



## Kapsaisin'in duodenumda histomorfolojik değişiklikler, IGF-I, EGFR ifadeleri ve hücre proliferasyonu üzerine etkisinin incelenmesi

Ender Deniz Asmaz<sup>1</sup>, Berrin Zık<sup>2</sup>

1 Ankara Medipol üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji- Embriyoloji AD, 06570 Ankara, Türkiye

2 Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji- Embriyoloji AD, 16059, Bursa, Türkiye

Gelis: 14.01.2025; Revizyon: 17.02.2025; Kabul Tarihi: 24.02.2025

### Öz

**Amaç:** Kapsaisin, hayvanlarda ve insanlarda deneysel gastrik mukozal hasara karşı gastrointestinal sistemde dikkate değer koruyucu etkilere sahip olan acı biberin ana aktif bileşenidir. İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), sindirim sisteminde hücre çoğalmasını, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını düzenlemede önemli rol oynayan bir büyüme faktörüdür. Bu çalışmada düşük doz kapsaisin uygulaması sonrasında duodenumda IGF-I, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve Ki-67 immünoaktivitesini belirlemeyi ve bu tedavi yönteminin sıçan duodenumunda neden olduğu histomorfolojik değişiklikleri incelemeyi amaçladık.

**Yöntemler:** Deney sonunda 21 günlük 30 dişi Sprague-Dawley sıçan 3 gruba ayrıldı. Birinci grup; hiçbir tedavi uygulanmayan kontrol grubu (Kontrol-A), ikinci grup düşük doz Kapsaisin grubu (20 gün -0,5mg/ kg/ gün), üçüncü grup ise kapsaisin çözülürdüğü solventi alan vehicle grubu (Kontrol-B, 20-gün). Deney sonunda doku örnekleri toplandı ve hem immünohistokimyasal yöntemle IGF-I, EGFR ve Ki-67'nin ifade düzeyleri incelendi hem de histomorfolojik parametreler değerlendirildi.

**Bulgular:** Kapsaisin tedavi gruplarının villus yüksekliği, kript derinliği, total mukozal kalınlığı, villus/kript oranı, yüzey emilim alanı arttı. Ayrıca tedavi deney grubunun yüzey epitelinde, Lieberkühn kriptlerinde, Brunner bezlerinde ve düz kas tabakasında hem IGF-I hemde EGFR immünoreaksiyonu daha güçlü olarak belirlendi. Ki-67 ise deney grubunda yüzey epitelinde orta derecede immünoaktivite, Lieberkühn kriptlerinde güçlü immünoaktivite, Brunner bezlerinde orta derecede immünoaktivite gösterdi. Ayrıca kript bezlerinde değerlendirilen proliferasyon indeksi kontrol grubuna göre daha yüksekti.

**Sonuç:** Kapsaisin uygulamasının sıçanlarda büyüme faktörlerinin sentezi yoluyla hücre çoğalmasını uyardığı ve sindirim fonksiyonlarını kolaylaştırdığı sonucuna vardık.

**Anahtar kelimeler:** Kapsaisin; duodenum; EGFR; Ki-67; IGF-I.

DOI: 10.5798/dicletip.1657567

**Yazışma Adresi / Correspondence:** Berrin Zık, Ankara Medipol üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji- Embriyoloji AD, 06570 Ankara, Türkiye e-mail adresi: bzık@uludag.edu.tr

## Investigation of the effects of capsaicin on histomorphological changes, IGF-I, EGFR expressions and cell proliferation in the duodenum

### Abstract

**Objective:** Capsaicin (CAP) is the main active component of chili pepper, which has remarkable protective effects on the gastrointestinal tract against experimental gastric mucosal damage in animals and humans. Insulin like growth factor-I (IGF-I) is a growth factor that plays an important role in regulating cell proliferation, survival and differentiation in the digestive system. In this study, we aimed to determine IGF-I, epidermal growth factor receptor (EGFR) and Ki-67 immunoreactivity in the duodenum after low-dose capsaicin application and to examine the histomorphological changes caused by this treatment method in the rat duodenum.

**Methods:** At the end of the experiment, 30 female Sprague-Dawley rats, 21 days old, were divided into 3 groups. The first group was the control group (Control-A) that received no treatment, the second group was the low-dose Capsaicin group (20 days 0.5 mg/ kg/ day), and the third group was the vehicle group that received the solvent in which capsaicin was dissolved (Control-B, 20 days). At the end of the experiment, tissue samples were collected and both the expression levels of IGF-I, EGFR and Ki-67 were examined by immunohistochemical methods and histomorphological parameters were evaluated.

**Result:** The villus height, crypt depth, total mucosal thickness, villus/crypt ratio, and surface absorption area of the capsaicin treatment groups increased. In addition, both IGF-I and EGFR immunoreactivity were determined to be stronger in the surface epithelium, Lieberkühn crypts, Brunner glands, and smooth muscle layer of the treatment experimental group. Ki-67 showed moderate immunoreactivity in the surface epithelium, strong immunoreactivity in Lieberkühn crypts, and moderate immunoreactivity in Brunner glands in the experimental group. In addition, the proliferation index evaluated in the crypt glands was higher than in the control group.

**Conclusion:** We concluded that capsaicin application stimulates cell proliferation through the synthesis of growth factors in rats and facilitates digestive functions.

