

AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI DOZ VE SÜRELERDE UYGULANAN 17 β -
ÖSTRADİOLÜN OVERİOKTOMİZE RATLARDA SPONTAN
MYOMETRİYAL KASILIMLAR ÜZERİNE ETKİSİ**

Vet. Hek. Özlem YILDIZ-GÜLAY

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL**

Bu tez Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 07.VF.03
Proje numarası ile desteklenmiştir

Tez No: 2008-002

2008-AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Fakültesi Fizyoloji Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

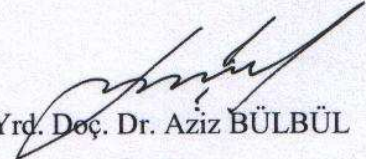
Tez Savunma Tarihi: 25/09/2008


Prof. Dr. Recep ASLAN

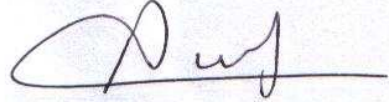
ÜYE


Prof. Dr. Meltem ŞİRELİ

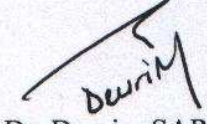
ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL

ÜYE

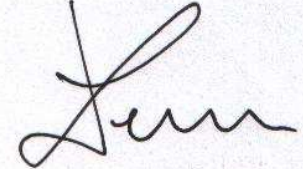

Yrd. Doç. Dr. Alper SEVİMLİ

ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Devrim SARIPINAR

ÜYE

Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Özlem YILDIZ GÜLAY'ın
“*Farklı Doz ve Sürelerde Uygulanan 17β-Östradiolün Overioktomize Ratlarda
Spontan Myometriyal Kasılmalar Üzerine Etkisi*” başlıklı tezi 09./10./2008 günü
saat.10:00 da Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri
uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Yavuz DEMİR

ÖNSÖZ

Bu tez Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 07. VF. 03 proje numarası ile desteklenmiş olup Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nun AKÜHEK-44-08 referans no ve 203 sayılı izni ile yapılmıştır.

Doktora eğitimim ve tezimin hazırlanması süresince danışmanlığımı yapan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL'e yardım ve desteklerinden dolayı sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimim boyunca engin bilgi ve birikiminden yararlandığım ve bana her konuda yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Recep ASLAN ve Prof. Dr. Yılmaz DÜNDAR'a saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Araştırmamın her aşamasında yardımcı olan değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Alper SEVİMLİ, Yrd. Doç. Dr. Korhan ALTUNBAŞ'a, bilgi ve tecrübeleri ile gelişimime katkısı olan değerli hocam Doç. Dr. Abdullah ERYAVUZ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Araştırmam sırasında bana yardımcı olan arkadaşım Özlem ÖZDEN'e teşekkürlerimi sunuyorum. Bu günlere ulaşmamda her zaman desteklerini hissettiğim annem, babam, ağabeyim ve eşime sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
KABUL ve ONAY	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER.	IV
KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.	VIII
TABLolar LİSTESİ	IX
GRAFİKLER LİSTESİ	XI
ÖZET	XIII
SUMMARY	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Östrojen Hormonu	1
1.1.1. Östrojen Hormonunun Yapısı, Sentezi ve Salınımı	1
1.1.2. Östrojenlerin Taşınması ve Metabolizması	4
1.1.3. Östrojen Reseptörleri	5
1.1.4. Östrojenin Genomik Olmayan Etkileri	7
1.1.5. Östrojenin Genomik Etkileri.....	9
1.2. Düz Kas Kasılım ve Gevşeme Mekanizması.....	10
1.2.1. Myometriyal Kasılma	11
1.2.2. Myometriyal Kasılmaları Uyaran Yollar	13
1.2.3. Myometriyal Gevşemeyi Uyaran Yollar.....	14
1.3. Nitrik Oksit ve Myometriyal Kasılma	15
1.4. Guanilil Siklaz ve Hücre Sinyali.....	17
1.4.1. Siklik GMP Bağımlı Protein Kinazlar	18
1.4.2. Siklik AMP Bağımlı Protein Kinazlar ve cGMP Sinyali.....	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1. Araştırmada Kullanılan Aletler.....	22
2.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasal ve Kitler.....	22
2.3. Deney Gurupları.....	22

2.4. İzole Organ Banyosu	24
2.5. Uterusta İzometrik Kasılımların Belirlenmesi	24
2.6. Myometriyumda cGMP-PK1'in İmmunohistokimyasal Boyanması.....	25
2.6.1. Tespit ve Histolojik Doku Takibi.....	25
2.6.2. İmmunhistokimyasal yöntem.....	26
2.6.3. İmmunhistokimyasal değerlendirme.....	26
2.7. İstatistiksel Analiz.....	26
3. BULGULAR	28
3.1. Spontan Kasılımların Şiddeti ve Frekansı.....	28
3.2. L-Arginin Uygulamasının Kasılım Şiddetine Etkisi.....	29
3.3. SNP Uygulamasının Kasılım Şiddetine Etkisi.....	38
3.4. Östrojenin Doza ve Süreye Bağlı Olarak cGMP-PK1 Dağılımına Etkisi.....	46
4. TARTIŞMA	50
5. SONUÇ	56
KAYNAKLAR DİZİNİ	57

KISALTMALAR

AMP	:	Adenozin monofosfat
ATP	:	Adenozin trifosfat
cAMP	:	Siklik AMP
Ca	:	Kalsiyum
CAL	:	Kalmodülin
CFTR	:	Sistik fibrozis transmembran konduktans regülatörü
cGC	:	Guanilil siklaz
cGMP	:	Siklik GMP
CGRP	:	Kalsitonin gen related protein
Cl	:	Klor
cNOS	:	Yapısal nitrik oksit sentetaz
COMT	:	Katekol-O-metiltransferaz
CRH	:	Kortikotropin relising hormon
DES	:	Dietilsitilbesterol
EFS	:	Electric Field Stimulation
ER	:	Östrojen reseptörü
ER-α	:	Östrojen reseptörü α
ER-β	:	Östrojen reseptörü β
FSH	:	Folikül uyarıcı hormon
g	:	Gram
Gα_s	:	G protein uyarıcı α altbirimi
GnRH	:	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GTP	:	Guanozin trifosfat
HRE	:	Hormon respons element
IP	:	Fosfoinositol
IP₃	:	İnositol trifosfat
i.m.	:	İntra muskuler
iNOS	:	Uyarılabilir nitrik oksit sentetaz

VII

K	:	Potasyum
K_{Ca}	:	Kalsiyum tarafından aktiflenen potasyum kanalları
LH	:	Lüteinleştirici hormon
L-NNA	:	N-nitro-L-Arjinin
M	:	Molar
µg	:	Mikrogram
ml	:	Miligram
ms	:	Milisaniye
MLCK	:	Miyozin hafif zincir kinaz
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NO	:	Nitrik oksit
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
nNOS	:	Nöronal nitrik oksit
PGF_{2α}	:	Prostaglandin F _{2α}
PKA	:	Protein kinaz A
PKC	:	Protein kinaz C
PKG	:	Protein kinaz G
RT-PCR	:	Real-Time polimeraz zincir reaksiyonu
SHBG	:	Seks hormon bağlayıcı globulin
SNP	:	Sodyum Nitroprussid

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1: Memelilerde bulunan major östrojenler	3
Şekil 3.1: Kontrol (G1A) ve deneme gruplarında (25 µg 17β-östradiol, G2A; 50 µg 17β-östradiol, G3A ve 100 µg 17β-östradiol G4A) 18'inci saatte uterus sirküler (S) ve longitudinal (L) kaslarında cGMP-PK1 dağılımı, bar= 100µm	47
Şekil 3.2: Kontrol (G1B) ve deneme gruplarında (25 µg 17β-östradiol, G2B; 50 µg 17β-östradiol, G3B ve 100 µg 17β-östradiol G4B) 90'inci saatte uterus sirküler (S) ve longitudinal (L) kaslarında cGMP-PK1 dağılımı, bar= 100µm.....	48
Şekil 3.3: Kontrol (G1C) ve deneme gruplarında (25 µg 17β-östradiol, G2C; 50 µg 17β-östradiol, G3C ve 100 µg 17β-östradiol G4C) 162'nci saatte uterus sirküler (S) ve longitudinal (L) kaslarında cGMP-PK1 dağılımı, bar= 100µm.....	49

TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1: Araştırmada kullanılan deneysel gruplar	23
Tablo 2.2: Yöntem içerisinde dokulara uygulanan deney protokolü	25
Tablo 3.1: Gruplarda 18'inci saat sonunda spontan myometriyal kasılımların şiddeti (amplitüt) ve sıklığı (frekans).....	28
Tablo 3.2: Gruplarda 90. saat sonunda spontan myometriyal kasılımların şiddeti (amplitüt) ve sıklığı (frekans)	29
Tablo 3.3: Gruplarda 162. saat sonunda spontan myometriyal kasılımların şiddeti (amplitüt) ve sıklığı (frekans)	29
Tablo 3.4: Gruplarda 18. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6)	30
Tablo 3.5: Gruplarda 18. saate uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında oluşan kasılımın % inhibisyon	32
Tablo 3.6: Gruplarda 90. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6)	33
Tablo 3.7: 90. saate gruplarda uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında oluşan kasılımın % inhibisyon	34
Tablo 3.8: Gruplarda 162. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6)	36

Tablo 3.9: 162. saate gruplarda uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında oluşan kasılmanın % inhibisyon	37
Tablo 3.10: Gruplarda 18. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6)	39
Tablo 3.11: Gruplarda 18. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılmanın % inhibisyonu	40
Tablo 3.12: Gruplarda 90. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6)	41
Tablo 3.13: Gruplarda 90. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılmanın % inhibisyonu	43
Tablo 3.14: Gruplarda 162. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6)	44
Tablo 3.15: Gruplarda 162. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılmanın % inhibisyonu	45
Tablo 3. 16: Gruplarda 18. saatte uterus sirküler ve longitudinal kaslarında cGMP-PK1 boyama skor değeri.....	47
Tablo 3. 17: Gruplarda 90. saatte uterus sirküler ve longitudinal kaslarında cGMP-PK1 boyama skoru değeri.....	48
Tablo 3. 18: Gruplarda 162. saatte uterus sirküler ve longitudinal kaslarında cGMP-PK1 boyama skoru değeri.....	49

GRAFİKLER LİSTESİ

Sayfa No

<p>Grafik 3.1: Gruplarda 18. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri</p>	31
<p>Grafik 3.2: 18'inci saat sonunda gruplarda uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) ve NNA (10^{-3} M) + L-arginin (10^{-3} M) varlığında oluşan kasılımın % inhibisyonu.....</p>	32
<p>Grafik 3.3: Gruplarda 90. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri</p>	33
<p>Grafik 3.4: 90. saatte gruplarda uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) ve NNA (10^{-3} M) + L-arginin (10^{-3} M) varlığında oluşan kasılımın % inhibisyonu.....</p>	35
<p>Grafik 3.5: Gruplarda 162. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri</p>	36
<p>Grafik 3.6: Gruplarda 162. saate uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) ve NNA (10^{-3} M) + L-arginin (10^{-3} M) varlığında oluşan kasılımın % inhibisyonu.....</p>	38
<p>Grafik 3.7: Gruplarda 18. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri</p>	39

Grafik 3.8: Gruplarda 18. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımın % inhibisyonu.....	40
Grafik 3.9: Gruplarda 90. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri	42
Grafik 3.10: Gruplarda 90. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımın % inhibisyonu.....	43
Grafik 3.11: Gruplarda 162. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri	44
Grafik 3.12: Gruplarda 162. saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımın % inhibisyonu.....	46

ÖZET

Bu çalışmada farklı doz ve sürelerde uygulanan 17 β -östradiolün ovaryumları çıkarılmış sıçanlarda spontan myometriyal kasılımlar üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada 3-6 aylık ve ortalama 270 \pm 20 g ağırlığında, 72 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar, her grupta 18 sıçan bulunacak şekilde, kontrol (Ov) ve 3 deneme gurubuna (östrojen) ayrılmıştır. Kontrol grubuna günlük olarak kas içi susam yağı enjeksiyonları yapılmış (0,2 ml), birinci deneme grubundaki sıçanlara günlük 25 μ g 17 β -östradiol, ikinci deneme gurubundaki sıçanlara günlük 50 μ g 17 β -östradiol, ve üçüncü deneme gurubundaki sıçanlara günlük 100 μ g 17 β -östradiol kas içi uygulanmıştır. Her grup kendi arasında 3 alt gruba ayrılarak 18, 90 ve 162. saatlerde 6'şar hayvan genel ötenazi yapılmıştır.

Endojen nitrik oksit etkinliğinin belirlenmesi amacıyla L-Arginin, eksojen nitrik oksit yolunun değerlendirilmesi amacıyla SNP ve endojen NO etkisinin reseptör düzeyinde etkisinin ortaya konulması için L-NNA (Nitro-N-Arginin) uygulaması yapıldı. Alınan uterus örneklerinden elde edilen doku kesitlerinde cGMP-PK1 ekspirasyonunu göstermek için immunohistokimyasal yöntemle boyandı.

Uygulama sonrası östrojen verilen gruplarda spontan myometriyal kasılımların şiddeti, östrojenin dozuna ve süresine bağlı olarak arttı. Ayrıca, östrojenin L-arginin-NOS-NO-cGMP yolunun etkinliğini engellediği belirlendi. Östrojenin uterusunda bulunan longitudinal düz kaslarda cGMP-PK1 ekspirasyonu üzerine etkisinin bulunmadığı görüldü. Sonuç olarak östrojenin doza ve süreye bağımlı olarak uterus kasılımlarının şiddetini artırırken, L-Arginin-NOS-NO- cGMP-PK1 yolunun etkinliğini engellediği fakat bu engellenmenin cGMP-PK1 üzerinden olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: 17 β -östradiol, Myometriyum, CGMP'ye bağımlı protein kinaz, NOS, Sıçan.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of injecting different doses and time intervals of 17β -estradiol on spontaneous myometrial contractions of ovariectomized rats. Three to 6 months old 71 female Sprague Dawley rats, weighing 270 ± 20 g, were used in the current study. The ovariectomized rats were randomly assigned to one control (Ov) and three experimental (17β -estradiol injected) groups of 18 rats each. Rats in the Ov group received daily sesame oil (0.2 ml, IM), whereas each rat in the three experimental groups was treated with daily 25, 50 and 100 μ g estradiol (IM), respectively. Each group was further divided in 3 subgroups: 6 rats in each group were sacrificed by cervical dislocation at 18, 90 and 162 hr.

