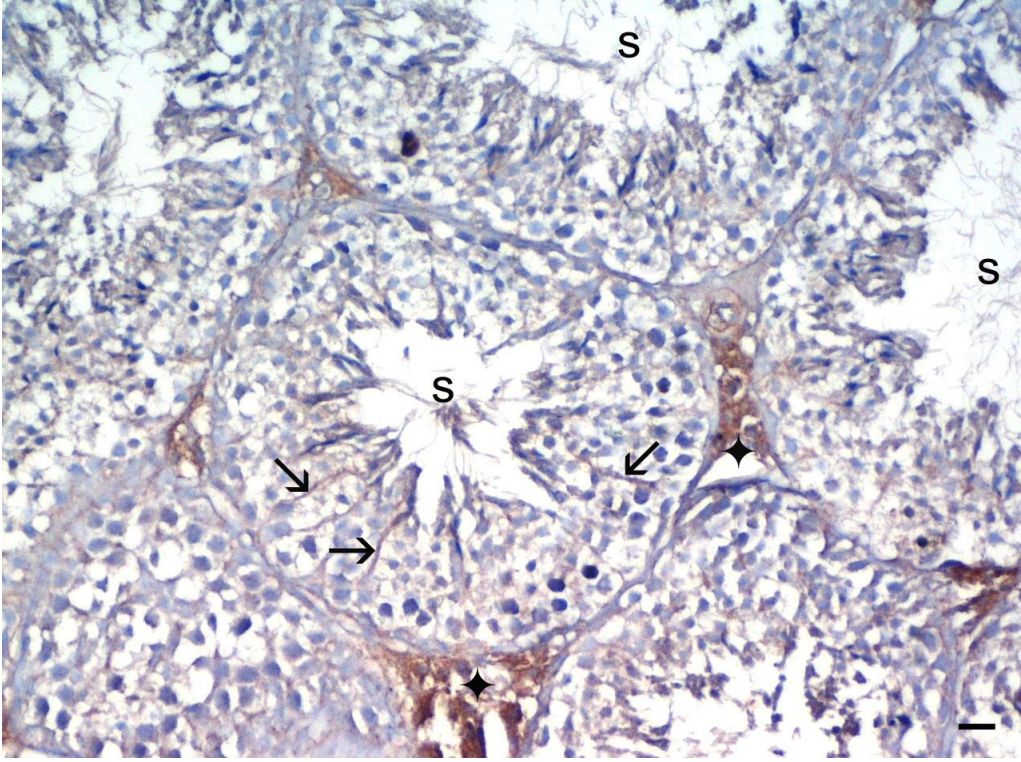


Şekil 14: Deney grubu erişkin dönem, testis dokusu, seminifer tubuller (S), Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→), üçlü boyama. Bar 25µm.

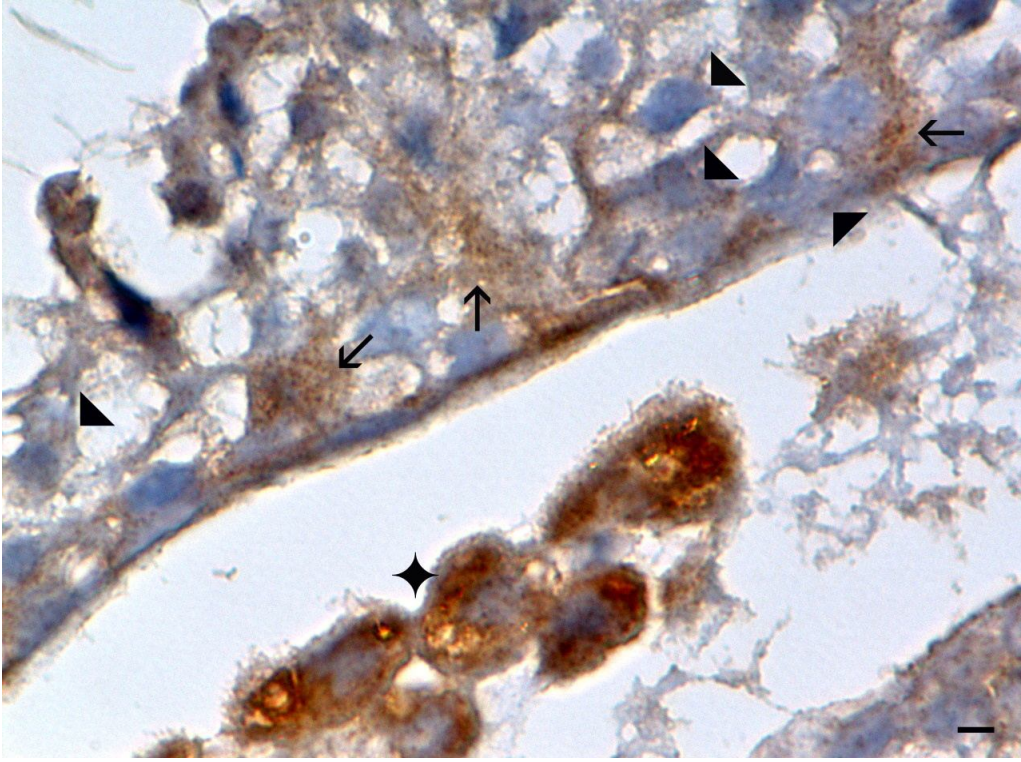
İmmunohistokimyasal Bulgular

Ghrelin antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyama sonucunda, her iki dönemde (puberte-erişkin) ve tüm gruplarda (kontrol - deney) immun reaksiyonun özellikle intersitisyel alanlarda Leydig hücrelerinde ve tubulus seminiferus kontortuslar içerisinde Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında eksprese edilmiştir (Şekil 15, 16, 18-21). Ancak, spermatogenez seriyi oluşturan hücrelerde reaksiyona rastlanmamıştır (Şekil 15, 16).

Leydig ve Sertoli hücrelerinde tespit edilen boyanmanın tamamen hücre sitoplazmasında ve granüler tarzda olduğu görülmüştür. Hücre çekirdeği immun boyanma açısından negatif reaksiyon vermiştir (Şekil 22, 25).



Şekil 15: Kontrol grubu erişkin dönemde ghrelin ekspresyonu, seminifer tubuller (S), Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→). Bar 50 µm.



Şekil 16: Kontrol grubu erişkin dönem testis dokusu ghrelin pozitif hücreler. Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→). Ghrelin negatif hücreler, spermatogenik seriyi oluşturan hücreler (▲). Bar 10µm.

40 günlük kontrol grubu Leydig hücrelerinde şiddetli immün reaksiyon (+++) görülürken, deney grubunda orta şiddette (++) reaksiyon saptanmıştır (Tablo 5 – Şekil 17, 22, 23).

75 günlük kontrol grubu Leydig hücrelerinde şiddetli immün reaksiyon (+++) görülürken, deney grubunda orta şiddette (++) reaksiyon saptanmıştır (Tablo 5 – Şekil 17, 24, 25). Bu farklılık istatistikî açıdan da anlamlı bulunmuştur.

Sertoli hücreleri açısından bakıldığında ise, 40 günlük dönemde boyanma yoğunluğu hem kontrol hem de deney gruplarında şiddetli (+++) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 17, 26, 27). 75 günlük dönemde ise, her iki grup içinde orta şiddette (++) değerlendirilmiştir (Şekil 17, 28, 29).

40 ve 75 günlük kontrol grubundaki Leydig hücrelerinde immün reaksiyon, şiddetli boyanma gösterirken (+++) deney grubu orta şiddette (++) boyanarak, kontrole oranla daha az reaksiyon vermiştir (Tablo 5).

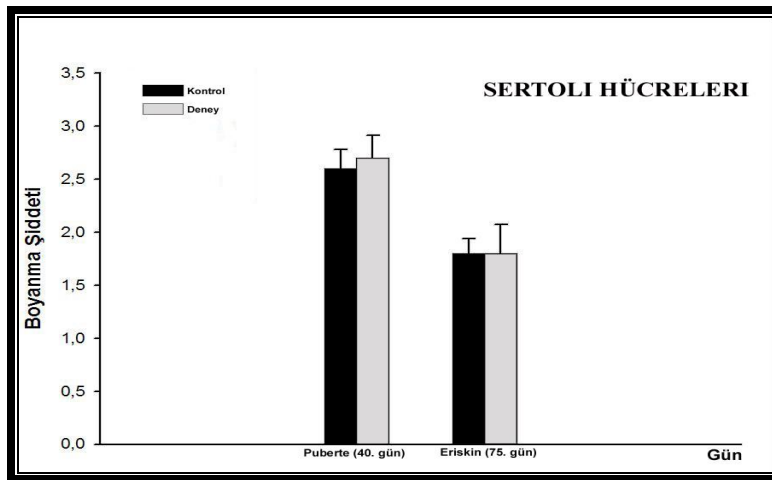
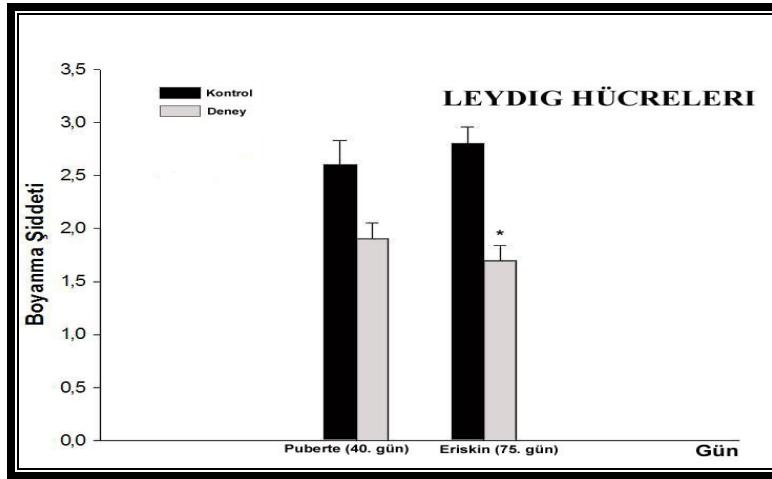
Yapılan immünohistokimyasal boyama ile paralel olarak gerçekleştirilen negatif kontrol preparatlarında boyanma kalitesi değerlendirilerek, hiçbir boyanma gözlenmemiştir (Şekil 30).