**Keywords:** Capsaicin; duodenum; EGFR; Ki-67; IGF-I.

### GİRİŞ

Kapsaisin (KAP), Solanaceae familyasının *Capsicum* cinsine aittir. Acı biberlerin ana bileşeni olan KAP (8-metil-N-vanilil-6-nonenamid), genellikle polimodal nosiseptörler olarak adlandırılan duyu C ve A $\delta$  liflerinin periferik terminalini seçici olarak aktive eder. Şu anda romatoid artrit ve diyabetik nöropati gibi çeşitli periferik durumların terapötik tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca KAP'ın gastrointestinal, kardiyovasküler ve solunum sistemleri ve lipid metabolizması üzerinde etkileri olduğu rapor edilmiştir. Günümüzde pek çok alanda çalışılan bir konu olan KAP etkisi, uygulanan doza, sisteme ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişmektedir<sup>1</sup>.

Düşük dozda KAP, duyu nöronlarının uçlarından katekolaminler, nörokinin A (NKA),

vazoaktif bağırsak polipeptidi (VIP), kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) ve P maddesi (SP) gibi nöropeptitlerin salınmasını uyarır<sup>2</sup>. Buna karşılık, yüksek dozda KAP, nörotoksik bir etki gösterir ve kapsaisine duyarlı sinir uçlarının uzun süreli, geri dönüşü olmayan bir inaktivasyonuna neden olarak duyu afferent fonksiyonlarının ve duyu nöropeptitleri salma yeteneklerinin kaybıyla sonuçlanır<sup>3</sup>.

KAP'ın hayvanların ve insanların mide mukozasını çeşitli hasarlara karşı koruduğu gösterilmiştir. Genel olarak KAP etkisinin, gastrointestinal sistemdeki duyu afferent nöronların aktive edilmesinden kaynaklandığı ve mukozal kan akışı, mukus sekresyonu ve bikarbonat sekresyonları gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonların aracılık ettiği düşünülmektedir<sup>4</sup>.

Büyüme faktörleri çok hücreli organizmaların gelişimi, büyümesi ve homeostazisi için gereklidir. Gastrointestinal sistem, insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF) etkisinin ana hedef organıdır<sup>5</sup>. IGF sistemi, gastrointestinal sistemde hücresel çoğalma, hayatta kalma ve apoptoz için önde gelen endokrin, parakrin ve otokrin düzenleyici eksen olarak işlev görür. Gastrointestinal sistemdeki IGF'lerin ve IGF reseptörlerinin varlığı ve dağılımı kapsamlı bir şekilde belirlenmiştir<sup>6</sup>.

Ayrıca epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), çeşitli hücre dışı uyarılara yanıt olarak hücre içi sinyalleşmeye aracılık eden bir reseptör tirozin kinazdır<sup>7</sup>. Reseptör tirozin kinazların epidermal büyüme faktörü ailesi, hücre proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını düzenlemede önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, EGF ailesi üyeleri epitelyal hücre göçünü, mukozal kan akışını, mukus üretimi ve salgılanmasını, gastrointestinal motiliteyi modüle etme yetenekleriyle ilişkilidir<sup>8</sup>.

Ki-67 nükleer proliferasyonla ilişkili bir antijendir. Hücre döngüsünün büyüme ve sentez aşamalarında ifade edilir ancak G0 fazında (dinlenme fazı) ifade edilmez<sup>9</sup>. Sindirim sistemini araştıran birçok araştırmacı, bu proliferasyon belirteci ve morfolojik parametreleri kullanarak tedavinin etkilerini ayrıntılı olarak ele almıştır<sup>10,11</sup>.

KAP, ağrı tedavisi için bir araştırma aracı veya topikal merhem olarakta kullanılır ve birçok kişi tarafından acı biber yoluyla düzenli olarak tüketilir. Bu miktar etnik gruplar arasında değişiklik göstermektedir, ancak çoğu insan diyet yoluyla düşük KAP seviyelerine maruz kalmaktadır<sup>12,13</sup>.

Çalışmalar KAP'ın organizmadaki birçok metabolizma üzerinde etkisi olduğunu göstermiştir. Ancak KAP'nin sindirim sistemindeki proliferatif etkileri ve büyüme

faktörleriyle ilişkisi konusunda yeterli veri bulunmamaktadır.

Bu çalışmada ilk kez düşük dozda KAP uygulamasının sıçan duodenumunda hem morfolojik değişiklikler hem de IGF-I, EGFR ve hücre proliferasyonu üzerine etkilerini belirlemeyi amaçladık.

## YÖNTEMLER

### Deney protokolü

Bu çalışmada, Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden elde edilen hormonal gelişimini tamamlayan 21 günlük Sprague-Dawley dişi sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanı olarak kullanılan Sprague Dawley sıçanı, tıbbi ve beslenme araştırmalarında yaygın olarak kullanılan, çok amaçlı yetiştirilmiş bir albino sıçan türüdür. Ana avantajı sakinliği ve kullanım kolaylığıdır. Hayvanlar çalışma süresince kontrollü laboratuvar koşulları altında tutuldu. Sıçanlar rastgele her birinde 10 hayvan bulunacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Birinci grup (Kontrol A) herhangi bir tedavi uygulanmayan grup, İkinci grup (KAP: deney grubu), %10 etanol, %10 Tween 80 ve %80 damıtılmış sudan oluşan bir solvent içinde hazırlanan KAP (Sigma Chemical Co.) (0.5 mg/kg/gün) subkutan olarak uygulandı (20 gün). Üçüncü gruba (Kontrol B: vehicle tedavisi), KAP'ı çözdürmede kullanılan solvent aynı şekilde eşit hacimde uygulandı (20 gün).

