



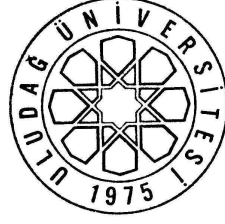
T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

POSTNATAL GELİŞME DÖNEMLERİNDE CAPSAİCİN UYGULANAN FARE
TESTİSLERİNDE TRANSFORMING GROWTH FACTOR β ' NİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL EKSPRESYONU

Cansel G. ÖZGÜDEN AKKOÇ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2007



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

POSTNATAL GELİŞME DÖNEMLERİNDE CAPSAİCİN UYGULANAN FARE
TESTİSLERİNDE TRANSFORMING GROWTH FACTOR β ' NİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL EKSPRESYONU

Cansel G. ÖZGÜDEN AKKOÇ

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Aytekin ÖZER

BURSA-2007

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüęü'ne,

Bu tez, jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Aytekin ÖZER	
Üye	Prof. Dr. Bahri YILDIZ	
Üye	Prof. Dr. Nesrin ÖZFİLİZ	
Üye	Prof. Dr. Hatice ERDOST	
Üye	Doç. Dr. Levent ERGÜN	

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih, sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	5
GEREÇ ve YÖNTEM.....	17
BULGULAR.....	23
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR.....	49
TEŞEKKÜR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	57

ÖZET

Bu çalışmada postnatal gelişme sürecinde Capsaicin uygulanan farelerin testislerinde, Capsaicin'in TGF- β 'nın lokalizasyonu ve ekspresyonu üzerine etkisi incelenmiştir.

Çalışmada 30 adet fareden oluşan deney grubuna 21 günlük yaşa ulaşınca 1 hafta boyunca her gün 1mg/kg dozda Capsaicin'in subkutan uygulaması yapılmıştır. Ardından fareler 1 hafta dinlendirilmiştir. Bu uygulama fareler 75 günlük yaşa ulaşmaya kadar devam etmiştir. Kontrol grubunu oluşturan farelere de aynı deney grubundaki farelerde olduğu gibi subkutan enjeksiyon yapılmış, fakat Capsaicin yerine serum fizyolojik kullanılmıştır. Bu süreçte deney ve kontrol grubundan 35. günde (puberte dönemi), 50. günde (puberte sonrası dönem) ve 75. günde (erişkin dönem) 10'ar hayvan servikal dislokasyon ile öldürülmüştür. Hayvanların testislerinin morfolojik yapısı incelenmiş ve TGF β -1 ve TGF β -2'nin immunohistokimyasal demonstrasyonu yapılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre; Capsaicin fare testislerinde tubulus seminiferus kontortusların çaplarının büyümesine neden olmaktadır. Çapları büyüyen seminifer tubuluslarda aynı dönemde kontrol grubuna göre, primer spermatosit, genç ve olgun spermatid sayılarında yoğunluk göze çarpmaktadır. Capsaicin enjeksiyonu 35 günlük deney grubunda Leydig hücrelerinde TGF- β ₁ ekspresyonunun şiddetlenmesine neden olurken 75 günlük deney grubunda da olgun spermatidlerde TGF- β ₂ ekspresyonunun şiddetlenmesine neden olmuştur.

Anahtar kelimeler: Capsaicin, fare, TGF- β , testis.

SUMMARY

The Immunohistochemical Expression of TGF- β in Capsaicin Injected Mice Testis at the Postnatal Development Period

In this study, it was examined the effects of capsaicin on the existence of TGF- β in Capsaicin injected mice testis at the postnatal development period.

In the experiment group, a total of 30 mice, at 21 day of age, were injected subcutaneously 1mg/kg doses of capsaicin everyday during one week, and then, the animals were allowed to rest for one week. The same procedure was repeated until the mice reach to 75 day of age. In control groups, mice were injected subcutaneously with serum physiologic as in the experiment group. During this period, 10 animals from both experiment and control groups, were sacrificed via cervical dislocation at the 35th, 50th and 75th days of age. The immunohistochemical demonstration of TGF- β_1 , TGF- β_2 and morphologic structure of testes were examined.

As a conclusion, our results show that the effect of capsaicin is caused to become larger seminiferous tubules. The capsaicin injected mice's seminiferous tubules have more primer spermatocytes, early and late spermatids than control groups. In addition that the expression of TGF- β_1 in Leydig cells at the 35th days of age mice and also the expression of TGF- β_2 in late spermatids at the 75th days of age mice are more intenseness in experiment groups.

Key words: Capsaicin, mouse, TGF- β , testis

GİRİŞ

Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), ilk olarak 1980'lerin başında epitel hücre kültüründe izole edilmiştir ve günümüzdeki formları da hızla bulunmuştur. TGF- β ismi epitel hücre kültürlerindeki hücrelerde şekillendirdiği fenotipik transformasyon nedeni ile verilmiştir (1, 2).

TGF- β ailesi yapısal benzerliklerine rağmen içerdikleri değişik polipeptidler nedeni ile 5 alt gruba ayrılır. Bunlar TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 , TGF- β_4 ve TGF- β_5 'tir. TGF- β_1 , TGF- β_2 ve TGF- β_3 memelilerde izole edilirken, TGF- β_4 ve TGF- β_5 ise kuşlarda ve *Xenopus laevis*'te izole edilmiştir. TGF- β_1 endotel, hematopoietik ve bağ doku hücrelerinde eksprese edilirken, TGF- β_2 epitel ve nöral hücrelerde, TGF- β_3 mezenşimal hücrelerde eksprese edilmiştir (3).

TGF- β , çoğu mezenşimal, endotelial ve hemapoetik kök hücrelerde (hemositoblastlar), hücre çoğalması için potansiyel bir inhibitördür ve hücreyel çoğalmayı düzenler. Soma hücreleri dört basamaklı bir hücre siklusu içinde çoğalırlar. G₁ fazında, protein ve RNA sentezlenir, S fazında yeni DNA sentezlenir, G₂ fazında kromozomlar duplike olur ve M fazında da hücre mitoz geçirek iki yeni hücre meydana getirir. TGF- β , hücre siklusunun G₁ fazında siklin-bağlı protein kinaz inhibitörü p15 üretimini stimüle ederek ve hücre siklusu düzenleyicilerinden özellikle siklin-bağlı protein kinazlardan 2 ve 4 ile siklin A ve E'nin üretimini veya fonksiyonunu inhibe edip retinoblastoma genin (Rb) fosforilasyonunu azaltarak etkisini gösterir. Böylelikle hücreyel çoğalma inhibe edilir, hücreyel farklılaşma uyarılır veya apoptozis şekillenir. Kanserli hücrelerde TGF- β sinyal iletim mekanizması zarar gördüğü için bu hücrelerde TGF- β 'ya karşı bir direnç gelişir. Bu nedenle hücre çoğalması kontrol edilemez (4, 5).

Günümüzde TGF- β ailesine ait üyelerin hücreler ile ekstraselüler matriks arasındaki homeostazi sağladığı belirlenmiştir. Hücreler ile ekstraselüler matriks arasındaki bu denge bozulursa hastalıklar ortaya çıkar. TGF- β 'yı vücutta epitelyal, endotelial, hematopoietik, nöral ve bağ dokuya ait hücreler üretirler. TGF- β , hücrelerin büyümesini ve farklılaşmalarını, embriyonik gelişmeyi, yara iyileşmesini, seksüel gelişimi ve anjiyogenezi düzenler. TGF- β üretimindeki azalmalar veya artışlar akciğerde, karaciğerde ve böbreklerde fibrotik hastalıklara neden olurken ayrıca arteroskleroza da neden olabilir (1, 2). TGF- β 'nın diğer önemli bir görevi de ekstraselüler matriksin üretilmesi ve depo edilmesidir. Ekstraselüler matriks iki şekilde üretilir. Birincisi; TGF- β fibroblastları ve

diğer hücreleri uyarak ekstraselüler matriks proteinleri ve integrinleri, fibronektinleri ve kollajenleri de içeren hücre adhezyon proteinlerinin üretimini sağlar. İkincisi ise; ekstraselüler matriksin yıkımına yol açan enzim üretimini azaltır (4).

Kapillar damar oluşumu defektine sahip farelerle yapılan çalışmalarda özellikle TGF- β_1 ya da TGF- β 'nın tip II reseptörünün defektin gelişimini azalttığı saptanmıştır (4).

TGF- β , bütün lökositler tarafından üretilmektedir. Lökositlerin farklılaşmasını sağlarken aşırı çoğalmalarını ve aktive olmalarını da baskılar. TGF- β lökositlerdeki adhezyon moleküllerini düzenler ve bu hücrelerde kemotaktik bir stimulan olarak görev alır (4).

Literatürde TGF- β 'ların belirtilen bu özellikleri ile ilgili fazla miktarda makale bulunmasına karşın, TGF- β ve genital organlarla yapılan çalışmalara çok az sayıda rastlanmıştır. Özellikle testislerde yapılan çalışmalarda TGF- β_1 ve TGF- β_2 'nin fetal, neonatal, puberte ve erişkin rat testislerinde eksprese edildiği bildirilmiştir. Fetal rat testislerinde TGF- β_1 ve TGF- β_2 hem Sertoli hücrelerinde hem de Leydig hücrelerinde eksprese edilirken, TGF- β_1 neonatal rat testislerinde sadece Sertoli hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde eksprese edilmiştir. Puberte dönemindeki rat testislerinde ise TGF- β_1 Sertoli hücrelerinde, gonositlerde ve Leydig hücrelerinde eksprese edilmiş, TGF- β_2 'nin de sadece Leydig hücrelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir. Erişkin dönemdeki rat testislerinde TGF- β_1 sadece Sertoli hücrelerinde ve gonositlerde eksprese edilmiş fakat TGF- β_2 ekspresyonu ise hiçbir hücrede görülmemiştir. Ayrıca bu faktörlerin testis organ kültürlerinde apoptozisi arttırarak germ hücre sayısını düzenledikleri de görülmüştür (6-12).

Çalışmamızda kullanılan Capsaicin (CAP), acı kırmızı biberin etken maddesidir. Acı kırmızı biber Solanacea familyasına dahil olan bir bitkidir ve botanik biliminde Capsicum annuum olarak bilinmektedir. CAP yakıcı, acı, beyaz ve kokusuz özellikte bir alkaloiddir. Acı kırmızı biberin bu aktif komponenti ilk olarak Tresh tarafından 1846 yılında izole edilmiştir. Tresh bu bileşeni CAP olarak isimlendirmiştir (13-15).

Acı kırmızı biberin organizma üzerinde etkilerini inceleyen bilimsel araştırmalar 1990'lı yıllarda yoğunlaşmıştır. Yapılan çoğu çalışmalarda acı kırmızı biber yerine etken madde CAP kullanılmıştır.

CAP organizmada başta gastrointestinal, kardiovasküler ve solunum sistemleri olmak üzere pek çok sistemin histo-fizyolojileri üzerine etkilidir. Son yıllarda fizyolojik ve farmakolojik etkilerinden dolayı tıp alanı ve ilaç sanayinde kullanımı yaygınlaşmıştır. CAP'ın etkisi dozuna, uygulama şekline ve dokuya göre değişiklik göstermektedir (16-18).

CAP'ın topikal uygulanması özellikle ameliyat sonrası nöropatik ağrılarda etkilidir. CAP'ın ağrı duyusu ile doğrudan ilişkili olduğunu açıklığa kavuşturan pek çok çalışma yapılmıştır. CAP sensorik sinirler üzerinde bulunan vanilloid reseptör 1 (VR-1)'e bağlanması ile nöronda depolarizasyona ve nörotransmitter maddelerin, örneğin Substans P (SP) ve kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) salınmasına neden olmaktadır. CAP uygulamasının devam etmesi sensorik sinirlerden SP'nin salınımının tükenmesine ve sinirlerde desensitizasyon yaratarak ağrının ortadan kalkmasına dolayısıyla, nörotoksositeye sebep olur (13, 19-22).

CAP 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, SP damar geçirgenliğini artırır, dolayısıyla reaksiyon bölgesine T lenfositlerin göçü hızlanır. Lenfokinlerin sentezi artar. Yüksek dozda verilen CAP ise SP salınımını arttırarak duraklatır ve dolayısıyla immun sistem üzerine ters bir etki yapar (23-26).

Ayrıca CAP'ın, karbonhidrat metabolizması ve karaciğer enzimlerinin aktivitesini arttırdığı, lipit metabolizmasını uyararak yağ dokudan lipidin mobilizasyonunu kolaylaştırdığı, oksijen tüketimini arttırdığı, solunumu başlangıçta arttırdığı sonra azalttığı, serum glikoz ve insulin 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 (27-33).

Acı kırmızı biber yumurtacı tavuk üreticileri tarafından da kullanılır. Oktay ve Olgun, erişkin tavukların yemlerine acı kırmızı biberi ilave ederek 81 gün süre ile beslemişler, yumurta sarısının renginin koyulaştığını, yumurta veriminin, yemden yararlanmanın ve kuluçka üretiminin etkilenmediğini gözlemişlerdir (34). Furuse ve ark. diyetlerine acı kırmızı biber ilave ettikleri erişkin yumurtacı tavuklarda karın içi yağ miktarında azalma olduğunu, yumurta performansında %3 oranında artış olduğunu bildirmişlerdir (35).

Anabilim dalımızda daha önce sonuçlandırılan DPT ve Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu'na desteklenen 2 projede (36, 37), gelişme döneminde rasyonlarında toksik olmayan dozlarda acı kırmızı biber tüketen tavukların ve horozların reproduktif sistem organlarının daha hızlı geliştiği, acı kırmızı biberin biyolojik aktivatör bir madde olduğu belirtilmiştir (38,39). Bunun üzerine yine Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonunca

desteklenen bir diğer projede, acı kırmızı biberli diyetle beslenen tavuk ve horozlarda üreme organlarının gelişmesinde etkili olabilecek hipofiz ve epifiz bezleri ince yapı düzeyinde incelenmeğe alınmış ve bu çalışmada da elde edilen bulgularla, acı kırmızı biberli beslenmenin üreme organlarının gelişmesini aktive edici yönde olduğu saptanmıştır (40).

Bu çalışmada gelişme süreleri boyunca uygun dozlarda CAP uygulanan farelerin testislerinde, immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak genital sistem organlarının gelişmesinde rolü olduğu bildirilen TGF β 'nın lokalizasyonu ve ekspresyonunun gözlenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Erkek Genital Sistemi

Erkek genital sistemi; testisler, genital boşaltım kanalları (duktus efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus, uretra) ve bu kanallara açılan yardımcı bezler (vezikula seminalis, bulbouretral bez, prostat) ve erkek dış genital organı olan penisten ibarettir (41).

Testis

Testisler, erkek üreme sisteminin esas fonksiyonel organlarıdır. Bir çift tubuler bileşik bez olan bu organlar, skrotum içinde asılı dururlar. Gametlerin üretimi (gametogenezis) ve steroid hormon üretiminden (steroidogenesis) sorumludurlar. Prenatal periyod süresince 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 uygun olan bir ısıdır (41).

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 çevrilidir (42). Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testisten organ içine giren ince fibröz bölmeler organı piramit biçimli lopçuklara ayırır. Her lopçuğun içinde tubulus seminiferus kontortus denen tubuller ve bu tubullerin arasını dolduran gevşek bağ dokulu interstisyum bulunur (43, 44). Tunika albugineadan içeriye uzanan bağ doku miktarında türler arasında farklılıklar vardır. Sıçan, fare ve köpek testisleri çok az intertubuler bağ dokuya sahiptirler (45).

Testis, intersitisyum (intertubuler bölüm) ve tubulus seminiferus kontortuslar olmak üzere iki bölümden oluşur. İntersitisyum organın stromasını oluşturur. Bu bölüm kan ve lenf damarlarından zengindir (45).

İntersitisyumda çeşitli hücre tipleri vardır, bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ doku hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Puberte sırasında sekonder seks karakterlerini belirleyen testosteron hormonunu üretilip, salgılayan

Leydig hücreleri belirir. Bu hücreler steroid hormon sentezleyen hücelere özgü organel ve enzimlerden zengindir, granülsüz endoplazma retikulumu, tubulus tipi mitokondriyonlar, steroid dehidrojenaz enzimi ile testosteronun öncüsü kolesterolü içerir (45-48). Mitokondri sayısı puberte döneminde oldukça artar (47)

Erken fetal hayatta gelişen testiste çok sayıda Leydig hücresi bulunur. Plasental kökenli gonadotropinlerin kan yoluyla fetal testise ulaşip, Leydig hücrelerini uyarması sonucu Leydig hücreleri testosteron sentezlemeye başlar. Sentezledikleri bu hormon erkek genital organlarının embriyolojik farklılaşmasına etkindir. Gebeliğin yarısında tam olarak gelişen Leydig hücreleri daha sonra dejenerasyona uğrarlar, dolayısıyla testosteron düzeyi de giderek düşer. Doğumdan hemen sonra Leydig hücrelerinde atrofi hızlanır. Ancak pubertede hipofiz hormonlarından Luteotropik hormon (LTH) uyarması ile yeniden Leydig hücreleri görülmeye başlamaktadır (44).

Testisin parankimini oluşturan tubulus seminiferus kontortuslar kör uçlarla başlayan kıvrımlanmış, 150-300µm çapında kanalcıklardır. Tubulus seminiferus kontortuslar fibröz bağ doku kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve germinal (seminifer) epitelyumdan oluşur (49). Tüm memeli türlerinde testiste tubulus seminiferus kontortusları çevreleyen myoid hücreler bulunur (50). Myoid hücrelerin spermin tubulus seminiferus kontortuslar içinde ilerletilmesi ve sıvının hareketi için bir güç sağladığı ve Leydig hücrelerinin testosteron uyarısını Sertoli hücrelerine aktarmak suretiyle androjen bağlayıcı protein yapımına katkıda bulunduğu bildirilmektedir (45). Ayrıca büyüme faktörleri yanı sıra plazminojen-aktivatör-inhibitör, kollajen tip I, fibronektin, proteoglikanlar ile bazı sekresyon ürünlerinin yapımında da rol aldığı tespit edilmiştir (49).