Tablo 5: Leydig ve Sertoli hücrelerinde ghrelin immunpozitif boyanma şiddetinin değerlendirilmesi.

	n	Leydig Hücreleri		Sertoli Hücreleri	
		Kontrol \pm SEM	Deney \pm SEM	Kontrol \pm SEM	Deney \pm SEM
Puberte dönemi	10	2,6 \pm 0,23 (+++)	1,9 \pm 0,15 (++)	2,6 \pm 0,18 (+++)	2,7 \pm 0,21 (+++)
Erişkin dönem	10	2,8 \pm 0,16 (+++)	1,7 \pm 0,14 * (++)	1,8 \pm 0,14 (++)	1,8 \pm 0,27 (++)

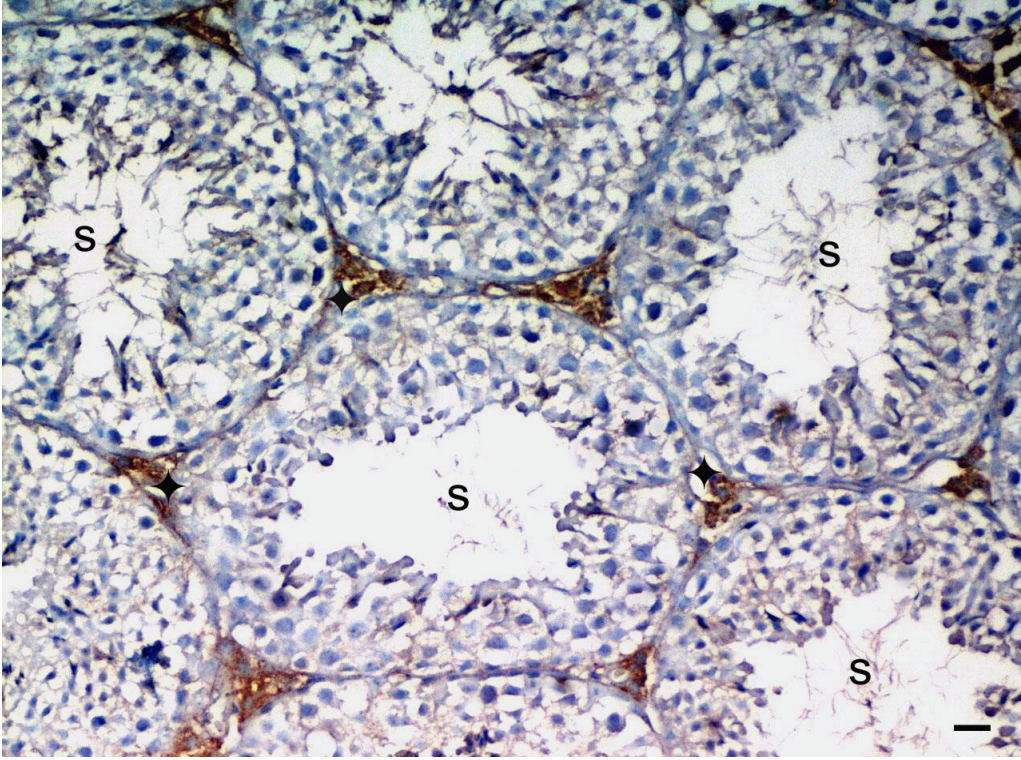
*Erişkin dönem, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,05$.

Şiddetli boyanma (+++), orta şiddette boyanma (++), zayıf boyanma (+).

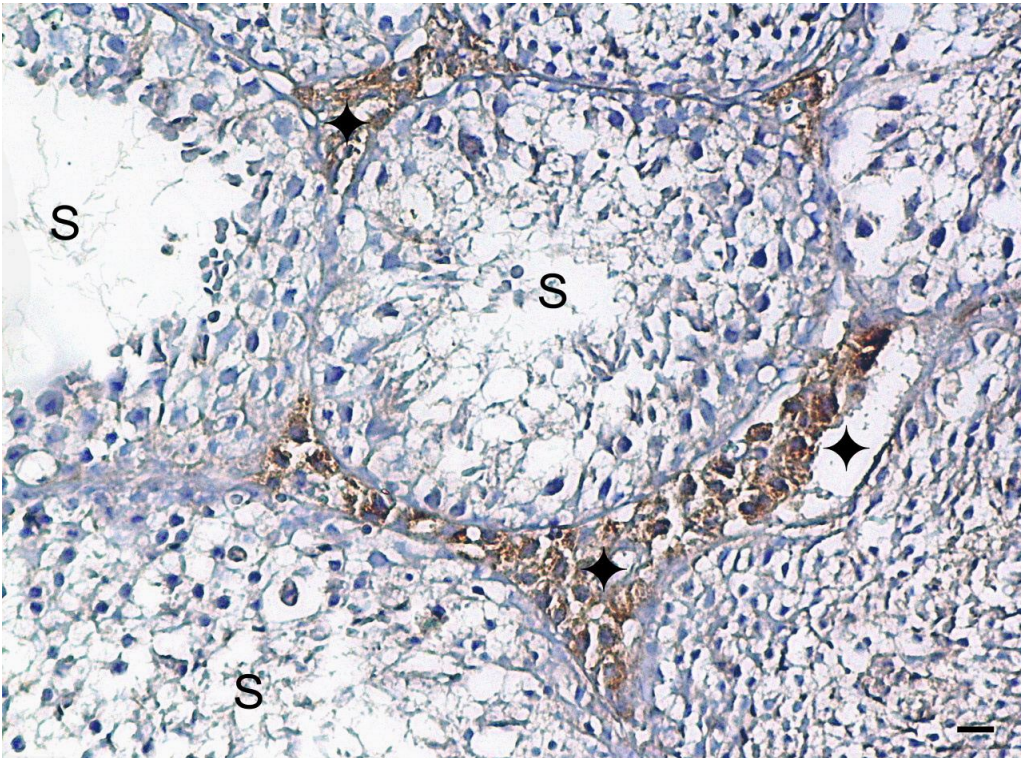


Şekil 17: Puberte (40 gün) ve erişkin (75 gün) gruplarda, Leydig ve Sertoli Hücrelerinde ghrelin immunpozitif boyanma şiddeti.

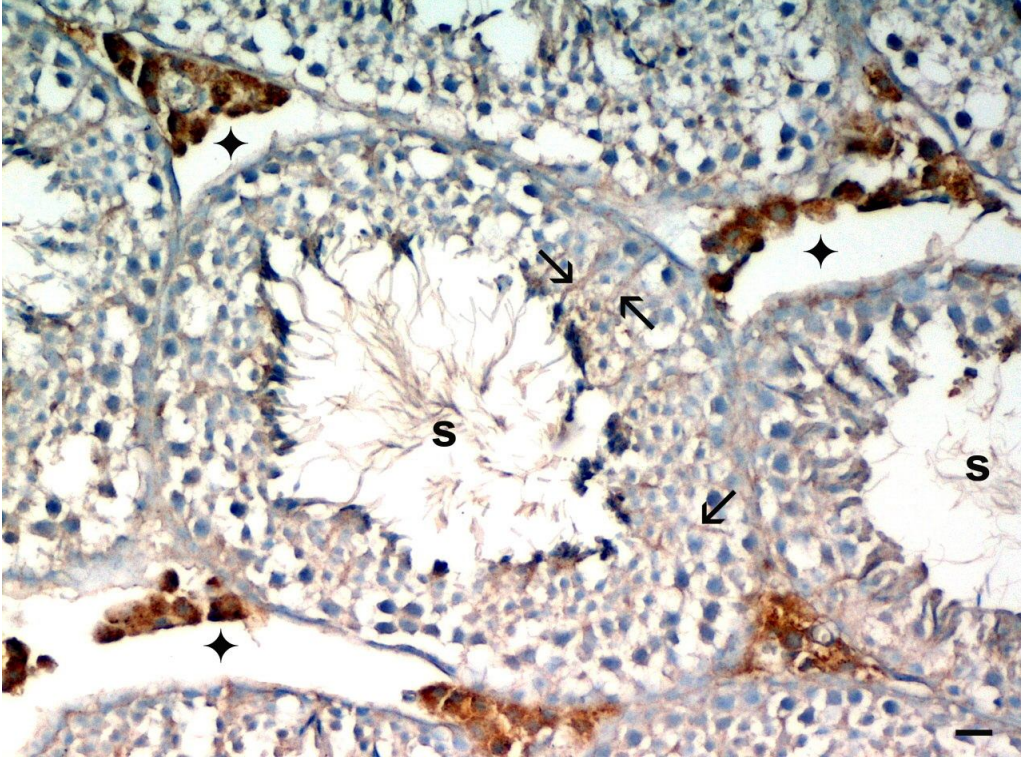
* Erişkin dönem, deney ve kontrol arasındaki önem, $p < 0,05$.



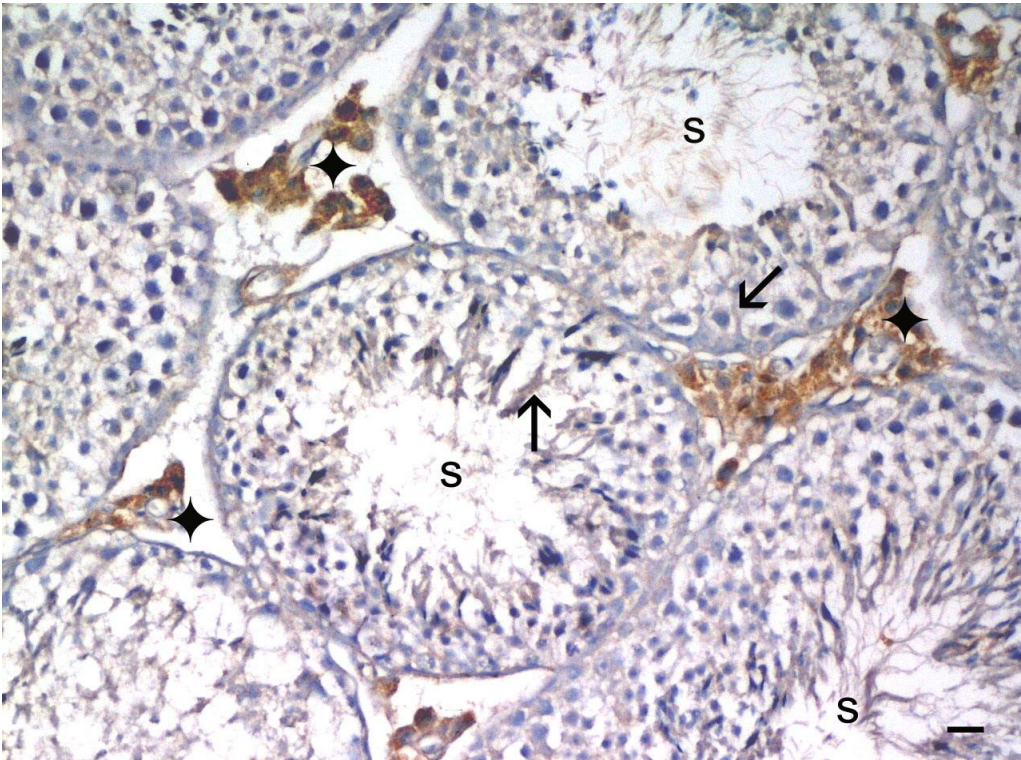
Şekil 18: Kontrol grubu puberte döneminde ghrelin ekspresyonu, seminifer tubuller (S), Leydig hücreleri (◆). Bar 50 µm.