20 günlük KAP tedavisinin ardından hayvanlara sodyum pentobarbital enjeksiyonu yoluyla ötenazi uygulandı ve karın duvarları açıldı. Duodenumun bir kısmı bağırsaklardan çıkarıldı ve alkollü formaldehit içinde fikse edildi. Doku örnekleri rutin histolojik prosedürlere göre parafin bloklara gömüldü. Beş mikrometre kalınlığında kesitler alındı. IGF-I, EGFR ve Ki-67 lokalizasyonunun hem morfometrik hem de immünohistokimyasal değerlendirilmesi için bu kesitler kullanıldı.

Deney protokolleri için alınan etik kurul kararı ile (Karar no:2005/2- 2005) çalışma Ulusal

Sağlık Enstitüsünün Laboratuar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Rehberine ve Helsinki Deklerasyonu Prensiplerine uygun olarak uygulandı.

### Duodenumun Morfometrik Analizi

Morfometrik analiz için alınan kesitler Crossman'ın üçlü boyasıyla boyandı. Villus yüksekliği, kript derinliği, villus/kript oranı, toplam mukozal kalınlık, villus yüzeyi emilim alanı ölçüldü ve mikrograflar Nikon 80i mikroskobu ile fotoğraflandı<sup>14</sup>. Villus yüksekliğinin ölçümü villus ucundan villus-kript birleşimine kadar, kript derinliği ise villus-kript birleşiminden kriptin alt sınırına kadar ölçülmüştür<sup>15</sup>. Toplam mukozal kalınlığı villus ucundan kriptleri içeren en alt submukoza sınırına kadar ölçüldü. Villus emici yüzey alanı şu formül kullanılarak hesaplandı: Villus emici yüzey alanı =  $(2 \pi) \times (\text{ortalama villus genişliği}/2) \times \text{villus yüksekliği}$ <sup>14</sup>.

### Immunohistokimya

Standart streptavidin-biyotin peroksidaz kompleksi tekniği ImPRESS reaktif kiti (MP 7405, MP 7801) kullanılarak gerçekleştirildi. Kesitler deparafinize edilip hidratlandıktan sonra antijen retrieval için 750 W'lık bir mikrodalga fırında sodyum sitrat tamponu (1 M, pH 6.1) ile 3 x 5 dakika süreyle uygulama gerçekleştirildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesi açısından oda sıcaklığında 10 dakika süreyle bloke edildi (%3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi). Spesifik olmayan antikor bağlanmasını azaltmak için kesitlere 20 dakika boyunca bloking serumu uygulandı. Kesitler üreticinin firmanın önerdiği şekilde 1:100 IGF-1 primer antikoru (G-17) (sc-1422, Santa Cruz, CA, ABD), EGFR primer antikoru (sc-03, Santa Cruz, CA, ABD) ve 1:100 Ki-67 primer antikoru (Lab Vision klonu SP6) ile 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Numuneler PBS ile yeniden yıkandı ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca ImmPRESS reaktif (IGF-1 için anti-goat MP-7405, EGFR ve Ki-67 için anti-rabbit MP-7801) ile inkübe edildi. Son olarak görüntüleme için 3.3'-diaminobenzidin (DAB) kullanıldı ve

hematoksilin ile karşıt boyama yapıldı. Kesitler ksilol ile temizlendi ve entellan ile kaplandı.

Kesitler iki bağımsız gözlemci tarafından aşağıdaki puanlama sistemi kullanılarak değerlendirildi: 0, immün reaksiyon yok; 1, zayıf immün reaksiyon; 2, orta derecede immün reaksiyon; 3, güçlü immün reaksiyon<sup>16</sup>. Proliferatif indeks (PI) oranı, Ki-67 boyaması pozitif olan kript hücresi sayısının toplam kript hücresi sayısına oranı olarak hesaplandı. Kript başına çoğalan hücre sayısı, 10 kriptadaki çoğalan hücrelerin ortalaması olarak tanımlandı<sup>15,17</sup>.

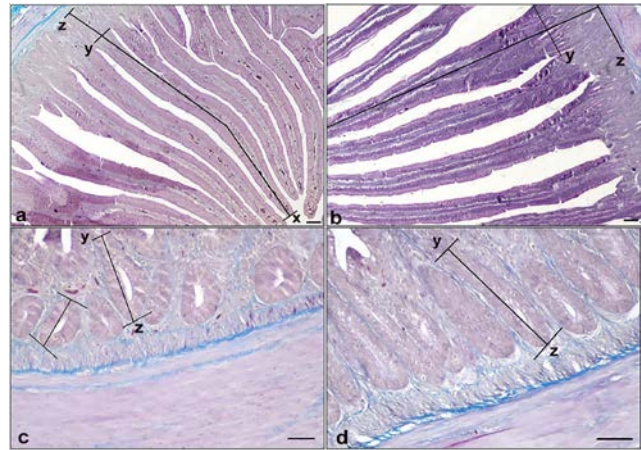
### İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizleri için IBM SPSS v29 programı kullanıldı. Tüm veriler ortalama±SD (Std Sapma) olarak sunuldu. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık tek yönlü ANOVA testi ve ardından Dunn'ın post hoc testi ile analiz edildi. Analizlerde p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### Morfometrik bulgular

Deney grubunda kontrol gruplarına göre villus yüksekliğinde (p<0,001), kript derinliğinde (p<0,05), toplam mukozal kalınlıkta (p<0,001), villus/kript oranında (p<0,001) ve villus yüzey emilim alanlarında (p<0,05) artış görüldü (Şekil 1,5a, Şekil 5, Tablo I).