Tubulus seminiferus kontortuslar sadece spermatogenik (germinal, seminifer) hücrelerden meydana gelmez. Aynı zamanda Sertoli hücreleri diye adlandırılan destek hücrelerine de sahiptirler (48). Sertoli hücreleri seminifer tubul içinde germ hücreleri arasında yerleşmiş somatik hücrelerdir. Pubertal gelişim esnasında Sertoli hücre bölünmesi durur. Erişkin Sertoli hücre popülasyonu hayvanın yaşamı boyunca sabit olarak kalır (45). Sertoli hücrelerinin bazal bazal membrana ve apikal kısmı tubulus seminiferus kontortusların lumenine doğru uzanır. Işık mikroskopik olarak Sertoli hücrelerinin sınırları zayıf olarak görülmektedir, çünkü bunların çok sayıda lateral uzantıları spermatogenik serideki hücreleri çevreler (47). Oval, ökromatik nükleus genellikle bazalde yerleşmiştir ve belirgin bir nükleolusa sahiptir. Nüklear membranda karakteristik uzunlamasına bir kıvrım görülebilir (46).

Bütün evcil memelilerin Sertoli hücreleri değişen miktarlarda lipid inkluzyonları ve glikojen içerir. Mikrofilamanlar, mikrotubuller ve granülsüz endoplazma retikulumu boldur. Fakat az sayıda granüllü endoplazma retikulumu bulunur. Hücre yüzeyi spermatidler tarafından sık sık derince çentiklenir. Spermatidlerin akrozomal bölgeleri seviyesinde mikrofilamanlar ile ilişkili bir şekilde yüzeysel lokalize olmuş endoplazmik retikulum sisternaları Sertoli hücrelerinin karakteristik özelliğidir. Benzer yapılar bitişik Sertoli hücreleri arasındaki temas bölgelerinde de mevcuttur (50). Sertoli hücreleri, seminifer tubul epiteli içerisinde iki daimi (bazal ve adluminal) bir geçici (ara) kompartman şekillendirir. Bazal kompartmanda spermatogoniumlar ve mayozun erken leptoten fazındaki spermatositler bulunur. Bazo-lateral yüzeylerde Sertoli hücreleri arasında tight junctionlar ve zonula okludens, bazalden adluminal kompartmanı sınırlandırır. Orijinal olarak kan testis bariyeri adı verilen bu bariyer yalnızca Sertoli hücreleri tarafından şekillendirildiği için ve yalnızca Sertoli hücrelerinin bulunduğu kültürde şekillenebildiği ve fonksiyonunu ortaya koyduğu için en uygun olarak Sertoli hücre bariyeri olarak adlandırılır. Ara kompartman olarak bilinen üçüncü kompartman bazalden adluminal kompartmana leptoten hücrelerin geçişi esnasında, tight junctionların yıkılması ve tekrar yenilenmesi ile şekillenir. Ara kompartmanın bulunması, bazalden adluminal kompartmana hücrelerin geçişi esnasında Sertoli hücre bariyerinin bütünlüğünün korunmasını sağlar.

Spermatogonyumların bölünmeleri ve kök hücrelerin yenilenmeleri bazal kompartmanda meydana gelir. Diffuz bir bariyer olan kan-testis bariyeri mayozun komplike sürecinin ve spermiyogenezisin dışarıdan bir sorun olmaksızın meydana gelmesi için bir mikro çevre sağlar. Sertoli hücre bariyeri adluminal kompartmana birçok maddenin girmesine izin verir. Fakat genellikle bu maddelerin çok küçük miktarı tubul lumenine ulaşır. Tubul lumen sıvısında çok daha yüksek konsantrasyonlarda bazı maddelerin bulunması, adluminal kompartman içindeki Sertoli hücreleri ve germ hücreleri tarafından bunların salgılandığını gösterir. Toksinlerin, zehirli maddelerin direkt olarak adluminal germ hücrelerini etkilemesi için ya bariyerin bozulması ya da Sertoli hücrelerinin içerisine girmesi gereklidir (45).

Spermatogonial Hücrelerin Kökeni

Hem erkeklerde hem de dişilerde germ hücre hattının ilk bilinen köken hücresi primordial germ hücreleridir. Epiblast (embriyonal ektoderm) hücrelerinin küçük bir topluluğundan oluşurlar. Bu hücreler allantoisin tabanından genital kıvrıma, arka barsak boyunca göç ederler (51). Farelerde göç esnasında ve fetal yaşamın 13. gününe kadar primordial germ hücreleri çoğalır. Bu hücreler genital kıvrıma ulaştıkları zaman sayıları yaklaşık her gonad da 10.000'e ulaşır (52). Erkek genital kıvrımında, primordial germ hücreleri öncü Sertoli hücreleri olan somatik destek hücreleri tarafından sarılırlar. Primordial germ hücreleri ve Sertoli hücreleri birlikte seminifer kord olarak adlandırılan bir hücre dizisini oluştururlar. Gelişim süresince bu kordlar bir lumen şekillendirir ve böylelikle tubulus seminiferus kontortuslar oluşur. Seminifer kord içerisinde mevcut olan germ hücreleri morfolojik olarak primordial germ hücrelerinden farklıdır ve gonositler olarak adlandırılırlar. Sıçanlarda ve farelerde seminifer kordun şekillenmesinden sonra, gonositler birkaç gün çoğalırlar ve sonra hücre siklusunun G_0/G_1 fazında tutulurlar. Doğumdan çok kısa bir süre sonra gonositler spermatogonium A'yı oluşturmak için yeniden çoğalmaya başlar. Bu olay spermatogenezisin başladığının işaretidir (51).

Spermatogonial Çoğalma ve Kök Hücre Yenilenmesi

Spermatogonyum, çekirdeklerinde heterokromatin içermeyen spermatogonyum A ve bol miktarda heterokromatine sahip spermatogonyum B olmak üzere ikiye ayrılır. Sıçanlarda ve farelerde üçüncü bir tip olan intermediate tip spermatogonyumda görülmektedir. Spermatogonial kompartmanda A_s (A_{single}), A_{pr} (A_{paired}), ve A_{al} (A_{alined}) spermatogonyumlar, tubulus seminiferus kontortusların bazal membranında topoğrafik düzenlerine bağlı olarak ayrılabilirler. A_s spermatogonyumlar spermatogenezisin kök hücreleridir (51, 53). A_s spermatogonyumun bölünmesi üzerine, kardeş hücreler ya birbirlerinden uzaklaşırlar ya da sitokinezis tamamlanmaz. Bu durum hücrelerin birlikte kalmasına ve bir hücreler arası köprü ile bağlantılı olan A_{pr} spermatogonyumunun oluşmasına sebep olur. Normal olarak kök hücre topluluğunun yaklaşık yarısı A_{pr} spermatogonyumu şekillendirmek için bölünür. Diğer yarısı ise kendi kendini yenileyen bölünelere uğrar böylelikle kök hücre sayısı korunur. A_{pr} spermatogonyum 4, 8 ya da 16 A_{al} spermatogonyumun zincirlerini şekillendirmek için bölünür. A_{al} spermatogonyumu da, altı adet bölünme geçirerek önce A_1 spermatogonyumuna sonrada A_2 , A_3 , A_4 , intermediate

ve son mitoz bölünme boyunca primer spermatositi meydana getiren spermatogonyum B'ye farklılaşırlar (54).

Farklılaşma fazının sonunda en olgun spermatogonyum genç primer spermatositleri oluşturmak için bölünür. Özellikle Tip B spermatogonyumlar preleptoten spermatositleri şekillendirmek için bölünürler. Preleptoten hücreler, hücre siklusunun S fazına giren spermatogenik serinin en son hücreleridir. Kromozomlar rekombine olur ve genetik materyal iki mayoz bölünme esnasında hücrelerin herbirinde paylaşılır. Bununla birlikte, germ hücre sayısı birinci ve ikinci mayoz bölünmeler tamamlandıktan sonra dörde katlanır. Rekombinasyonun meydana geldiği uzun bir mayoz profazı sonunda haploid spermatidlerin meydana gelmesine neden olan iki hızlı bölünme takip eder. İlk mayoz bölünmenin profazı istisnai olarak uzun sürer (yaklaşık 3 hafta). Hücrelerin büyüklükleri ve nukleusları profaz esnasında ilerleyen bir şekilde artar. Büyüklük profazın sonunda çok fazla olur. Nuklear değişiklikler, mayoz profazının gelişiminin alt tiplendirilmesi için önemlidir.

Leptoten primer spermatositlerin bulunması mayozun profaz sürecinin başladığını işaret eder. Preleptotenden leptotene geçişte, çekirdek derece derece periferik kromatinini kaybeder ve ışık mikroskopuyla görülebilen ince kromatin iplikleri şekillendirir. Bu iplikler yoğunlaşmış kromozomlardır fakat kromozomlar çiftleşmemiş durumdadırlar. Preleptoten-leptoten geçiş hücreleri tubulün bazalinden çok hafif bir şekilde hareket eder ve nukleusları ile birlikte bir bütün olarak hücreler yuvarlak bir şekil alırlar. Geçiş hücreleri testisin ara kompartmanında ayırt edilebilirler.

Zigoten hücrelerde homolog kromozomlar çiftleşmiş olurlar. Nukleusta çiftleşen aparatlar; yalnızca elektron mikroskopuyla tanınabilen uzamış üçlü bir, synaptonemal kompleks olarak adlandırılır. Kromozomlar uzunlamasına çiftleştikleri için; zigoten hücrelerin nukleusları içerisinde ışık mikroskopuyla görülen kromozomların iplikleri, leptoten hücrelerinkinden daha kalın olarak ortaya çıkar.

Pakiten hücrelerde, kromozomlar tam olarak çiftleşmişlerdir. Sıçanlarda hemen hemen iki hafta süresince aynı durumda kalırlar. Aslında tüm memeli türlerinde mayozun pakiten fazı 1 haftanın üzerinde 1,5-2 hafta sürer. Her tür için saptanmış bir süre vardır. Crossing over olarak da bilinen genetik rekombinasyon bu sürede meydana gelir. Pakiten hücreler yaşamlarının ortasına kadar sentez yapıcıdır ve büyüklükleri hızlı bir şekilde artar. Kesitlerde görülebilen nukleolusları epeyce büyümüştür. Nukleusun büyüklüğünün artması yüzünden kromozomal materyal çok geniş bir şekilde yayılmıştır. Geç pakiten nukleusları genellikle ovaldir, oysa pakiten öncüleri yuvarlaktır.

Erkeklerde mayozun diploten fazı kısadır, kiyazma olarak bilinen bölgeler dışında diplotende sinaptonemal kompleks, kromozomal çiftlerin ayrılmasına izin vererek dağılır. Mayozun diploten fazını histolojik kesitlerde tanımlamak zordur. Diploten hücreleri en büyük primer spermatositlerdir ve germ hücrelerinin de en büyükleridir. Bu hücreler pakiten hücreler gibi aynı miktarda kromatine sahiptirler fakat nukleusları büyüdüğü için daha büyük interkromozomal açık alanlara sahiptirler. Diploten uzun bir profazın sonu olmasına rağmen hücre bölünme siklusunun geri kalanı hızlı bir şekilde tamamlanır. Metafaz, anafaz ve telofaz ilk mayoz bölünme ya da mayoz I olarak görülür. Hücreler sekonder spermatositleri şekillendirir. İkinci mayoz bölünme ya da mayoz II spermatidleri üretmek için hızlı bir şekilde devam eder.

Mayoz I'in metafaz I, anafaz I ve telofaz I hücreleri diploten hücreleri gibi iridirler, bu da daha küçük olan mayoz II hücrelerinden onların ayırt edilmelerini sağlar. Mayoz I hücreler çok kısa ömürlü hücreler olan sekonder spermatositleri meydana getirirler. Kısa ömürleri ve ayırt edici özelliklerinin olmaması onları tanımlamamızda güçlükler yol açar. Tubullerin enine kesitlerinde küçük bir parçada sekonder spermatositler bulunur. Nukleusları yuvarlaktır ve yaygın olarak karıştırıldığı step I spermatidlerden yaklaşık %30-40 daha büyüktür. Sekonder spermatositlerin ince nuklear özellikleri yeni şekillenmiş spermatidlerden ayırt edilmesine yardımcı eder.

Mayoz II hücreler mayoz I hücrelerden daha küçük boyutlarıyla ayrılabilir. Mayoz II'nin tüm fazları kısadır. Bölünen sekonder spermatositler (metafaz II, anafazII ve telofaz II) mayoz I de görülenden epeyce daha küçüktür. Mayoz sürecinin sonunda haploid hücreler meydana gelir (45).

Spermiyogenezis

Spermatidler Sertoli hücreleri arasındaki kompartmanların lumene en yakın bölümünde yer alan yuvarlak hücrelerdir ve bunlar erken evre spermatidleri olarak adlandırılırlar. Daha sonra Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarına göç ederek bir dizi yapısal değişikliğe uğrarlar. Bu yapısal değişiklikler:

- 1) Akrozom oluşumu,
- 2) Flagellum şekillenmesi,
- 3) Kromatin kondensasyonu,
- 4) Fazla sitoplazmanın atılmasıdır.

Spermatidin bu yapısal değişiklikleri geçirdiği dönem olgun spermatid evresi olarak bilinir (45).

Transforming Growth Factor Beta (TGF-β)

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

Tablo-1: TGFβ ailesi ve alt grupları

AMH: anti-Müllerian Hormon, BMP: Bone Morphogenetic Hormon,
CDMP: Cartilage derived morphogenetic hormon,
GDF: Growth differentiation factor, GDNF: Glial derived neurotrophic factor
MIC-1: Macrophage inhibitory cytokine-1, OP: Osteogenic protein

TGFβ'lar	BMP/GDF	Activin	Diğerleri
TGFβ ₁	BMP-2	Activinβ _A	AMP
TGFβ ₂	BMP-4	Activinβ _B	Inhibin-α
TGFβ ₃	BMP-5	Activinβ _C	Lefty A
TGFβ ₄	BMP-6	Activinβ _E	Lefty B
TGFβ ₅	BMP-7/OP-1		GDNF
	BMP-8a/OP-2		Neurturin
	BMP-8b/OP-3		Persephin
	BMP-14/GDF-5/CDMP-1		Artemin
	BMP-13/GDF-6/CDMP-2		MIC-1/GDF-15
	BMP-12/GDF-7/CDMP-3		Nodal
	GDF-1		
	GDF-3		
	BMP-9/GDF-2		
	BMP-10		
	BMP-11/GDF-11		
	GDF-8/Myostatin		
	BMP-3/Osteogenin		
	BMP-3b/GDF-10		
	GDF-9		
	GDF-9B/BMP-15		
	BMP-16, -17, -18		

TGF-β ailesi hemen hemen bütün hücrelerde bulunan yüksek affiniteli hücre yüzey reseptörlerine bağlanır. Hücre yüzeyinde 2 tip TGF-β reseptörü vardır. Bunlar 65 kDa ağırlığında olan tip I ve 85-90 kDa ağırlığında olan tip II reseptörleridir. TGF-β öncelikle

hücre yüzeyinde bulunan tip II reseptörüne bağlanır. Daha sonra tip II reseptörü tip I reseptörünü fosforlar ve fosforlanan tip I reseptörü hücre içinde bulunan ve sinyal iletiminden sorumlu Smad proteinlerini etkileyerek hücre yüzeyindeki TGF- β 'dan gelen sinyalleri hücre çekirdeğine iletir (9, 55).

TGF- β 'lar organizmada epitelyal, endotelial, hematopoietik, nöral ve bağdoku hücreleri tarafından üretilen multifonksiyonel ekstraselüler proteinlerdir. Günümüzde TGF- β ailesine ait üyelerin, hücrelerin büyümesini ve farklılaşmalarını, embriyonik gelişmeyi, yara iyileşmesini, anjiyogenezi ve seksüel gelişimi düzenlediği bildirilmiştir (1, 2).

Testiküler fonksiyonlar sadece luteinizasyon hormonu (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) gibi gonadotropinlerin kontrolü altında değil bunlarla birlikte epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF) ve TGF- β gibi sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin de kontrolü altındadır. Memeli testislerinde TGF- β_1 , TGF- β_2 ve TGF- β_3 izole edilmiş ve bu büyüme faktörlerinin testiküler fonksiyonların parakrin/otokrin düzenleyicileri oldukları gösterilmiştir (56) .

TGF- β , fetal Leydig hücrelerinde steroidogenezisi düzenlediği bilinmektedir. Fetal domuz Leydig hücrelerinde TGF- β 'nın düşük konsantrasyonları (~0,06-0,4 ng/ml) LH salınımını stimüle ederek Leydig hücrelerinden testosteron üretimini artırırken yüksek konsantrasyonları (~ 2,5-10ng/mL) Leydig hücrelerinden testosteron salınımını inhibe eder. Fetal rat Leydig hücrelerinde ise TGF- β_1 'in 1ng/mL dozu ise LH salınımını uyararak testosteron üretimini %75 arttırmıştır. Bu çalışmalar testislerde TGF- β 'nın miktarına bağlı olarak Leydig hücrelerinde steroidogenezisi hem arttırmakta hem de azaltmakta olduğunu göstermiştir (12, 57, 58) .

Leydig hücrelerinin proliferasyonu pubertenin başlangıcı için önemlidir. Çünkü Leydig hücrelerindeki sayıca artış testosteron üretiminde bir dalgalanma meydana getirmektedir. Ratlarda olgunlaşmamış Leydig hücrelerinin proliferasyonu doğumdan sonraki 14. günde başlar, 21. ve 28. günler arasında hücre sayısında dikkat çekici bir artış görülür. Yapılan bir çalışmada (12) 10 günlük ratlardan elde edilen Leydig hücrelerinde TGF- β_1 'in LH salınımını inhibe ettiği ve Leydig hücrelerinde DNA sentezini durdurduğu bildirilmiştir. Bu da gösteriyor ki TGF- β_1 sadece steroidogenezisi düzenlemekle kalmaz ayrıca Leydig hücrelerinin DNA sentezini de kontrol altında tutar (59). Ayrıca fetal ve neonatal ratlarda yapılan bir çalışmada (8), TGF- β_1 ve TGF- β_2 'nin gonositlerin proliferasyonu sırasında bu hücrelerin mitotik aktivitesini bozmadan apoptosise neden oldukları gösterilmiştir.

TGF- β 'ların gen transkripsiyonunu aktive ettiği ve ekstrasellüler protein sentezini (ECM) arttırdığı bildirilmiştir (12). TGF- β tarafından aktive edilen fibroblastlar tip I, tip III, tip IV, tip V kollajen ve fibronektin sentezlerler. Sertoli hücrelerinde TGF- β_1 ECM protein sentezi üzerine benzer etkilere sahiptir. Örneğin TGF- β_1 Sertoli hücrelerinde proteoglikanların sentezlenmesine neden olurlar ve anabolizmayı düzenlerler. TGF- β_1 , kollajen ekspresyonunun düzenlenmesi dışında *in vivo* çalışmalarda germ hücrelerinin göçü sırasında proteolizisi sınırladığı düşünülen ve Sertoli hücrelerince salgılanan plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) 'i stimüle ettiği gösterilmiştir (60-62).