In order to determine endogenous nitric oxide activity, L-arginine solution was used. Sodium nitroprusside (SNP) was used for evaluation of the exogenous nitric oxide pathway. In addition, L-NNA (nitro-N-arginine) treatment was applied in order to determine the effect of endogenous NO at receptor level. Immunohistochemical evaluation was performed to determine cGMP-PK1 expression from the uterus samples.

In the current study, estrogen treatment increased spontaneous myometrial contraction in dose and time dependent manner. Moreover, estrogen treatments inhibited L-arginin-NOS-NO-cGMP pathway. On the other hand, estrogen failed to have any effect on cGMP-PK1 expression in uterine longitudinal smooth muscles. Thus, 17β -estradiol treatments increased the uterine smooth muscle cell contractions. Treatments also inhibited L-Arginin-NOS-NO-cGMP-PK1 pathway. However, our results indicated that 17β -estradiol did not show its effect through cGMP-PK1.

Key Words: 17β -estradiol, myometrium, cGMP-dependent protein kinase, NOS, Rat

1. GİRİŞ

1.1. Östrojen Hormonu

1.1.1. Östrojen Hormonunun Yapısı, Sentezi ve Salınımı

Steroidler siklopentanoperhidrofenantren halka yapısı içeren bileşiklerdir. Tüm steroidlerin öncül molekülü pek çok dokuda sentezlenebilen kolesteroldür (1). Kolesterol molekülünün bir yan zincirinde veya eklenen molekül grubundaki değişme, çeşitli steroid moleküllerinin üretilmesine yol açar. Steroidlerin sentezlendiği klasik bir metabolik yol vardır (2). Tüm hayvan dokuları steroidleri sentezleyebilme yeteneğine sahiptir. Ancak sentez hızı her dokuda farklıdır. Steroidlerin sentezinde üç temel aşama vardır: ilk iki aşama, her endokrin organda aynı, son aşama ise endokrin beze özgüdür. İlk aşama asetattan kolesterol sentezi, ikincisinde steroidin oluşumundaki öncül moleküller, son aşamada da steroidin son şekli alması için gerekli küçük değişmeler yer alır. Tüm steroidler, bir siklopentan halkasına bağlı (D), fenantrene benzeyen (A, B ve C halkaları) siklik çekirdek içerirler (steron-siklopentano perhidrofenantren yapısı). Kolesterolde olduğu gibi steroidlerde genellikle 17'nci pozisyonda bir yan zincir bulunur. Birleşik bir veya birden fazla hidroksil grubu içeriyorsa, karbonil veya karboksil grubu içermiyorsa bir steroldür ve "ol" takısı alarak isimlendirilir (3).

Memelilerde bütün steroid hormonların öncüsü olan pregnenolon kolesterolden yan zincirin kırılması ve oksidasyonu sonucu oluşur. Bu yüzden kolesterolün pregnenolona dönüşme basamağı steroid hormonların biyosentezinde en önemli adımdır (4).

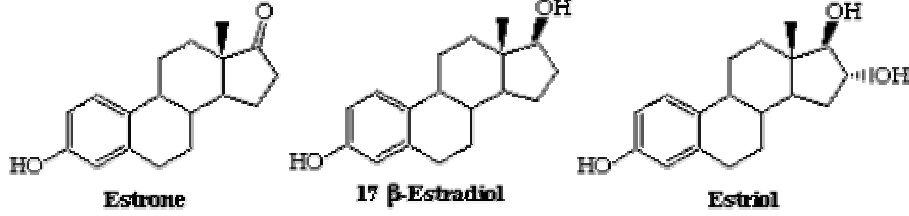
Endoplazmik retikulum ve mitokondride meydana gelen bir dizi enzimatik değişiklik sonucunda kolesterolden steroid hormonlar oluşur. Östrojen biyosentezi için sitokrom P450 adı verilen ve CYP19 geninden oluşan enzime ihtiyaç vardır. P450 geni çok geniş bir ailedir ve yaklaşık 600 kadar üyesi bulunur. Sitokrom P450'nin yapısında tek bir hem molekülü bulunur (5). Bu hem molekülü C19 androjenik steroid substratının bağlanmasından ve östrojenlerin karakteristik fenolik A halkasının oluşmasına sebep olan bir dizi katalitik reaksiyonların oluşmasından sorumludur. Bu aromataz reaksiyonu, metabolize olan her molekül steroid için üç

molekül oksijen ve üç molekül nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) kullanır. Bu işlemde, oksijen molekülleri C19 metil grubunun formik asite oksidasyonunda kullanılırken eş zamanlı olarak A halkası aromatize olarak östrojenlerin fenolik A halkası oluşur. Bu işlem sırasında indirgeyici olarak NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi ile NADPH kullanılır (6).

Tüm steroid hormonlar için en önemli kısıtlayıcı enzimatik basamağı üç molekül oksijen, üç molekül NADPH ve mitokondrideki elektron transfer sisteme gerek duyar. İlk reaksiyon 22'nci karbonun hidroksilasyonudur. Bunu 20'nci karbonun hidroksilasyonu takip eder. Oluşan 20, 22-hidroksikolesterol daha sonra 20 ve 22'nci karbon arasından dezmolaz enzimi sayesinde ayrılarak 21 karbonlu bir steroid olan pregnenolon ve izokaproaldehit elde edilir (1). İzokaproaldehit izokaproik asite okside olurken, pregnenolon ise adrenal bezde ve gonatlarda $\delta 5$ yoluyla 17-hidroksipregnenolona veya $\delta 4$ yoluyla progesterona dönüştürülür. Delta 5 yolu daha çok testislerde testesteron ve adrenal korteksin zona fasikülata tabakasında kortizol sentezlenmesi için tercih edilirken, $\delta 4$ yolu ile progesteron oluşumu ovaryumlarda östradiol sentezi ve adrenal korteksin zona glomeruloza tabakasında aldesteron sentezi için tercih edilir (7).

Yumurtalık follüküllerinde üç ana hücre tipi vardır. Bunlar follikül çevresindeki interstisyel hücrelerden köken alan teka interna hücreleri, yumurta hücrelerini saran granuloza hücreleri ve yumurta hücrelidir. Yumurtalıklardaki teka interna hücrelerinde pregnenolon önce $\delta 4$ yolu ile progesterona, daha sonra da androstenedion'a çevrilir. Oluşan androstenedion yumurtalıklardaki granuloza hücrelerinde önce testosterona (17α -hidroksisteroid dehidrogenaz ile) ve daha sonra major östrojen olan östradiole (17β -östradiol) dönüştürülür. Östrojen sentezindeki anahtar enzim 19-hidroksilaz-aromataz kompleksidir. Ondokuzuncu karbonun uzaklaştırılması ve A halkasının aromatisasyonu ile 18 karbonlu steroidin yapımı katalizlenir. Etkili diğer östrojenler ise östron ve östriol'dür. Östrojenlerde androjenler ve böbrek üstü bezi kabuk kısmı hormonları gibi siklopentanoperhidrofenantren halkası içeren 18 karbonlu steroidlerdir. Östronda bir -OH, östradiolde 2 -OH, ve östriolde 3 -OH ve birer de metil grubu bulunur (Şekil 1.1). Ayrıca östronda 17'nci karbon atomunda keton grubu bulunur. En fazla ve güçlü östrojen hormonu östradiol'dür. Östradiol, periferde 17β -hidroksisteroid

dehidrogenaz enzimi ile kısmen östron'a çevrilir. Postmenopozal kadınlarda en fazla bulunan östrojenidir. Östrondan dönüşen östriol'un etki gücü hepsinden daha zayıftır (8).



Şekil 1.1: Memelilerde bulunan major östrojenler

Hipotalamus, hipofiz ön lobu ve ovaryumlar arasındaki mekanizma ile östrus siklusu oluşur ve östrojenlerin salınımı düzenlenir. Hipotalamustan pulsatil olarak salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofiz ön lobundan gonadotropinler olarak da adlandırılan follikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH) salınımını uyarmaktadır. Östrus ve menstural siklusun başlangıcından foliküler fazın ortalarına kadar FSH salınımı daha fazladır. Follikül uyarıcı hormon, granuloza hücrelerinde LH reseptörlerinin sayısını artırırken, aromataz aktivitesini de yükselterek östrojen üretimini artırır. Siklusun ilerleyen günlerinde ise hipofiz ön lobundan LH'nin salınımı daha fazladır. Gonadotropin hormonların (FSH ve LH) hipofiz ön lobundan salınma miktarları ovaryumlardan salgılanan hormonların kontrolü altındadır. Östrojen, progesteron ve inhibin FSH salınımını azalmasına sebep olabileceği gibi, siklusun farklı dönemlerinde LH ve FSH salınımını da artırabilir (9). Normal siklusun foliküler safhasında bazal GnRH salınımını östrojen kontrol altında tutar. Östrus sırasında olgunlaşmaya başlayan foliküllerden salgılanan östrojenlerin kandaki yoğunluğunun artması ön hipofizden FSH salgılanmasını inhibe eder. Siklusun ortasında pozitif feedback mekanizması etkindir. Pozitif feedback oluşumunda ve LH'nin ani olarak artmasında hem östrojenin hem de GnRH'nin etkisi önemlidir. Siklusun bu döneminde östrojen hipofiz ön lobunda GnRH reseptör sayısını artırarak gonadotropinlerin salınım miktarlarını yükseltebilir (10).

Kökenini asetattan alan östrojenler gebelik dönemi dışında başlıca LH ve FSH'nın sinerjik etkileri altında ovaryum foliküllerinin teka interna ve granuloza hücrelerinden, ovulasyondan sonra da korpus luteumdan salınır (11). Folikül sıvısı içinde bulunduğundan folikül hormonu anlamına gelen folikülin, dişi memeli hayvanlarda kızgınlığı meydana getirdiği için "östrin" adı ile de anılır. Ayrıca az miktarda östrojen, adrenal korteksin zona retikularis tabakasından da salgılanır. Çok az miktarda testislerin leydig hücrelerinde testosteron ve androstenediondan östrojen oluşur. Bununla birlikte başta yağ doku olmak üzere karaciğer, böbrekler, akciğer, deri, beyin ve çizgili kaslar gibi pek çok dokudan az miktarda östron üretilmektedir. Gebelik döneminde ise östrojen üretiminin asıl kaynağı plasentadır. Menapoz sonrası endojen östrojen periferel dokularda adrenal korteksten salgılanan androstendiyonun östrone dönüştürülmesi ile elde edilir. Buna ilaveten, yağ dokusunda bulunan aromataz enzimi ovaryumlardan salgılanan az miktardaki testesteronu östradiole çevirir (12).

1.1.2 Östrojenlerin Taşınması ve Metabolizması

Östrojenler, plazmada başlıca plazma albümini ve özel östrojen bağlayıcı globülini olan seks hormon bağlayıcı globuline (SHBG) bağlı olarak taşınır. Östrojen varlığı kendilerini taşıyan SHBG'nin miktarını da artırır. Bu proteinler hormonları vaktinden önce inaktivasyona karşı korudukları gibi hormonların aşırı ve dengesiz bir şekilde salınmalarını da önler. Hormonla plazma proteinleri arasındaki bağlanma son derece zayıftır. Bu nedenle 30 dakika ya da daha fazla bir süre içerisinde dokulara hızla serbestler (12).

Vücuttan sitokrom P450 enzimi yoluyla metabolize edilerek atılan östrojenler (13) insanlarda östradiol esas olarak karaciğerde oksidatif metabolizma (hidroksilasyon), glukoronidasyon (glukoronit konjugatlarına dönüştürülerek), sülfataz (sülfatlara dönüştürülerek), esteraz (yağ asit esterleri oluşturularak) ve katekol östradiollerin O-metilasyonu yollarıyla (O-metile katekol oluşturularak) metabolize olur. İdrar ve gayta ile atılır (14). Bunun yanında östrojenler az da olsa beyin, uterus, böbrek, ovidukt, meme ve prostat gibi sitokrom P-450 aktivitesi gösteren başka dokularda da metabolize edilebilirler (14,15). Östrojen metabolizması oksidasyon ile başlar. İlk basamak östradiolün östrona 17 β hidroksisteroid-

dehidrogenaz enzimi ile 17'nci karbondan oksidasyonudur. Bu olay geri dönüşümlü olmasına rağmen, östradiolün östrona dönüşümü östronun östradiola dönüşümünden çok daha hızlıdır. Daha sonra geri dönüşümsüz bir yol olan hidroksilasyon sitokrom P-450 enzimi tarafından oluşturulur (14). Hidroksilasyon ya 2'nci karbon pozisyonunda oluşur ve 2-hidroksiestron (2-OH) meydana gelir ya da 16 α karbondan oluşur ve 16 α hidroksiestron (16-OH) meydana gelir. Ayrıca az da olsa 4'üncü karbondan hidroksilasyon meydana gelebilir ve 4 hidroksiestron (4-OH) oluşur (16). Östrojenler ayrıca metilasyon, glukoronidasyon ve süfanasyon yoluyla da metabolize edilmelerine rağmen, bu yollar ile metabolize olmaları nadirdir. 2-OH ve 4-OH quinonlara hazır bir şekilde okside olabilirler (17).

1.1.3 Östrojen Reseptörleri

Steroid hormon reseptörler ailesi glukokortikoid, mineralokortikoid, progestin, 1,25 dihidroksivitamin D₃, progestin, androjen ve östrojenin de dahil olduğu geniş bir dağılım gösterir. Bu reseptör ailesinin tamamı aynı yapısal ve fonksiyonel karakteristiğe sahiptir. Hepsinde çok iyi korunmuş DNA ve ligand bağlanma bölgesi bulunur. Steroid hormon reseptörünün kendine ait hormon ile bağlanması transkripsiyona yol açarak steroid hormonun genomik aktivite oluşturmasına yol açar (18). Östrojen reseptörü (ER) klas-1 nükleer hormon reseptörü sınıfına dahildir (19).