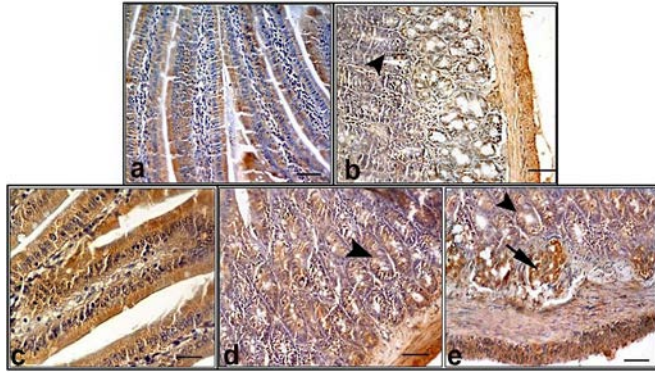
**Şekil 1.** (a) Kontrol grubu villus yüksekliği ölçümü (x-y)total mukozal kalınlığı ölçümü (x-z), (b) KAP tedavi grubu, (c) Kontrol grubu kript derinliği (y-z), (d) KAP tedavi grubu, kript derinliği (Bar:50 µm), Crossman üçlü boyama, a,b:4X- c,d:40X

**Tablo I:** Kontrol gruplarının ve deney grubunun villus yüksekliği, kript derinliği, villus/kript oranı, total mukozal kalınlığı ve villus yüzey emilim alanının morfometrik analizi. Veriler Ortalama±SD olarak sunulmuştur (standart sapma). Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel anlamlılığı gösterir (a,b,c)

Gruplar	N	Villus yüksekliği	Kript derinliği	Total mukozal kalınlık	Villus /Kript	Yüzey emilim alanı
Kontrol A	10	1009,02±17,1 <sup>a</sup>	546,5±28,5 <sup>a</sup>	2117,7±48,7 <sup>a</sup>	1,84 <sup>a</sup>	1,30±0,3 <sup>a</sup>
Kontrol B	10	1061,04±37,1 <sup>a</sup>	550,2±24,5 <sup>a</sup>	2068,58±68,1 <sup>b</sup>	1,92 <sup>a</sup>	1,34±0,4 <sup>a</sup>
KAP	10	1226,65±35,5 <sup>b</sup>	571,5± 23,9 <sup>b</sup>	2267,7 ± 41,5 <sup>c</sup>	2,14 <sup>b</sup>	1,47±0,03 <sup>b</sup>
<i>P değeri</i>		0.001	0.034	0.001	0.001	0.42

### Duodenumda IGF-1 immünoreaktivitesi

IGF-I immünoreaktivitesi villusun epitelyal katmanında, duodenumun Brunner bezlerinde, düz kas katmanında ve kriptalarda tespit edildi (Şekil 2,5b). Söz konusu bölgelerde gruplar arasında IGF-I immünoreaksiyonunun ekspresyonundaki farklılıkları Tablo II'de sunulmaktadır. Bölgelerde IGF-I ifadesinin intrasitoplazmatik olarak dağıldığı görülmüştür.



**Şekil 2.** Yüzey epitel hücrelerinde, kriptlerde (ok başı) ve Brunner bezlerinde (ince ok) IGF-I ekspresyonu, (a) Kontrol A, (b) Kontrol B grubu, (c-d-e) KAP tedavi grubu (Bar 50 µm), immunohistokimya. a,b: 40X- b,d,e:20X

**Tablo II:** Yüzey epitelinde, Brunner bezlerinde, kriptlerde, sirküler ve longitudinal kaslarda IGF-I ifadesi. Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel anlamlılığı gösterir (a,b,c)

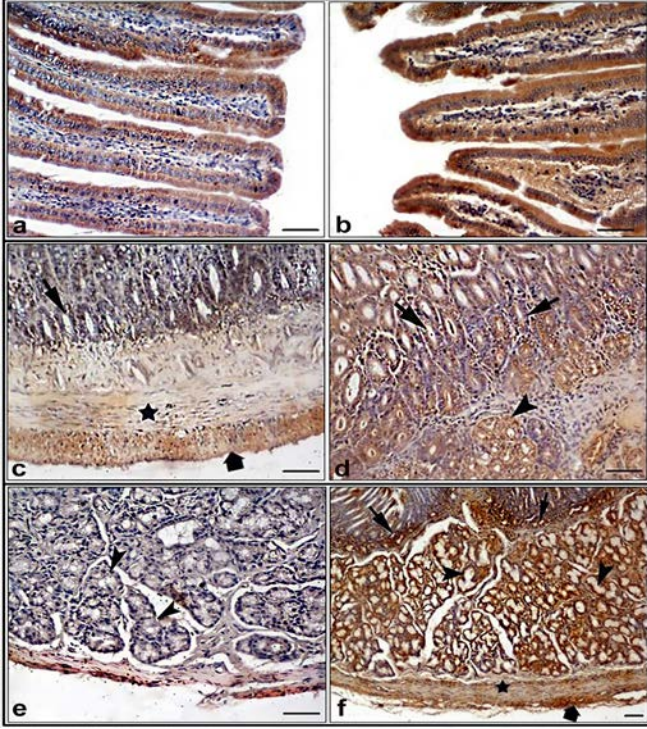
IGF-I	Kontrol A	Kontrol B	KAP	<i>P değeri</i>
Yüzey epiteli	2,00±0,18 <sup>a</sup>	2,21±0,20 <sup>b</sup>	2,64±0,21 <sup>c</sup>	0.029 / 0.001
Brunner bezleri	2,11±0,21 <sup>a</sup>	2,17±0,17 <sup>a</sup>	2,59±0,19 <sup>b</sup>	0.001
Kriptler	0,79±0,11 <sup>a</sup>	1,02±0,12 <sup>a</sup>	2,47±0,18 <sup>b</sup>	0.001
Sirkular kas	1,87±0,17 <sup>a</sup>	1,79±0,15 <sup>a</sup>	2,11±0,13 <sup>a</sup>	-
Longitudinal kas	2,40±0,19 <sup>a</sup>	2,51±0,22 <sup>a</sup>	2,60±0,24 <sup>a</sup>	-

Bununla birlikte kontrol grubunun yüzey epitel hücrelerinde orta derecede immünreaksiyon gözlenirken, deney grubunda güçlü bir reaksiyon gözlemlendi (Şekil 2a,c,5b) ( $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ) (Tablo II).