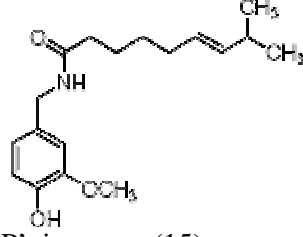
Doğumdan sonra puberte dönemine kadar TGF- β_1 sadece Leydig hücrelerinde LH'nın antagonisti değil, Sertoli hücrelerinde FSH'nın da antagonistidir (12). Örneğin puberteye ulaşmamış domuz testislerinden elde edilen Sertoli hücrelerinde yapılan bir çalışmada TGF- β_1 'in FSH salınımını engellediği bildirilmiştir (63).

TGF- β_1 , peritübüler hücrelerin kontraktilesini ve hücre şeklini düzenler. Bununla birlikte TGF- β_1 embriyogenez sırasında primordial germ hücrelerinin göçü sırasında kemotrofik etkiye sahiptir (12).

Birçok çalışma göstermiştir ki, testislerde her bir TGF- β izoformunun tek bir görevi vardır. Örneğin pubertenin başlangıcında TGF- β_3 spermatogenik hücre farklılaşmasında görev alırken TGF- β_2 germ hücrelerinin çoğalmasını düzenlemektedir. TGF- β_1 ise LH ve FSH gibi gonadotropinlerin salınımını duraksatarak testis gelişimini düzenler (6, 12, 64) .

Capsaicin

Acı kırmızı biberin kullanımı Azteklere kadar dayanmaktadır. Yazıtlarından acı kırmızı biberin antimikrobial ve antihemolitik ajan olarak terapatik özelliklerinden yararlandıkları görülmüştür. Anavatani Meksika olan bu bitki Amerika'nın 1492 yılında keşfi ile birlikte Avrupa'ya getirilmiştir. Bu bitkiye 'Capsicum' Latince ismini veren Fransız botanikçi Turneyfort'tur. Acı kırmızı biberin acılığını veren alkolooid yapıdaki bu bileşen ilk olarak Tresh tarafından 1846 yılında izole edilmiştir. Tresh bu bileşeni 'CAP' olarak isimlendirmiştir ve CAP'ın yapısının vanilloidler ile yakından ilişkili olduğunu tahmin etmiştir (15).



Şekil-1: CAP'nin yapısı (15).

Nelson 1919 yılında CAP'ın kimyasal yapısının vanilloid olduğunu bulduğunda Tresh'in tahminlerinde yanılmadığını göstermiştir. Daha sonra Szallasi ve Blumberg vanilloidleri endojen ve ekzojen olarak iki gruba ayırmışlar ve CAP'ın da ekzojen bir vanilloid olduğunu bildirmişlerdir (15).

Vanilloidler, çoğunluğu periferel sinirlerde yer alan ve vanilloid reseptör (VR) olarak tanımlanan belirli tipte reseptörlerle etkileşim içindedir. CAP'ın organizmada spesifik olarak bağlandığı reseptör CAP reseptörü ya da vanilloid reseptör-1 (VR-1) olarak isimlendirilmiştir (65).

VR-1'in sensorik nöronlarda nöropeptidlerin salınımında rol oynadığı son yıllarda yapılan çalışmalar ile saptanmıştır. CAP'ın VR-1 ile bağlanmasıyla Na^+ , Ca^{+2} ve K^+ iyonlarının hücre içine akışı şekillenmektedir. Bu durum nöronda depolarizasyona ve nörotransmitter maddelerin, örneğin nörokinin A (NKA), SP ve CGRP salgılanmasına neden olmaktadır (66, 67).

Kronik CAP uygulanan sıçanların medulla spinalislerindeki dorsal kornuda primer sensorik nöronlarda SP'nin spesifik ve etkileyici bir şekilde azaldığı görülmüş, ve CAP uygulamasının devam etmesi halinde nöronların bir bölümünde önce uyarımla başlayan sonra "CAP duyarsızlığı" olarak kabul edilen etkilerinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (68).

Ayrıca CAP'ın sindirim sisteminde anti-mikrobiale ve anti-kanserojen etkileri bildirilmektedir. Salmonella enteritis ile enfekte kanatlılarda diyet ile verilen CAP'ın iyileştirici etkisi olduğu gösterilmiştir (69).

Ratlarda, kalp operasyonlarında deri altı CAP uygulanması (50 mg/kg) sonucu muhtemelen CGRP uyarılmasına bağlı olarak doku korunmasının arttığı saptanmıştır (70).

Ratlarda CAP'ın uzun süreli verilmesinin midede alkol, aspirin ya da stres gibi ajanlar ile oluşan lezyonların iyileşmesinde etkili olduğu belirtilerek, oluşacak hasarlara karşı da koruyucu rol oynadığı, bu durum üzerinde CAP'a duyarlı afferent nöronların etkin olduğu saptanmıştır (71).

Özer ve ark. yumurtacı tavuk ve horozlarla yaptıkları çalışmalarda, rasyonlarına acı kırmızı biber ilave ederek puberte çağına gelen tavuk ve horozlarda karın içi yağlanmanın azaldığı, canlı ağırlık artışının yavaşladığı, tavukların ovaryumlarında folliküler gelişmenin daha hızlı olduğunu ve kontrol grubuna oranla deney grubu tavukların 11 gün önce ve iki kat daha fazla sayıda yumurta verdikleri görülmüştür. Erken yumurtlamaya paralel olarak acı kırmızı biberli rasyonla beslenenlerde yumurta kanalında epitelial ve kassel gelişmenin kontrol grubuna göre daha erken olduğu gözlenmiştir. Horozlarda ise deney grubunda testis ağırlığı, uzunluğu, genişliği ve seminifer tubullerde duvar kalınlığının arttığı saptanmıştır. Seminifer tubuluslarda üçüncü aydan itibaren spermatogenik hücre serisinde tamamlanma, Sertoli hücrelerinde fonksiyonel faza geçiş, seminifer tubulus lumenlerinde spermatozoonların varlığı tespit edilmiştir. Benzer özellikler kontrol grubunda ancak bir ay sonra görülebilmektedir. Epididimal kanalda deney grubunda 3. aydan itibaren spermatozoonlar görülmüştür. Kontrol grubunda aynı özellikler bir ay sonra gözlenmiştir (38, 39).

Erdost ve ark. tarafından bir günlük yaştan itibaren diyetlerine düşük dozda acı kırmızı biber ilave edilen tavuk ve horozların beş aylık gelişme süreci içinde hipofiz bezinde FSH, ve LH sentezinin ilk aylardan itibaren arttığı saptanmıştır. FSH-ir ve LH-ir hücre aktivitesinde görülen artış, bu hormonların hedef organları olan gonad gelişimini etkileyeceği düşünülmüştür. Hipofiz ön lobunda hücreler arasında endokrin hücreler ile sinaptik ilişki içinde olan çok sayıda SP içeren fibriller bulunmaktadır. Hipofiz ön lob hormonlarının nöral kontrolünün bu fibriller aracılığı ile gerçekleştiği düşünüldüğünde CAP'ın bu fibriller ve sistemler üzerindeki olası etkisinin de oldukça fazla olabileceği ortadadır (40).

TGF- β_1 ve TGF- β_2 'nin testislerdeki varlığının belirlenmesinde kullanılan immuno-histokimya, dokular ve hücrelerde bulunan protein, karbonhidrat veya lipid moleküllerinin (antijen) enzim ile işaretlenmiş bir antikor yardımı ile reaksiyona girmesi sonucuna dayalı bir tekniktir (72). İmmun boyamalarda kullanılan antikorlar poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki çeşittir ve yine direkt ve indirekt olmak üzere iki metod kullanılabilir. Metodun direkt veya indirekt olmasına göre, primer veya sekonder antikora bir enzim bağlanır. Bu enzim daha sonra substratla (kromojen) reaksiyona girerek renkli bir görünüm verir. İndirekt olarak kullanılan Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yönteminde sekonder antikor biotinle işaretlenmiş olup, daha sonra Streptavidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi ile birleşir (73). İH'de bir antijenin konsantrasyonu, boyandığı kromojenin görünen yoğunluğu ile kolayca değerlendirilir. Bu değerlendirme daha çok bağıl olarak

yapılmaktadır. Antikoru etkinliğinin kıyaslanmasında yarı kantitatif metot etkilidir. Sonuçlar tipik olarak 1+, 2+, gibi değerlendirilerek 3 veya 4'e kadar numaralandırma yapılır (74).

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 İmmunohistokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmanın materyalini 21 günlük, puberte dönemindeki 60 adet Swiss albino soyu erkek fare oluşturdu. Bu hayvanlar, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden aynı doğum tarihli farelerin doğumlarından 20 gün sonra cinsiyet ayrımı yapılarak elde edilmiştir. Hayvanlar *ad libitum*, pelet şeklindeki standart fare yemi ile beslendiler, içme suyunu serbest olarak tükettiler ve 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık periyodunda tutuldular, ayrıca klima ile buldukları oda sıcaklığı 21–23 °C, nem ise %50–60 oranında sabitlendi. Farelerin her CAP enjeksiyonu öncesinde canlı ağırlıkları tartıldı.

Çalışmadaki tüm deneysel işlemler Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Komitesi tarafından onaylandı (Karar No: 1.06.2004/1)

Deney Planı

Fareler puberte, puberte sonrası ve erişkin dönem olmak üzere 20'şer fareden oluşan 3 ana gruba ayrıldı. Bu gruplar da kendi içlerinde deney (10) ve kontrol (10) grubu olmak üzere iki alt gruba ayrıldı ve deney 7 hafta sürdü.

Capsaicinin Hazırlanması

Deney grubundaki 30 adet fareye 1 mg/kg dozdaki CAP (Sigma M 2028) % 0,9'luk serum fizyolojik içerisinde çözdürülüp, %1 Tween 20(Merck 817072) ilave edildikten sonra subkutan olarak 0,3 cc insülin enjektörü ile enjekte edildi.

Kontrol grubundaki 30 adet fareye ise sadece 0,3 cc %1 Tween 20 (Merck 817072) ve % 0,9'luk serum fizyolojik içeren karışım subkutan olarak 0,3 cc insülin enjektörü ile enjekte edildi.

Hayvanların Canlı Ağırlıkların Ölçümü, Testislerin Alınması, Ağırlıklarının Ölçülmesi, Tespit ve Takip

Üç gruptaki deney hayvanlarına 1 hafta boyunca her gün 1 mg/kg dozda subkutan CAP uygulaması yapıldı. Daha sonra enjeksiyona 1 hafta ara verildi, 3. hafta puberte dönemindeki (35. günde) grubun deney ve kontrol grubu farelerin canlı vücut ağırlıkları tartıldıktan sonra dietil eter (Merck 100926) anestezisi altında servikal dislokasyon ile öldürüldü. Sonrasında testisleri alınarak tartımları yapıldı.

Puberte sonrasındaki ve erişkin gruptaki hayvanlara 3. hafta tekrar CAP enjeksiyonu başlandı ve enjeksiyon 1 hafta boyunca her gün 1 mg/kg dozda subkutan olarak yapıldı. Enjeksiyondan sonra 1 hafta dinlendirilen farelerden puberte sonrasındaki grubun (50. günde) deney ve kontrol grubu fareleri 5. hafta canlı vücut ağırlıkları tartıldı. Daha sonra dietil eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile öldürüldü. Bunu takiben testisleri alınarak tartımları yapıldı.

Erişkin gruptaki hayvanlara 5. hafta tekrar CAP enjeksiyonu başlandı ve enjeksiyon 1 hafta boyunca her gün 1 mg/kg dozda subkutan olarak yapıldı. Enjeksiyondan sonra 1 hafta dinlendirilen farelerden puberte sonrasındaki grubun (75.günde) deney ve kontrol grubu fareleri 7. hafta canlı vücut ağırlıkları tartıldıktan sonra dietil eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile öldürüldü. Sonrasında testisleri alındı ve tartımları yapıldı.

Kontrol grubundaki hayvanlara da aynı prosedür uygulandı. Yalnız hayvanlara CAP yerine serum fizyolojik verildi.

Üç gruptaki deney ve kontrol grubu farelerin testisleri, hassas terazide tartıldıktan sonra 24 saat süre ile Bouin tespitine konuldu. Rutin doku takibi uygulandı ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 4-5 µ'luk kesitler alındıktan sonra normal histolojik yapının incelenmesi için Crossmon'ın üçlü boyama tekniği kullanıldı (75).

İmmunohistokimyasal Boyama

Parafin bloklardan alınan 4-5 µ'luk kesitlerde TGFβ'nın varlığı immunohistokimyasal yöntemlerden indirekt strepteavidin-biotin-kompleks yöntemi kullanılarak gösterildi.

Gereçler

Antikor sulandırma solüsyonu

Primer antikorların istenilen konsantrasyona sulandırılması sırasında Zymed firmasına ait 00-3118 kod numaralı 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, Santa Cruz firmasına ait SC-146 kodlu TGF β ₁ rabbit poliklonal antikor ve SC-90 kodlu TGF β ₂ rabbit poliklonal antikor kullanıldı. Her iki antikorun konsantrasyonu 1:750 olarak antikor sulandırma solüsyonu ile sulandırıldı.

Sekonder Antikor

Zymed firmasına ait, kullanıma hazır, 85-6743 kod numaralı Histostain® Plus Rabbit Primary Kit'in biotinli sekonder antikoru 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 immunositokimyasal boyama sırasında taze olarak, 1 ml DAB substrat içerisinde 1 damla DAB kromojen eklenerek hazırlandı ve hazırlandıktan sonra en geç 15 dakika içerisinde kullanıldı.

İmmun Yapıştırıcı

Boyamalar sonrasında lamalar üzerine bir damla Entellan (Merck 107961.0100)lameller ile yapıştırıldı.

İmmun Boyamada Kullanılan Solüsyonlar

Alkol-Eter Solüsyonu

Boyamalar sırasında kullanılan lamaların temizliği için 1:1 oranında karıştırılmış alkol-eter solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyonda 15 dakika süreyle bekletilen lamalar temiz bir tülbent ile temizlenmiştir.

Poly-L-lysine Solüsyonu

İmmunohistokimyasal boyamalarda kullanılacak olan lamalar, distile su içerisinde %10'luk Poly-L-lysine (Sigma P 8920) solüsyonu hazırlandıktan sonra 5-10 dakika bekletilip 37⁰C'lik etüvde bir gece kurutuldu. Ertesi gün kesitler bu lamlara çekildi.

Phosphate Buffered Saline (PBS) Solüsyonu

İmmunohistokimyasal boyamalar sırasında bütün yıkamalar için kullanılan PBS solüsyonu, sodyum klorürden (Merck,1.064.0100) 7,2g, di-Sodyum hidrojen Fosfat (Merck, 1.06586.0500) 1,43g, sodyum dihidrojen fosfat monohidrattan (Merck, 1.06346.0100) 0,43g tartılarak 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.

Saponin Solüsyonu

Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için 100 ml distile suya 0,05 gr Saponin (Serva, 34655) eklenip karıştırıldı.

İmmunohistokimyasal Boyama Prosedürü

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

Tüm kesitlere aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kere değiştirilerek ksilolde deparafinizasyon yapıldı.
2. Her biri 5'er dakika olmak üzere 2 kere absolu alkol ve bir kere %96'lık, %80'lik ve %70'lik alkollerden geçirildi. Daha sonra preparatlar distile suda 1 dakika yıkandı.
3. Antijen retrieval için preparatlar %0,05'lik saponin solüsyonuna alındı. Oda ısısında (20-25⁰C) 20 dakika inkübe edildi.
4. PBS ile her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kere yıkandı.
5. Preparatlardaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika tutuldu.
6. PBS ile her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kere yıkandı.
7. Lamların üzerindeki kesitlerin etrafları pappen ile çizildi.
Bundan sonraki aşamalarda kesitlerin kurummasını önlemek amacı ile kesitler nemli bir ortam içerisine 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, 1:750 oranında sulandırılmış antikor (TGF-β₁ ve TGF-β₂) ile negatif kontrol preparatları ise antikor sulandırma solüsyonu ile + 4⁰C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.
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-Strepteavidin 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 hematoksileninde 25 saniye tutuldu.
19. Akarsuda yıkandı.
20. Distile suda yıkandı.
21. Hızlı bir şekilde seri alkollerden geçirilerek ksilolde parlatıldı.
22. Entellan ile kapatıldı.

Değerlendirme

İmmunohistokimyasal değerlendirme; hedef hücrelerin boyanıp boyanmamasına, boyanmanın karakterine (diffuz ya da granüler) ve boyanan hedef hücrelerdeki boyanma yoğunluğuna bakılarak yapıldı. Değerlendirme iki bağımsız gözlemci tarafından, boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++), şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verilerek yapıldı (74).

İstatistik Analizler

Deney ve kontrol gruplarının canlı ağırlık ortalamaları, testis ağırlıkları ve immunohistokimyasal boyamalardan elde edilen verilerin istatistik değerlendirmeleri için Non-Parametrik testlerden Kruskal-Wallis Testi kullanıldı. Bu test sonrasında anlamlı çıkan gruplarda Mann-Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmaları yapıldı (76).

BULGULAR

Morfolojik ve Morfometrik Bulgular

Çalışma süresince deney ve kontrol grubunu oluşturan hayvanlarda ölüm gözlenmemiştir. CAP enjeksiyonundan sonra özellikle 50 ve 75 günlük farelerde uzun süreli bir hareketlilik gözlenmiştir.

Kontrol ve deney grubu hayvanların her dönem öncesi tartımları yapılarak canlı ağırlıkları tespit edilmiş ve canlı ağırlık ortalamaları alınmıştır. Alınan sonuçlara göre tüm deney gruplarındaki hayvanların canlı ağırlık ortalamalarının kontrol gruplarına oranla daha fazla olduğu saptanmış ve bu iki grup arasında $p < 0,005$ düzeyinde istatistiki öneme rastlanmıştır (Tablo-2, Şekil-2). Kontrol ve deney gruplarındaki tüm hayvanların testis ağırlıkları ortalamalarında ilk iki dönemde deney grubunda bir artış gözlenirken, üçüncü dönemde kontrol grubunda artış gözlenmiştir. Gözlenen farklılıklar arasında istatistiki bir öneme rastlanmamıştır (Tablo-2, Şekil-3).