Önceleri sadece tek tip ER olduğu düşünülmekteyken, 1996 yılında birbirinden bağımsız çalışmalarda sıçan (20), insan (21) ve farede (22) farklı bir ER bulunduğu açıklandı. İlk bulunan östrojen reseptörüne α , daha sonra bulunan formuna ise β adı verilmiştir. Östrojen reseptör β ilk olarak sıçan prostatının salgı yapan hücrelerinden izole edilmiş ve varlığı hem dişi hem de erkek üreme organlarında tesbit edilmiştir. Farede elde edilen ER α 595 aminoasitten oluşurken ER β 485 aminoasite sahiptir (20). Bu farkın en önemli sebebi ER β nın N9 terminusunun daha kısa olmasından kaynaklanır (22). Östrojen reseptörleri A, B, C, D, E ve F olarak isimlendirilen 6 fonksiyonel bölgeden ibarettir. N-terminalini oluşturan A/B bölgesi ER α ve β arasındaki en az benzerlik gösteren kısımdır ve insan ER arasında bu bölgede ancak %17'lik bir benzerlik bulunur. DNA respons element olarak tabir edilen ve reseptörlerin DNA bağlanma bölgesi olan C bölgesi ise tam aksine çok büyük benzerlik gösterir. Bu benzerlik %97 olarak bulunmuştur.

D bölgesi nükleer lokalizasyondan sorumlu olup reseptörler arasında %30'luk bir benzerlik bulunur (23). E bölgesi ise ligand bağlanma bölgesi olarak adlandırılır ve reseptörler arasında yaklaşık %60 lık bir benzerlik bulunmaktadır. Bununla birlikte hem ER α hem de β östrojene aynı şiddette bağlanma yeteneğine sahiptir (24). F bölgesi ise C-terminalinde bulunur ve bu bölgedeki benzerlik %18'dir (23).

Östrojenler lipofilik olduklarından plazma zarlarının lipid tabakasından kolaylıkla geçebilirler ve böylece bütün hücelere girebilirler. Östrojenler hücre içerisinde stoplazmik hidrofob proteinlere bağlanırlar. Bu nedenle, steroid hormon etkinliğinin spesifikliği hedef doku hücrelerinin stoplazmalarındaki özgül reseptör protein aracılığı ile sağlanır. Östrojen reseptör kompleksi nükleusa diffüze olur veya taşınır. Hücre düzeyinde serbest halde bulunan östrojen hormonu hücre membranını pasif difüzyon ile geçer ve stoplazmada bulunan kendisine ait reseptöre bağlanır. Ancak, bu bağlanmadan sonra reseptör-hormon kompleksi hücrenin çekirdeğine göç eder ve kromatine oldukça sıkı bir şekilde bağlanır. Bu nedenle östradiol gibi işaretlenmiş steroid bir hormon damardan verildiğinde bunun hedef hücre çekirdeklerinde toplandığı görülmektedir. Çekirdekte hormon buradaki özgül genleri, anlatımlarını özgül haberci RNA'lar oluşturmak yoluyla kayıtlanması (transkripsiyonu) için uyarır. Haberci RNA'lar stoplazmaya geçerek ribozomlarda yeni proteinlerin sentezi anlamına gelen çevirim işlemini başlatırlar (25).

Östrojenin reseptörüne bağlanması çok safhalı bir süreçtir. Östrojenin reseptörüne bağlanması ile reseptörlerde dimerizasyon oluşur. Dimerizasyondan reseptörlerin C ve E bölgeleri sorumludur (26). Dimerizasyon $\alpha - \alpha$ homodimerleri şeklinde olabileceği gibi $\alpha - \beta$ heterodimerleri şeklinde de olabilir. Bunun yanında $\beta - \beta$ homodimerleri de oluşmaktadır (27). Bu homo ve heterodimerlerin varlığı östrojenin hedef hücrelerde östrojene bağlı etkilerin neden farklı farklı olabileceğini de açıklamaktadır. Östrojenin reseptörüne bağlanması östrojen-reseptör kompleksinde yapısal bir değişikliğe (tersiyer ve kuaterner yapı) sebep olarak aktivasyona yol açar. Bu yapısal değişiklik sayesinde östrojen-reseptör kompleksi artık kromatine bağlanabilme yeteneği kazanır. Bu kompleks DNA üzerinde bulunan ve hormon respons element (HRE) olarak adlandırılan özel bölgeye bağlanır. Hormon respons element genellikle steroide duyarlı genlerin üst kısmında lokalize

olmuştur. Kompleksin HRE bölgesine bağlanması özel mRNA sentezini artırır ve sonuçta protein sentezinde artış gözlenir (25, 28).

Östrojen reseptörlerinin formları, miktarları ve dağılımları erkek ve dişi farelerde dokudan dokuya farklılık göstermektedir. Farelerde ER α yoğunlukları uterus, testis, hipofiz, ovaryum, böbrek, epididimis ve adrenal bezde daha fazladır. ER β ise prostat, ovaryum, akciğer, sidik kesesi, beyin, uterus ve testiste daha fazla rastlanmıştır (24).

Dokulardaki ER miktarı dolaşımdaki östrojen miktarları ile doğru orantılıdır. Artmış östrojen konsantrasyonu ratlarda ER ekspresyonunu artırmıştır. Östrojen enjeksiyonu ile meme dokusundaki ER konsantrasyonu yaklaşık % 40 artırmıştır. Steroid hormon reseptörleri yapımından sorumlu olan DNA bağımlı RNA polimeraz I ve II ekspresyonu da dışardan verilen östrojene bağımlı olarak 4 ile 5 kat artış göstermiştir (29).

1.1.4. Östrojenin Genomik Olmayan Etkileri

Yeni elde edilen bilgiler, özellikle üreme sisteminde, östrojenin hücre çekirdeğinde DNA üzerine olan etkilerinden farklı olarak, bazı etkilerini çok daha hızlı bir şekilde gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu etkiler peptid hormonların membran reseptörlerine bağlanmasını takiben gözlenen etkilerine benzer şekilde çok hızlı oluşmaktadır (30).

Tavuk ve domuzlardan ovulasyon öncesi alınan foliküllerden toplanan granuloza hücreleri ile yapılan araştırmada 17β -östradiol verilmesini takiben hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ani olarak artış göstermiştir (31). Östriol ve östron da aynı etkiyi oluşturmuştur. Östrojen reseptör agonisti tamoksifen uygulamasının veya RNA ve protein sentezini durduran aktinomisin-D ve sikloheksimidin Ca^{+2} konsantrasyonunda görülen artışı etkilemediği bildirilmiştir. Kalsiyum kanal blokörleri de (nifepidin ve metoksiverapamil gibi) Ca^{+2} artışını durduramamıştır. Bu yüzden östrojen uygulamaları sonucu ortaya çıkan ani hücre içi Ca artışı, D vitamini veya fosfat tarafından oluşturulan ve membran kanalları yoluyla hücre içi Ca^{+2} miktarının artmasına yol açan mekanizmadan farklı olarak oluşmaktadır. Fakat granuloza hücrelerinde östrojen yoluyla görülen hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış inositol fosfolipid hidroliz inhibitörleri ile (neomisin ve U-73,122)

engellenebilmektedir (32). Bu bilgiler östrojenin hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu üzerine etkisinin inositol 3 fosfat aracılığı ile olabileceğini düşündürmektedir. Granuloza hücrelerine östradiol uygulaması ile hücre içi Ca^{+2} artışı arasında yaklaşık 5 saniyelik bir zaman bulunmakta olup bu süre inositol 3 fosfatın oluşması ve Ca^{+2} iyonlarının hücre içi depolardan salınması için geçen süreye uymaktadır. Östrojene bağlı Ca^{+2} artışı kalmodüline (CAL) bağlı sistemlerin aktivasyonu, Ca^{+2} iyonuna bağlı parakrin ve otokrin faktörlerin aktivasyonu (transforming büyüme faktörü gibi), hücre proliferasyonunun uyarılması, ve hücre-hücre haberleşmesinin sağlanması gibi olaylarda önemli olabilir (33).

17 β -östradiol enjeksiyonu uterus dokusunda da genomik olamayacak kadar hızlı morfolojik ve fonksiyonel etkiler göstermektedir. Östradiol verilen endometriyal hücrelerde 10 dakikadan az bir sürede kalsiyum iyon konsantrasyonu artmaktadır (34) ve bu etki hücre zarı yüzeyinde bulunan, varlığı sıçan endometriyal ve karaciğer hücrelerinde daha önce ispatlanmış olan, östrojen bağlanma bölgeleri yoluyla olduğu düşünülmektedir (35, 36). Buna ilaveten ovaryumları alınmış sıçanlarda damar içi östrojen verilmesini takip eden bir dakikalık süre içerisinde endometriyal hücrelerdeki mikrovilus miktarı, uzunlukları ve yoğunluğu artış göstermiştir (37). Östrojenin mikroviluslar üzerindeki etkisi hücre zarında reseptörü bulunan peptid yapıdaki epidermal ve sinir büyüme faktörleri gibi büyüme faktörleri tarafından oluşturulan etkilere büyük benzerlik göstermektedir (38).

Östradiol germinal vezikül safhasındaki oositte de Ca^{+2} konsantrasyonunu artırmaktadır. Ayrıca hücre kültürü medyumunda bulunan östrojen oositlerin mayotik olgunlaşmasını etkilemese de, olgunlaşmış oositlerin fertilizasyon potansiyelini artırmaktadır. Metafaz II safhasındaki oositlerde bölünme oranı ve gelişimi östrojen bulunan ortamdakilerde artış göstermektedir (39).

Östrojenin genomik ve genomik olmayan yolları aynı anda da etkin olabilir ve bu yollar birbirleri üzerine etki edebilirler. Bazı çalışmalar östrojenin DNA-RNA-protein sentezi üzerine etkisini sağlayan hücre sitoplazmasında bulunan reseptöre bağlı yol ile hücre zarı reseptörü aracılığı ile oluşan sinyal iletimi arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Bu etkileşimin varlığı meme bezinde (40) ve uterus hücrelerinde (30) gösterilmiştir. Bu etkileşim steroid responsive genler ve siklik AMP (cAMP) sistemi arasındadır. Buna ilaveten östradiolün protein tirozin

fosforilizasyonu üzerine etkili olduğu da bildirilmiştir (41-43). 17 β -östradiolün, tirozin kinaz ve MAP kinazı, hücre zarında lokalize olan klasik ER varyantı yoluyla aktiflediği gözlenmiştir (44). Yani aynı östradiol eş zamanlı veya sırasıyla hem membran hem de nükleer reseptörünü uyarabilmektedir. Dolayısı ile östrojenin genomik olmayan etkilerinin ortaya çıkarılması hayvan ve insan fizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına yardım edecektir.

1.1.5. Östrojenin Genomik Etkileri

Östrojenler dişilerde cinsiyet organlarının ve ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişmesi, gelişmenin ve fizyolojik etkinliklerinin sürdürülmesi için gereklidirler. Östrojenlerin dişi memelilerde oluşturduğu ikincil sex karakterleri vücut şeklinin kılların ve sesin değişmesi, memelerin gelişmesi gibi işlevleri kapsar. Östrojen overlerin ve fallopian tüplerin gelişmesi, vajina epitelinin çok katlı epitele dönüşmesi, endometriyal bezlerin büyümesi ve uterus gelişmesi gibi genital organlar üzerine önemli etkilere sahiptir. Özellikle progesteronla birlikte östrus olarak nitelenen davranış ve fiziksel değişiklikleri oluştururlar. Ergenliğe ulaşmış dişilerde uterusun boyutları iki-üç kat artış gösterir. Östrojenler anabolizan etkiye sahiptirler. Bu yüzden hücre başkalaşımı ve büyümeyi uyarıcı etkileri bulunur. Östrojen etkisi altındaki endometriyumda belirgin bir proliferasyon oluşmakta ve implante olabilecek ovumun beslenmesine yardımcı olmak için endometriyal bezlerde büyük gelişme gözlenmektedir (45).

Ovaryumları çıkarılmış sıçan ve tavşanlarda dışardan östrojen uygulaması sonrası yaklaşık 30 dakika içerisinde uterus kan akımının önemli ölçüde arttığı ve uterus ağırlığının yaklaşık %50 oranında artış gösterdiği gözlenmiştir. Bu yüzden ovaryum steroidlerinden olan östrojen uterus morfolojisi ve motilitesi üzerine etkili en önemli faktörlerden birisi olarak kabul edilmektedir (11). Östrojen enjeksiyonunu takip eden 12 - 24 saat içerisinde hayvanlarda proöstrus benzeri davranışlar gözlenir. Bu davranışlar iki aya kadar devam edebilir. Süt ineklerine östrojen enjeksiyonunu takip eden 1-3 günde östrus benzeri davranışlar yoğun olarak oluşur (birbiri üzerine atlama, huzursuzluk, vajinadan mukus akıntısı, şişmiş ve kızarıklık vulva). Enjeksiyonu sonrası bir hafta içerisinde ovaryumlarda regresyon, mukus akıntısında artış, uterusu gerginlik, ve östrus benzeri hareketler görülmekte, 17 gün içerisinde vulvada şişlikle

birlikte sulu mukus akıntısı ve foliküler aktivitede gelişme oluşarak uterusu ödem artmaktadır. Bunu takip eden 7 hafta içerisinde ovaryumlarda büyük foliküller ve korpus luteum oluşmaya başlamaktadır (46). Kendiliğinden oluşan uterus motilitesinin karakteri bu hormonun etkisi ile değişiklik göstermekte ve spontan kasılmaların şiddetinde artış görülmektedir (47).

1.2. Düz Kas Kasılım ve Gevşeme Mekanizması

Düz kasların aktif hale gelerek kasılma mekanizması çizgili kasa göre farklı olmasına rağmen, hem düz kasların hemde çizgili kasların kasılabilmeleri için hücre içi Ca^{+2} yoğunluğunda bir artış gerekmektedir (48). Çizgili kaslarda hücre içindeki Ca^{+2} troponin C'ye bağlanarak kasılmaların oluşmasını sağlar. Çizgili kasların aksine düz kaslarda troponin bulunmaz. Bunun yerine Ca^{+2} CAL'e bağlanır. Dinlenme durumunda sitosolde bulunan Ca^{+2} miktarı azdır ve CAL sitosolde serbest olarak bulunur (49). Sarkoplazma Ca^{+2} yoğunluğundaki bir artış, 4 adet Ca^{+2} 'un CAL'de bulunan kalsiyum bağlama bölgesine bağlanmasına sebep olur. Kalsiyum iyonları ile bağlanan Ca^{+2} - CAL kompleksi şekil değişikliğine uğrayarak, merkezde bulunan heliks yapısının yardımı ile miyozin hafif zincir kinaz (MLCK) enziminin etrafına dolanarak MLCK'da bulunan otoinhibitör bölgenin yer değiştirmesine sebep olur. Miyozin hafif zincir kinaz adenozin trifosfat (ATP) varlığında miyozin hafif zincirini fosforlayabilme yeteneğine sahiptir. Bu yer değişikliği MLCK'da bulunan katalitik bölgenin açığa çıkmasına ve kinazın aktifleşmesine sebep olur. Kinaz da miyozinin yapısında bulunan miyozin hafif zincirinin N-terminalinden fosforile edilmesini katalize eder (49,50). Miyozin hafif zinciri 20 kDa ağırlığında olup miyozin başlarında bulunur. Miyozin hafif zincirin fosforile olması miyozin başları ile aktin filamentlerin arasında çarpaz köprü oluşumuna sebep olur ve kasılma meydana gelir (51).