Lieberkühn kriptlerinde deney grubunda orta düzeyde bir ekspresyon tespit edilirken (Şekil 2d), kontrol gruplarında zayıf bir reaksiyon gözlemlendi ( $p<0.001$ ). Brunner bezlerinde ise deney grubundaki immünreaksiyonlar, orta derecede immünreaksiyon yoğunluğuna sahip olup kontrol gruplarına göre daha güçlü bir ifade sergiledi (Şekil 2b,e,5b) ( $p<0.001$ ). Tüm gruplarda sirküler kas hücrelerinde orta derecede IGF-I immünreaksiyonu, longitudinal kas tabakasında ise güçlü saptandı (Şekil 2b,d,e,5b) ( $p>0.05$ ) (Tablo II).

### Duodenumda EGFR immünoreaktivitesi

EGFR lokalizasyonları villusun yüzey epitelinde, Lieberkühn kriptlerinde, Brunner bezlerinde ve duodenumun düz kas tabakasında tespit edildi (Şekil 3,5c). Gruplar arasındaki EGFR ekspresyon farklılıkları Tablo III'te sunulmaktadır.



**Şekil 3.** Yüzey epitel hücrelerinde, kriptlerde (ince ok), Brunner bezlerinde (ok başı), sirküler (yıldız) ve longitudinal kas (kalın ok) katmanlarında EGFR ekspresyonu. (a-e): Kontrol A grubu, (c): Kontrol B grubu, (b-d-f): KAP ile tedavi edilen grup, (Bar: 50 µm), İmmunohistokimya, a,b: 40X -c,d,e,f:20X

**Tablo III:** Yüzey epitelinde, Brunner bezlerinde, kriptlerde, sirküler ve longitudinal kaslarda EGFR ifadesi. Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel anlamlılığı gösterir <sup>(a,b,c)</sup>

EGFR	Kontrol A	Kontrol B	KAP	P değeri
<b>Yüzey epiteli</b>				
<b>Brunner bezleri</b>	2,17±0,17 <sup>a</sup>	2,20±0,20 <sup>a</sup>	2,61±0,20 <sup>b</sup>	0.041
	0,97±0,11 <sup>a</sup>	1,00±0,13 <sup>a</sup>	2,82±0,21 <sup>b</sup>	0.001
<b>Kriptler</b>	2,12±0,15 <sup>a</sup>	2,20±0,20 <sup>a</sup>	2,87±0,21 <sup>b</sup>	0.032
<b>Sirküler kas</b>	1,20±0,13 <sup>a</sup>	1,17±0,16 <sup>a</sup>	2,20±0,18 <sup>b</sup>	0.001
<b>Longitudinal kas</b>	2,18±0,17 <sup>a</sup>	2,21±0,21 <sup>a</sup>	2,58±0,17 <sup>b</sup>	0.022

Kontrol gruplarının duodenumunda, yüzey epitel hücrelerindeki EGFR ekspresyonu orta derecede

immünoreaktivite gösterdi. EGFR ekspresyonu ayrıca KAP tedavi grubunun yüzey epitel hücrelerinde güçlü immünoreaktivite gösterdi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 3 a,b,5c) (Tablo 3). Kontrol gruplarında Lieberkühn kriptlerinde orta derecede bir EGFR immünoreaktivitesi gözlenirken, KAP tedavi grubunda güçlü bir EGFR ekspresyonu gözlemlendi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 3c,d,5c) (Tablo III).

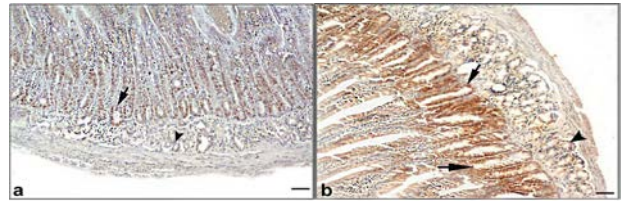
Brunner bezlerinde EGFR immün reaksiyonu genel olarak intrasitoplazmik yerleşim gösterdi. Kontrol gruplarında zayıf bir EGFR immünoreaktivitesi gözlenirken, KAP tedavi grubundaki Brunner bezlerinde güçlü bir immünreaksiyon gözlemlendi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 3 d,e,f,5c) (Tablo III).

Kontrol gruplarında sirküler kas tabakasında zayıf bir EGFR ekspresyonu belirlenirken, KAP tedavi grubunda orta derecede bir EGFR immünoreaktivitesi gözlemlendi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 3 c,e,f) (Tablo III).

Kontrol gruplarının longitudinal kas tabakasında EGFR ekspresyonu orta düzeyde iken deney grubunda güçlü bir immünreaktivite gösterdi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 3 c,e,f,5c) (Tablo III).