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

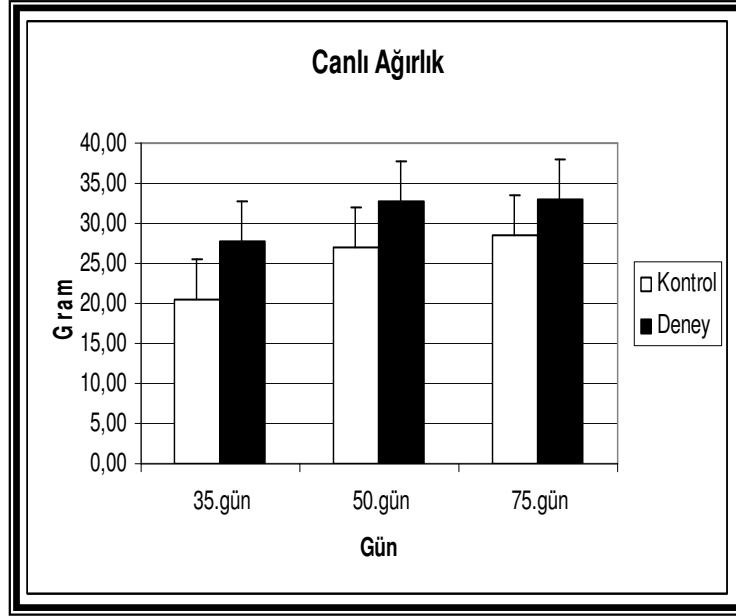
Histolojik Bulgular

Kontrol ve deney gruplarına ait farelerin testis dokuları Crossman'ın üçlü boyama yöntemi ile boyanıp incelendiğinde testislerin tunika albuginea ile çevrili olduğu görüldü. Tunika albugineanın altında düzgün, yuvarlak tubulus seminiferus kontortusların kesitlerinin yer aldığı, tubulu çevreleyen ince bir bazal membranın hemen altında tek sıra halinde myoid hücrelerin bulunduğu gözlemlendi. Bir ölçüm yapılmamış olmasına karşın, deney grubu testislerinde tubulus seminiferus kontortusların çaplarının kontrol grubuna göre daha büyük olduğu gözlemlendi (Şekil-4, 5, 6, 7, 8, 9). İnterstisiel alanların Leydig hücreleri ve kan damarlarından oluştuğu görüldü. Kontrol ve deney gruplarındaki tüm hayvanların testis ağırlık ortalamalarında önemli farklılıklar gözlenmemesine paralel olarak kontrol ve deney grubuna ait testis dokuları arasında interstisiel gelişmede hiçbir farklılık görülmemiştir. Tubuler gelişmede ise kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında deney gruplarında 35 ve 50 günlük dönemlerde primer spermatosit yoğunluğunun kontrol gruplarına oranla daha fazla olduğu görülmüş, bununla birlikte 75

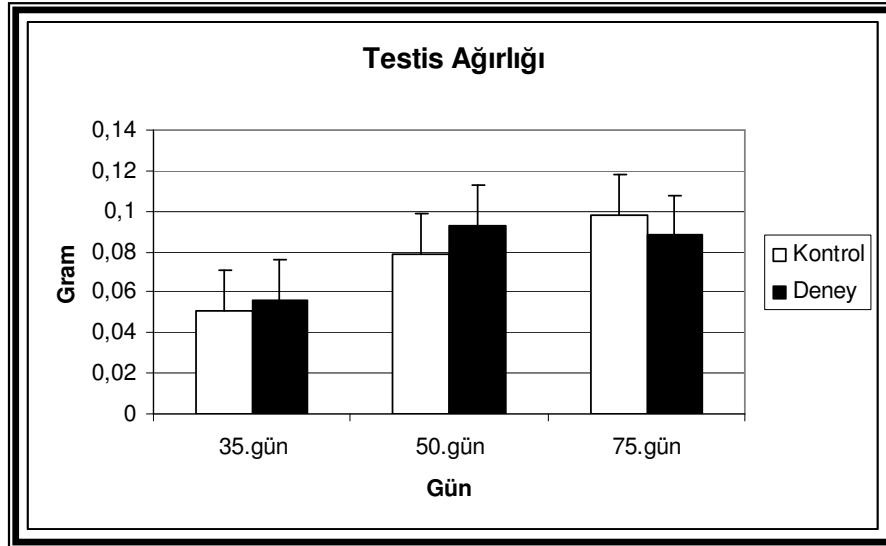
günlük dönemdeki deney grubunda genç ve olgun spermatid yoğunluğunun yaşla beraber artışının dikkat çekici olduğu gözlenmiştir. Bu histolojik bulgular dışında testis yapısında her hangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır (Şekil-4, 5, 6, 7, 8, 9).

Tablo-2: Kontrol ve deney gruplarının canlı ağırlık ve testis ağırlıkları ortalamaları
* : İki değer arasındaki önem ($p<0,05$)

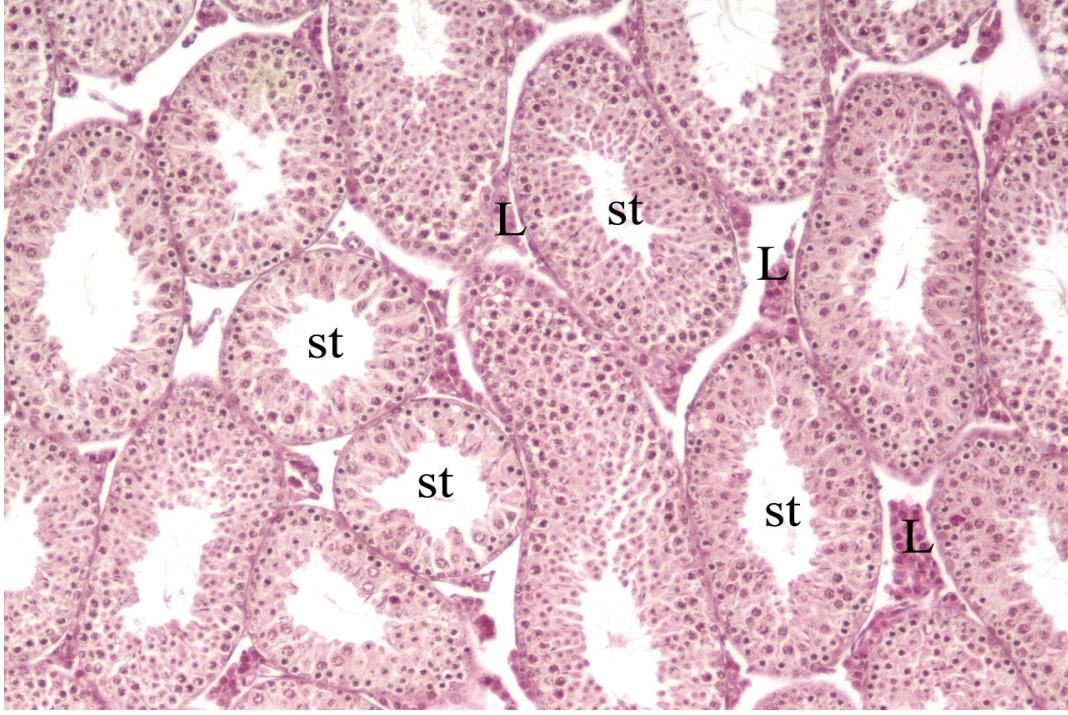
	n	<u>35 günlük</u>		<u>50 günlük</u>		<u>75 günlük</u>	
		<i>Kontrol</i> $x \pm SE$	<i>Deney</i> $x \pm SE$	<i>Kontrol</i> $x \pm SE$	<i>Deney</i> $x \pm SE$	<i>Kontrol</i> $x \pm SE$	<i>Deney</i> $x \pm SE$
Canlı Ağırlığı (g)	10	20.6 \pm 0.834	27.7 \pm 0.834*	27.1 \pm 0.834	32.8 \pm 0.834*	28.6 \pm 0.834	32.9 \pm 0.834*
Testis Ağırlığı (g)	10	0.051 \pm 0.003	0.056 \pm 0.003	0.079 \pm 0.003	0.093 \pm 0.003	0.098 \pm 0.003	0.088 \pm 0.003



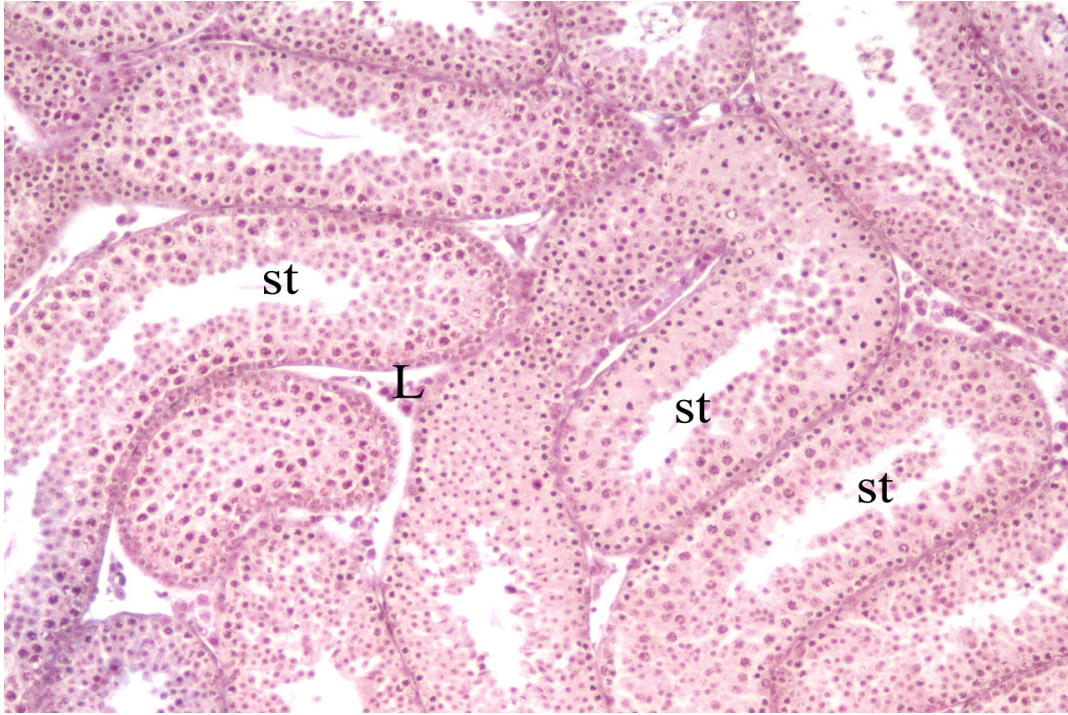
Şekil-2: Kontrol ve deney gruplarındaki hayvanların canlı ağırlık ortalamaları



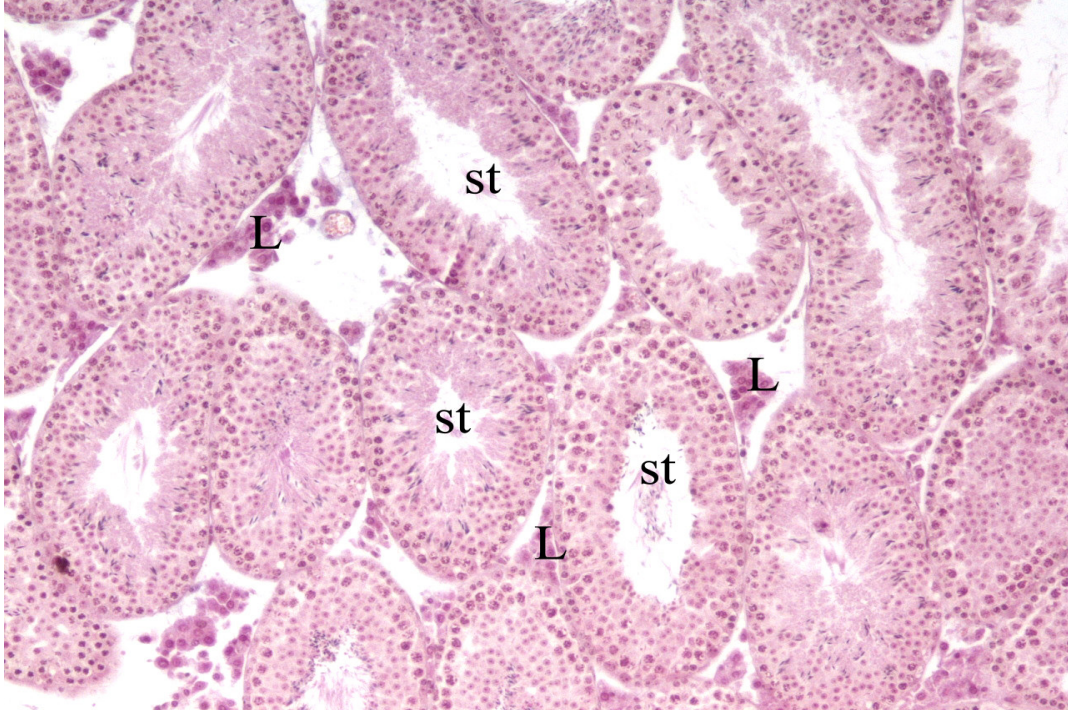
Şekil-3: Kontrol ve deney gruplarındaki hayvanların testis ağırlık ortalamaları



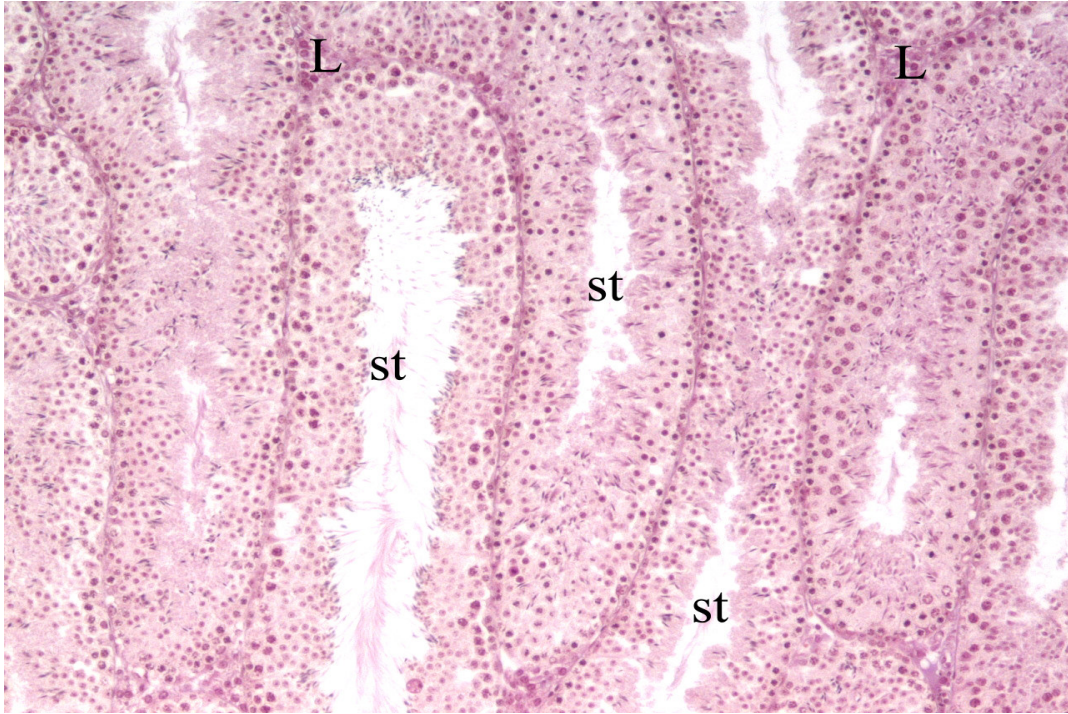
Şekil-4:35 günlük kontrol grubu, üçlü boyama, x10 objektif
st: tubulus seminiferus kontortus, **L:** Leydig hücreleri



Şekil-5:35 günlük deney grubu, üçlü boyama, x10 objektif
st: tubulus seminiferus kontortus, **L:** Leydig hücreleri



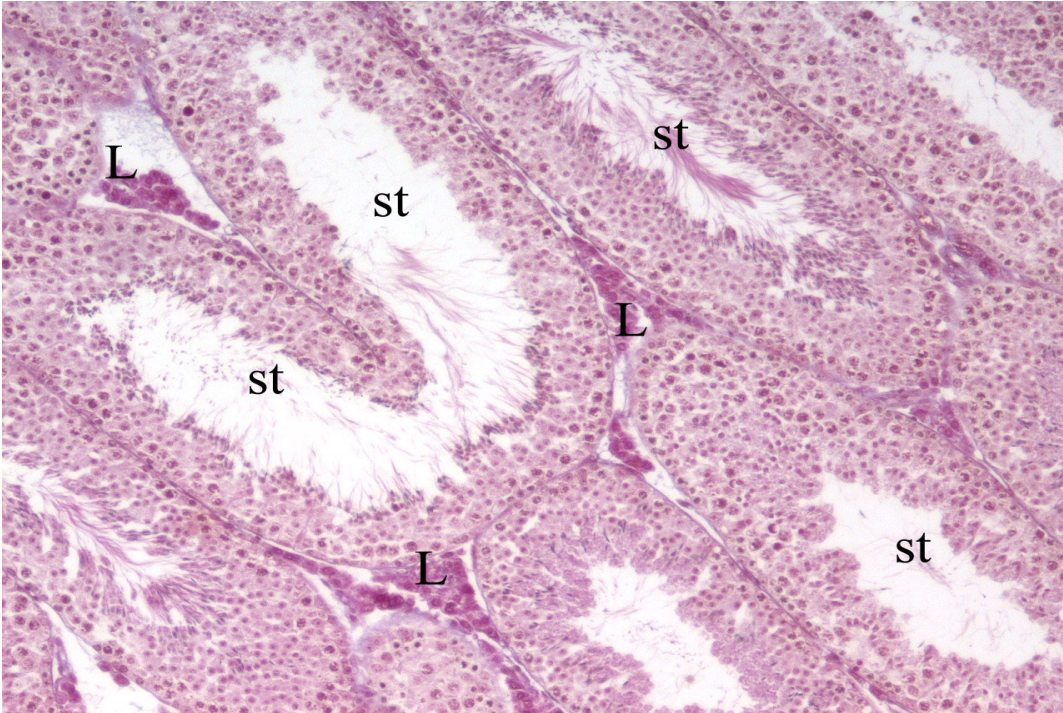
Şekil-6:50 günlük kontrol grubu, üçlü boyama, x10 objektif
st: tubulus seminiferus kontortus, L: Leydig hücreleri



Şekil-7:50 günlük deney grubu, üçlü boyama, x10 objektif,
st: tubulus seminiferus kontortus, L: Leydig hücreleri



Şekil-8:75 günlük kontrol grubu, üçlü boyama, x10 objektif
st: tubulus seminiferus kontortus, **L:** Leydig hücreleri



Şekil-9:75 günlük deney grubu, üçlü boyama, x10 objektif
st: tubulus seminiferus kontortus, **L:** Leydig hücreleri

İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal olarak TGF- β_1 ve TGF- β_2 ile boyanan kontrol ve deney gruplarına ait testis preparatlarının değerlendirilmeleri, hedef hücrelerin boyanıp boyanmamasına, boyanmanın karakterine (diffuz ya da granüler) ve boyanan hedef hücrelerdeki boyanma yoğunluğuna, boyandıkları alanlar ve hücresel düzeyde boyanma özelliklerine bakılarak yapıldı. Değerlendirme iki bağımsız gözlemci tarafından, boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) , şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verilerek yapıldı.