Kalsiyum iyonlarının sarkoplazmadan geri alınması ve miyozin hafif zincir fosfatazın uyarılması ile düz kaslarda gevşeme oluşur (51). Sarkoplazma Ca^{+2} 'un 10^{-7} mol/L seviyesinin altına düşmesi ile düz kasta gevşeme meydana gelir. İlk önce Ca^{+2} CAL'den ayrılır. Miyozin hafif zincir fosfataz mevcut fosfatları miyozinden kopararak miyozinin ATPaz aktivitesini kısıtlar. Düşük miyozin ATPaz aktivitesi düz kaslarda gerilimi azaltır ve böylece düz kasta gevşeme şekillenmektedir (12).

1.2.1 Myometriyal Kasılma

Uterus kasının farklı özellikte kasılma şekilleri bulunur. Bunlardan bir tanesi sürekli kasılım şeklindedir. Fokal ve sporadik bir şekilde ortaya çıkar ve rastgele oluşur. Bu kasılmalar sırasında myometriyum süresi yarım saate kadar ulaşabilen kasılmalar gösterir. Kasılan bölgedeki kan miktarı sıkışmadan dolayı azalır, kasılan bölgede sıvı miktarı düşer ve bu durum bölgeden geçen sinyal yoğunluğunda geçici bir azalmaya yol açar (52).

Uterus kasılma şekillerinden bir başkası ise ritmik bir şekilde oluşur ve myometriyumun sadece iç üçte bir bölgesinde, stratum subvaskularede, gözlenir. Stratum vaskulare ve supravaskulare tabakalarında ise herhangi bir kasılım aktivitesine rastlanmaz (53). Uterin peristalsis olarak adlandırılan bu harekette endometriyumda dalga benzeri bir yayılma gösterir (endometriyal kayma hareketi). Hızlı sperm taşınımı ve erken gebeliğin korunabilmesi için bu hareketlerin yönü ve sıklığı siklusa bağlı olarak değişir. Ovulasyon öncesi zamanda bu hareketlerin sıklığı iyice artarak dakikada yaklaşık 2-3 adete ulaşır (52). Peristaltik hareketlerdeki bozukluklar infertiliteye kadar ulaşabilen problemlerle neticelenebilir (54).

Ovulasyon öncesinde serviksten fundusa doğru bir peristaltik bulunmaktadır. Bu spermin serviksten fundusa doğru ulaşmasını kolaylaştırır. Menstrasyonda ise peristaltik fundustan servikse doğrudur. Bu sayede menstrasyon sırasında kanın uterus dışına atılması kolaylaştırılmış olur (55).

Uterusta gözlemlenen kasılma hareketleri dışideki siklusun zamanına göre yön ve sıklıkta değişiklikler gösterir (53). Menstrual siklusun ortasında uterus kasılmaları en yüksek düzeyde iken menstrasyon sırasında kasılmalar en düşük düzeyde kalır. Bu yüzden kasılmaların dominant folikülün kontrolü altında ve oksitosinle birlikte kontrol edildiği düşünülmektedir (56). Peristaltik hareketlerin gözlemlendiği uterusun stratum subvaskulare tabakası siklusla paralel şekilde östradiol reseptörlerinde değişiklik gösterir. Bu tabakadaki östrojen reseptörleri foliküler fazdan önce ve luteal fazda en az düzeyde bulunurken, foliküler faz esnasında en yüksek seviyelere ulaşır (57). Bu yüzden uterusu peristaltik hareketlerde görülen değişikliklerin östrojen reseptörlerindeki farklılıklarla birlikte kandaki östrojen düzeyleriyle de ilgili olduğunu düşünmek yanlış olmayacaktır (56).

Bununla birlikte östrojenin uterus hareketleri üzerine etkilerinin dolaylı olduğu ve büyüme faktörlerini, enzimleri, lokal hormonları ve reseptörleri içerdiği düşünülmektedir (58). Sığınlarda endometriyumda oksitosin yüksek düzeylerde üretilmektedir. Endometriyal oksitosinin ve reseptörünün düzeyleri östrusta artmakta ve östradiol bu artışı uyarmaktadır. Bu artışın ise merkezi sinir sistemi yoluyla değil lokal olduğu düşünülmektedir (59). Ovaryumdan salgılanan oksitosinin de uterus peristaltığı üzerine etkili olabileceği bildirilmiştir (60). LH piki ile birlikte foliküler oksitosin salınımı da hızlı olarak artmaktadır (61). Bu yüzden oksitosinin ovulasyon sonrası sperm taşınmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (56).

Endometriyal oksitosin ve reseptörünün otokrin ve parakrin etkisi ile birlikte prostaglandinlerin de kasılmaları uyardığı belirtilmiştir. Oksitosin yoluyla oluşan kasılmaların, özellikle gebelikte, prostaglandinlerin etkisi ile olabileceği düşünülmektedir (62). Doğuma yakın dönemde oksitosin reseptörlerindeki artışa paralel olarak prostaglandin $F_2\alpha$ düzeyleri de artar. Ayrıca myometriyumda ve glandular epitelde nitrik oksit sentaz (NOS) varlığı tespit edilmiştir (63,64). Bu yüzden nitrik oksitin (NO) endometriyum ve myometriyumda fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Gebe sığında NOS aktivitesi oksitosin tarafından uyarılmakta ve bu prostaglandin $F_2\alpha$ tarafından oluşturulan kasılmaları ve prostaglandin salınımını kontrol altına almaktadır (65).

Uterustaki tek yöne doğru oluşan peristaltik oksitosin reseptörlerinin yoğunluğu ile açıklanabilir. Sığır serviksindeki oksitosin reseptör seviyeleri östrusta çok yükselmektedir (66). Östrustaki koyunlarda serviksteki oksitosin bağlanma bölgeleri gebe ve anöstrustaki koyunlara göre çok yüksek bulunmuştur (67). Oksitosinin prostaglandin E_2 'yi uyardığı, prostaglandin E_2 'nin de servikal dokuyu yumuşattığı daha önce bildirilmiştir (66). Bu durum ovulasyon öncesi servikste görülen yumuşama ve açılmanın oksitosin tarafından uyarılan prostaglandin E_2 tarafından olabileceğini düşündürmektedir (56). Servikteki bu yumuşama, uterusun servikoismik bölgesindeki peristaltik hareketler, serviksin sıkışmasına sebep olmakta bu ise spermatozoaların sıkışarak servikal kıvrımlardan uterusu doğru ilerletilmesine sebep olmaktadır. Bu şekilde spermatozoaların istmusa doğru hareketleri uterus peristaltığı ile kolaylaştırılmaktadır (53).

1.2.2 Myometriyal Kasılmaları Uyarıcı Yollar

Myometriyal kasılmanın oluşması aktin ve miyozinin yapısında meydana gelen değişikliklere bağlıdır. Bu değişiklik sayesinde aktin ve miyozin birbirleri üzerinden kayarak kas hücresi miyositin kısalmasına sebep olur. Bu yapısal değişiklik için gerekli olan ATP, miyozin başlarında bulunan 20-kDa ağırlığındaki miyozin hafif zincirinin, miyozin hafif zincir kinaz (MLCK) enzimi ile fosforilasyonu neticesinde, miyozin tarafından tedarik edilir. Miyozin hafif zincir kinaz enzimi myometriyal kasılmada en önemli rolü oynayarak kasılmaları uyardığı gibi durdurabilme yeteneğine de sahiptir (68). Miyozin hafif zincir kinaz, kalsiyuma bağlanabilen bir protein olan CAL tarafından aktiflenir. Kalmodülün aktif hale geçebilmek için 4 adet Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç duyar. Kalsiyum tarafından aktif hale gelmiş CAL ile bağlanan MLCK, enzimde yapısal bir değişiklik oluşturarak, miyozin hafif zincirin fosforilize olmasına yol açar. Eğer MLCK protein kinaz A (PKA) ile fosforilize olursa, MLCK'nin Ca^{+2} -CAL kompleksine affinitesini azaltır ve inaktivasyona sebep olur (68). MLCK'nin aktivitesi Ca^{+2} ve cAMP düzeylerini ayarlayan intraselüler yollarla kontrol edilmektedir ve MLCK'nin bu aktivitesi uterus kasılması için çok önemlidir (68-70). Uterotoninler reseptör bağımlı kapıları açarak veya sarkoplazmik retikulum da dahil olmak üzere hücre içi kalsiyum depolarından Ca^{+2} bırakılmasını artırarak hücre içerisindeki Ca^{+2} miktarlarını artırmaktadır (71, 72). Myometriyal kasılmaları durduran faktörler ise etkilerini hücre içi cAMP veya siklik GMP (cGMP) miktarlarını artırarak kalsiyum depolarından Ca^{+2} salınımını veya MLCK aktivitesini azaltarak gösterirler. Relaxin veya prostasiklin gibi beta adrenerjik ajanlarla bağlanma adenilat siklaz aktivitesini artırır ve cAMP seviyesinde artışa sebep olur. Uterus kasılmalarını azaltan NO gibi ajanlar ise guanil siklazı aktifleyerek cGMP seviyelerinde yükselmeye sebep olur (71). Pato ve ark. gebe koyun uterusunda MLCK enzimini saflaştırmışlardır (73). Enzim 160 kDa ağırlığındadır ve aktivasyonu için mutlaka hem kalsiyum hem de CAL'e ihtiyaç duyar. Kalsiyum-CAL eksikliğinde enzim inaktiftir. Kalsiyum-CAL kompleksine bağlanması ile MLCK'nin katalitik kısmı açığa çıkar ve katalitik bölge miyozin hafif zincirin fosforile olarak kasılma olayını başlatmasına sebep olur. Gevşeme ise ya tip-2A fosfataz enziminin katalitik alt ünitesi ile MLCK'nin defosforilize olması ya da MLCK aktivitesinin azalması ile meydana gelir (74). Miyozin hafif zincir kinaz

aktivitesinin azalması için ise hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun azalması gereklidir. Hücre içi Ca^{+2} miktarının azlığı kalsiyumun CAL'den ayrılmasına sebep olarak MLCK aktivitesini azaltır (68).

Beta-adrenerjik agonistleri relaksin ve PGI_2 hücre içi cAMP seviyelerini artırarak myometriyal kasılmaları oluştururlar. İnhibitörlerin hücre yüzeyindeki kendilerine ait reseptörlere bağlanması GTP binding protein Gs'nin beta, gama ve alfa alt ünitelerinden ayrılmasına sebep olmaktadır. Alfa alt ünitesi adenilat siklazı aktifleyerek cAMP sentezini artırır. Siklik AMP daha sonra PKA'yı aktifler. Protein kinaz A ise ya MLCK'yı fosforile ederek Ca-CAL kompleksine bağlanmasını zayıflatır ya da Ca^{+2} 'un zara bağlanma bölgesini fosforile eder ve hücre içi serbest kalsiyum miktarını azaltır (68).

Hücre içi serbest kalsiyum kasılma sırasında 150 nM'den 500 nM'ye kadar artar. Hücre içindeki kalsiyum artışı için gerekli kaynaklar hücre dışından, hücre içindeki kalsiyum bağlanma bölgelerinden ve hücre içi organellerden sağlanır (75). Hücre dışı kalsiyum reseptör bağımlı veya voltaja duyarlı kapılardan hücre içerisine girer. Hücre içi kalsiyumun serbestleşmesi ise fosfoinositol (IP) yolu ile sağlanır. Bir uteroninin plazma membranındaki reseptörüne bağlanması G proteinini uyarır ve fosfolipaz C ile bağlanır. Bu inositol trifosfatı (IP_3) ve diasilgliserolü serbestler. Özellikle serbestlenen IP_3 hücre içi kalsiyumu, sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum çıkışını artırarak yükseltir (75, 76).

1.2.3 Myometriyal Gevşemeyi Uyarıcı Yollar

Düz kas gevşemesine sebep olan ana yol cAMP veya cGMP artışı ile oluşur. G protein bulunduran reseptörler β adrenerjik agonistler (epinefrin ve ritodin) kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) ve kalsitonin gen related proteini (CGRP) gibi uterus kası gevşeticileri G protein uyarıcı α altbirimi ($G\alpha_s$) ile eşleştirir (77). Adenilat siklazın bütün izoformları $G\alpha_s$ tarafından aktiflenir ve ATP'den cAMP üretimini sağlar (78). Nitrik oksit sentaz arjininden NO sentezler ve NO çözülmüş guanilat siklazı uyararak guanozin trifosfattan (GTP) cGMP oluşumunu uyarır (79). Peptid faktörleri membran bağlı guanilat siklazı uyararak cGMP yapımını artırır. Siklik AMP ve cGMP sırasıyla cAMP bağımlı PKA'yı ve cGMP bağımlı protein

kinazı aktifler. Bu kinaz enzimleri birçok proteini fosforile ederek hücre içi Ca^{+2} yoğunluğunu değiştiren sistemi kontrol altına alır (78).

Relaksin ve β agonistleri kalsiyum tarafından aktiflenen potasyum kanallarının ortalama açık kalma sürelerini PKA'nın rol oynadığı bir yolla artırır (80). Bu kanalın kapatılması insan ve sıçan myometriyumunda kasılmaları artırmıştır (81). İnsan myometriyumunda bulunan kalsiyum tarafından aktiflenen potasyum kanalları forskolin ve ritodrine tarafından aktiflenir (82). Sıçanlarda bu kanalın mRNA'sı gebelikte artış gösterirken doğuma yakın azalması, bu kanalın etkisinin gebeliğin ilerlemesi ile azaldığını göstermektedir (83). Ayrıca siklik nükleotidler gibi bu kanalı açık tutan maddelerin etkisi de doğuma yakın zamanlarda azalmaktadır. Bunlara ilaveten protein kinaz C (PKC) gebe myometriyumda potasyum akımını artırır. Bu mekanizma kasılmalar arasında gevşeme oluşumunu uyarabilir (84).