### Ki-67'nin ekspresyonu ve proliferatif indeks (PI)

Bir hücre proliferasyon belirteci olan Ki-67'nin ekspresyonu, yüzey epitel hücrelerinde, kript hücrelerinde ve duodenumun Brunner bezlerinde gözlemlendi. Kontrol gruplarının yüzey epitel hücrelerinde zayıf immünreaksiyon gözlenirken, deney grubunda orta derecede bir immünreaksiyon gözlemlendi (Şekil 4,5d) ( $p < 0,05$ ) (Tablo IV).



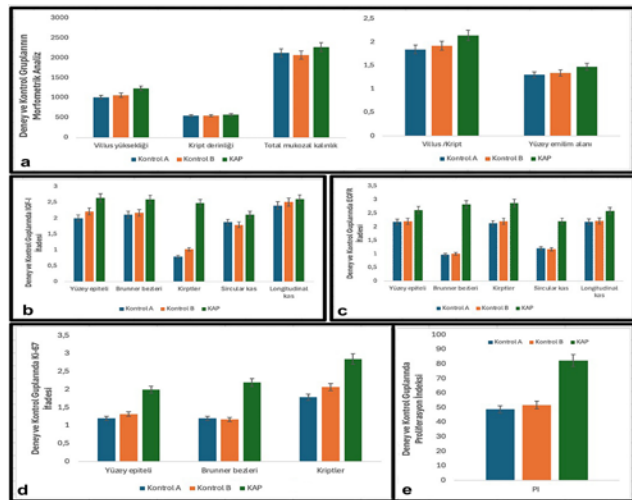
**Şekil 4.** Ki-67 ekspresyonu (a) Kontrol A grubu, (b) KAP uygulanan grup, Kriptler, (ince ok), Brunner bezi (ok başı) (Bar: 50 µm), İmmunohistokimya, a:4X- b:10X

**Tablo IV:** Kontrol ve deney grubu duodenumunda Ki67 ekspresyon yoğunluğu ve proliferasyon indeksinin değerlendirilmesi. (PI): Proliferasyon İndeksi. Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel anlamlılığı gösterir (a,b,c)

Ki 67	Kontrol A	Kontrol B	KAP	P değeri
Yüzey epiteli	1,20±0,09 <sup>a</sup>	1,32±0,14 <sup>a</sup>	2,00±0,14 <sup>b</sup>	0.020
Brunner bezleri	1,20±0,13 <sup>a</sup>	1,17±0,11 <sup>a</sup>	2,20±0,17 <sup>b</sup> 2,85±0,20 <sup>b</sup>	0.001
Kriptler	1,79±0,12 <sup>a</sup>	2,07±0,17 <sup>a</sup>	82,29±1,63 <sup>b</sup>	0.001
PI	48,82±1,21 <sup>a</sup>	51,80±1,85 <sup>a</sup>		0.001

Kontrol A ve Kontrol B gruplarının kript hücrelerinde zayıf ila orta düzeyde bir immün reaksiyon gözlenirken KAP tedavi grubunun kript hücrelerinde orta ila güçlü immünoreaktivite gözlemlendi (p <0.001). Ki-67, kontrol gruplarının Brunner bezlerinde zayıf bir şekilde eksprese edilirken, deney grubunda orta derecede eksprese edildi (p <0.001) (Şekil 4, 5d).

Ayrıca Lieberkühn kript hücreleri için kontrol grubu ve deney gruplarının karşılaştırmalı proliferasyon indeksi (PI) belirlendi. Deney grubunda kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak bir artışı belirlendi (Şekil 5e) (p<0.001) (Tablo IV).



**Şekil 5.** (a) Kontrol ve deney gruplarında morfolojik farklar, (b) Yüzey epitel hücrelerinde, kriptlerde, Brunner bezlerinde, sircular ve longitudinal kas katmanlarında IGF-I ekspresyonu, (c) Yüzey epitel hücrelerinde, kriptlerde, Brunner bezlerinde, sircular ve longitudinal kas katmanlarında EGFR ekspresyonu, (d)

Kontrol ve deney gruplarında Ki-67 ekspresyonu, (e) Kontrol ve deney gruplarında Proliferasyon indeksi (PI).

## TARTIŞMA

Gastrointestinal sistemin nöronlar açısından zengin olduğu bilinmektedir. Bu duyuşal nöronlar birincil afferentlerdir ve gastrointestinal sistemde birçok önemli fizyolojik fonksiyona sahiptirler<sup>18</sup>. KAP'ın özofagus, mide ve bağırsak mukozasına uygulanması mukozal kan akışını artırır. Öte yandan sıçan kolonundaki primer aferentlerin KAP ile uyarılmasının mukozal epitelyal hücre proliferasyonunda artışa neden olduğunu bildirilmiştir<sup>19</sup>. Birçok araştırmacı, Ki-67 veya PCNA gibi çoğalma belirteçlerini kullanarak, besin takviyesi olarak verilen tedaviler sonrasında sindirim kanalında hücre çoğalmasının arttığını veya azaldığını tespit etmiş ve kullanılan tedavi yöntemi hakkında kesin sonuçlar elde etmiştir<sup>15</sup>. Duodenumdaki kök hücreleri içeren Lieberkühn Kriptleri, bağırsak epitelinin çoğalma merkezidir. Yeni oluşan enterositler daha sonra yukarıya doğru göç eder ve villusun ucundan dışarı atılır. Çalışmamızda hücre proliferasyon indeksi ve Ki-67 ekspresyon yoğunluğu KAP tedavi grubunda daha yüksekti. Araştırmacılar villus yüksekliğinde ve kript derinliğindeki önemli değişikliklerin besin emilim kapasitesini ve emilim verimliliğini arttırdığını bildirmiştir<sup>20</sup>. Çalışmamızda yer alan KAP grubunda Ki-67 ekspresyonunun kontrollere göre artmış olması, villus büyümesinin uyarıldığını, besin emiliminin arttığını ve dolayısıyla sindirimin desteklendiğini gösterdi. Brunner bezleri, mukus ve bikarbonattan zengin salgısıyla midedeki asidik kimusun nötralize edilmesine yardımcı olan, böylece bağırsak sindirimini kolaylaştıran submukozal bezlerdir<sup>21</sup>. Çalışmamızda olduğu gibi Brunner bezlerinde Ki-67 ekspresyonunun artması sindirimi ve besin kullanımını doğrudan etkileyebilir.