TGF- β_1 antikoru ile yapılan boyamalar

TGF- β_1 , tüm deney ve kontrol gruplarındaki Leydig hücrelerinde ve genç spermatidlerde eksprese edilirken spermatogonyumlarda, primer spermatozoidlerde, olgun spermatidlerde ve Sertoli hücrelerinde eksprese edilmemiştir. Bununla birlikte negatif kontrol preparatlarında da (Şekil-10) hiçbir boyanma görülmemiştir.

35 günlük kontrol grubundaki testislerde Leydig hücrelerinde immun reaksiyon görülmezken (-), 50 günlük kontrol grubunda immun reaksiyon şiddetlenmiş (+++) (Şekil-11, 13, Tablo-3) ve bu iki grup birbiri ile karşılaştırıldığında $p < 0,005$ düzeyinde istatistiki öneme rastlanmıştır (Tablo-5). 75 günlük kontrol grubunda immun reaksiyon orta şiddette (++) görülmüş ve 35 ve 75 günlük kontrol grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında $p < 0,005$ düzeyinde istatistiki öneme rastlanmıştır (Şekil-15, Tablo-3, 5).

35 günlük deney grubundaki testislerde Leydig hücrelerinde immun reaksiyon zayıf (+) iken 50 günlük deney grubunda immun reaksiyon orta şiddette (++) görülmüş (Şekil-12,14, Tablo-3), 75 günlük deney grubunda ise reaksiyon şiddetlenmiştir (+++) (Şekil-16, Tablo-3). 75 günlük deney grubu 35 günlük deney grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,005$ düzeyinde istatistiki öneme rastlanmıştır (Tablo-5).

Leydig hücrelerinde alınan TGF- β_1 ekspresyonu sonuçlarına bakıldığında; 35 günlük kontrol grubunda immun boyanma olmazken (-) 35 günlük deney grubunda zayıf boyanma (+) görülmüştür. Bu iki grup arasında istatistiksel her hangi bir farklılık görülmemiştir. 50 günlük kontrol grubunda immun reaksiyon şiddetli (+++) iken 50 günlük deney grubunda immun reaksiyon orta şiddetli (++) olarak görülmüş, 75 günlük kontrol grubunda immun reaksiyon orta şiddetli (++) iken, 75 günlük deney grubunda

reaksiyon şiddetlenmiştir (+++) (Tablo-3). 75 günlük dönemler arasında önemli düzeyde ($p<0,005$) istatistiki önem bulunmuştur (Tablo-5).

35 günlük kontrol grubu testislerdeki genç spermatidlerde immün reaksiyon zayıf (+) iken, 50 günlük kontrol grubunda immün reaksiyon orta şiddette (++) , 75 günlük kontrol grubunda ise immün reaksiyon şiddetli (+++) olarak görülmüştür (Şekil-11, 13, 15, Tablo-4). Yapılan istatistiksel incelemelerde kontrol grubundaki genç spermatidlerde TGF- β_1 ekspresyonu sonuçlarına göre 35 günlük ve 50 günlük dönemler ile 35 günlük ve 75 günlük dönemler arasında önemli düzeyde ($p<0,005$) istatistiki önem bulunmuştur (Tablo-5).

35 günlük deney grubunda immün reaksiyon zayıf (+) iken, 50 ve 75 günlük deney gruplarında immün reaksiyon orta şiddette (++) görülmüştür (Şekil-12,14,16, Tablo-4).

Genç spermatidlerde TGF- β_1 ekspresyonu sonuçlarına bakıldığında; 35 günlük deney grubu ve 35 günlük kontrol grubu karşılaştırıldığında immün reaksiyon şiddetinde istatistiksel bir farklılık görülmemiştir. 50 günlük deney ve kontrol grubu karşılaştırıldığında da immün reaksiyon şiddetinde istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Fakat 75 günlük deney grubundaki immün reaksiyon orta şiddette (++) iken, 75 günlük kontrol grubunda immün reaksiyon şiddetli (+++) olarak görülmüştür ve bu iki grup arasında istatistiksel bir farklılık görülmemiştir (Tablo-4, 5).

Tablo-3: Kontrol ve deney gruplarındaki Leydig hücrelerinde TGF- β_1 'in ekspresyonu

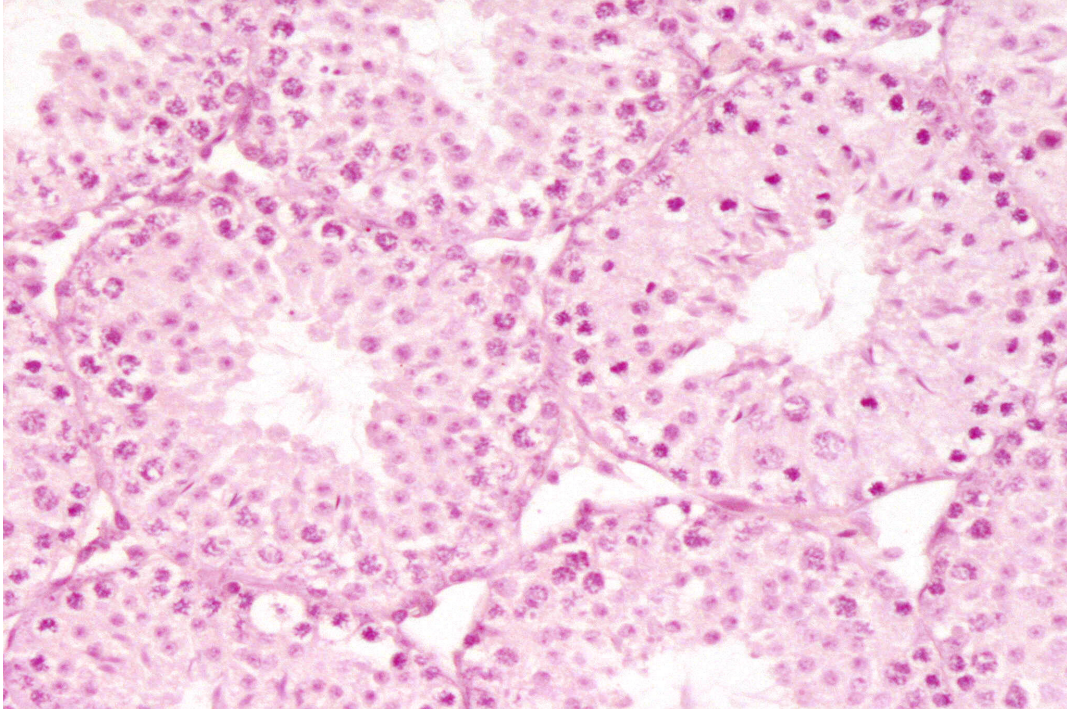
	<u>Kontrol Grubu</u>	<u>Deney Grubu</u>
35 günlük dönem	-	+
50 günlük dönem	+++	++
75 günlük dönem	++	+++

Tablo-4: Kontrol ve deney gruplarındaki genç spermatidlerde TGF- β_1 'in ekspresyonu

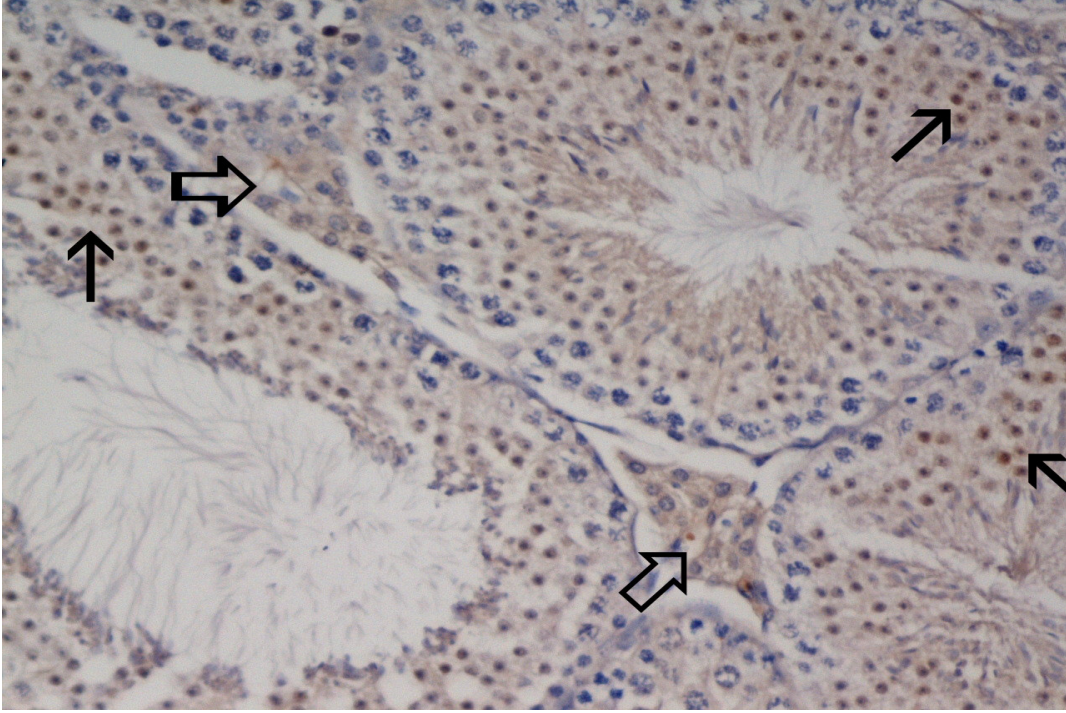
	<u>Kontrol Grubu</u>	<u>Deney Grubu</u>
35 günlük dönem	+	+
50 günlük dönem	++	++
75 günlük dönem	+++	++

Tablo-5: Kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlara ait TGF- β_1 immunohistokimyasal skor ortalamaları, **K:**Kontrol Grubu, **D:**Deney Grubu,
*:İki değer arasındaki önem $p<0,05$

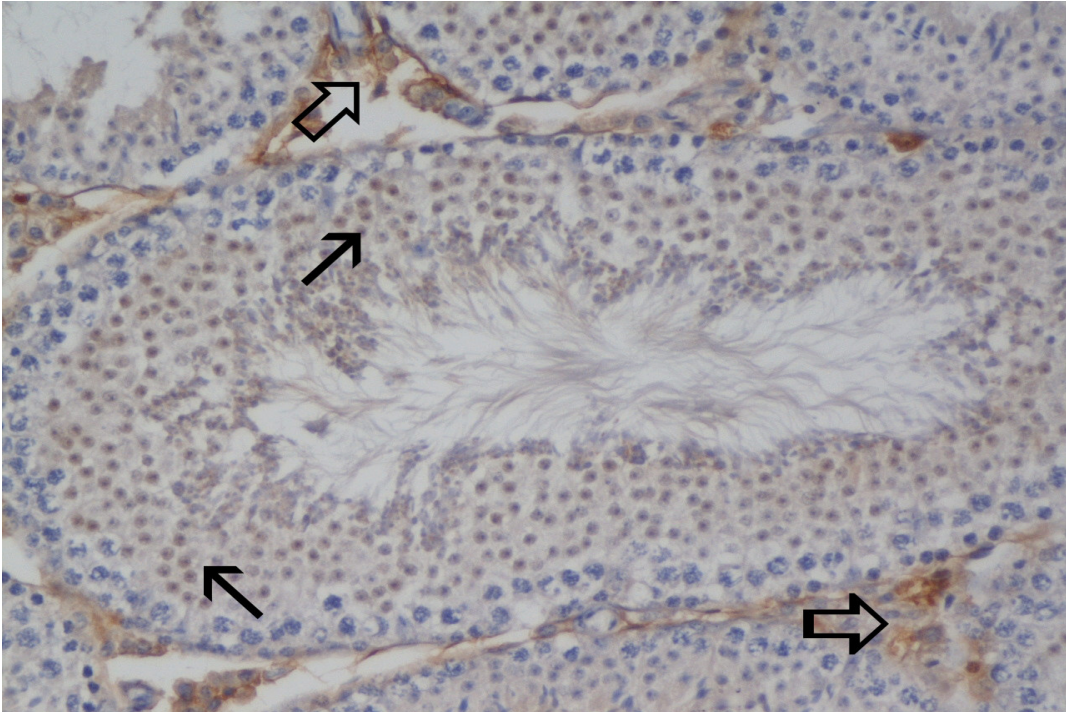
Kontrol/Deney	K/K		K/K		K/K		D/D		D/D		D/D		D/K		D/K		D/K	
Gruplar	35	50	35	75	50	75	35	50	35	75	50	75	35	35	50	50	75	75
LeydigHücre	0,6	2,1*	0,6	1,4*	2,1	1,4	1,2	1,6	1,2	2,2*	1,6	2,2	1,2	0,6	1,6	2,1	2,2*	1,4
GençSpermatid	0,7	1,8*	0,7	2,4*	1,8	2,4	0,9	1,8	0,9	1,8	1,8	1,8	0,9	0,7	1,8	1,8	1,8	2,4



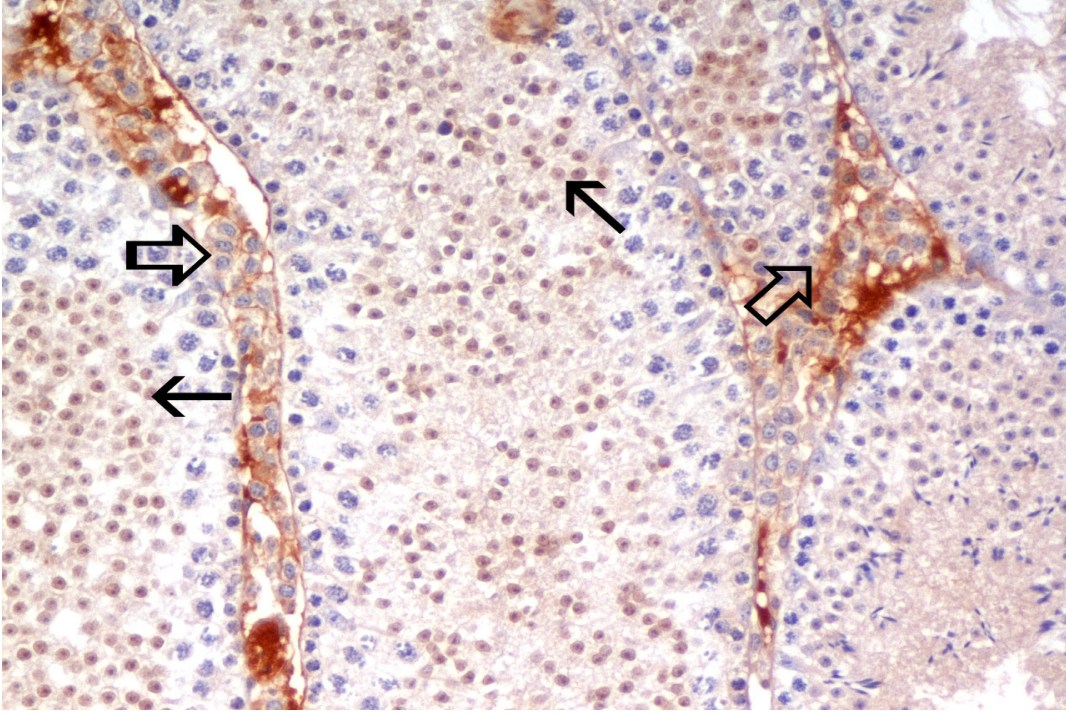
Şekil-10: TGF- β_1 ekspresyonu için negatif preparat x20 objektif



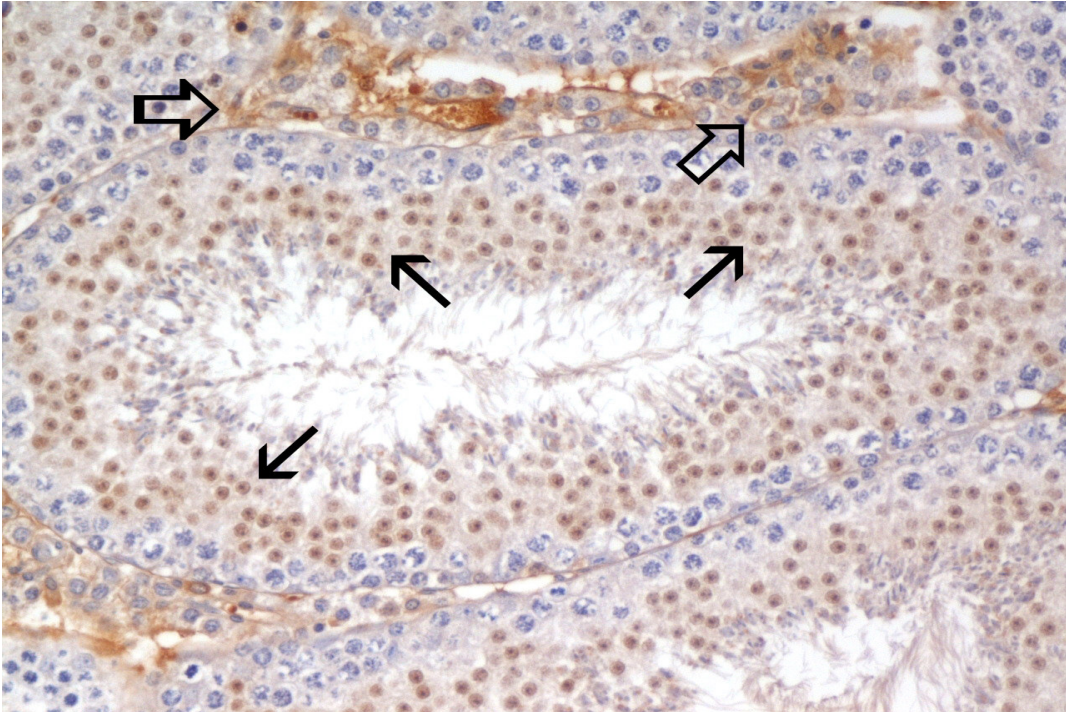
Şekil-11: 35 günlük kontrol grubunda TGF- β_1 ekspresyonu, x20 objektif,
↑: genç spermatid, ⇨: Leydig hücresi