1.3. Nitrik Oksit ve Myometriyal Kasılma

1987 yılına kadar bir atmosfer atığı olarak düşünülen NO, bu tarihten sonra damarlarda gevşemeye yol açtığı gözlenmiş ve ilk önceleri endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak adlandırılmıştır (85). Hem insanlarda hem de hayvanlarda üretildiği ispatlanan nitrik oksit 1992 yılında science dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir.

Nitrik oksit dokularda yük taşımadığından hücreden hücreye kolaylıkla geçebilmektedir. Aşırı ve kontrolsüz salınımı hücreler için zararlı ve ölümcül olabilmesine rağmen, NO'in az miktarlardaki salınımı dokular için çok önemli fizyolojik fonksiyonların oluşmasında etkilidir (86).

Nitrik oksit sentezlenmesini uyaran iki adet enzim tespit edilmiştir. Bunlardan ilki olan yapısal nitrik oksit sentez (cNOS) periferik ve merkezi sinir sistemi, idrar yolu dokusu ve damar endoteli gibi dokularda pasif olarak bulunur. Enzimin aktif hale geçebilmesi için hücre içi Ca^{+2} yoğunluğunun artması gerekir. Kalsiyum iyonları daha sonra CAL'le birleşerek cNOS'u aktifler ve L-arjininden NO sentezlenmesi sağlanır. Hücre içi iyonize kalsiyum yoğunluğu azalmaya başladığı anda cNOS enzimi inaktif duruma geçeceğinden dolayı sentezlenen NO miktarı çok düşük seviyelerde kalmaktadır (86, 87).

Nitrik oksit sentezleyen diğerk enzim olan uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ise hücre içerisinde bulunmaz. Bu enzim özellikle monosit, nötrofil, makrofaj ve hepatosit gibi hücrelerde sentezlenir (86). Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferonlar gibi sitokinler bu hücreleri uyararak iNOS sentezlenmesine yol açar ve bakteriler için sitostatik/sitotoksik etkili olan NO sentezi uyarılır. Yapısal formun aksine iNOS tarafından uyarılan NO sentezi günlerce devam edebilir (88).

Nitrik oksit hücre üzerine olan etkisini hücre zarını geçtikten sonra demir veya sülfür içeren proteinlere bağlanarak gösterir. Damar düz kasları ve nöronlar üzerinde bulunan guanilat siklazı aktifler. Guanilat siklaz ise GTP'den cGMP oluşumunu artırır. İkincil bir haberci olan cGMP'nin hücre içi artışı kas gevşemesi ve sinapslarda uyarı geçişi gibi olayların oluşmasına sebep olan mekanizmaların başlamasına yol açar (86).

Endotelial kaynaklı NO damar düz kaslarının gevşemesini sağlayarak kan basıncının ayarlanmasını sağlarken, merkezi sinir sisteminde bulunan NO ise sinirsel uyarılmaların iletimi, hafıza oluşumu, denge gibi birçok fonksiyonun kontrol edilmesinde ve desteklenmesinde bir nörotransmitter olarak rol oynamaktadır (86). Nitrik oksit perifer sinir sisteminde ise etkisini nonadrenerjik ve nonkolinerjik (NANK) sinirler üzerinde gösterir. Bu sinirler NO tarafından uyarıldığında vazodilatasyona yol açarken, bağırsak, ürogenital sistem ve solunum gibi fonksiyonların kontrol edilmesinde rol oynamaktadır. Nitrik oksit bu hayati fonksiyonların yanı sıra trombosit agregasyonu, adezyonun engellenmesi ve kalp kasının kasılmasının düzenlenmesi üzerine de etkili olmaktadır (86, 88, 89).

Uterus kasılmaları gebelik sırasında farklı mekanizmalar sayesinde kontrol altına alınır (90). Yakın zamanda NO'in de bazı hayvan türlerinde uterus kasılmasını durduracağı önerilmiştir (91). Bu çalışmalarda NO'in gebe sıçanlarda (92, 93) ve insanlarda (94) myometriyumunu gevşettiği gözlenmiştir. Ayrıca NOS enziminin uterustaki varlığı sıçanda (95-97) ve tavşanda (91) saptanmıştır. Nitrik oksit hızlı bir şekilde hücreye girer ve sitozolde bulunan guanilil siklaz (cGC) enzimini artırarak ikincil haberci olan cGMP yapımını uyarır. Bu cGMP'ye bağımlı protein kinaz G'yi (PKG) aktifleyerek düz kaslarda kasılmaya yol açan proteinlerin fosforilasyonu sayesinde gevşemeyle sonuçlanır (98). Memelilerde uterus düz kaslarının elektrofizyolojisi değişiklik gösterir ve uyarılabilirliği azalır (99); kas kasılmasına

yol açan sinyal iletim yolları baskılanırken kas kasılmasını durduran yollar uyarılır (100). Doğumla birlikte bu durum tam tersine döner ve uterus kasılmalarının uyarılması sağlanır (99). Doğumdan hemen önce insanda (94) ve sıçanda (93) myometriyumun NO'ya duyarlılığı azalır ve uterus dokusundaki NO sentezi düşer (95). Uterusta NO duyarlılığının ve üretiminin birlikte azalması myometriyum kasılmalarının artışına neden olur. Uyarılabilir NOS (iNOS) myometriyum kasılmalarını kontrol ettiği düşünülmektedir (91, 95). İnsanda (91) ve sıçanda (95), uterus düz kaslarındaki iNOS düzeyleri gebelikte artarken doğuma yaklaştıkça düzeyleri azalmaktadır. Tavşanlarda endometriyal desidua hücrelerindeki iNOS'un myometriyal hücrelerin gevşemesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (97).

1.4. Guanilil Siklaz ve Hücre Sinyali

Guanilil siklazlar GTP'nin cGMP'ye dönüşümünü katalize eden enzimdir. Bu enzim ailesinin hemen hemen bütün hücrelerde bulunan membrana bağlı ve çözülmüş izoformları mevcuttur. Peptid hormonlar, bakteri toksinleri, serbest radikaller, kalsiyum ve adenin nükleotit gibi hücre içi moleküller de dahil olmak üzere birçok agonist tarafından regüle edilirler. Guanilil siklazın uyarılması ve sonucunda cGMP'nin oluşması ile cGMP bağımlı protein kinaz, cGMP tarafından regüle edilen fosfodiesteraz ve siklik nükleotid kapılı iyon kanalları gibi kompleks hücre içi sinyaller uyarılmış olur. Guanilil siklaz ve cGMP tarafından oluşturulan bu haberci sistemleri düz kas kasılması ve elektrolit - sıvı homeostazisi gibi birçok fizyolojik olayın oluşumuna da izin verir (101).

Nitrik oksit, peptid ligandlar ve hücre içi kalsiyum yoğunluğunun artışı gibi karmaşık sinyallerin sonucunda guanilil siklazdan cGMP sentezlenmesi hücre içi çok önemli mekanizmaların başlamasına yol açar. Bu sinyaller özel guanilil siklaz - resetör eşleşmesi ile başlar. Daha sonra kofaktörler sitosolik purin nükleotidi olan GTP'nin cGMP'ye dönüşümünü başlatır. Hücre içi cGMP yoğunluğunun artması protein kinazları aktif hale getirerek doğrudan iyon kanallarının uyarılmasına ve/veya hücre içi siklik nükleotidlerin fosfodiesterazlar üzerinden yoğunluklarının değiştirilmesi ile hücre fizyolojisi üzerinde önemli etkilerini gösterirler (102).

Endojen ve eksojen kaynaklı birçok faktör (otokoidler, hormonlar, nörotransmitterler ve toksinler gibi) cGMP üzerinden hücre sinyalleri oluşturur. Bu

faktörler sonucunda guanilil siklaz sentezi, hedefe yönelme, ve cGMP'nin yıkımlanması işlemleri sırasıyla oluşur. Guanilil siklaz ve cGMP' hücre sinyal iletiminde aracılık eden hücre içi mediyatörler aşağıda incelenmiştir (101).

1.4.1. Siklik GMP Bağımlı Protein Kinazlar

Protein kinaz G (PKG), cGMP sinyallerine aracılık eden en önemli hücre içi mediyatördür. Ligand tarafından cGMP konsantrasyonunun artması PKG'nin aktivasyonu ile sonuçlanır. Protein kinaz G aktivasyonu ise ATP'de bulunan γ -fosfatın hedef proteinde bulunan serin veya treonin amino asidine katalitik transferine yol açar. Fosforilizasyona uğramış bu protein hücre dışından gelmiş uyarının özel biyolojik fonksiyona dönüşmesini sağlar (101).

Memelilerde iki farklı PKG geni izole edilmiştir. Bunlardan ilki insan kromozomu 10 bölgesinde olup, N terminal bölgesinin alternatif bölünmesi sonucu oluşan PKG I'in I α ve I β izoformlarını kodlar (103). Diğeri ise PKG II'yi kodlar ve insan kromozom 4 bölgesinde bulunur (104). Protein kinaz GI memelilerin serebellum, platelet, düz kas dokularında çokça bulunan 76 kDa büyüklüğünde sitosolik bir homodimerdir (101). PKG I α başlıca vasküler sistem, böbrek, ve adrenal bezde daha fazla bulunurken, PKG I β daha çok uterusunda bulunur (103).

Protein kinaz G II 86 kDa ağırlığında membrana bağlı bir homodimerdir. Kardiyovasküler sistemde bulunmayan PKG II, beyin ve barsaklarda bol miktarda bulunur. Akciğer, böbrek ve kemikte de bulunur. Protein kinaz G II'nin amino asit sırası PKG I'den N terminal bölgesinde farklılık gösterir. Bu farklılık PKG II'nin hücre membranına bağlı olarak bulunmasına yol açar (Lohmann ve ark 1997). Protein kinazG II'nin cGMP bağlanma bölgesinin afinitesi de çok azdır. Ayrıca PKG'nin iki formu farklı hücrelerde eksprese edilir (101, 105).

Bilinen bütün PKG'lerde N-terminal, regülatör ve katalitik bölgeler mevcuttur. N-terminal bölgesi toplam beş regülatör kısma ayrılır: Leusin ve izoleusin heptad tekrarından oluşan bir α -heliks içeren subünit dimerizasyon bölgesi; cGMP bulunmadığı zaman katalitik bölgeyi inhibe eden oto-inhibitör bölge; cGMP varlığında bazal katalitik aktiviteyi artıran otofosforilasyon bölgesi; afiniteyi kontrol eden bölge; ve enzimle spesifik subselüler yapıların etkileşimini ayarlayan intraselüler lokalizasyon bölgesi. Regülatör bölge, A ve B olarak sınıflandırılan 2

adet siklik nükleotid bağlanma bölgesi bulundurur ve enzimin 2 molekül cGMP ile bağlanmasını takiben tam aktivasyonundan sorumludur. Protein kinaz G'lerin C-terminalinde bulunan katalitik bölge ise Mg^{+2} -ATP'ye ve hedef proteinlere bağlanma yerleri bulundurur (105).

Şu anki geçerli hipoteze göre PKG I intraselüler olarak bulunmakta ve Ca^{+2} konsantrasyonunu kontrol etmektedir. Protein kinaz G II ise hücre zarındaki sıvı hemostazını ayarlamaktadır. Protein kinaz G I'in klasik hedefleri substratlar olup, PKG I tarafından hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak fosforile edilmektedir ve önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Bu grupta bulunan substratlar (I) düz kas hücrelerinde gevşemeye yol açan IP_3 ve fosfolamban, (II) platelet ve nötrofil aktivasyonunda görev alan vazodilatör-uyarıcı fosfoprotein ve vimentin, (III) serebellar purkinje hücreleri tarafından eksprese edilen ve fosfataz inhibitörü olarak rol oynayan G substratı ve (IV) tromboksan A_2 reseptörü (106). PKG I'in yeni bulunan hedef proteinleri ise (I) fosforilasyonu takiben vasküler düz kas tonusunu ve kalp kası kasılımını kontrol eden L-tip Ca^{+2} ve Ca^{+2} tarafından aktiflenen K^+ kanalları, (II) bağırsak düz kaslarını gevşettiği düşünülen Ca^{+2} bağımlı sitosolik fosfolipaz A_2 , (III) tirozin hidroksilaz, ve (IV) düz kas hücrelerinin gevşemesinde rol oynayan miyozin hafif zincir fosfataz (107).

Protein kinaz G I'in aksine PKG II'nin sadece bir tane klasik hedefi tespit edilmiştir; PKG II tarafından fosforile edilen ve bağırsak mukozasında bulunan kistik fibrozis transmembran konduktans regülatörü (CFTR) (108). İnce barsaktaki enterositlerin apikal membranlarında bulunan PKG II, CFTR'yi fosforile eder. CFTR'nin fosforilasyonu elektrojenik klorid akımını uyararak ince barsağa sıvı sekresyonunu sağlar. Sıçan böbreğinin medullasında bulunan klor kanallarının da aynı mekanizmayla çalıştığı düşünülmektedir (109). Protein kinaz G II'nin ayrıca renin sistemini ve kemik büyümesini de kontrol ettiği düşünülmektedir, hedef moleküller halen bilinmemektedir (105,110).