Bu çalışmada immünohistokimyasal teknikle KAP tedavisinden sonra sıçan duodenumunda

IGF-I ekspresyonunu gösterdik. IGF-I bağırsak kriptalarında güçlü bir proliferasyon uyarıcısıdır<sup>22</sup>. Önceki çalışmamız KAP'ın yüzey epitelinde, Lieberkühn kriptlerinde, Brunner bezlerinde, düz kas tabakasında ve duodenumun miyenterik plexus nöronlarında Substance P (SP) immünreaksiyonunu arttırdığını göstermişti. Duodenumda KAP tedavisi ile SP ekspresyonunun arttığını doğruladık<sup>23,24</sup>. Önceki çalışmalarda duyu sinirlerinin KAP ile uyarılmasının kalsitonin geni ile ilişkili peptid ve Substance P gibi nörotransmitterlerin salınmasına yol açtığı ve bu nörotransmitterlerin IGF'yi artırdığı bildirilmektedir<sup>25,26</sup>. Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer şekilde yüzey epitelinde, Lieberkühn kriptlerinde, Brunner bezlerinde, duodenumun düz kas tabakasında KAP tedavisi sonrası IGF-I immünoreaktivitesinin yoğunluğu artmıştır.

Ayrıca verilen KAP'ın yüzey epitel hücrelerinde, Lieberkühn kriptlerinde, Brunner bezlerinde ve duodenumdaki düz kas tabakasında EGFR ekspresyonunu arttırdığını gözlemledik. Öte yandan EGFR, hücre çoğalması, farklılaşması, hayatta kalma ve göçünün düzenlenmesinde önemli rol oynar<sup>27,28</sup>. İntragastrik EGF'nin mide mukozası hasarının iyileşmesini arttırdığı ve mide mukozasını stres, etanol, hipertonic salin ve aspirin gibi çeşitli uyarılara karşı koruduğu gösterilmiştir<sup>29</sup>. Düşük doz kapsaisin uygulamasından sonra duodenal yüzey epitel hücrelerinde EGFR'nin artan ekspresyonu, KAP'ın mikrovillus enzim fonksiyonunun apikal yüzey üzerindeki etkilerini modüle edebileceğini veya membranlar arasında moleküler taşımayı kolaylaştırabileceğini düşündürmektedir.

KAP'ın nöropeptit salınımına neden olduğu ve bu nöropeptitlerin gastrointestinal sistemde önemli roller oynadığı iyi bilinmektedir. Bu nedenle, KAP uygulamasına yanıt olarak IGF-I ve EGFR üretimindeki artış, bir veya birkaç spesifik nöropeptidin salınımına bağlı olabilir.

## SONUÇ

Bu sonuçlar, KAP uygulamasının IGF-I ve EGFR sentezini arttırdığını ve sıçan gastrointestinal sistem fonksiyonlarını destekleyebileceğini göstermektedir. Ayrıca verilen tedavinin hücre proliferasyonunu indüklediği ve duodenum gelişimini desteklediği morfometrik analizlerle gösterilmiştir. Kript hücreleri özellikle bu büyüme faktörleri ailesinin mitojenik aktiviteyle ilişkilidir. Bu çalışmada, düşük dozda KAP uygulanması, duodenumdaki kript hücrelerinde IGF-I, EGFR ve Ki-67 ekspresyonlarını arttırdı; bu da hücre çoğalmasının, farklılaşmasının ve göçünün indüklediğini düşündürmektedir. Bu çalışma, düşük doz kapsaisin bağırsak aktivitesini etkilediğini ve sindirimi kolaylaştırdığını göstermektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) 104 O 372 numaralı projeden sağlanan bütçe ile finanse edilmiştir.

**Etik Kurul Onayı:** Deney protokolleri için alınan etik kurul kararı ile (Karar no:2005/2- 2005) çalışma Ulusal Sağlık Enstitüsünün Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Rehberine ve Helsinki Deklerasyonu Prensiplerine uygun olarak uygulandı.

**Çıkar Çatışması Beyanı:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) 104 O 372 numaralı projeden sağlanan bütçe ile finanse edilmiştir.

**Declaration of Conflicting Interests:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** This study was financed with the budget provided by TÜBİTAK-TOVAG (Turkish Scientific and Technological Research Council) project number 104 O 372.