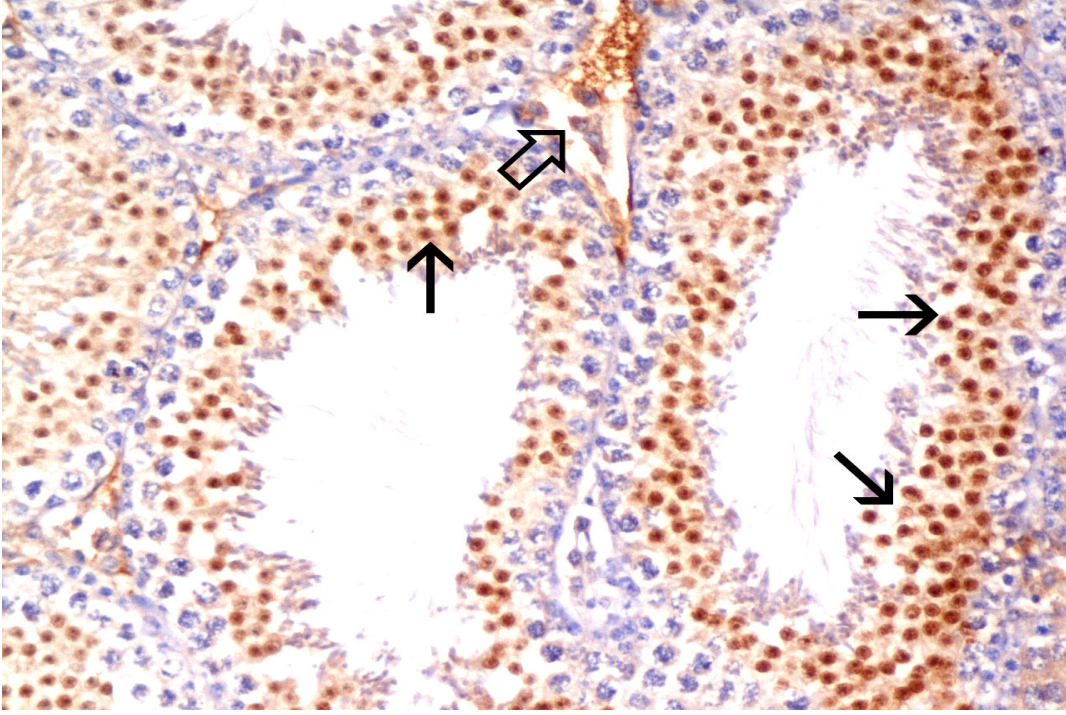
Şekil-12: 35 günlük deney grubunda TGF- β_1 ekspresyonu, x20 objektif
↑: genç spermatid, ⇨: Leydig hücresi



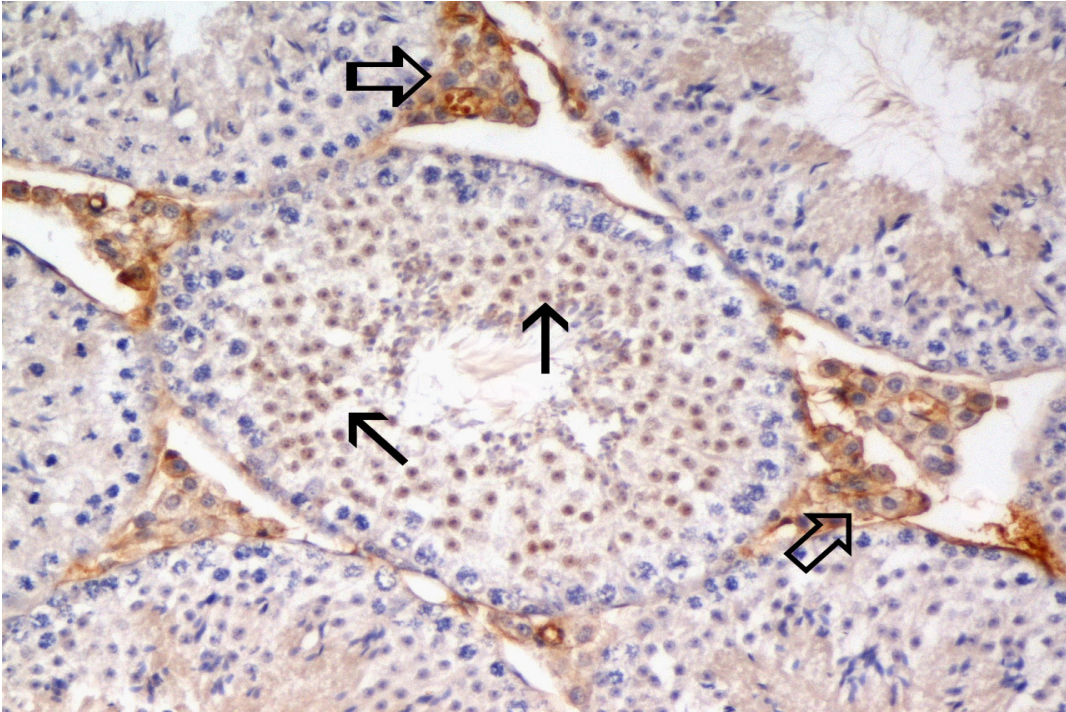
Şekil-13: 50 günlük kontrol grubunda TGF- β_1 ekspresyonu x20 objektif,
↑: genç spermatid, ⇨: Leydig hücresi



Şekil-14: 50 günlük deney grubunda TGF- β_1 ekspresyonu, x20 objektif,
↑: genç spermatid, ⇨: Leydig hücresi



Şekil-15: 75 günlük kontrol grubunda TGF- β_1 ekspresyonu, x20 objektif,
↑: genç spermatid, ⇨: Leydig hücresi



Şekil-16: 75 günlük deney grubunda TGF- β_1 ekspresyonu, x20 objektif,
↑: genç spermatid, ⇨: Leydig hücresi

TGF- β_2 antikorlu ile yapılan boyamalar

TGF- β_2 , tüm deney ve kontrol gruplarındaki Leydig hücrelerinde ve olgun spermatidlerde eksprese edilirken spermatogonyumlarda, primer spermatositlerde, genç spermatidlerde ve Sertoli hücrelerinde eksprese edilmemiştir. Bununla birlikte negatif kontrol preparatlarında da (Şekil-17) hiçbir boyanma görülmemiştir.

35 ve 50 günlük kontrol grubundaki Leydig hücrelerinde immun reaksiyon şiddetli (+++) iken, 75 günlük kontrol grubunda immun reaksiyon orta şiddetli (++) olarak görülmüştür (Şekil-18, 20, 22, Tablo-6). Yapılan istatistiksel analizde herhangi bir farklılık görülmemiştir (Tablo-8).

35 ve 50 günlük deney grubundaki Leydig hücrelerinde immun reaksiyon şiddetli (+++) iken, 75 günlük deney grubunda immun reaksiyon orta şiddetli (++) olarak görülmüştür (Şekil-19, 21, 23, Tablo-6). Yapılan istatistiksel analizde herhangi bir farklılık görülmemiştir (Tablo-8).

35, 50 ve 75 günlük kontrol ve deney grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında immun reaksiyon bakımından herhangi bir farklılık görülmemiştir (Tablo-6). Ayrıca yapılan istatistiksel analizde de herhangi bir farklılık görülmemiştir (Tablo-8).

35 ve 50 günlük kontrol gruplarında olgun spermatidlerde immun reaksiyon zayıf (+) iken (Şekil-18, 20, Tablo-7), 75 günlük kontrol grubunda immun reaksiyon orta şiddette (++) (Şekil-22, Tablo-7) gözlenmiş ve 35 günlük kontrol grubu ile 75 günlük kontrol grubu karşılaştırıldığında $p < 0,005$ düzeyinde istatistiksel önem bulunmuştur (Tablo-8).

35 ve 50 günlük deney gruplarında olgun spermatidlerde immun reaksiyon zayıf (+) iken (Şekil-19, 21, Tablo-7), 75 günlük deney grubunda immun reaksiyon şiddetlenmiştir (+++) (Şekil-23, Tablo-7). 35 ve 50 günlük deney grupları 75 günlük deney grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında $p < 0,005$ düzeyinde istatistiksel önem bulunmuştur (Tablo-8).

Kontrol ve deney gruplarında olgun spermatidlerde TGF- β_2 ekspresyonu sonuçları incelendiğinde 35 ve 50 günlük kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında immun reaksiyon şiddetinde bir fark görülmediği gibi bu gruplar arasında istatistiksel bir farklılığa da rastlanmamıştır (Tablo-8). 75 günlük kontrol grubunda immun reaksiyon orta şiddette (++) iken 75 günlük deney grubunda immun reaksiyon şiddetli (+++) olarak görülmüştür (Tablo-7). Fakat istatistiksel bir önem bulunmamıştır (Tablo-8).

Tablo-6: Kontrol ve deney gruplarındaki Leydig hücrelerinde $TGF\beta_2$ 'in ekspresyonu (-) boyanmama, (+) zayıf boyanma, (++) orta şiddette boyanma, (+++)şiddetli boyanma

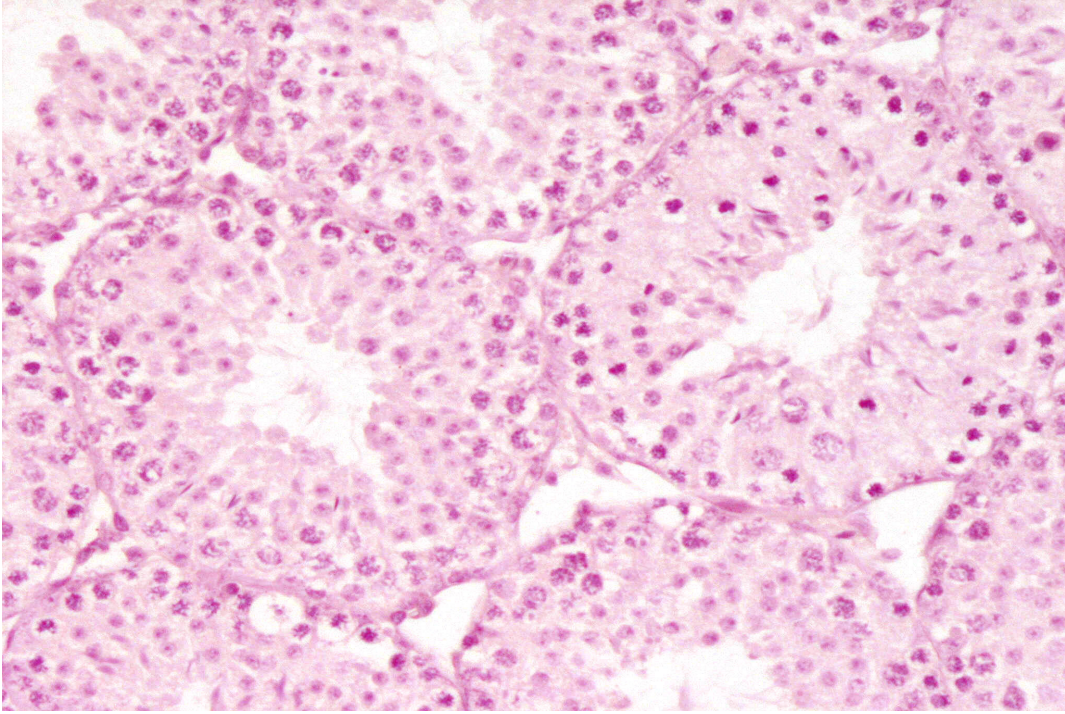
	Kontrol Grubu	Deney Grubu
35 günlük dönem	+++	+++
50 günlük dönem	+++	+++
75 günlük dönem	++	++

Tablo-7: Kontrol ve deney gruplarındaki olgun spermatidlerde $TGF\beta_2$ 'in ekspresyonu (-) boyanmama, (+) zayıf boyanma, (++) orta şiddette boyanma, (+++)şiddetli boyanma

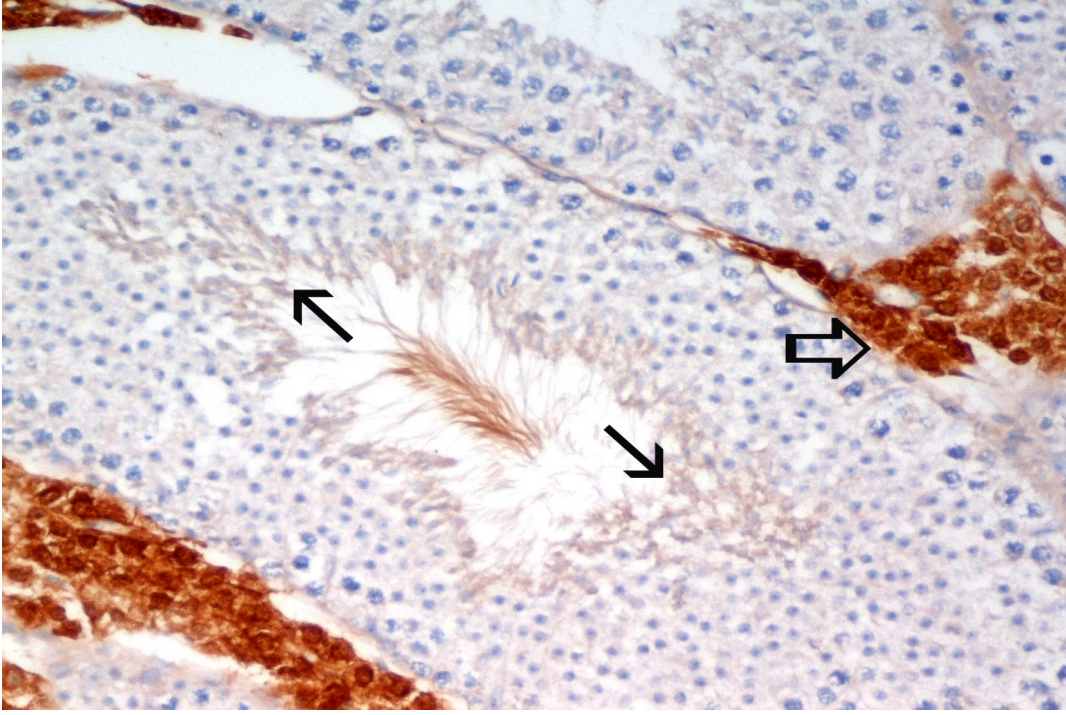
	Kontrol Grubu	Deney Grubu
35 günlük dönem	+	+
50 günlük dönem	+	+
75 günlük dönem	++	+++

Tablo-8: Kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlara ait TGF- β_2 immunohistokimyasal skor ortalamaları **K:** Kontrol Grubu, **D:** Deney Grubu,
*: İki değer arasındaki önem ($p<0,05$)

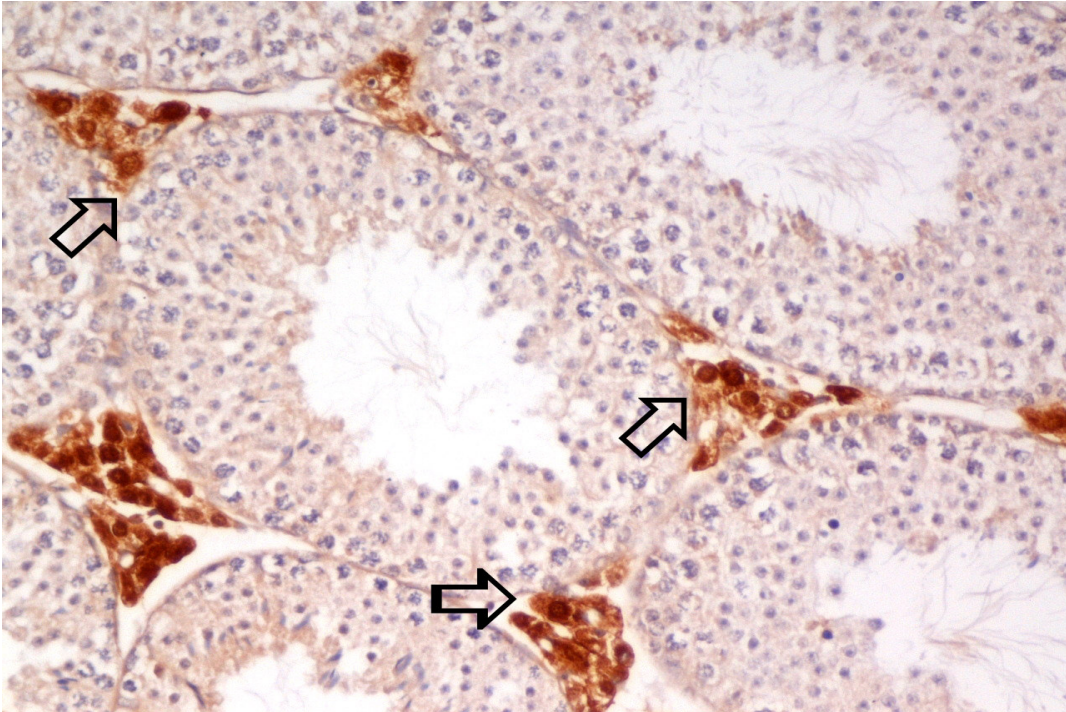
Kontrol/Deney	K/K		K/K		K/K		D/D		D/D		D/D		D/K		D/K		D/K	
Gruplar	35	50	35	75	50	75	35	50	35	75	50	75	35	35	50	50	75	75
Leydig Hücresi	2,9	2,6	2,9	1,9	2,6	1,9	2,8	2,7	2,8	2,7	2,7	2,7	2,8	2,9	2,7	2,6	2,7	1,9
Olgun Spermatisit	0,8	1,3	0,8	1,9*	1,3	1,9	0,6	1,2	0,6	2,3*	1,2	2,3*	0,6	0,8	1,2	1,3	2,3	1,9