1.4.2. Siklik AMP Bağımlı Protein Kinazlar ve cGMP Sinyali

Protein kinaz A, PKG gibi özel siklik nükleotid bağlanma bölgesine sahip olduğundan cGMP ile aktif hale gelebilirler. Protein kinaz A'nın cGMP ile aktivasyonu, cAMP ile aktivasyonundan yaklaşık 50 kat daha azdır (105). Protein

kinaz A'nın siklik nükleotid bağlanma bölgesi PKG'nin siklik nükleotid bağlanma bölgesi ile yüksek benzerlik göstermesine rağmen, anahtar amino asitlerde farklılık mevcuttur (111). Protein kinaz G için bilinen birçok fizyolojik substrat PKA içinde substrat olarak bilinmektedir. Ayrıca, birçok hücreyel olayda cGMP ile cAMP birbirleriyle uyumlu olarak hareket ederler. Bu yüzden PKG ve PKA fare ve tavşanda IP₃'e bağımlı Ca⁺² salınımını durdurarak mide düz kaslarında gevşemeye yol açtığı bildirilmiştir (101). Benzer şekilde tavşanların ince barsak düz kas hücrelerinde izoproterenol ve SNP sitosolik Ca bağımlı fosfolipaz A₂'nin fosforilasyonunu sırasıyla PKA ve PKG üzerinden uyarmaktadır (112). Benzer etki PKA ve PKG'nin vazointestinal peptid ve izoproterenol ile peşpeşe uyarılması ile de elde edilebilir. Vertebralılarda cGMP ve cAMP düz kas hücrelerinde gevşemesinde, plateletlerde aktivasyonun engellenmesinde ve barsaklarda klorid ve su sekresyonunun regülasyonunda rol oynar. Siklik AMP'nin sıçan aortası ve domuz koroner arteri gibi bazı dokularda PKG'nin aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (113). In vitro çalışmalarda cGMP'de PKA'yı aktiflemektedir (114). Siklik GMP ve AMP arasındaki bağlantı kinaz hedef proteinlerinde olduğu gibi daha aşağı aşamalarda da meydana gelebilir (115). Nitrik oksit sentazın aşırı yapımı NO miktarını artırmakta ve cGMP miktarını artırarak PKA'nın çapraz aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu mekanizma sıçan aortasındaki düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve PKG Ia'nın yapımını durdurmaktadır (101). Bu kapsamda cGMP'nin PKA yoluyla da sinyal iletimine sebep olabileceğini işaret etse de, ne cGMP'nin PKA'yı, ne de cAMP'nin PKG'yi aktiflemesi bu iki nükleotitten birinin yokluğunda tek başına yeterli olmamaktadır. Bununla birlikte çalışmalar cGMP'nin ince ve kalın barsakta elektrojenik klorid sekresyonunu tip 3 fosfodiesterazları inhibe ederek kontrol ettiğini ve bu şekilde cAMP'yi artırarak PKA'yı aktiflediğini göstermiştir (116).

Laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada ovaryumları çıkartılmış sıçanlarda L-Arginin uygulaması uterus kaslarında gevşemeye yol açarken, 10 gün süre ile 10 µg/gün 17β-östradiol verilen sıçanlarda L-Arginin uygulamasının uterus kasındaki kasılımlar üzerine gevşetici etkisi gözlenmemiştir. Aynı çalışmada SNP uygulamasının uterusu gevşemeye yol açtığı, fakat bu etkinin 10 gün boyunca 10 µg dozunda 17β-östradiol verilen sıçanlarda ortadan kalktığı gözlenmiştir (117). Yine

Ov sıçanlarda 10 gün boyunca 10 µg dozunda verilen 17β-östradiol uterustaki kasılmaların Şiddetini arttırırken myometriyal kasılım sıklığını Ov grubuna göre azaltmıŐtır (118). Bu bulgular 17β-östradiolün NO zerine olan etkisinin myometriyumdaki cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine olabileceğini düşündürmektedir. Daha nceki çalışmalarda östrojen uygulamalarının uterus kasılmalarını arttırdığına (47, 118) veya uterus kasılmalarını durdurduğuna dair bildirimler bulunmaktadır (48). Ayrıca literatürlerde farklı doz ve süreye bağlı olarak 17β-östradiolün uterus kasılmaları ve cGMP-PK1 zerine etkisinin araŐtırıldıęı bir çalışmaya rastlanmamıŐtır.

Bu yüzden çalıŐmamızda ovaryumları çıkarılmış sıçanlarda 17β-östradiolün doza ve süreye bağlı olarak uterus kasılmaları üzerine etkisinin belirlenmesi yanı sıra bu etkilerin ortaya çıkmasında cGMP-PK1'in rolünün değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Araştırma Laboratuvarı ile Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nun AKÜHEK-44-08 referans no ve 203 sayılı izni ile hayvan denemelerine başlandı.

2.1. Araştırmada Kullanılan Aletler

Araştırmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında bulunan İzole Organ Banyosu ile kaydedici sistem olarak Force Displacement Transducer 10-A ve Acquisition System MP30 Model Biopac WSW marka (Biopac Student Lab PRO Software and MP30 Hardware) ve uyarım için ISO 150-C (May Isolation Power Supply) EFS (Electric Field Stimulation) cihazları kullanıldı.

2.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasal ve Kitler

Sodyum Klorid (Riedel), Potasyum Klorid (Riedel), Kalsiyum Klorid Dihidrat (Fluko), Potasyum Fosfat (Fluko), Magnezyum Sülfat (Sigma), Glikoz (Sigma), Sodyum Bikarbonat (Sigma), L-Arginin (Sigma), Sodyum Nitroprusid (SNP-Sigma), N-nitro-L-Arjinin (L-NNA; Sigma), 17 β -Östrodiol (Santa Cruz), Progesteron (Sigma), Anti-cGMP-PK1 (R-20, Santa Cruz), Universal LSAB Kit (Dako).

2.3. Deney Grupları

Araştırmada Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Deney Hayvanları Ünitesi'nden elde edilen 3 aylık ve ortalama 270 \pm 20 gr ağırlığında, 72 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce sıçanlara genel anestezi (21,1 mg/kg ketamin ve 4,2 mg/kg ksilazin) altında ovariektomi uygulandı. Anesteziyi takiben sıçanların abdomen bölgesi tıraş edilerek enzisyonla batına girildi. Fallop tüpleri ve ovaryumlar 2,0 ipek iplik ile bilateral tüpler bağlanarak ovaryumlar çıkarıldı.

Enzasyon bölgesi kapatıldıktan sonra operasyon sonrası beş gün boyunca sıçanlara 60 000 IU Penisilin G (Pfizer) kas içi uygulandı.

Araştırma süresince sıçanlar, oda ısısı 20-22 °C olan ve havalandırılmalı bir odada barındırıldı. Ticari sıçan yemi ve su *ad libitum* olarak temin edildi. Overiektomiden 2 hafta sonra sıçanların genel muayeneleri yapılarak her grupta 18 sıçan bulunacak şekilde, kontrol ve 3 deneme grubuna (östrojen) ayrıldı. Araştırmada kontrol ve östrojen gruplarındaki sıçanlara uygulanan deneysel prosedür Tablo 2.1’de verildi.

Tablo 2.1: Araştırmada kullanılan deneysel gruplar

Grup	Alt grup	Uygulama	Ötenazi zamanı
Kontrol (Ov)	18’inci saat	0,2 ml susam yağı/sıçan/	Uygulama sonrası 18. saat
Kontrol (Ov)	90’inci saat	0,2 ml susam yağı/sıçan/gün (3gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
Kontrol (Ov)	162’nci saat	0,2 ml susam yağı/sıçan/gün (6 gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
25µg 17β-östradiol	18’inci saat	17β-östradiol 25 µg/sıçan	Uygulama sonrası 18. saat
25µg 17β-östradiol	90’inci saat	17β-östradiol 25 µg/sıçan/gün (3gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
25µg 17β-östradiol	162’nci saat	17β-östradiol 25 µg/sıçan/gün (6gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
50µg 17β-östradiol	18’inci saat	17β-östradiol 50 µg/sıçan	Uygulama sonrası 18. saat
50µg 17β-östradiol	90’inci saat	17β-östradiol 50 µg/sıçan/gün (3gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
50µg 17β-östradiol	162’nci saat	17β-östradiol 50 µg/sıçan/gün (6gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
100µg 17β-östradiol	18’inci saat	17β-östradiol 100 µg/sıçan	Uygulama sonrası 18. saat
100µg 17β-östradiol	90’inci saat	17β-östradiol 100 µg/sıçan/gün (3 gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
100µg 17β-östradiol	162’nci saat	17β-östradiol 100 µg/sıçan/gün (6gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra

Özetle kontrol grubuna susam yağı (0,2 ml/sıçan/gün IM), deneme gruplarına ise her bir sıçan için 0,2 ml susam yağında çözdürülmüş 17 β -östradiolden birinci deneme grubu (Östrojen 1) sıçanlara 25 μ g/sıçan/gün, ikinci deneme grubu sıçanlara (Östrojen 2) 50 μ g/sıçan/gün ve üçüncü deneme grubundaki sıçanlara (Östrojen 3) 100 μ g/sıçan/gün kas içi altı gün uygulandı.

Her grup kendi içinde üç alt gruba ayrılarak 18'inci, 90'ıncı ve 162'nci saatlerde 6'şar hayvan genel anestezi altında etik kurallara uygun olarak boyun eklemlerinden disloke edilerek ötenazi yapıldı.

2.4. İzole Organ Banyosu

Ötenaziyi takiben karın bölgesi hemen açılarak kornu uteriler zarar verilmeden çıkarıldı. İzole edilen her bir kornu, krebs çözeltisi (NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1, KH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 25 ve glikoz 11 mM) içerisine alındı. Sonra uterus etrafındaki mezenter ve yağ dokudan dikkatli bir şekilde temizlenerek 0,1 – 0,3 cm x 0,8 cm boyutlarında şerit şeklinde doku parçası elde edildi. Hazırlanan bu preparatlar, 37 °C sıcaklıkta ve %95 O₂ - %5 CO₂ gaz karışımı ile sürekli havalandırılan 20 ml krebs çözeltisi içerisinde olacak şekilde izole organ banyosunun I ve II numaralı olmak üzere her iki kadehindeki platin halka elektrotun alt ucuna bağlanarak dokunun halka elektrotlar arasında kalması sağlandı. Dokunun diğer ucu üst uçlarından force transducer'a bağlanıp tespit edildi ve izometrik düz kas hareketleri "force transducer" ve "acquisition system" yardımı ile bilgisayarda görüntülenerek kaydedildi.

2.5. Uterusta İzometrik Kasılımların Belirlenmesi

Başlangıçta izole organ banyosunun I ve II nolu kadehlerine tespit edilen iki ayrı doku parçasına 2 gramlık bir gerim uygulandı. Ortama alışmaları için en az 1 saat süreyle ve her 15 dakikada bir değiştirmek koşulu ile krebs çözeltisi içerisinde bekletildi. Öncelikle normal spontan kasılımların belirlenmesi için 45 dakikalık kasılım periyodu kaydedildi. Takiben Electric Field Stimulation (EFS) ile her iki doku için submaksimal kasılımın sağlandığı voltaj, frekans ve uyarı derinliği değerleri tespit edildi. Bunun için dokuya çeşitli düzeylerde elektrik akımı (10, 20, 30, 40 volt) farklı sürelerde (0,25, 0,5, 1 ms) ve sıklıkta (frekans) (2, 4, 8, 16, 32, 64

Hz) uygulandı (119). En iyi kasılımin meydana geldiği ortalama frekans değeri 32 Hz, uyarı derinliği 1 ms ve voltaj yüksekliği ise 20 volt olarak tespit edildi.

Araştırmada yöntemi içerisinde dokulara uygulanan deney protokolü Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.2: Yöntem içerisinde dokulara uygulanan deney protokolü.

Uygulama	Uygulama Protokolü	Amaç
İnkübasyon	Bir saat inkübasyona bırakıldı	Ortama uyum
Uygulama I	Elektiriksel Uyarım (EFS) L-Arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) + EFS	Submaksimal kasılımin tespiti Endojen NO etkisi
Uygulama II	L-NNA (10^{-3} M) + L-Arginin (10^{-3} M) + EFS SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) + EFS	Enzimsel düzeyde endojen NO tespiti Eksojen NO etkisi

Endojen NO etkinliğinin belirlenmesi amacıyla EFS varlığında L-Arginin 1μ M den 1 mM, eksojen NO yolunun değerlendirilmesi amacıyla SNP 10 nM den 0.1 mM dozlarında logaritmik olarak artırılarak her on dakikada bir izole organ banyosuna ilave edildi (Tablo 2.2).

Endojen NO etkisinin enzimsel düzeyde etkisinin ortaya konulması için EFS varlığında 100 mmol/L L-NNA verildikten sonra L-arginin 1mM dozunda izole organ banyosuna eklendi.

2.6. Myometriyumda cGMP-PK1’in İmmunohistokimyasal Boyanması

2.6.1. Tespit ve Histolojik Doku Takibi

Alınan uterus örnekleri %10 tamponlu formaldehit ile 24 saat tespit edildi. Tespitten sonra doku örneklerinin histolojik takipleri yapılarak parafin bloklara gömüldü. Bloklardan 4–5 μ ’luk kesitler alınarak immunhistokimyasal yöntemle boyandı (120).

2.6.2. İmmunhistokimyasal Yöntem

İmmunhistokimyasal yöntem olarak indirekt streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi kullanıldı. Buna göre: Asit-alkolle temizlenmiş ve poli-L-lisin ile kaplanmış olan lamlara 4-5µ'luk doku kesitleri alındı ve kesitler 60 °C'lik etüvde 1 saat bekletildi.

Preparatlar ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek, antijen retrieval için pH 6 olan Sitrat buffer içerisinde mikrodalga fırında 700 watt'da 3 kez 5'er dakika kaynatıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için distile suda hazırlanmış % 3'lük Hidrojen peroksit ile 10 dakika inkübe edildi. Anti rabbit poliklonal IgG primer antikor (1/500 dilüsyon) ile preparatlar nemli ortamı sağlayan bir kap içerisinde 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Preparat biotinli sekonder antikor ile oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Enzim olarak Streptavidin-HRP ile preparatlar oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. DAB substrat-kromojen solüsyonunda 5 dakika tutularak, Harris Hematoksilen ile 30 saniye zıt boyama yapıldı. Alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı (120).

2.6.3. İmmunhistokimyasal Değerlendirme

Birbirinden bağımsız iki araştırmacı tarafından immunohistokimyasal boyamaların değerlendirmeleri reaksiyonun şiddetine ve dağılımına bakılarak yapıldı. Reaksiyonun şiddeti yönünden, boyanmanın olmaması 0, zayıf reaksiyon 1, orta şiddetli reaksiyon 2, şiddetli reaksiyon 3 olarak değerlendirildi.

Reaksiyonun dokudaki dağılımına göre aşağıdaki skorlama yapıldı:

Reaksiyonun olmaması = 0

<% 1= 1

% 2-10= 2

% 11-30= 3

% 31-65= 4

% >65= 5

Reaksiyonun şiddeti ve dağılımından elde edilen skor değerleri toplanarak immunohistokimyasal boyama skor değeri elde edildi (120).