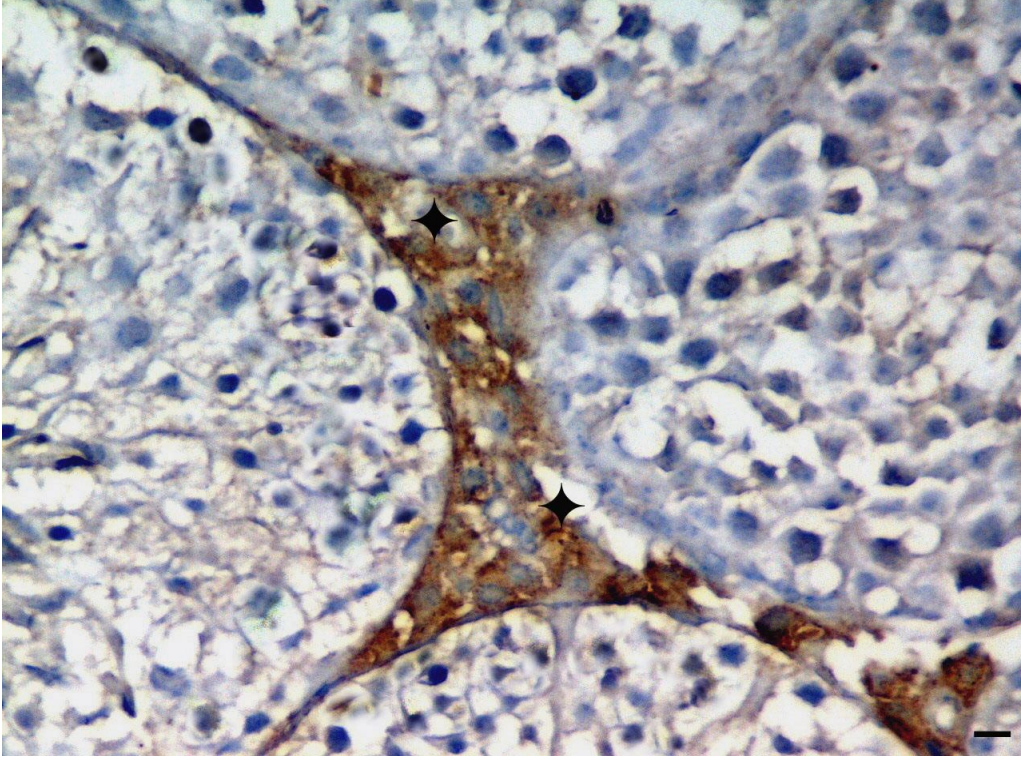
Şekil 19: Deney grubu puberte döneminde ghrelin ekspresyonu, seminifer tubuller (S), Leydig hücreleri (◆). Bar 50 µm.



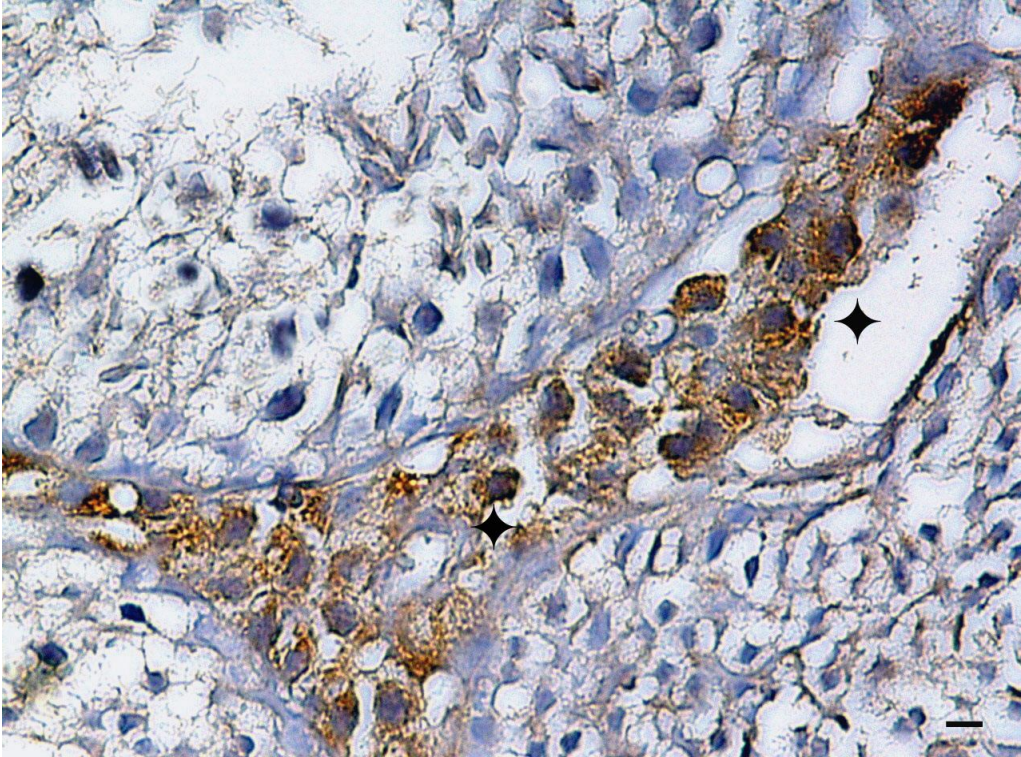
Şekil 20: Kontrol grubu erişkin dönem ghrelin ekspresyonu, seminifer tubuller (S), Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→). Bar 50 µm.



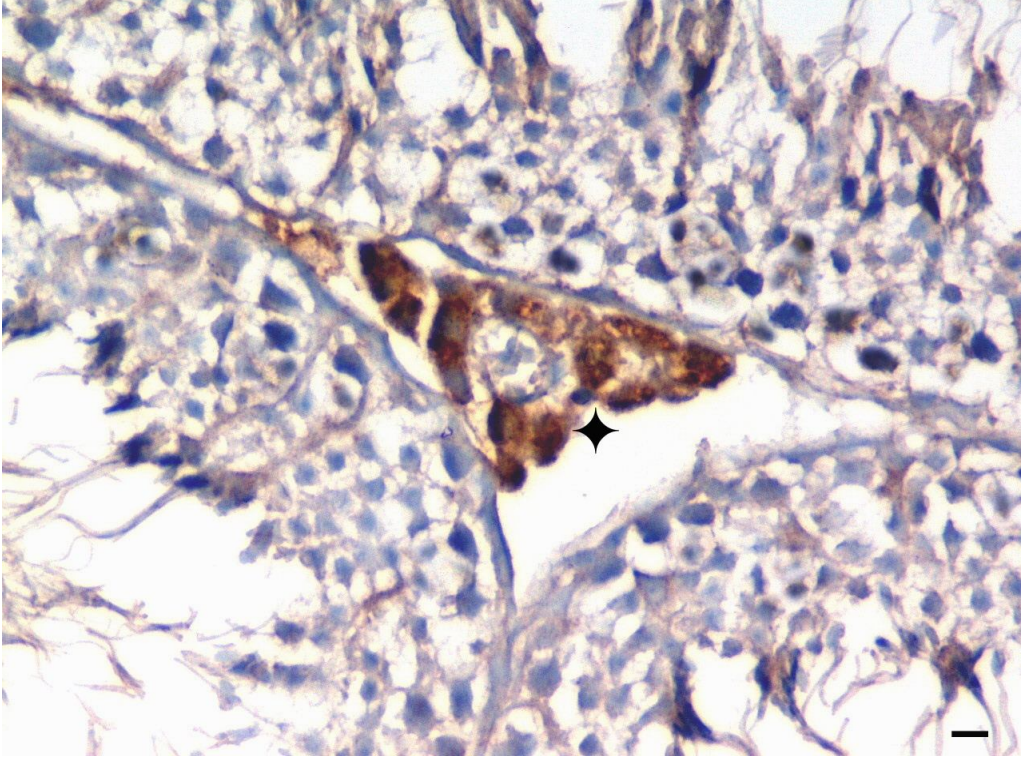
Şekil 21: Deney grubu erişkin dönem ghrelin ekspresyonu, seminifer tubuller (S), Leydig hücreleri (◆), Sertoli hücreleri (→). Bar 50 µm.