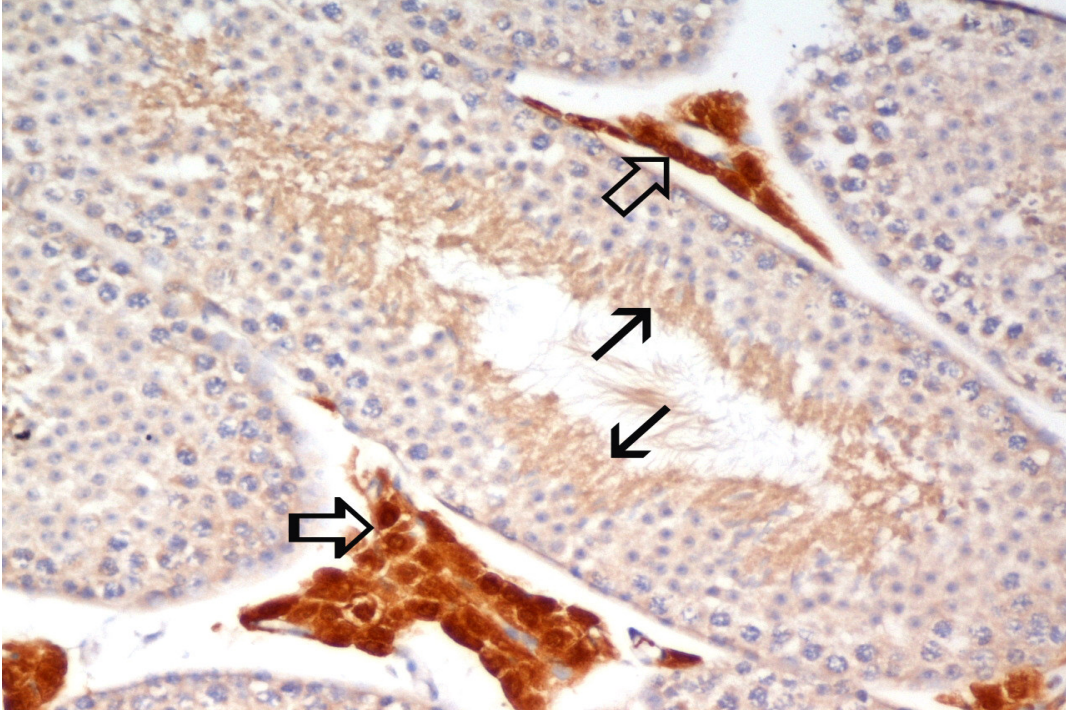
Şekil-17: TGF- β_2 ekspresyonu için negatif preparat, x10 objektif



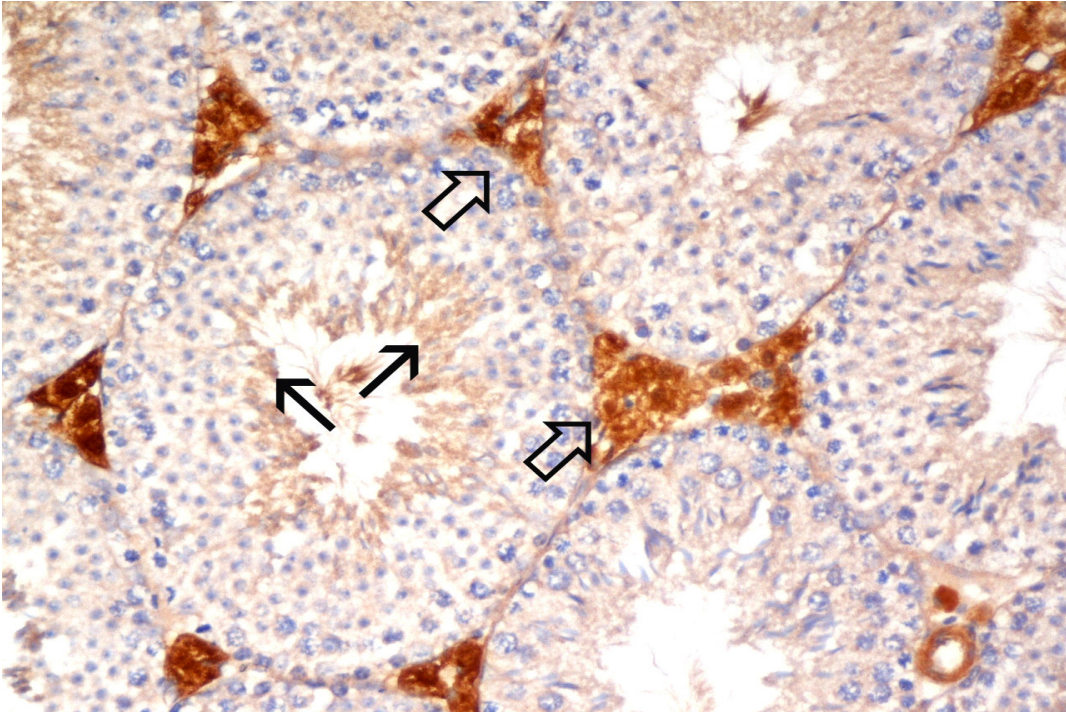
Şekil-18: 35 günlük kontrol grubunda TGF- β_2 ekspresyonu, x20 objektif,
↑: olgun spermatid, ⇨: Leydig hücresi



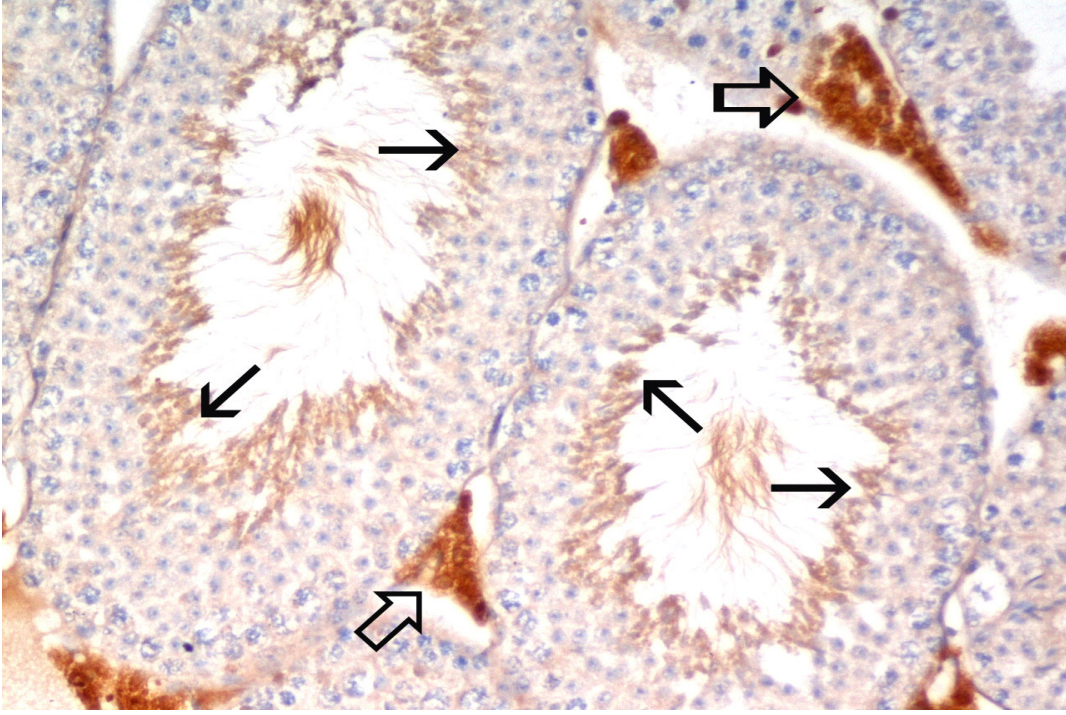
Şekil-19: 35 günlük deney grubunda TGF- β_2 ekspresyonu, x20 objektif,
↑: olgun spermatid, ⇨: Leydig hücresi



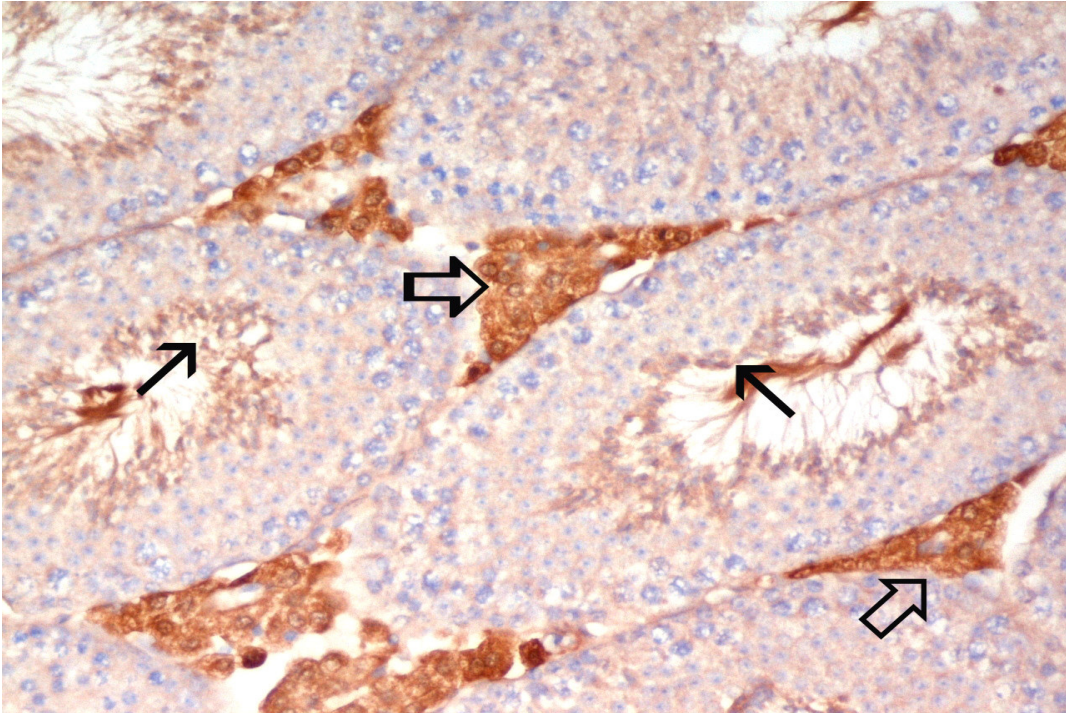
Şekil-20: 50 günlük kontrol grubunda TGF- β_2 ekspresyonu, x20 objektif,
↑: olgun spermatid, ⇨: Leydig hücresi



Şekil-21: 50 günlük deney grubunda TGF- β_2 ekspresyonu, x20 objektif,
↑: olgun spermatid, ⇨: Leydig hücresi



Şekil-22: 75 günlük kontrol grubunda TGF- β_2 ekspresyonu, x20 objektif,
↑: olgun spermatid, ⇨: Leydig hücresi



Şekil-23: 75 günlük deney grubunda TGF- β_2 ekspresyonu, x20 objektif,
↑: olgun spermatid, ⇨: Leydig hücresi

TARTIŞMA ve SONUÇ

TGF- β 'lar; adrende, megakaryositlerde, kondrositlerde, kalp kası hücrelerinde, böbrekteki tubulus distalislerde, testislerde, ovaryumdaki intersitisiel hücreleri ve plasentanın koriyonik hücrelerinde bulunur ve hücrelerin gelişmesini ve büyümesini düzenleyen çok fonksiyonlu büyüme faktörleridir (77)

Memeli testislerinde TGF- β_1 , TGF- β_2 ve TGF- β_3 izole edilmiş ve bu büyüme faktörlerinin testiküler fonksiyonların parakrin/otokrin düzenleyicileri oldukları gösterilmiştir (56) .

Srinivasan ve ark. (78) fare yemlerine % 2 Capsaicin ilave ederek hayvanları 7 hafta boyunca beslemişlerdir. Deneyin ilk dört haftasında hayvanlarda kilo artışı görülürken, beşinci haftadan itibaren kilolarında azalma tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada, deney gruplarındaki hayvanların canlı ağırlıklarının kontrol gruplarına oranla daha fazla olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu bulgular Srinivasan ve arkadaşlarının ilk dört haftadaki bulguları ile benzerlik göstermektedir. Sambaiah ve ark. (79) ve Oh ve ark. (80) ratlar ile yaptıkları çalışmalarda, CAP'ın non-steroid yağ asitlerini mobilize ettiğini ve ana enerji kaynağı olarak kullanılmasını sağladığını bildirmişlerdir. Ayrıca CAP uygulanan hayvanlarda hareketliliğin ve bu hareketlilik süresinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada CAP enjeksiyonundan sonra özellikle 50 ve 75 günlük hayvanlarda uzun süreli bir hareketlilik gözlenmesi bu çalışmalar ile desteklenmiştir.

Sunulan çalışmada hayvanların testis ağırlıkları incelendiğinde kontrol ve deney gruplarında ilk iki dönemde artış gözlenirken, üçüncü dönemde sadece kontrol grubunda artış, deney grubunda ise bir azalma gözlenmiştir. Bizim bulgularımızın aksine, Özer ve ark.'ları (39), yemlerine % 1 acı kırmızı biber ilave edilen ve 1 günlük yaştan itibaren beslenen horozlarla yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna göre deney grubu hayvanlarının testis ağırlıklarında artış gözlemişlerdir. Bulgular arasında gözlenen bu farklılık, kullanılan CAP'nin türü, dozu, veriliş yolu ve çalışmada kullanılan hayvan türünün farklılığından kaynaklandığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda kontrol ve deney grubu testislerinde makroskopik görünüm açısından bir farklılık görülmemesine rağmen, testis dokuları Crossman'ın üçlü boyama yöntemi (75) ile boyanıp incelendiğinde, deney grubu testislerinde tubulus seminiferus kontortusların çaplarının kontrol grubuna göre daha büyük olduğu gözlenmiştir. Bunun

dışında interstisiyel gelişmede hiçbir farklılık görülmemiştir. Tubuler gelişmede ise kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında deney gruplarındaki primer spermatosit yoğunluğunun kontrol gruplarına oranla daha fazla olduğu görülmüş, bununla birlikte deney gruplarındaki genç ve olgun spermatid yoğunluğunun yaşla beraber artışının dikkat çekici olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular Özer ve ark. (39) horozlarla yapmış oldukları çalışmanın bulguları ile benzerlik göstermiştir. Özer ve arkadaşları gelişme dönemlerinde düşük dozda acı kırmızı biberli rasyonla beslenen horozların seminifer tubullerinde duvar kalınlığının arttığını ve seminifer tubuluslarda spermatogenik hücre serisinin kontrol grubundan 1 ay önce üçüncü aydan itibaren tamamlandığını bildirmişlerdir.

Bazı araştırmacılar (6, 7, 11), TGF- β_1 'i puberte dönemindeki rat testislerinde immunohistokimyasal olarak, Leydig hücrelerinde ve genç spermatidlerde gözlerken, erişkin rat testislerinde TGF- β_1 'i sadece Leydig hücrelerinde gözlemişler ve Leydig hücrelerinde boyanma şiddetinin yaşla beraber azaldığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada, kontrol grubunun Leydig hücrelerinde immunohistokimyasal bulgular değerlendirildiğinde, TGF- β_1 ekspresyonunun 35 günlük puberte dönemindeki farelerde gözlenmediği, 50 günlük puberte sonrası farelerin Leydig hücrelerinde yoğun olduğu, 75 günlük erişkin dönemdeki farelerde ise boyanma şiddetinde azalma olduğu gözlenmiş, TGF- β_1 her üç dönemde de genç spermatidlerde yaşa bağlı olarak artan yoğunlukta ekspresyon göstermiştir. Bu bulgular diğer araştırmacıların (6, 7, 11) bulguları ile benzerlik göstermekte ancak genç spermatidlerde alınan sonuçlarda farklılık görülmemektedir.

Çalışmamızın deney grubunda, Leydig hücrelerinde TGF- β_1 immunreaksiyonu, kontrol grubundan farklı olarak 35. günde zayıf şiddette görülmeye başlanmış ve yaşla birlikte boyanma şiddetinin bu hücrelerde arttığı gözlenmiştir. Jung ve ark. (81) TGF- β 'ların testiküler gelişim ve fonksiyonda önemli rol oynadığını belirtmektedir. *In vitro* çalışmalarda (12) ise, TGF- β_1 'in yüksek konsantrasyonunun LH salınımını inhibe ederek testosteron üretimini durdurduğu ve spermatogenezisi düzenlediğini bildirmişlerdir. Erdost ve ark. (40) yapmış oldukları çalışmada acı kırmızı biberli rasyonla beslenen tavuk ve horozların hipofiz bezinden ilk aylardan itibaren FSH ve LH sentezinin arttığı saptanmış, hipofizde endokrin hücreleri ile ilişki içinde olan çok sayıda SP içeren fibriller bulunması CAP'ın direkt hipofize etki ettiğini ve bu nedenle de deney grubundaki horoz ve tavukların gonad gelişimini kontrol grubu hayvanlardan daha önce başladığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da deney grubunda kontrol grubundan farklı olarak erken dönemde, TGF- β_1 reaksiyonunun Leydig hücrelerinde zayıf şiddette gözlenmesi, CAP'ın

düşük konsantrasyonunun sinirsel innervasyondan zengin olan testis üzerine olumlu etki yaptığını, bu fonksiyonunu sensorik sinir sonlarından SP ve CGRP gibi neurotransmitter maddelerin salınımını uyararak (82), spermatojenik hücre gelişiminin kontrol grubuna göre daha erken dönemde başlamasını sağladığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın kontrol grubunda, genç spermatidlerde TGF- β_1 boyanma yoğunluğu yaşla beraber artmıştır. Elde edilen bu bulgular, erişkin dönemdeki ratların genç spermatidlerinde immunreaksiyon gözlenmediğini belirten araştırmacıların (6, 7, 11) bulgularıyla farklılık göstermiştir. Watrin ve ark.(83) ise erişkin fare testislerindeki genç spermatidlerde TGF- β_1 mRNA eksprese edildiğini belirtmesi bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Çalışmamızın 50 ve 75 günlük deney gruplarındaki genç spermatidlerde TGF- β_1 immun boyanma yoğunluğunun kontrol gruplarından farklı olarak bu dönemlerde değişmediği ve aynı şiddette eksprese edildiği gözlenmiştir. Bazı araştırmacılar (12, 59, 81) TGF- β_1 'in yüksek konsantrasyonunun spermatogenik hücrelerde mitotik aktiviteyi inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızın 75 günlük kontrol grubundaki genç spermatidlerde TGF- β_1 'in şiddetli immunreaksiyon göstermesi yukarıdaki araştırmacıların belirttiği gibi bu hücrelerde mitotik aktivitenin azaldığını, deney grubunda ise reaksiyon şiddetinin kontrole göre daha zayıf olmasının genç spermatidlerde aktivitenin devam ettiği sonucuna varılmasına neden olmuştur.