2.7. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler için 'SPSS 13.0 istatistik paket programı' kullanıldı. İzole organ banyosu değerlendirmelerinde gruplar arasında fark olup

olmadığının belirlenmesinde, dokularda cGMP'ye bağımlı PKG değerlendirilmesinde ve immunohistokimyasal değerlendirme sonucu elde edilen verilerin önem gösterip göstermediğinin belirlenmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi, farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için ise Tukey testi yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Spontan Kasılmaların Şiddeti ve Frekansı

Gruplarda 18'inci saat sonunda uterus düz kaslarında görülen spontan kasılmaların şiddeti (amplitüt) ve sıklığı (frekans) Tablo 3.1'de gösterildi. Myometriyum kasılım şiddeti bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi ($p<0.001$). Kasılım şiddetinin 17 β -östradiol dozundaki artışa bağlı bir şekilde rakamsal olarak arttığı, 100 μ g 17 β -östradiol grubunda görülen artışın kontrol ve 25 μ g 17 β -östradiol gruplarındaki artışa göre istatistiki olarak fazla olduğu belirlendi.

Kasılım sıklığı bakımından 25 μ g 17 β -östradiol ve 50 μ g 17 β -östradiol grupları arasında fark bulunmazken, uygulanan 17 β -östradiol miktarına bağlı olarak tüm gruplarda kasılım sıklığının kontrol grubuna göre azaldığı ($p<0.001$) görüldü (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Gruplarda 18'inci saat sonunda spontan myometriyal kasılmaların şiddeti (amplitüt) ve sıklığı (frekans).

	Kontrol (OV)	25 μ g 17 β - östradiol	50 μ g 17 β - östradiol	100 μ g 17 β - östradiol	P
Kasılım şiddeti (g)	0,95 \pm 0,04 ^c	1,06 \pm 0,04 ^{bc}	1,18 \pm 0,03 ^{ab}	1,26 \pm 0,03 ^a	0,000*
Kasılım sıklığı (adet/dk)	1,71 \pm 0,08 ^a	1,50 \pm 0,03 ^b	1,36 \pm 0,03 ^{bc}	1,28 \pm 0,05 ^c	0,000*

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): $p<0.001$

Gruplarda 90'inci saat sonunda uterus düz kaslarında görülen spontan kasılmaların şiddeti ve sıklığı Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Myometriyum kasılım şiddeti bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi ($p<0.001$). Kasılımın şiddeti en düşük Ov grubunda gözlenirken, en kuvvetli 50 μ g 17 β -östradiol ve 100 μ g 17 β -östradiol grubunda oluştu.

Myometriyal kasılmalar en sık olarak Ov grubunda gözlenirken, 17 β -östradiol uygulanan gruplarda kasılım sıklığının Ov grubuna göre azaldığı ($p<0.001$) görüldü (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Gruplarda 90'nci saat sonunda spontan myometriyal kasılmaların şiddeti (amplitüt) ve sıklığı (frekans).

	Kontrol (OV)	25 µg 17β- östradiol	50 µg 17β- östradiol	100 µg 17β- östradiol	p
Kasılım şiddeti (g)	0,87±0,04 ^c	1,02±0,04 ^b	1,28±0,04 ^a	1,32±0,05 ^a	0,000*
Kasılım sıklığı (adet/dk)	1,66±0,07 ^a	1,36±0,04 ^b	1,21±0,04 ^{bc}	1,07±0,06 ^c	0,000*

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiki olarak fark bulunmuştur. (*): p<0.001

Benzer şekilde 162'nci saat sonunda da gruplar arasında spontan myometriyum kasılım şiddeti bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenirken (p<0.001), en yüksek kasılım şiddetinin 50 µg 17β-östradiol ve 100 µg 17β-östradiol grubunda olduğu belirlendi (Tablo 3.3).

Myometriyum kasılım sıklığı bakımından 162'nci saatte gruplar arasında fark belirlenirken (p<0.001), kasılımın sıklığının 17β-östradiol uygulamasına bağlı olarak azaldığı ve en sık kasılımın Ov grubunda olduğu belirlendi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Gruplarda 162'nci saat sonunda spontan myometriyal kasılmaların şiddeti (amplitüt) ve sıklığı (frekans).

	Kontrol (OV)	25 µg 17β- östradiol	50 µg 17β- östradiol	100 µg 17β- östradiol	P
Kasılım şiddeti (g)	0,82±0,04 ^c	1,16±0,05 ^b	1,45±0,05 ^a	1,48±0,04 ^a	0,000*
Kasılım sıklığı (adet / dk)	1,79±0,07 ^a	1,13±0,04 ^b	0,98±0,06 ^b	0,77±0,04 ^c	0,000*

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiki olarak fark bulunmuştur. (*): p<0.001

3.2. L-Arginin Uygulamasının Kasılım Şiddetine Etkisi

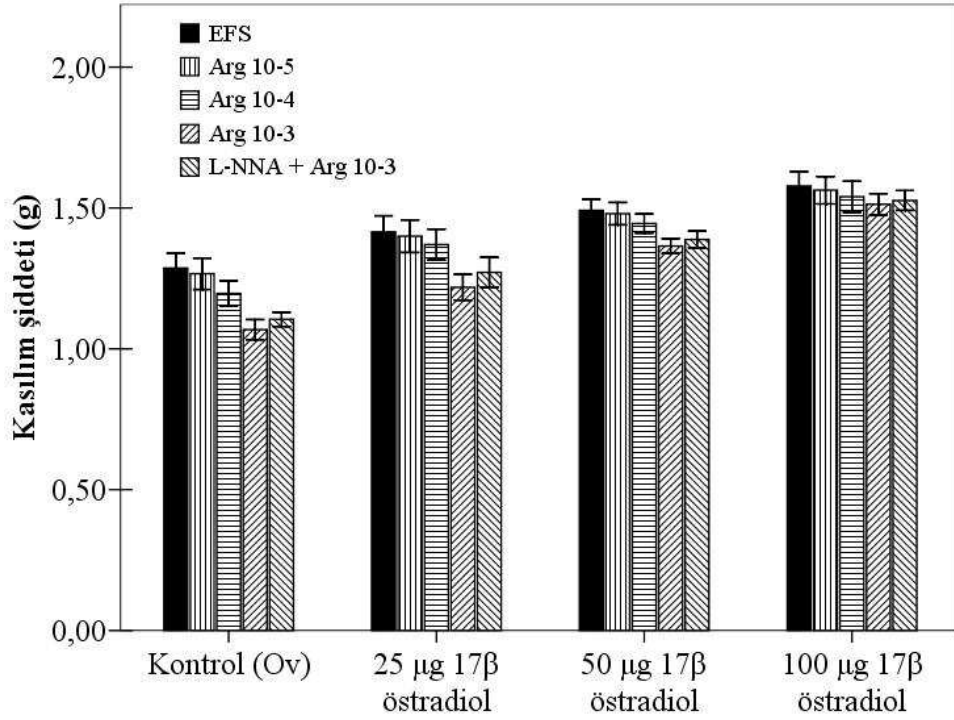
Gruplarda 18'inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) ve NNA (10^{-3} M) + L-arginin (10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri ve doz-cevap eğrisi Tablo 3.4; Grafik 3.1 gösterilmiştir. İstatistiki olarak kontrol ve 25 µg 17β-

östradiol gruplarında L-argininin dozuna bağımlı olarak kasılım şiddetinde azalma görülürken ($p<0.05$), en etkili L-arginin dozunun 10^{-3} M olduğu belirlendi. 50 μg 17β -östradiol ve 100 μg 17β -östradiol gruplarında ise L-argininin hiçbir dozunun etkili olmadığı saptandı (Tablo 3.4; Grafik 3.1). Aynı zamanda 25 μg 17β -östradiol grubunda NNA uygulamasının L-argininin (10^{-3} M) etkisini ortadan kaldırdığı belirlendi.

Tablo 3.4: Gruplarda 18'inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6).

	EFS	Arg 10^{-5}	Arg 10^{-4}	Arg 10^{-3}	NNA+Arg 10^{-3}	P
Kontrol (Ov)	1,28±0,05 ^a	1,26±0,05 ^a	1,19±0,04 ^{ab}	1,06±0,03 ^b	1,10±0,02 ^b	0,006**
25 μg 17β -östradiol	1,41±0,05 ^a	1,40±0,05 ^a	1,37±0,05 ^{ab}	1,21±0,03 ^b	1,27±0,05 ^{ab}	0,043*
50 μg 17β -östradiol	1,50±0,03	1,48±0,03	1,44±0,03	1,36±0,02	1,38±0,02	0,066
100 μg 17β -östradiol	1,57±0,07	1,56±0,04	1,54±0,05	1,51±0,03	1,52±0,03	0,854

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): $p<0.05$; (**): $p<0.01$



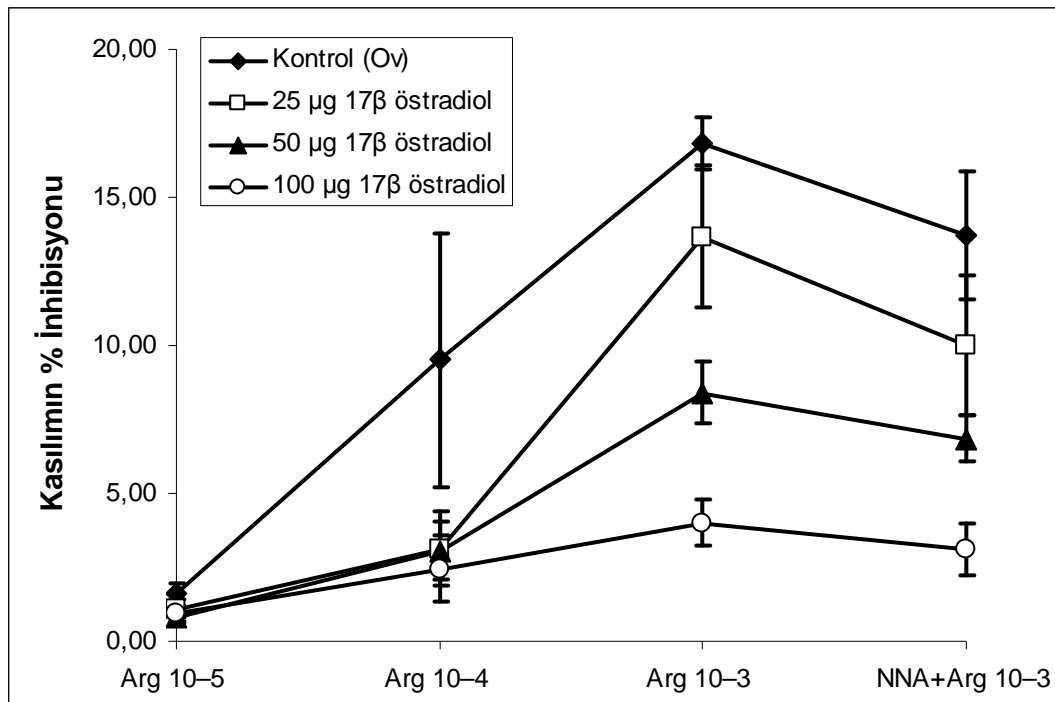
Grafik 3.1: Gruplarda 18'inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüd değerleri.

Gruplarda 18'inci saatte kasılımın % inhibisyonu Tablo 3.5 ve Grafik 3.2'de gösterilmiştir. L-argininin 10^{-3} M uygulaması sonrasında kasılımın inhibisyonunun kontrol grubunda östrojen uygulanan gruplara göre daha fazla olduğu saptandı ($p < 0.001$). Doza bağlı olarak en düşük inhibisyon en yüksek östrojen verilen grupta (100 µg 17β-östradiol) gözlemlendi. Uterus dokusuna NNA varlığında uygulanan L-argininin (10^{-3} M) kontrol ve en düşük doz östrojen grubu (25 µg 17β-östradiol) arasında fark oluşturmadığı belirlenirken, kontrol grubu ile yüksek dozlardaki östrojen grupları (50 ve 100 µg 17β-östradiol) arasında farklılık belirlendi ($p < 0,01$).

Tablo 3.5: Gruplarda 18'inci saate uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında oluşan kasılımın % inhibisyon

	Kontrol (Ov)	25 µg 17β-östradiol	50 µg 17β-östradiol	100µg 17β-östradiol	P
Arg 10^{-5}	1,60±0,35	1,07±0,37	0,79±0,20	0,94±0,15	0,263
Arg 10^{-4}	9,51±4,28 ^a	3,14±1,22 ^{ab}	3,07±0,97 ^{ab}	2,46±1,09 ^b	0,110
Arg 10^{-3}	16,83±0,88 ^a	13,68±2,38 ^b	8,39±1,05 ^c	4,00±0,78 ^d	0,000**
NNA+Arg 10^{-3}	13,73±2,18 ^a	10,00±2,39 ^{ab}	6,85±0,78 ^{bc}	3,13±0,89 ^c	0,002*

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): $p < 0.01$; (**): $p < 0.001$



Grafik 3.2: 18'inci saat sonunda gruplarda uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) ve NNA (10^{-3} M) + L-arginin (10^{-3} M) varlığında oluşan kasılımın % inhibisyon

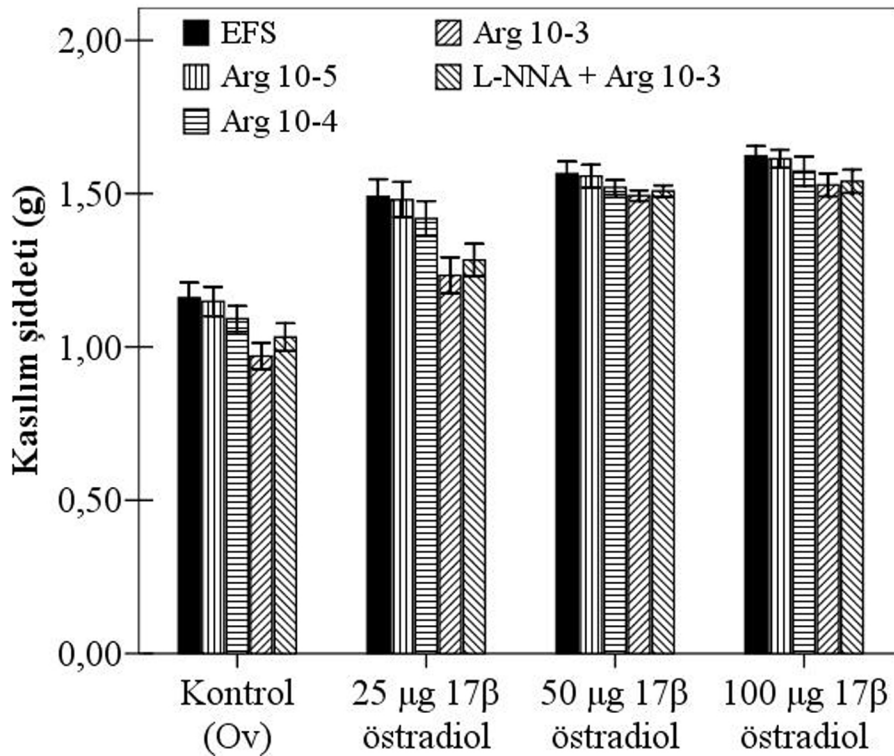
Gruplarda 90'inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) ve NNA (10^{-3} M) + L-arginin (10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasımlara ait amplitüt değerleri ve doz-cevap eğrisi Tablo 3.6 ve Grafik 3.3 de gösterilmiştir. 50 µg 17β-östradiol ve 100 µg 17β-östradiol gruplarında 90'inci saatteki L-Argininin hiçbir dozu etkili olmazken, Ov ve

25 µg 17β-östradiol (p<0.05) gruplarında L-Argininin dozuna bağımlı olarak gevşeme şekillendiği saptandı.