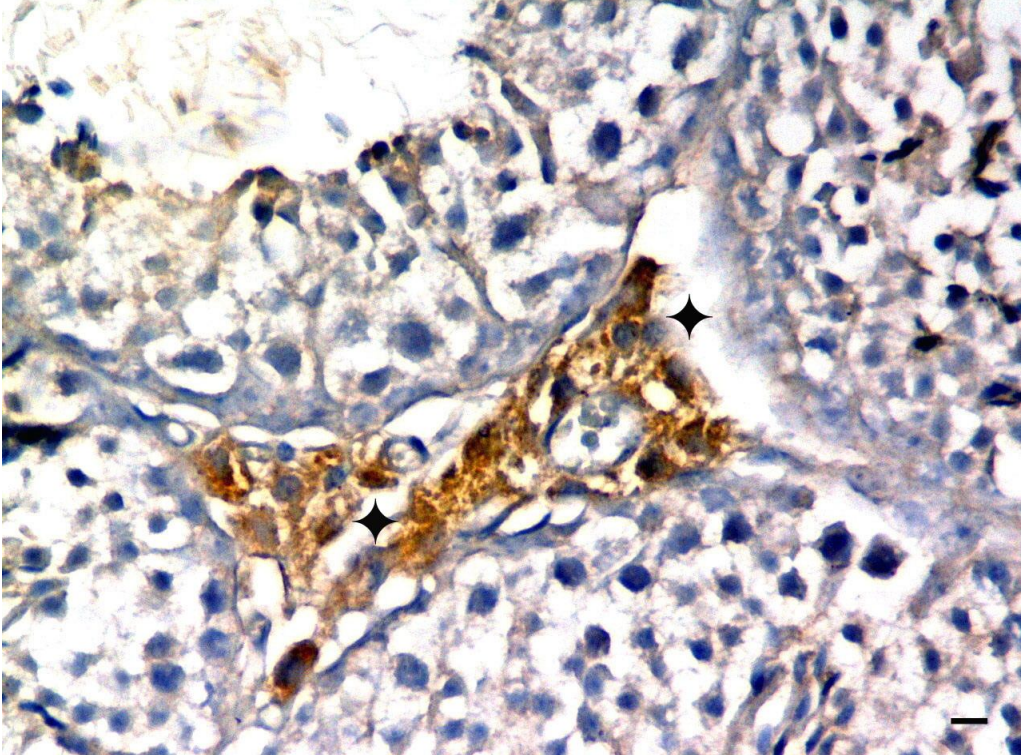
Şekil 22: Kontrol grubu puberte döneminde intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde ghrelin ekspresyonu (◆). Bar 25 µm.



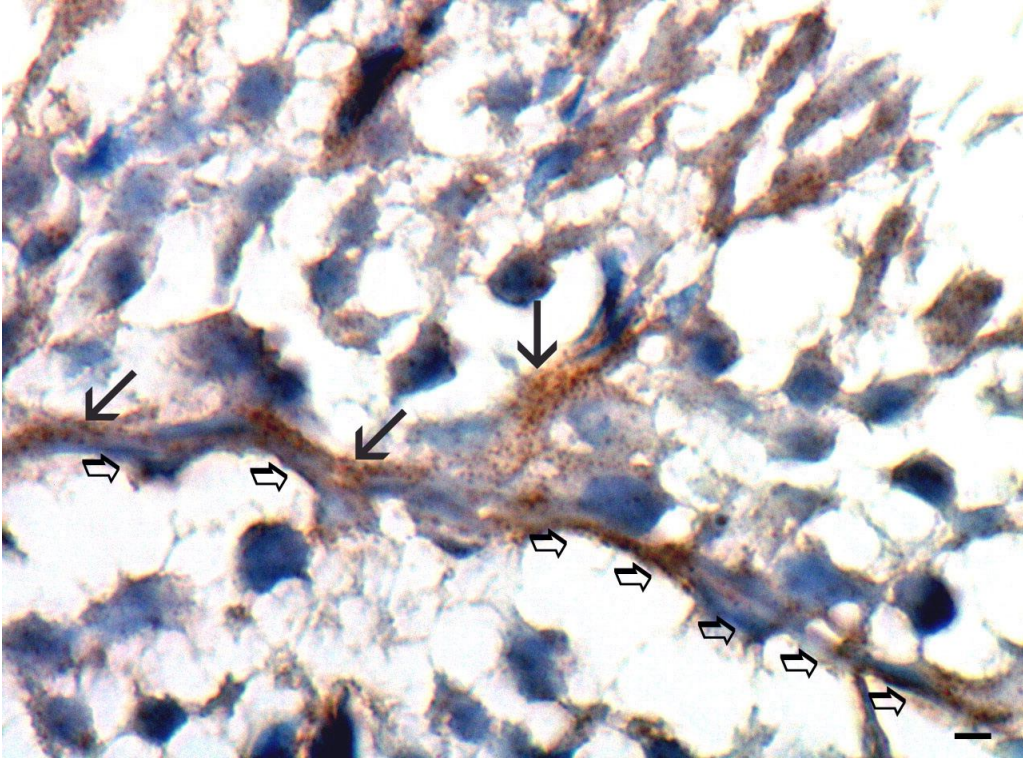
Şekil 23: Deney grubu puberte döneminde intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde ghrelin ekspresyonu (◆). Bar 25 µm.



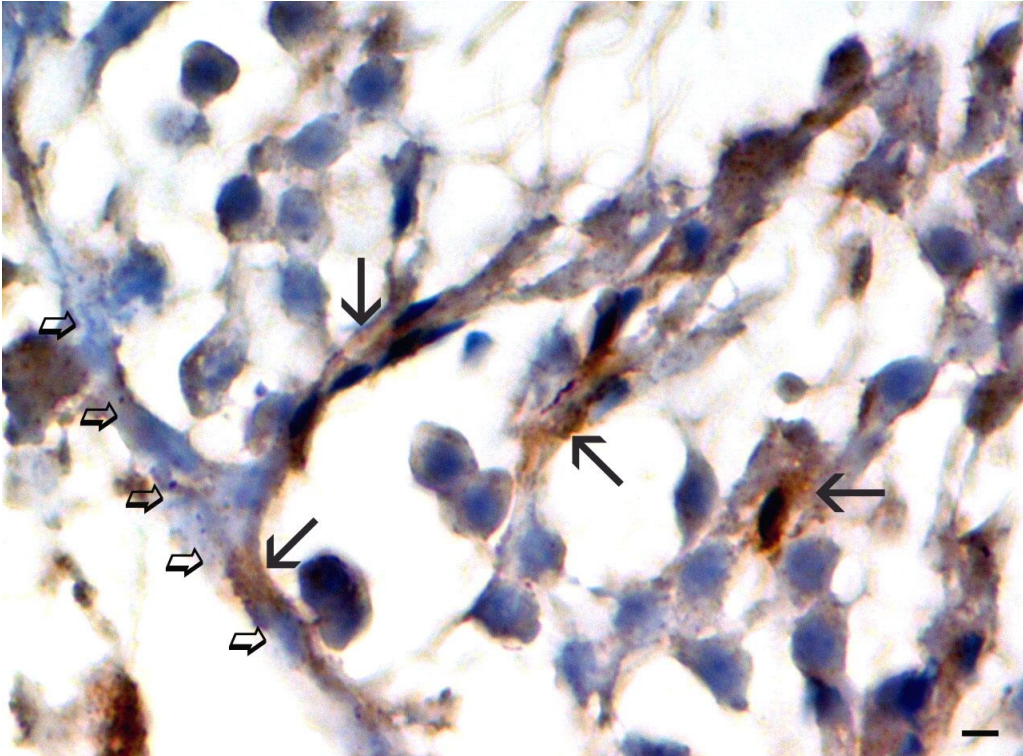
Şekil 24: Kontrol grubu erişkin dönem intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde (◆) ghrelin ekspresyonu. Bar 25 µm.



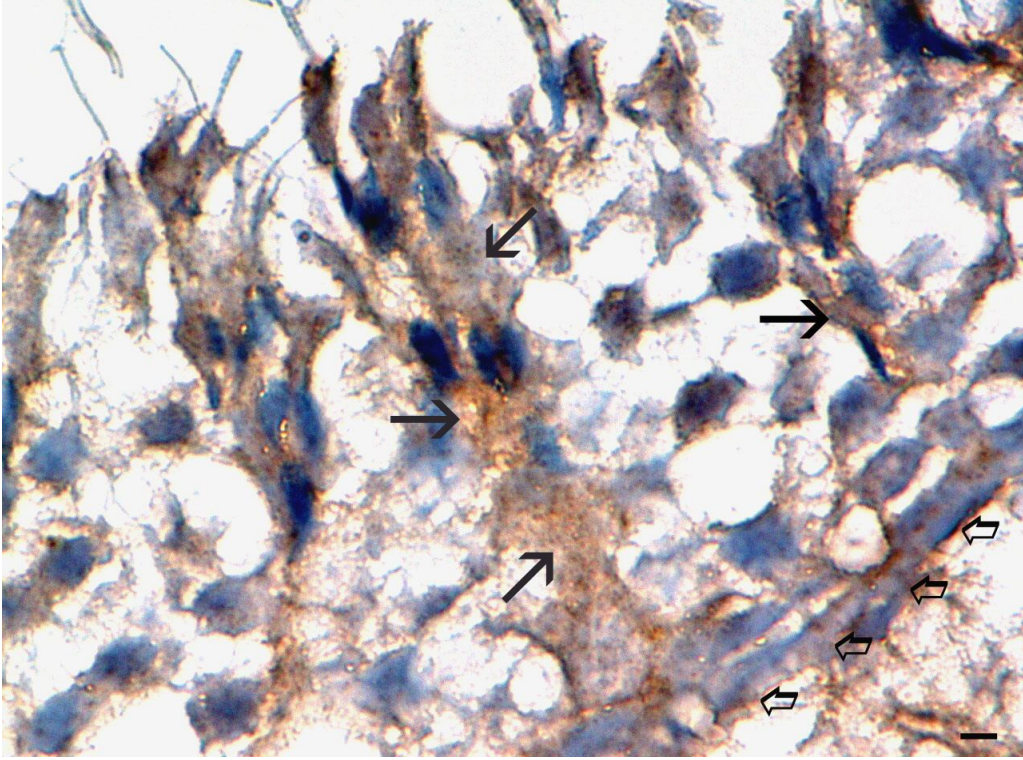
Şekil 25: Deney grubu erişkin dönem intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde ghrelin ekspresyonu (◆). Bar 25 µm.