Teerds ve ark. (7) Olaso ve ark. (9), ve Ingman ve ark. (11) puberte dönemindeki ratlarda sadece Leydig hücrelerinde, erişkin dönemdeki ratlarda ise hem Leydig hücrelerinde hem de olgun spermatidlerde TGF- β_2 ekspresyonu gözlemişler ve Leydig hücrelerindeki ekspresyonun yaşa bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada TGF- β_2 ekspresyonu Leydig hücrelerinde ve olgun spermatidlerde gözlenmiştir. Tüm kontrol ve deney gruplarındaki Leydig hücrelerinde TGF- β_2 ekspresyonu benzer yoğunlukta gözlenirken, 75 günlük kontrol ve deney gruplarının olgun spermatidlerindeki TGF- β_2 ekspresyon şiddeti arasında istatistiksel öneme sahip olmayan bir farklılık göstermiştir. Her iki grupta da 75. günlerde olgun spermatidlerde TGF- β_2 ekspresyonunun artmıştır. Jung ve ark. (81) yaptıkları çalışmalarında testislerde olgun spermatidlerde TGF- β_2 ekspresyonunun yaşa bağlı olarak arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen bulgu ile Jung ve arkadaşlarının bulguları arasında benzerlik bulunmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızdaki deney grubu testislerinde; tubulus seminiferus kontortusların çaplarının kontrol grubuna göre daha büyük olması, tubuluslarda primer

spermatozit yoğunluğunun fazla olması, bununla birlikte TGF- β_1 ekspresyonunun Leydig hücrelerinde kontrol grubuna göre deney grubunda daha erken dönemde gözlenmeye başlanması, CAP uygulanan farelerin puberteye kontrol grubu farelerine göre daha erken dönemde girdikleri sonucuna varmamıza neden olmuştur.

KAYNAKLAR

1. PIEK E, HELDIN C, DIJKE PT. Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *The FASEB Journal*, 13: 2105-18, 1999.
2. BONDESTAM J. Ligands & signaling components of the transforming growth factor beta family. Helsinki University Biomedical Dissertations No. 17, Helsinki, page 9-12, 2002.
3. GNESSI L, FABBRI A, SPERA G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: An integrated system with hormones and local environment. *Endocrine Reviews*, 18: 541-609, 1997.
4. BLOBE CG, SCHIEMANN WP, LODISH HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England Journal of Medicine*, 342: 1350-8, 2000.
5. HEDGER MP, MEINHARDT A. Cytokines and the immune-testicular axis. *Journal of Reproductive Immunology*, 58: 1-26, 2003.
6. MULLANEY BP, SKINNER MK. Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Molecular Endocrinology*, 7: 67-76, 1993.
7. TEERDS KJ, DORRINGTON JH. Localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 during testicular development in the rat. *Biology of Reproduction*, 48: 40-5, 1993.
8. OLASO R, GAUTIER C, LEVACHER C, DURAND P, SAEZ J, HABERT R. The immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 2 in the fetal and neonatal rat testis. *Molecular and Cell Endocrinology*, 7: 165-172, 1997.
9. OLASO R, PAIRAULT C, HABERT R. Expression of type I and II receptors for transforming growth factor beta in the adult rat testis. *Histochemical Cell Biology*, 110: 613-8, 1998.
10. CUPP AS, KIM G, SKINNER MK. Expression and action of transforming growth factor beta (tgfbeta-1, tgfbeta-2, and tgfbeta-3) during embryonic rat testis development. *Biology of reproduction*, 60: 1304-13, 1999.
11. INGMAN WV, ROBERTSON SA. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays*, 24: 904- 14, 2002.
12. LUI WY, LEE WM, CHENG CY. TGF-Betas: Their role in testicular function and Sertoli cell tight junction dynamics. *International Journal of Andrology*, 26: 147-160, 2003.

13. LEMBECK F. Columbus, capsicum and capsaicin: Past, present and future. *Acta Physiology of Hungary*, 69: 265-73, 1987.
14. TAKAHATA K, CHEN X, MONOBE K, TADA M. Growth inhibition of capsaicin on hela cells is not mediated by intracellular calcium mobilization. *Life Sciences*, 64: 165-71, 1999.
15. SZALLASI A, BLUMBERG PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews*, 51: 159-212, 1999.
16. PYAN DG, LEVINE JD, GOETZL EJ. Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *Journal of Immunology*, 132: 1601-04, 1984.
17. PANOSSIAN A, GABRIELIAN E, WAGNER H. Dose-dependent reversible effects of capsaicin on interleukin-1 a production is associated with the metabolism of arachidonic acid (Leukotriene B4 and Prostaglandin E2) as well as nitric oxide production in human leucocytes. *Phytomedicine*, 3: 169-174, 1996.
18. KRESS M, GUTIMANN C, AVERBECK B, REEH PW. Calcitonin gene related peptid and Prostaglandin E2 but not Substance P release induced by antidromic nevre stimulation from rat skin in vitro. *Neuroscience*, 89: 303-10, 1999.
19. RITTER S, DINH TT. Capsaicin induced neuronal degeneration: Silver impregnation of cell bodies, axons, and terminals in the central nervous system of the adult rat. *Journal of Comparative Neurology*, 271: 79-90, 1988.
20. CATERINA MJ, SCHUMACHER MA, TOMINAGA M, ROSEN TA, LEVINE JD, JULIUS D. The Capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-24, 1997.
21. DURGA PM, NAU C. Desensitization of capsaicin- activated currents in the Vanilloid Receptor TRPV1 is decreased by the cyclic amp-dependent protein kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 50080-90, 2003.
22. RASHID MH, INOUE M, KONDO S, KAWASHIMA T, BAKOSHI S, UEDA H. Novel expression of Vanilloid receptor 1 on capsaicin-insensitive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. *Journal of Pharmacology*, 304: 940-8, 2003.
23. STANISZ AM, BEFUS D, BIENENSTOCK J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, Substance P, and Somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *Journal of Immunology*, 136: 152-6, 1986.

24. HELME RD, EGLEZO A, DANDIE GW. The effect of Substance P on the regional lymph node antibody response to antigen stimulation in capsaicin pretreated rats. *Journal of Immunology*, 139: 3470- 73, 1987.
25. KRISHNA A, GHOSH JJ. Capsaicin pretreatment protects free radical induced rat lung damage on exposure to gaseous chemical lung irritants. *Phytotherapy Research*, 3: 159-161, 1989.
26. BIGGS DF, LADENIUS RC. Capsaicin selectively reduced airway responses to histamine, Substance P, and vagal stimulation. *European Journal of Pharmacology*, 175: 29-33, 1990.
27. SAMBAIAH K, SATYANARAYANA MN. Hypocholesterolemic effect of red pepper and capsaicin. *Indian Journal Expanded Biology*, 18: 898-99, 1980.
28. MONSEREENUSORN Y. Subchronic toxicity studies of capsaicin and capsicum in rats. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 41: 95-110, 1983.
29. KAWADA T, SAKABE S, WATANABE T, YAMAMOTO M, IWAI K. Some pungent principles of spices cause the adrenal medulla to secrete catecholamine in anesthetized rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 188: 229-33, 1988.
30. YOSHIOKA M. Effects of red-pepper diet on the energy metabolism in men. *Journal Nutrition Science Vitaminol*, 41: 647-56, 1995.
31. MEINYK A, HIMMS-HAGEN J. Resistance to aging-associated obesity in Capsaicin-desensitized rats one year after treatment. *Obesity Research*, 3: 337-44, 1995.
32. DOUCET E, TREMBLAY A. Food intake, energy balance and body weight control. *European Journal Clinical Nutrition*, 51: 846-55, 1997.
33. LIM K. Dietary red pepper ingestion increases carbohydrate oxidation at rest and during exercise in runners. *Medical Science Sports Exercise*, 29: 355-61, 1997.
34. OKTAY E, OLGUN H. Kırmızı biberin new hampshire tavuklarında yumurta verimi, yumurta kalitesi ve kuluçka verimine etkisi, IV. *Bilim Kongresi Bildiri Kitabı*, Ankara, sayfa 1-6, 1973.
35. FURUSE M, NAKAJIMA SI, MIYAGAWA S, NAKAGAWA J, OKUMURA JI. Feeding behavior, abdominal fat and laying performance in laying hens given diets containing red pepper. *Japanese Poultry Science*, 31: 45-52, 1994.

36. ÖZER A, ERDOST H, ZİK B. Tavuklarda acı kırmızı biberli rasyonla beslemenin reproduktif sistem organları üzerine etkisinin histolojik yönden incelenmesi. Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu Proje No: 96/8, 1999.
37. ÖZER A, ERDOST H, ZİK B, ÖZFİLİZ N. Horozlarda acı kırmızı biberli rasyonla beslemenin reproduktif sistem organları üzerine etkisinin histolojik yönden incelenmesi. Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu Proje No: 98/21, 2001.
38. ÖZER A, ERDOST H., ZİK 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.
39. ÖZER A, ZİK B, ERDOST H, ÖZFİLİZ N. Histological investigations on the effects of feeding a diet containing red hot pepper on the reproductive organs of the cock. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30: 7-15, 2006.
40. ERDOST H, YAKIŞIK M, ÖZFİLİZ N, ZİK B, ÇAVUŞOĞLU İ, KAHVECİ Z, NOYAN S. Acı kırmızı biberli rasyonla beslenen tavuk ve horozlarda hipofiz ve epifiz bezlerinin yapısal özellikleri. Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje No: 2000/12, Bursa.
41. STEVENS A, LOWE J. *Human histology*, C.V. Mosby Press, 2nd edition, London, page 309-325, 1997.
42. ARTAN E. *Histoloji*, İstanbul Üniversitesi Basımevi, 1.baskı, İstanbul, sayfa 357-375, 1988.
43. ÖZER A, YAKIŞIK M, ÖZFİLİZ N, ERDOST H, ZİK B. *Histoloji Kılavuzu*, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1.baskı, Bursa, sayfa 164–174, 2006.
44. PEKER Ş. *Histoloji*, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1.baskı, Bursa, sayfa 260-287, 1990.
45. RUSSELL LD, ETTLIN RA, HIKIM APS, CLEG ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*, Cache River Press, USA, page 1-160, 1990.
46. BANKS WJ. *Applied veterinary histology*, 2nd edition, Williams&Wilkins Press, Baltimore, page 489–505, 1985.
47. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, KELLEY RO. *Basic histology (Temel Histoloji)*. Çeviren: AYTEKİN Y. Barış Kitabevi, 6. baskı, İstanbul, sayfa 495-516, 1993.
48. ROSS MH, Kaye IG, Pawlina W. *Histology a text and atlas*, 4.th edition, Lippincott Williams & Wilkins Press, USA, page 690–4, 2003.
49. GÜRSOY E, KOPTAGEL E. *Embriyoloji Atlası*, 1. baskı, Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas, sayfa 6–30, 1997.

50. DELLMANN HD, BROWN EM. Text book of veterinary histology, 2nd Edition, Lea&Febiger Press, Philadelphia, page 282–308, 1981.
51. ROOIJ DG, GROOTEGOED JA. Spermatogonial stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(6): 694–701, 1998.
52. TAM PP, SNOW MH. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 64: 133-47, 1981.
53. OAKBERG EF. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *The Anatomical Record*, 169(3): 515-31, 1971.
54. RAVINDRANATH N, DALAL R, SOLOMON B, DJAKIEW D, DYM M. Loss of telomerase activity during male germ cell differentiation. *Endocrinology*, 138(9): 4026-9, 1997.
55. MOUSTAKAS A, SOUCHELNYTSKYI S, HELDIN CH. Smad regulation in tgf-beta signal transduction. *Journal of Cell Science*, 114: 4359-69, 2001.
56. ZHANG YQ, HE XZ, ZHANG JS, WANG RA, ZHOU J, XU RJ. Stage-specific localization of transforming growth factor beta1 and beta3 and their receptors during spermatogenesis in men. *Asian Journal of Andrology*, 6: 105-9, 2004.
57. BENAHMED M, SORDOILLET C, CHAUVIN MA, DEPERETTI E, MORERA AM. On the mechanisms involved in the inhibitory and stimulating actions of transforming growth factor-beta on porcine testicular steroidogenesis: An in vitro study. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 67: 155-64, 1989.
58. GAUTIER C, LEVACHER C, SAEZ JM, HABERT R. Expression and regulation of transforming growth factor beta1 mRNA and protein in rat fetal testis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(1): 135-9, 1997.
59. KHAN SA, MIRSAFIAN M, HOWDESHELL K, DORRINGTON JH. Transforming growth factor- β inhibits DNA synthesis in immature rat Leydig cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 148: 21-8, 1999.
60. MASSAGUE J, CHEIFETZ S, ENDO T, NADAL-GINARD B. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 8206–10, 1986.
61. ROBERTS AB, SPORN MB, ASSOIAN RK. Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of

- collagen formation in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83, 4167-71, 1986.
62. VARGA J, ROSENBLOOM J, JIMENEZ SA. Transforming growth factor beta causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochemistry Journal*, 1: 597-604, 1987.
 63. MORERA AM, ESPOSITO G, GHIGLIERI C, CHAUVIN MA, HARTMANN DJ, BENAHMED M. Transforming growth factor beta 1 inhibits gonadotropin action in cultured porcine Sertoli cells. *Endocrinology*, 130: 831-6, 1992.
 64. KONRAD L, ALBRECHT M, RENNEBERG H, AUMULLER G. Transforming growth factor-beta2 mediates mesenchymal-epithelial interactions of testicular somatic cells. *Endocrinology*, 141: 3679-86, 2000.
 65. 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(5464): 306-13, 2000.
 66. KILO S, HARDING-ROSE C, HARGREAVES KM, FLORES CM. Peripheral CGRP release as a marker for neurogenic inflammation: A model system for the study of neuropeptide secretion in rat paws skin. *Pain*, 73: 201-7, 1997.
 67. VYKLICKY L, LYFENKO A, KUFFLER DP, VLACHOVA V. Vanilloid receptor TRPV1 is not activated by vanilloids applied intracellularly. *Neuroreport*, 14: 1061-65, 2003.
 68. THERIAULT E, OTSUKA M, JESSEL T. Capsaicin-evoked release of Substance P from primary sensory neurons. *Brain Research*, 170: 209-13, 1979.
 69. TELLEZ GI, JAEGER L, DEAN CE, CORRIER DE, DELOACH JR, WILLIAMS JD, HARGIS BM. Effect of prolonged administration of dietary capsaicin on salmonella enteritidis infection in leghorn chicks. *Avian Disorders*, 37:143-8, 1993.
 70. ZHOU FW, LI YJ, DENG HW. Early and delayed protection by capsaicin against reperfusion in jury in rat hearts. *Acta Pharmacologica Sinicia*, 20: 912-6, 1999.
 71. TENG CH, KANG JY, WEE A, LEE KO. Protective action of capsaicin and chilli on haemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in the rat. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13: 1007-14, 1998.
 72. TRUE LD. Principles of immunohistochemistry. Editor: TRUE LD. Atlas of Diagnostic Immunohistopathology. New York Press, USA, page 1.1-1.31, 1990.

73. JACKSON P, BLYTHE D. Immunolabelling techniques for light microscopy. Editor: BEESLEY JE, Immunocytochemistry, Oxford University Press, New York, USA, page 15–43, 1993.
74. ADAMS EJ, GREEN JA, CLARK AH, YOUNGSON JH. Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining. *Journal of Clinical Pathology*, 52: 75-77, 1999.
75. CROSSMON G. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of principles involved. *Anatomical Record*, 69: 33-38, 1937.
76. KAN İ. Biyoistatistik, 1. baskı, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, sayfa 145-155, 1998.
77. THOMPSON NL, FLANDERS KC, SMITH JM, ELLINGSWORTH LR, ROBERTS AB, SPORN MB. Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *The Journal of Cell Biology*, 108: 661-9, 1989.
78. SRINIVASAN MR, SATYANARAYANA MN. Influence of capsaicin, curcumin and ferulic acid in rats fed high fat diets. *Journal of Bioscience*, 12(2): 143-152, 1987.
79. SAMBAIAH K, SATYANARAYANA MN. Influence of red pepper and capsaicin on body composition and lipogenesis in rats. *Journal of Bioscience*, 4(4): 425-430, 1982.
80. OH W, OHTA F. Dose-dependent effect of capsaicin on endurance capacity in rats. *British Journal of Nutrition*, 90: 515-20, 2003.
81. JUNG JC, PARK GT, KIM KH, WOO JH, AN JM, KIM KC, CHUNG HY, BAE YS, PARK JW, KANG SS, LEE YS. Differential expression of transforming growth factor-beta in the interstitial tissue of testis during aging. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92: 92-98, 2004.
82. HOLZER P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacology Review*, 43(2): 143-201, 1991.
83. WATRIN F, SCOTTO L, ASSOIAN RK, WOLGEMUTH DJ. Cell lineage specificity of expression of the murine transforming growth factor beta 3 and transforming growth factor beta 1 genes. *Cell Growth Difference*, 2(2): 77-83, 1991.

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesi, planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması aşamalarında yardımlarını esirgemeyerek yanımda olan Anabilim Dalı Başkanımız ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aytekin ÖZER'e sonsuz teşekkür ederim. Tezimin hazırlanması sırasında bana her türlü yardımlarından dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Bahri YILDIZ'a, Sayın Prof. Dr. Hatice ERDOST'a, ayrıca Anabilim Dalı öğretim üye ve elemanları Sayın Prof. Dr. Nesrin ÖZFİLİZ'e, Sayın Doç. Dr. Berrin ZİK'a, Araş. Gör. Şerife TÜTÜNCÜ'ye, Araş. Gör. Tuncay İLHAN'a ve diğer arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren sevgili ailem, annem Meral ÖZGÜDEN ile babam Prof. Dr. Turgut Ali ÖZGÜDEN'e ve doktora eğitimim süresince bana destek olan sevgili eşim Araş. Gör. Dr. Ahmet AKKOÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İstanbul'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Bursa Özel İhsan Çizakça İlk ve Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi ise Bursa Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladım. 1997 yılında kazandığım Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2002 yılında mezun oldum. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. Halen aynı anabilim dalında doktora eğitimime devam ediyorum. Evliyim.