## KAYNAKLAR

1. Xiang Q, Guo W, Tang X, et al. Capsaicin-The spicy ingredient of chili peppers: A review of the



- gastrointestinal effects and mechanisms. *Trends Food Sci Technol.* 2021; 116:755–765.
2. Andersson KE, Wein AJ. *Anatomy, Physiology and Pharmacology of the Lower Urinary Tract. Urologic Principles and Practice.* 2020; 97-126.
3. Özgüden-Akkoç CG, Asmaz ED, İlhan T, et al. Düşük doz kapsaicin uygulanan sıçanların ovaryumlarında TGF-Beta 1'in immunohistokimyasal yerleşimi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2018; 15: 238-246.
4. Rosca AE, Iesanu MI, Zahiu CDM, et al. Capsaicin and gut microbiota in health and disease. *Molecules.* 2020; 25:5681.
5. Kulebyakin KY, Nimiritsky PP, Makarevich PI. Growth Factors in Regeneration and Regenerative Medicine: "the Cure and the Cause". *Front Endocrinol.* 2020; 11:384.
6. Asmaz ED. Sıçan İleumunda Kapsaisinin Neden Olduğu Morfometrik Değişikliklerin, IGF-I ve IGF-IR Ekspresyonlarının İncelenmesi. *J Res Vet Med.* 2024; 43:102-107.
7. Wee P, Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel).* 2017; 9:52.
8. Gieryńska M, Szulc-Dąbrowska L, Struzik J, et al. Integrity of the intestinal barrier: the involvement of epithelial cells and microbiota-a mutual relationship. *Animals.* 2022; 12:145.
9. Yu-Jia L, Jun-Ping A, Huang X, et al. PAR2 Involved in colonic platelet-derived growth factor receptor-A-positive cell proliferation in diabetic mice. *Jpn J Gastroenterol Hepatol.* 2021; 6:1-2.
10. Li J, Wang A, Chen X, et al. Ki67 for evaluating the prognosis of gastrointestinal stromal tumors: A systematic review and meta analysis. *Oncol Lett.* 2022; 23:189.
11. Thongsong B, Suthongsa S, Wiyaporn M. Postnatal ontogeny of small intestinal histomorphology, crypt cell proliferation and peptide transporter 1 gene expression in piglets. *Thai J Vet Med.* 2016; 46:391-399.
12. Hernández-Pérez T, Gómez-García MDR, Valverde ME, et al. Capsicum annuum (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020; 19:2972-2993.
13. Nazeer S, Afzal TTR, Sana Saeed M, et al. Chili Pepper. In: Zia-Ul-Haq M, Abdulkreem A, Riaz M, Farooq -Gohar U. (eds). *In Essentials of Medicinal and Aromatic Crops Cham: Springer International Publishing;* 2023;855-885.
14. Yesilbag D, Abdullahoglu E, Urkmez E, et al. Evaluation of the Effects of Different Natural Dietary Feed Additives on Performance and Intestinal Histomorphology in Quails. *J Hellenic Vet Med Soc.* 2022; 73:4407–4416.
15. Asmaz ED, Seyidoglu N. The prevention role of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on intestinal health. *Food Sci Hum Wellness.* 2022; 11:1342–1346.
16. Guler S, Asmaz D, Kayapunar NV, et al. Effects of dietary calcium, phosphorus and microbial phytase on intestinal morphology in laying hens. *Turk J Vet Anim Sci.* 2022; 46:2:14.
17. Asmaz ED, Yesilbag D, Odabasi F, et al. Synergistic effect of feed additives on cell proliferation and morphology in quail (*Coturnix coturnix Japonica*) duodenum. *J Hellenic Vet Med Soc.* 2022; 73:4575-4582.
18. Fleming MA, Ehsan L, Moore SR, et al. The Enteric nervous system and its emerging role as a therapeutic target. *Gastroenterol Res Pract.* 2020; 8:8024171.
19. Xiang Y, Xu X, Zhang T, et al. Beneficial effects of dietary capsaicin in gastrointestinal health and disease. *Exp Cell Res.* 2022; 15:417:113227.
20. Hżewska L, Osiak-Wicha C, Tomaszewska E, et al. Morphometric Analysis of Developmental Alterations in the Small Intestine of Goose. *Animals.* 2023; 13(20):3292.
21. Zhu M, Li H, Wu Y, et al. Brunner's Gland Hamartoma of the Duodenum: A Literature Review. *Adv Ther.* 2021; 38:2779-2794
22. Zhou W, Rowitz BM, Dailey MJ. Insulin/IGF-1 enhances intestinal epithelial crypt proliferation through PI3K/Akt, and not ERK signaling in obese humans. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018; 243:911-916.

23. Akkoç CGÖ, İlhan T, Peker S, et al. The effects of low dose capsaicin on substance P expression in rat duodenum. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2017; 64: 31-36
24. Zık B, Özgüden-Akkoç CG, Tütüncü Ş, et al. Expression of Vanilloid Receptor-1 in the duodenum of the Capsaicin treated rat. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2007; 51:149-153.
25. Li Q, Peng J. Sensory nerves and pancreatitis. *Gland Surg.* 2014; 3:284-92
26. Lázár BA, Jancsó G, Sántha P. Modulation of sensory nerve function by Insulin: Possible relevance to pain, inflammation and axon growth. *Int J Mol Sci.* 2020; 21:2507.
27. Orofiamma LA, Vural D, Antonescu CN. Control of cell metabolism by the epidermal growth factor receptor. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2022; 1869:119359.
28. Bakır B, Sarı EK. Immunohistochemical distribution of platelet derived growth factor-c and platelet derived growth factor receptor-alpha in small intestine of rats treated with capsaicin. *Turk J Vet Anim Sci.* 2015; 39:160-167.
29. Liu F, Nong X, Qu W, et al. Weikangling capsules combined with omeprazole ameliorates ethanol-induced chronic gastritis by regulating gut microbiota and EGF-EGFR-ERK pathway. *Life Sci.* 2023; 315:121368.