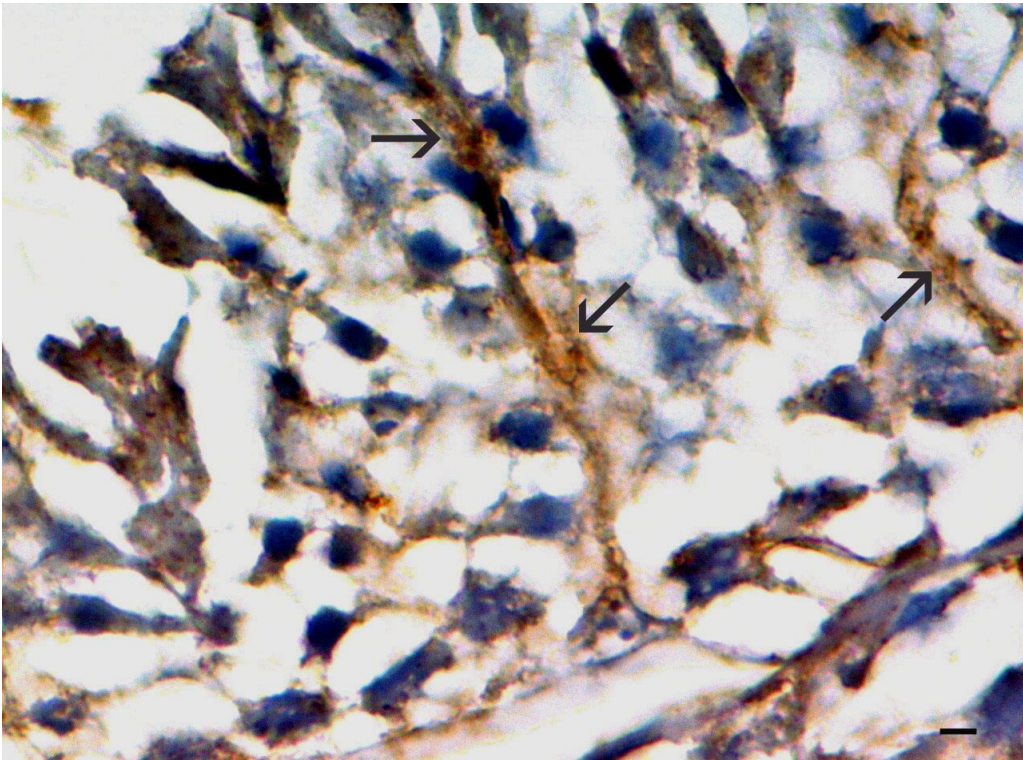
Şekil 26: Kontrol grubu puberte döneminde Sertoli hücrelerinde ghrelin ekspresyonu. Sertoli hücresi sitoplazması (→). Bar 10 µm.



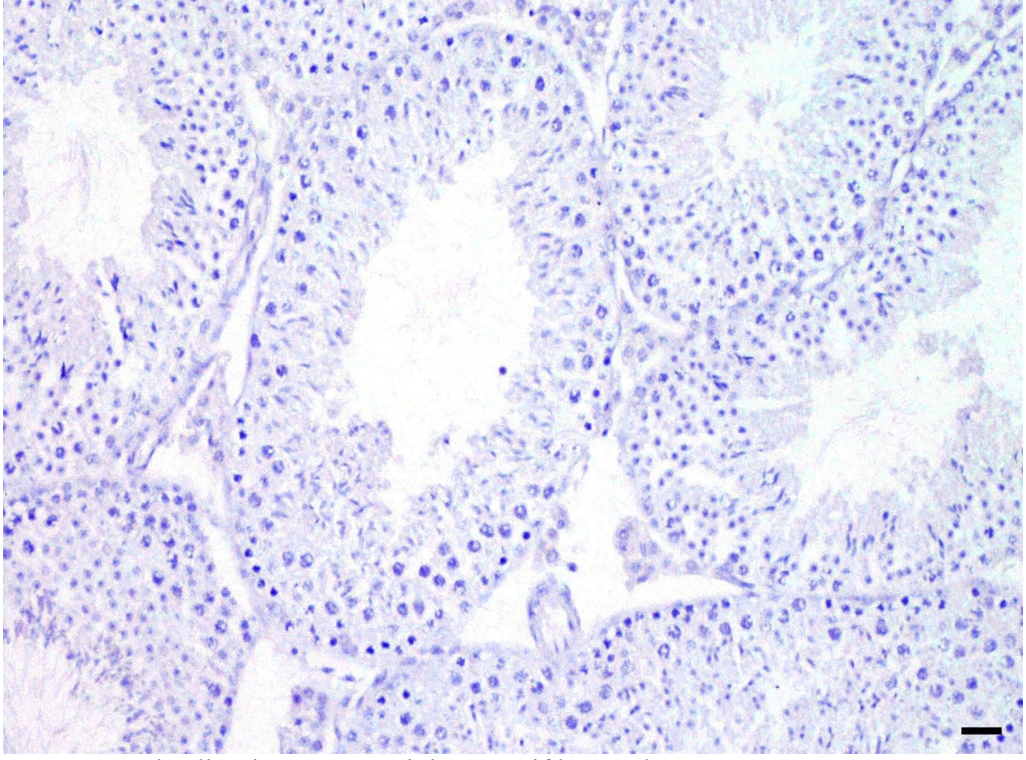
Şekil 27: Deney grubu puberte döneminde Sertoli hücrelerinde ghrelin ekspresyonu. Sertoli hücresi sitoplazması (→), seminifer tubul duvarı (⇨). Bar 10 µm.



Şekil 28: Kontrol grubu erişkin dönem Sertoli hücrelerinde ghrelin ekspresyonu. Sertoli hücresi sitoplazması (→), seminifer tubul duvarı (⇄). Bar 10 µm.



Şekil 29: Deney grubu erişkin dönem Sertoli hücrelerinde ghrelin ekspresyonu. Sertoli hücresi sitoplazması (→). Bar 10 µm.



Şekil 30: Ghrelin ekspresyonu için negatif kontrol. Bar 50 μm .

TARTIŞMA ve SONUÇ

Acı kırmızı biber ve onun etken maddesi olan CAP'ın genel metabolizma ve genital sistem üzerine olan farklı etkileri bir çok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Traurig ve arkadaşları (103), yeni doğan ratlara capsaicin uygulaması yaparak, capsaicinin vücut gelişimi, seksüel olgunluk ve fertilizasyon üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Capsaicin uygulanan gruptaki hayvanların puberte zamanının geciktiği, fertilitede ve vücut ağırlıklarında azalma olduğu saptanmıştır. Araştırmamızda özellikle puberte döneminde, gelişmekte olan spermatojenik hücre serisinde yoğunluk özellikle deney grubunda belirgin olarak gözlenmiştir. Aynı dönemde deney grubu Leydig hücrelerinde ghrelin ekspresyonunun azaldığı da görülmüştür. Azalan ghrelin immunreaktivitesinin LH salınımını uyardığını bildiren Fernandez-Fernandez ve arkadaşları'nın (24) bulguları ile bizim bulgularımız paraleldir. Yapılan bu projede, farelerin günlük yem tüketimlerinde, capsaicin uygulanan gruplarda, her iki yaş döneminde de kontrol grubuna göre dikkate değer biçimde artış olduğu gözlemlendi. Özellikle erişkin dönemde bu artış oldukça belirgin olarak saptandı. Ancak yem tüketimindeki bu artışa karşılık, canlı ağırlık kazancının deney gruplarında azaldığı görüldü. Bu bulgular yukarıda bahsedilen capsaicin ve canlı ağırlık kazancı çalışmaları ile paralellik göstermektedir. Park ve arkadaşları (104), 6-7 haftalık ratların rasyonlarına % 0,02 CAP ilavesinin yem alımını azalttığını ve bu nedene bağlı olarak beyindeki birçok bölgede nöropeptid Y (NPY) ekspresyonununun zayıfladığını bildirmişlerdir. Bu sonuç yiyecek alımının kontrolüyle ilgili olan hipotalamustaki NPY'nin capsaicin tarafından olumsuz etkilendiğini düşündürmektedir. Araştırmamızda ise bu sonuçların tam tersi olarak, CAP'li yem ile beslenen her iki yaş grubundaki farelerin yem alımında dikkate değer bir artış saptanmıştır.

Olgun ve Oktay (105), erişkin tavukların yemlerine acı kırmızı biber ilave ederek 81 gün süreyle beslemişler, yumurta sarısının renginin koyulaştığını, yumurta veriminin, yemden yararlanmanın ve kuluçka üretiminin ise etkilenmediğini gözlemişlerdir. Furuse ve arkadaşları (106), diyetlerine acı kırmızı biber ilave ettikleri erişkin yumurtacı tavuklarda karın içi yağ miktarında azalma, yumurta performansında ise % 3 oranında artış olduğunu bildirmişlerdir. Özer ve arkadaşları (37, 107) ışık mikroskopik düzeyde yaptıkları araştırmada acı kırmızı biberin tavuk ve horozlarda genital sistemin gelişmesi üzerinde uyarıcı bir etkisi olduğunu göstermişlerdir. Erdost ve arkadaşları (40), elektron mikroskopik düzeydeki bir başka araştırmalarında tavuk ve horozların hipofizinde gonadotropik hücrelerin sentez aktivitesinin ilk aylardan itibaren belirgin şekilde arttığını göstermişlerdir.

İmmunohistokimyasal boyamalar sonucu elde edilen, FSH ve LH immunpozitif reaksiyonlar değerlendirildiğinde deney gruplarındaki olumlu gelişme elektron mikroskopik bulgular ile desteklenmiştir. FSH ve LH hormonlarının sentez aktivitesindeki artışın, bu hormonların etkili olduğu genital sistemin gelişimini de olumlu yönde etkileyeceği sonucuna varılmıştır (37, 39, 40). Çalışmamızda, özellikle puberte döneminde deney grubunun kontrol grubundan daha fazla mitotik aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Bu bulgu, CAP'ın puberte döneminde daha etkin bir proliferatif etki sağladığını düşündürmektedir.

Erdost ve arkadaşları (108), farelere 21. günden itibaren s.c capsaicin uygulaması sonucunda canlı ağırlıklarının değerlendirmesini yaparak tüm deney gruplarındaki hayvanların kontrol gruplarına oranla daha fazla olduğunu saptamışlardır. Yapılan bu tez çalışmasında ise yem ilavesi olarak oral yoldan verilen CAP'ın hem puberte hem de erişkin dönemde canlı ağırlıkta azalmaya sebebiyet vermesi, subkutan CAP uygulaması sonucu elde edilen bulgular ile ters düşmektedir. Bu bulgular subkutan CAP uygulamasının tersine oral yoldan yemle birlikte alınan CAP'ın canlı ağırlık kazancına etkisinin farklı olduğunu düşündürmektedir.

Ayrıca capsaicinin karbonhidrat metabolizmasını ve karaciğer enzimlerinin aktivitesini arttırdığı, lipid metabolizmasını uyararak yağ dokudaki lipidin yakılmasını kolaylaştırdığı (33), oksijen tüketimini arttırdığı, solunumu başlangıçta arttırdığı sonra azalttığı, serum glikoz ve insülin seviyesini arttırdığı, 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 belirtilmiştir (33-35). Çalışmamızda bu biyokimyasal değerlendirmeleri yapamamakla birlikte bu bulgulara ilave olarak yem tüketiminin deney grubunda belirgin derecede artmış olması, her iki yaş döneminde de deney grubu farelerde belirgin bir hareketlilik gözlenmesi, yem tüketimi artmasına rağmen, canlı ağırlık kazancının azalmış olması CAP'ın metabolizma üzerindeki uyarıcı etkisini bir kez daha göstermiştir.

Rat testis dokusundaki ghrelinin ekspresyonu, özellikle erişkin ratlarda (60-90 günlük) en yüksek düzeyde, infantil-prepubertal ratlarda ise düşük düzeylerde saptanmıştır (7). İmmunreaktif ghrelin hücreleri, rat, koyun, insan gibi çeşitli türlerin, testis dokusunda Leydig hücreleri ve Sertoli hücrelerinde tanımlanmıştır (25). Ratlarda sadece Leydig hücrelerinde ekspresyonun bulunduğu, Sertoli hücrelerinde immunreaksiyonun negatif olduğu bildirilmiştir (7). Ancak daha sonraki yıllarda Arakawa ve arkadaşları'nın (109) farelerde yaptığı çalışmada, Sertoli hücrelerinde de ghrelin üretiminin ve salınımının olduğu RIA yöntemi

kullanılarak gösterilmiştir. İnsanlarda yapılan bir başka çalışmada ise Leydig hücrelerine ek olarak seminifer tubul içerisinde Sertoli hücrelerinde de immunreaksiyonun olduğu bildirilmiş, spermatogenezisin herhangi bir aşamasındaki germ hücrelerinde ise immunpozitif hücreye rastlanmadığı belirtilmiştir (25). Araştırmamızda da intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde ve seminifer tubul içerisindeki Sertoli hücrelerinde ghrelin immunpozitif reaksiyon görülmüştür ancak spermatogenik serideki hücrelerde ghrelin pozitif reaksiyona rastlanmamıştır. Reaksiyon özellikle Leydig hücrelerinde kuvvetli olup, Leydig ve Sertoli hücrelerinde lokalizasyon hücre sitoplazmasında granüler tarzda dağılım göstermiştir.

Puberte ve erişkin dönemde, CAP ilavesi yapılmış rasyonla beslenen deney grubu farelerde, Leydig hücrelerindeki ghrelin reaksiyonunun kontrol grubundaki farelere göre daha az yoğunlukta olduğu gözlenmiştir. Barreiro ve arkadaşları (110), ghrelinin Leydig hücreleri üzerinde düzenleyici rol oynadığını ve bu rolün antiproliferatif olarak ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Ratlara dışarıdan ghrelin verilmesi, immatür Leydig hücrelerinin proliferasyonunda dikkate değer bir azalmaya neden olduğunu, bu etkisini gösterirken, intersitisyumdaki diğer mezenşimal kökenli hücreleri (bağ dokusu hücreleri gibi) etkilemediğini açıklamışlardır (110). Araştırmamızda, yemle birlikte oral yoldan verdiğimiz CAP deney grubu Leydig hücrelerinde ghrelin ekspresyonunun azalmasına sebep olmuş ve her iki döneme ait deney gruplarında, tubul içerisindeki spermatogenik hücre dizisinde de gözle görülür bir artış sağlanmıştır. Bu bulgular Barreiro ve arkadaşları'nın (110) çalışmalarına paralel olup, azalan ghrelinin dolaylı olarak tubul içerisindeki hücreleri proliferatif yönde etkilemiş olabileceğini düşündürmektedir.

Ghrelinin Sertoli hücreleri üzerinden de Leydig hücrelerinin fonksiyonlarını etkilediğini bildiren araştırmacılar (110), stem cell factor (SCF) ile anti-Mullerian hormon (AMH) gibi Sertoli hücrelerinden köken alan ve Leydig hücrelerinin proliferasyonunda rol oynayan önemli moleküllerin, ghrelin tarafından etkilendiğini yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. Ghrelinin testosteron üzerindeki steroidogenik etkisine ek olarak, direkt seminifer tubul fonksiyonlarına da etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği gibi, GHSR tip1a demonstrasyonu testisin tubuler kompartmanı içerisinde de yapılmıştır (111). Çalışmamızda Sertoli hücrelerindeki ghrelin ekspresyonu deney ile kontrol grupları arasında bir farklılık göstermemiştir ancak deney gruplarında hücrenin en önemli fonksiyonu olan spermatogenik hücre serisindeki artış belirgindir.

Gerçekleştirdiğimiz tez projesinin temel hedefi postnatal gelişme dönemlerinde, capsaicin ilavesi yapılmış yemle beslenen farelerin testislerinin ghrelin peptidi yönünden değerlendirilmesidir. Elde edilen sonuçlar özet olarak:

- Hem puberte hem de erişkin deney grubu farelerde aşırı hareketlilik gözlemlendi.

- Canlı ağırlık kazancı yönünden çalışma değerlendirildiğinde, hem puberte hem de erişkin dönemde canlı ağırlık kazancının deney gruplarında kontrol gruplarına oranla daha az olduğu ve istatistiki önem gösterdiği saptandı.

- Yem tüketimlerinde ise deney gruplarını oluşturan farelerin kontrol gruplarına oranla daha fazla yem tükettikleri ancak daha fazla yem tüketerek daha az canlı ağırlık kazandıkları görüldü.

- Puberte ve erişkin dönemlerde özellikle deney grubunda tubulus duvarında spermatojenik hücre serisinde artış saptandı.

- Ghrelin antikorlu ile yapılan immunohistokimyasal boyama sonucunda fare testisinde Leydig ve Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon ilk olarak gösterilerek literatür bilgisine katkı sağlandı. Spermatogenik seride herhangi bir reaksiyon görülmedi.

- Hem puberte hem de erişkin dönem deney grubu Leydig hücrelerinde, ghrelin immunreaksiyonu kontrol gruplarına oranla daha az boyanma yoğunluğu gösterdi.

- Sertoli hücrelerindeki ghrelin immunreaksiyonu ise, puberte dönemi farelerde erişkin döneme oranla daha fazla boyanma yoğunluğu gösterdi.

Sonuç olarak hazırlanan bu tez çalışması ile ghrelinin fare testisindeki lokalizasyonu ve capsaicinin ghrelin üzerindeki etkisi ilk defa immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Yem ilavesi olarak düşük doz, uzun süre CAP uygulamasının testiste ghrelin ekspresyonunu azalttığı ve spermatogenik hücre serisini olumlu yönde etkilediği görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, NAKAZATO M, MATSUO H, KANGAWA K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402:656-660, 1999.
2. TANAKA M, HAYASHIDA Y, IGUCHI T, NAKAO N, NAKAI N, NAKASHIMA K. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. *Endocrinology*, 142 (8): 3697-3700, 2001.
3. DATE Y, KOJIMA M, HOSODA H, SAWAGUCHI A, MONDAL MS, SUGANUMA T, MATSUKURA S, KANGAWA K, NAKAZATO M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 141 (11): 4255-4261, 2000.
4. PAPOTTI M, GHE C, CASSONI P, CATAPANO F, DEGHENGI R, GHIGO E, MUCCIOLI G. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85: 3803-3807, 2000.
5. KOJIMA M, HOSODA H, MATSUO H, KANGAWA K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 12: 118–122, 2001.
6. GNANAPAVAN S, KOLA B, BUSTIN SA, MORRIS DG, MCGEE P, FAIRCLOUGH P, BHATTACHARYA S, CARPENTER R, GROSSMAN AB, KORBONITS M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87: 2988-2991, 2002.
7. TENA-SEMPERE M, BARREIRO ML, GONZALEZ LC, GAYTAN F, ZHANG FP, CAMINOS JE, PINILLA L, CASANUEVA FF, DIEGUEZ C, AGUILAR E. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*, 143: 717–725, 2002.
8. TOLLE V, ZIZZARI P, TOMASETTO C, RIO MC, EPELBAUM J, BLUET-PAJOT MT. In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, 73: 54-61, 2001.
9. WREN AM, SMALL CJ, WARD HL. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 141: 4325-4328, 2000.
10. TAKAYA K, ARIYASU H, KANAMOTO N. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85: 4908–4911, 2000.
11. BROGLIO F, VAN KOETSVELD P, BENSO A, GOTTERO C, PRODAM F, PAPOTTI M, MUCCIOLI G, GAUNA C, HOFLAND L, DEGHENGI R, ARVAT E, VAN DER LELY AJ, GHIGO E. Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(10): 4829-4832, 2002.

12. YILMAZ B. Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. Birinci basım, Feryal Matbaacılık, Ankara, sayfa 294-296, 1999.
13. TSCHOP M, SMILEY DL, HEIMAN ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407: 908–913, 2000.
14. SORIANO-GUILLEN L, BARRIOS V, CAMPOS-BARROS A, ARGENTE J. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *Journal of Pediatrics*, 144: 36-42, 2004.
15. CUMMINGS E, PURNELL JQ, FRAYO SR. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 50: 1714-1719, 2001.
16. DE AMBROGI M, VOLPE S, TAMANINI C. Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptidyl hormone. *Medical Science Monitor*, 9: 217-224, 2003.
17. CIAMPANI T, FABBRI A, ISIDORI A, DUFAU ML. Growth hormone-releasing hormone is produced by rat Leydig cell in culture and acts as a positive regulator of Leydig cell function. *Endocrinology*, 131: 2785–2792, 1992.
18. BAKER J, HARDY MP, ZHOU J, BONDY C, LUPU F, BELLVE AR, EFSTRATIADIS A. Effects of an igfl gene null mutation on mouse reproduction. *Molecular Endocrinology*, 10: 903-18, 1996.
19. TENA-SEMPERE M, PINILLA L, GONZALEZ LC, DIEGUEZ C, CASANUEVA FF, AGUILAR E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *Journal of Endocrinology*, 161(2): 211-218, 1999.
20. COWLEY MA, SMITH RG, DIANO S. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 37: 649–661, 2003.
21. LU S, GUAN JL, WANG QP, UEHARA K, YAMADA S, GOTO N, DATE Y, NAKAZATO M, KOJIMA M, KANGAWA K, SHIODA S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*, 321: 157–160, 2002.
22. FURUTA M, FUNABASHI T, KIMURA F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288: 780-785, 2001.
23. BARREIRO ML, TENA-SEMPERE M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 226: 1–9, 2004.
24. FERNANDEZ-FERNANDEZ R, TENA-SEMPERE M, AGUILAR E, PINILLA L. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neuroscience Letters*, 362: 103–107, 2004.
25. GAYTAN F, BARREIRO ML, CAMINOS JE, CHOPIN LK, HERINGTON AC, MORALES C, PINILLA L, PANIAGUA R, NISTAL M, CASANUEVA FF, AGUILAR E,

- DIEGUEZ C, TENA-SEMPERE M. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(1): 400–409, 2004.
- 26.** MILLER DW, HARRISON JL, BROWN YA , DOYLE U, LINDSAY A, ADAM CL, LEA RG. Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3: 60-74, 2005.
- 27.** JENSEN RS, MCLEAD MJ, ESHBAUGH WH, GUTTMAN SI. Numerical taxonomic analyses of allozymic variation in *Capsicum* (*Solanacea*). *Taxonomy*, 28 : 315 – 327, 1979.
- 28.** LEMBECK F. Columbus, capsicum and capsaicin: past, present and future. *Acta Physiology of Hungary*, 69: 265 – 273, 1987.
- 29.** PYAN PG, LEVINE JD, GOETZL EJ. Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *Journal of Immunology*, 132: 1601 – 1604, 1984.
- 30.** KRESS M, GUTHMAN C, AVERBECK B, REEH PW. Calcitonin gene related peptid and prostaglandin E 2 but not substance P release induced by antidromic nerve stimulation from rat skin in vitro. *Neuroscience*, 89: 303 – 310, 1999.
- 31.** RASHID MH, INOUE M, KONDO S, KAWASHIMA T, BAKOSHI S, UEDA H. Novel expression of vanilloid receptor 1 on capsaicin – intensive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. *Journal of Pharmacology*, 304 (3): 940- 948, 2003.
- 32.** DURGA PM, NAU C. Desensitization of capsaicin – currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP – dependent kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 50080 – 50090, 2003.
- 33.** MONSEREENUSORN Y. Subchronic toxicity studies of capsaicin and capsicum in rats. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 41: 95 – 110, 1983.
- 34.** KAWADA T. Some pungent principles of spices cause the adrenal medulla to secrete catecholamine in anesthetized rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 188 (2): 229 – 233, 1988.
- 35.** LIM K. Dietary red pepper ingestion increases carbohydrate oxidation at rest and during exercise in runners. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 29 (3): 355 – 361, 1997.
- 36.** ÖZER A, ERDOST H, ZIK B, ÖZFİLİZ N. Horozlarda Acı Kırmızı Biberli Rasyonla Beslemenin Reprodüktif Sistem Organları Üzerine Etkisinin Histolojik Yönden İncelenmesi. UÜ Araştırma Fonu Proje No: 98/21, 2001.
- 37.** 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.

- 38.** ERDOST H, YAKIŞIK M, ÖZFİLİZ N, ZIK B, ÇAVUŞOĞLU İ, KAHVECİ 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), Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, (2000).
- 39.** ERDOST H, ÖZER A, YAKIŞIK M, ÖZFİLİZ N, ZIK B. FSH and LH cells in the laying hens and cocks, fed with a diet containing red hot pepper. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol 4 (1): 119-23, 2006.
- 40.** ERDOST H, ÇAVUŞOĞLU İ, YAKIŞIK M, ÖZFİLİZ N, ZIK B. Gonadotrophs in the chicken, fed with a diet containing red hot pepper. *Indian Veterinary Journal*, 83: 419-423, 2006.
- 41.** ERDOST H, ÖZER A, ÖZFİLİZ N, ÖZGÜDEN C, ÖNEN Ş, İLHAN T. Gelişme süreci içinde capsaicin uygulanmış fare testislerinde vanilloid reseptör 1 (VR1) ve substance-P (SP). (U.Ü. Proje No: V-2003/82), Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2003.
- 42.** ÖZGÜDEN AKKOÇ CG. Postnatal gelişme dönemlerinde capsaicin uygulanan fare testislerinde transforming growth factor β 'nın immunohistokimyasal ekspresyonu. (Doktora Tezi), Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
- 43.** STEVENS A, LOWE J. *Human histology*, 2nd edition, Mosby Press, London, page 309-325, 1997.
- 44.** ARTAN E. *Histoloji*, 1.baskı, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, sayfa 357-375, 1988.
- 45.** PEKER Ş. *Histoloji*, 1.baskı, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, sayfa 260-287, 1990.
- 46.** RUSSELL LD, ETTLIN RA, HIKİM APS, CLEG ED. *Histological and histopatological evaluation of the testis*, Cache River Press, USA, page 1-160, 1990.
- 47.** BANKS WJ. *Applied veterinary histology*, 2nd edition, Williams&Wilkins Press, Baltimore, page 489–505, 1985.
- 48.** JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, KELLEY RO. *Basic histology (Temel Histoloji)*. Çeviren: AYTEKİN Y. 6. baskı, Barış Kitabevi, İstanbul, sayfa 495-516, 1993.
- 49.** ROSS MH, Kaye IG, Pawlina W. *Histology a text and atlas*, 4th edition, Lippincott Williams & Wilkins Press, USA, page 690–4, 2003.
- 50.** GÜRSOY E, KOPTAGEL E. *Embriyoloji Atlası*, 1. baskı, Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas, sayfa 6–30, 1997.
- 51.** ESHBAUGH WH. A nomenclatural note on the genus capsicum. *Taxonomy*, 17: 51-52, 1968.
- 52.** LOPEZ-HERNANDEZ J, ORUNA-CONCHA MJ, SIMAL-LOZANE J, GONZALES-CASTRO MJ, VARQUEZ-BLANCO ME. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin

in cayenne pepper and parden peppers by HPLC. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 92: 393-395, 1996.

53. GOVINDARAJAN VS. Capsicum-production, technology, chemistry and quality-Part II. Processed products, standarts, world production and trade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 23: 207 – 288, 1986.

54. TAE-WOONG OH, FUKIO OHTA. Dose-dependent effect of capsaicin on endurance capacity in rats. *British Journal of Nutrition*, 90: 515-520, 2003.

55. YOUNG-SOON S. More than spice: capsaicin in hot chilli peppers makes tumor cells commit suicide. *Journal of the National Cancer Institue*, 94: 1263-1265, 2002.

56. SZALLASI A, BLUMBERG PM. Vanilliod (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews*, 51: 159-211, 1999.

57. CATERINA MJ, JULIUS D. Sense and spesificity: a molecular identity for nociceptors. *Current Opininion Neurobiology*, 9: 525-530, 1999.

58. SZALLASI A. Vanilloid receptor ligands: hopes and realities for the future. *Drugs and aging*, 18: 561-573, 2001.

59. SZALLASI A, BLUMBERG PM. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life Science*, 47: 1399-1408, 1990.

60. CATERINA MJ, LEFFLER A, MALMBERG AB, MARTIN WJ, TRAFTON J, PETERSEN-ZEITZ KR, KOLTZENBURG M, BASBAUM AI, JULIUS D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288: 306-313, 2000.

61. GEPETTI P, TREVISONI M. Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and fuction. *British Journal of Pharmacology*, 141: 1313-1320, 2004.

62. STAINISZ AM, BEFUS D, BIENENSTOCK J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunglobulin synthesis and proliferations by lymph nodes, and spleen. *Journal of Immunology*, 136: 152-156, 1986.

63. KRISHA A, GHASH JJ. Capsaicin pretreatment protects free radical induced rat lung damage on exposure to gaseous chemical lung irritants. *Phytotherapy Research*, 3: 159-161, 1989.

64. LIU L, SIMON SA. Asidic stimuli activates two distinct patways in taste receptor cells from rat fungiform papillae. *Brain Research*, 923: 58-70, 2001.

65. LIN W, OGURA T, KINNAMAN SC. Asid-activated cation currents in rat vallate taste receptor cells. *Journal of Neurophysiology*, 88: 133-141, 2002.

66. SZALLASI A. The vanilloid receptor: receptor types and species differences. *General Pharmacology*, 25(2): 223-43, 1994.
67. WREN AM, SEAL LJ, COHEN MA, BRYNES AE, FROST GS, MURPHY KG, DHILLO WS, GHATEI MA, BLOOM SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86 (12): 5992, 2001.
68. ANGELONI SV, GLYNN N, AMBROSINI G, GARANT MJ, HIGLEY JD, SUOMI S, HANSEN BC. Characterization of the rhesus monkey ghrelin gene and factors influencing ghrelin gene expression and fasting plasma levels. *Endocrinology*, 145 (5): 2197- 2205, 2004.
69. AYDIN S, ÖZKAN Y, ÇAYLAK E, AYDIN S. Ghrelin and its biochemical functions. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26: 272-283, 2006.
70. LITWACK G. GHRELIN, Vol:77, first edition, Elsevier, USA, Page 13-25, 2008.
71. KORBONITS M, GOLDSTONE AP, GUEORGUIEV M, GROSSMAN AB. Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25: 27-68, 2004.
72. KOJIMA M, KANGAWA K. Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews*, 85: 495-522, 2005.
73. MCKEE KK, PALYHA OC, FEIGHNER SD, HRENIUK DL, TAN CP, PHILLIPS MS, SMITH RG, VAN DER PLOEG LH, HOWARD AD. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors, *Molecular Endocrinology*, 11: 415–423, 1997.
74. SMITH RG, VAN DER PLOEG LHT, HOWARD AD, FEIGHNER SD, CHENG K, HICKEY GJ, WYVRATT MJ, FISHER MH, NARGUND RP, PATCHETT AA. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocrine Reviews*, 18: 621–645, 1997.
75. CAPELLA C, VASSALLO G, SOLCIA E. Light and electron microscopic identification of the histamine-storing argyrophil (ECL) cell in murine stomach and of its equivalent in other mammals. *Zeitschrift Fuer Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 118: 68–84, 1971.
76. BORDI C, DADDA T, AZZONI C, FERRARO G. Classification of gastric endocrine cells at the light and electron microscopical levels. *Microscopy Research and Technique*. 48: 258–271, 2000.
77. DAVIS JC. The relation between the pancreatic alpha cells and certain cells in the gastric mucosa. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 67 (1): 237-240, 1954.
78. DZAJA A, DALAL MA, HIMMERICH H, UHR M, POLLMACHER T, SCHULD A. Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 286: 963-967, 2004.

- 79.** TSCHOP M, WEYER C, TATARANNI PA, DEVANARAYAN V, RAVUSSIN E, HEIMAN ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 50: 707–709, 2001.
- 80.** ARIYASU H, TAKAYA K, TAGAMI T, OGAWA Y, HOSODA K, AKAMIZU T, SUDA M, KOH T, NATSUI K, TOYOOKA S, SHIRAKAMI G, USUI T, SHIMATSU A, DOI K, HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86: 4753-4758, 2001.
- 81.** KIERSON JA, DIMATTEO DM, LOCKE RG. Ghrelin and cholecystokinin in term and preterm human breast milk. *Acta Paediatrica*, 95: 991–995, 2006.
- 82.** AYDIN S, HALİFEOĞLU I, ÖZERCAN IH, ERMAN F, KILIÇ N, AYDIN S, İLHAN N, ÖZKAN Y, AKPOLAT N, SERT L, ÇAYLAK E. A comparison of leptin and ghrelin levels in plasma and saliva of young healthy subjects. *Peptides*, 26: 647-652, 2005.
- 83.** GROSCHL M, TOPF HG, BOHLENDER J. Identification of ghrelin in human saliva: Production by the salivary glands and potential role in proliferation of oral keratinocytes. *Clinical Chemistry*, 51: 997-1006, 2005.
- 84.** WIERUP N, SVENSSON H, MULDER H, SUNDLER F. The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory Peptides*, 107: 63-69, 2002.
- 85.** MITCHELL SE, NOGUEIRAS R, RANCE K, RAYNER DV, WOOD S, DIEGUEZ C, WILLIAMS LM. Circulating hormones and hypothalamic energy balance: regulatory gene expression in the Lou/C and Wistar rats. *Journal of Endocrinology*, 190 (3): 571-579, 2006.
- 86.** MORI K, YOSHIMOTO A, TAKAYA K, HOSODA K, ARIYASU H, YAHATA K, MUKOYAMA M, SUGAWARA A, HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS letters*, 486 (3): 213-216, 2000.
- 87.** CAMINOS JE, GUALILLO O, LAGO F, OTERO M, BLANCO M, GALLEGO R, GARCIA-CABALLERO T, GOLDRING MB, CASANUEVA FF, GOMEZ-REINO JJ, DIEGUEZ C. The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology*, 146 (3): 1285-1292, 2005.
- 88.** HATAYA Y, AKAMIZU T, TAKAYA K, KANAMOTO N, ARIYASU H, SAIJO M, MORIYAMA K, SHIMATSU A, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86: 552-4555, 2001.
- 89.** MORTON GJ, SCHWARTZ MW. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, 25: 56-62, 2001.
- 90.** NAGAYA N, KANGAWA K. Ghrelin, a novel growth hormone releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure. *Regulatory Peptides*, 114 (2-3): 71-77, 2003.

- 91.** DORNONVILLE DE LA COUR C, LINDSTROM E, NORLEN P, HAKANSON R. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regulatory Peptides*, 120: 23-32, 2004.
- 92.** CASSONI P, PAPOTTI M, GHE C, CATAPANO F, SAPINO A, GRAZIANI A, DEGHENGI R, REISSMANN T, GHIGO E, MUCCIOLI G. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86: 1738-1745, 2001.
- 93.** DRUCE M, BLOOM SR. Central regulators of food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 6: 361-367, 2003.
- 94.** DATE Y, MURAKAMI N, KOJIMA M, KUROIWA T, MATSUKURA S, KANGAWA K, NAKAZATO M. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275 (2): 477-480, 2000.
- 95.** ARVAT E, DI VITO L, BROGLIO F, PAPOTTI M, MUCCIOLI G, DIEGUEZ C, CASANUEVA FF, DEGHENGI R, CAMANNI F, GHIGO E. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *Journal of Endocrinological Investigation*, 23(8): 493-495, 2000.
- 96.** PEINO R, BALDELLI R, RODRIGUEZ-GARCIA J, RODRIGUEZ-SEGADE S, KOJIMA M, KANGAWA K, ARVAT E, GHIGO E, DIEGUEZ C, CASANUEVA FF. Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *European Journal of Endocrinology*, 143 (6): 11-14, 2000.
- 97.** KAIYA H, VAN DER GEYTEN S, KOJIMA M, HOSODA H, KITAJIMA Y, MATSUMOTO M, GEELISSEN S, DARRAS VM, KANGAWA K. Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology*, 143 (9): 3454-3463, 2002.
- 98.** KAIYA H, KOJIMA M, HOSODA H, MORIYAMA S, TAKAHASHI A, KAWAUCHI H, KANGAWA K. Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*, 144 (12): 5215-5226, 2003.
- 99.** UNNIAPPAN S, LIN X, CERVINI L, RIVIER J, KAIYA H, KANGAWA K, PETER RE. Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology*, 143 (10): 4143-4146, 2002.
- 100.** DATE Y, MURAKAMI N, TOSHINAI K, MATSUKURA S, NIIJIMA A, MATSUO H, KANGAWA K, NAKAZATO M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, 123 (4): 1120-1128, 2002.
- 101.** CROSSMON C. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anatomical Record*, 69: 33-38, 1937.

- 102.** SÜMBÜLOĞLU K, SÜMBÜLOĞLU U. Biyoistatistik, Özdemir Yayıncılık, Ankara, 1994.
- 103.** TRAURIG HH, 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.
- 104.** PARK ES, JO S, YI SJ, KIM JS, LEE HS, LEE IS, SEO KM, SUNG JK, LEE I, YOON YS. 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.
- 105.** OKTAY E, OLGUN H. Kırmızı biberin New Hampshire tavuklarında yumurta verimi, yumurta kalitesi ve kuluçka kalitesine etkisi, IV. Bilim Kongresi, Ankara-Türkiye, sayfa: 1-6, 1973.
- 106.** FURUSE M, MAKAJIMA SI, MIYAGAWA S, NAKAGAWA J, OKUMARA JI. Feeding behavior, abdominal fat and laying performance in laying hens given diets containing red pepper. *Japanese Poultry Science*, 31(1): 45-52, 1994.
- 107.** ÖZER A, ZİK B, ERDOST H, ÖZFİLİZ N. Histological investigations on the effects of feeding with a diet containing red hot pepper on the reproductive system organs of the cock. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30: 7-15, 2006.
- 108.** ERDOST H, ÖZFİLİZ N, ÖZGÜDEN C, GÜNEŞ N, TÜTÜNCÜ Ş, İLHAN T, ÖZER A. Expression of capsaicin receptor (VR1) in the testes of mice after an application of capsaicin. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51: 649-653, 2007.
- 109.** ARAKAWA Y, YAMANISHI S, MATSUMOTO S, KATO I, YU X, YANAIHARA H, KUROKAWA N. Ghrelin is expressed in and released from mouse testicular Sertoli TM4 cells. *Biomedical Research*, 25(5): 245-248, 2004.
- 110.** BARREIRO ML, GAYTAN F, CASTELLANO JM, SUOMINEN JS, ROA J, GAYTAN M, AGUILAR E, DIEGUEZ C, TOPPARI J, TENA-SEMPERE M. Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger RNA expression in rat testis. *Endocrinology*, 145: 4825-4834, 2004.
- 111.** BARREIRO ML, SUOMINEN JS, GAYTAN F, PINILLA L, CHOPIN LK, CASANUEVA FF, DIEGUEZ C, AGUILAR E, TOPPARI J, TENA-SEMPERE M. Developmental, stage-specific, and hormonally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. *Biology of Reproduction*, 68: 1631-1640, 2003.

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesi, planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması aşamalarında yardımlarını esirgemeyerek her zaman yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice ERDOST'a sonsuz teşekkür ederim. Tüm çalışma boyunca her türlü yardımlarından dolayı, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Aytekin ÖZER, Sayın Prof. Dr. Nesrin ÖZFİLİZ, Sayın Prof. Dr. Berrin ZİK ve Sayın Yard. Doç. Dr. Nazmiye GÜNEŞ'e teşekkürü bir borç bilirim. Doktora başladığım ilk günden, tezimi hazırladığım bugüne kadar yanımda olan ve beni yalnız bırakmayan çalışma arkadaşlarım Sayın Araş. Gör. Dr. Cansel G. ÖZGÜDEN AKKOÇ ve Sayın Yard. Doç. Dr. Şerife TÛTÛNCÛ'ye, özellikle laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Laborant Sayın Nesrin SALÇA'ya teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren ve her zaman yanımda olan sevgili ailem, annem Sayın Ayten İLHAN, babam Sayın Hasan İLHAN ve kardeşim Sayın Bahar İLHAN'a sonsuz teşekkürler.

ÖZGEÇMİŞ

Kırklareli 1979 doğumluyum. İlköğretimimi Ankara Aydınlikevler İlkokulu'nda, orta ve lise eğitim-öğretimimi Ankara Yıldırım Bayezit Anadolu Lisesi'nde ve Muğla Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde lisans eğitimime başlayarak 2003 yılında mezun oldum. 2004 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu doktora sınavını kazanarak Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. 2005 yılında aynı anabilim dalına araştırma görevlisi olarak atandım. Bekarım.