Tablo 3.6: Gruplarda 90'ıncı saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6).

	EFS	Arg 10^{-5}	Arg 10^{-4}	Arg 10^{-3}	NNA+Arg $^{-3}$	P
Kontrol (Ov)	1,16±0,04 ^a	1,14±0,04 ^a	1,09±0,04 ^{ab}	0,97±0,04 ^b	1,03±0,04	0,034*
25 µg 17β-östradiol	1,49±0,05 ^a	1,48±0,05 ^a	1,41±0,05 ^a	1,23±0,05 ^b	1,28±0,05	0,010**
50 µg 17β-östradiol	1,56±0,03	1,55±0,03	1,52±0,02	1,49±0,01	1,50±0,01	0,351
100 µg 17β-östradiol	1,62±0,03	1,59±0,03	1,57±0,04	1,52±0,04	1,54±0,03	0,433

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): p<0.05; (**): p<0.01



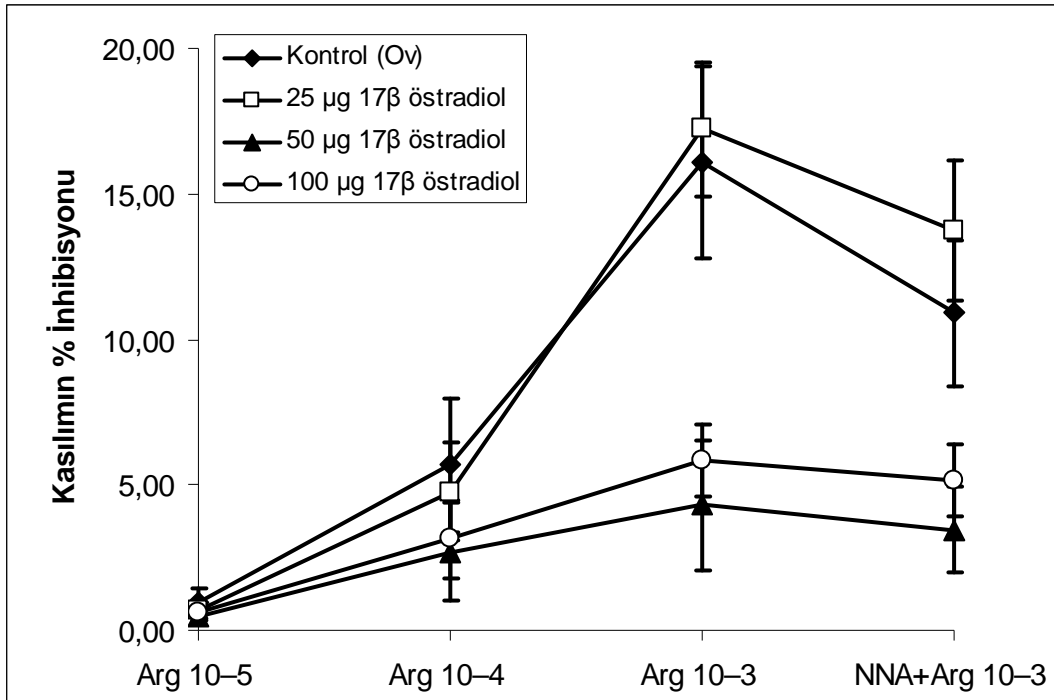
Grafik 3.3: Gruplarda 90'ıncı saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri.

Gruplarda 90'inci saat sonunda elde edilen kasılımın % inhibisyonu Tablo 3.7 ve ve Grafik 3.4'te gösterilmiştir. L-argininin en düşük iki dozunda kasılımın % inhibisyonunda gruplar arasında fark gözlenmedi. L-argininin 10^{-3} M uygulaması sonrasında ise kasılımın % inhibisyonunun Ov ve en düşük östrojen dozu olan 25 µg 17β-östradiol gruplarında diğer iki östrojen gruplarına göre (50 ve 100 µg 17β-östradiol) daha fazla olduğu saptandı ($p<0.001$). Doza bağlı olarak en düşük inhibisyon 50 ve 100 µg 17β-östradiol uygulanan gruplarda gözlemlendi.

Tablo 3.7: 90'inci saate gruplarda uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında oluşan kasılımın % inhibisyon

	Kontrol (Ov)	25 µg 17β- östradiol	50 µg 17β-östradiol	100 µg 17β-östradiol	P
Arg 10^{-5}	0,98±0,44	0,68±0,16	0,51±0,18	0,60±0,21	0,658
Arg 10^{-4}	5,68±2,32	4,77±1,68	2,70±1,67	3,15±1,35	0,623
Arg 10^{-3}	16,09±3,32 ^a	17,22±2,32 ^a	4,32±2,24 ^b	5,85±1,25 ^b	0,001**
NNA+Arg 10^{-3}	10,92±2,51 ^{ab}	13,73±2,39 ^a	3,44±1,48 ^{bc}	5,14±1,25 ^b	0,005*

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): $p<0.01$; (**): $p<0.001$



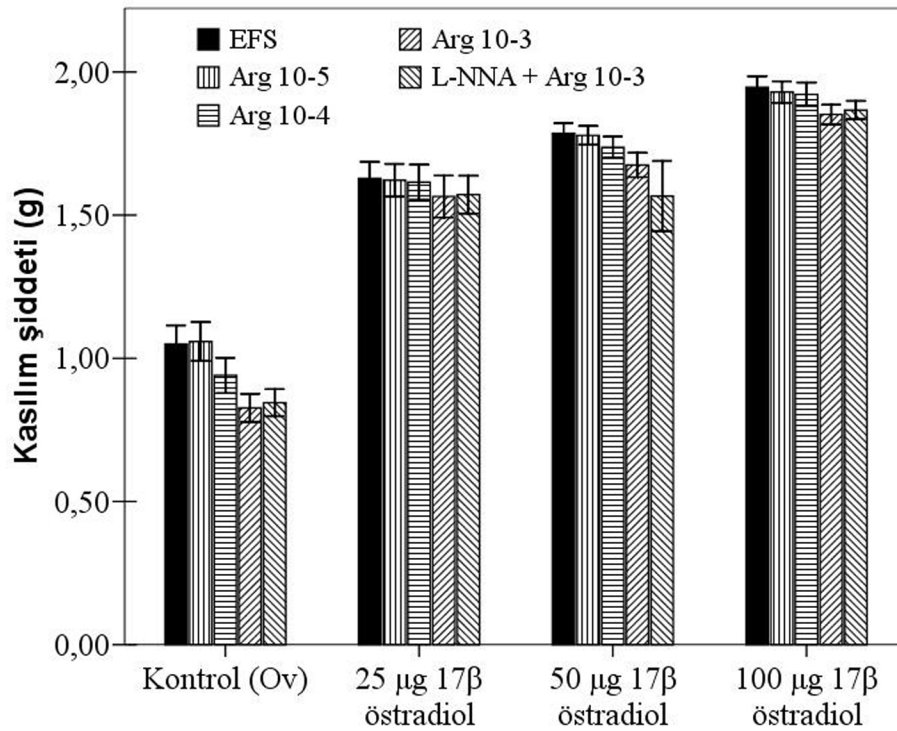
Grafik 3.4: 90'inci saatte gruplarda uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) ve NNA (10^{-3} M) + L-arginin (10^{-3} M) varlığında oluşan kasılımın % inhibisyonu.

Gruplarda 162'nci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) ve NNA (10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri ve doz-cevap eğrisi Tablo 3.8 ve grafik 3.5'te gösterilmiştir. 25, 50 ve 100 µg 17β-östradiol gruplarında L-Argininin tüm dozları etkisiz olurken, yalnız Ov grubunda L-Arginin dozuna bağımlı olarak gevşeme şekillenmiştir ($p < 0.05$). Ov grubundaki en etkili L-Arginin dozunun 10^{-3} M olduğu belirlendi.

Tablo 3.8: Gruplarda 162'nci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6).

	EFS	Arg 10^{-5}	Arg 10^{-4}	Arg 10^{-3}	NNA+Arg 10^{-3}	P
Kontrol (Ov)	1,05±0,05 ^a	1,05±0,06 ^a	0,94±0,06 ^{ab}	0,82±0,04 ^b	0,84±0,04 ^b	0,022*
25µg 17β-östradiol	1,63±0,05	1,62±0,05	1,61±0,06	1,56±0,07	1,57±0,06	0,924
50µg 17β-östradiol	1,78±0,03	1,77±0,03	1,73±0,03	1,67±0,04	1,56±0,12	0,125
100µg 17β-östradiol	1,94±0,03	1,93±0,03	1,92±0,04	1,70±0,14	1,86±0,03	0,139

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): p<0.05



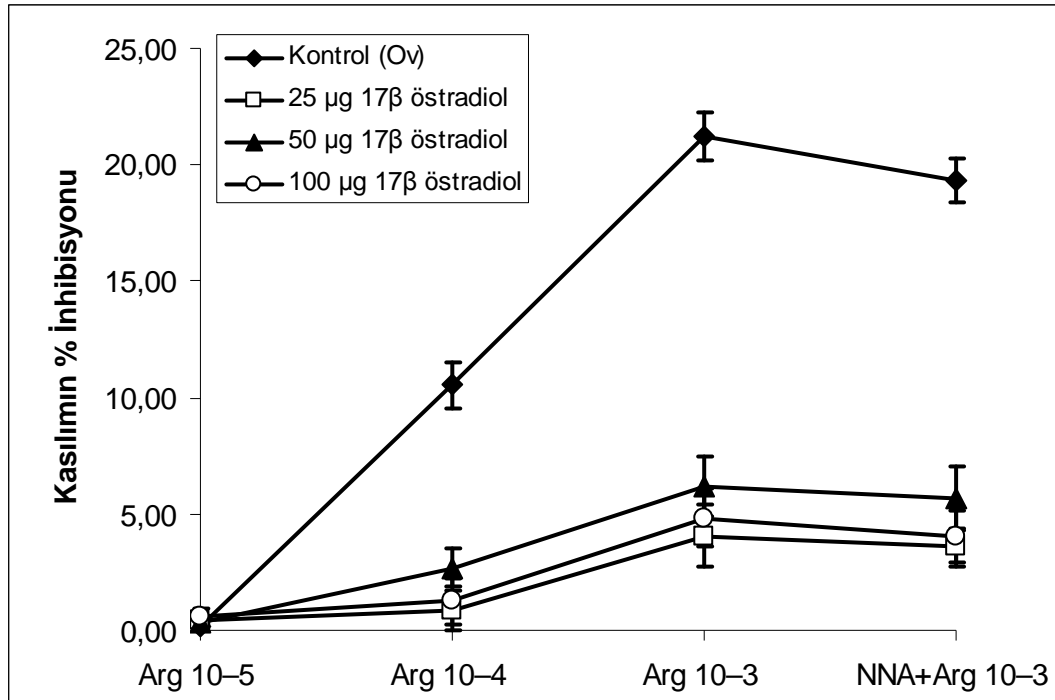
Grafik 3.5: Gruplarda 162'nci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri

Gruplarda 162'nci saat sonunda elde edilen kasılmanın % inhibisyonu Tablo 3.9 ve Grafik 3.6'da gösterilmiştir. L-argininin en düşük dozunda (10^{-5} M) kasılmanın % inhibisyonunda gruplar arasında fark gözlenmedi. L-argininin diğer dozlarında ve NNA varlığında kasılmanın % inhibisyonunun Ov grubunda östrojen uygulanan diğer gruplara göre daha fazla olduğu saptandı ($p<0.001$). Doza bağlı olarak 162'nci saat sonunda en yüksek inhibisyon Ov grubunda gözlenirken östrojen uygulanan gruplar arasında (25, 50 ve 100 μg 17 β -östradiol) % inhibisyon değerleri arasında fark bulunmadı (Tablo 3.9; Grafik 3.6).

Tablo 3.9: 162'nci saate gruplarda uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında oluşan kasılmanın % inhibisyon

	Kontrol (Ov)	25 μg 17 β - östradiol	50 μg 17 β - östradiol	100 μg 17 β - östradiol	P
Arg 10^{-5}	0,21 \pm 0,49	0,40 \pm 0,13 ^b	0,35 \pm 0,26 ^b	0,64 \pm 0,27 ^b	0,217
Arg 10^{-4}	10,54 \pm 1,01 ^a	0,84 \pm 0,87 ^b	2,70 \pm 0,85 ^b	1,27 \pm 0,98 ^b	0,000*
Arg 10^{-3}	21,19 \pm 1,03 ^a	4,07 \pm 1,30 ^b	6,17 \pm 1,28 ^b	4,82 \pm 1,24 ^b	0,000*
NNA+Arg 10^{-3}	19,33 \pm 0,92 ^a	3,58 \pm 0,83 ^b	5,67 \pm 1,39 ^b	4,04 \pm 1,14 ^b	0,000*

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): $p<0.001$



Grafik 3.6: Gruplarda 162'nci saate uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) ve NNA (10^{-3} M) + L-arginin (10^{-3} M) varlığında oluşan kasılımın % inhibisyonu

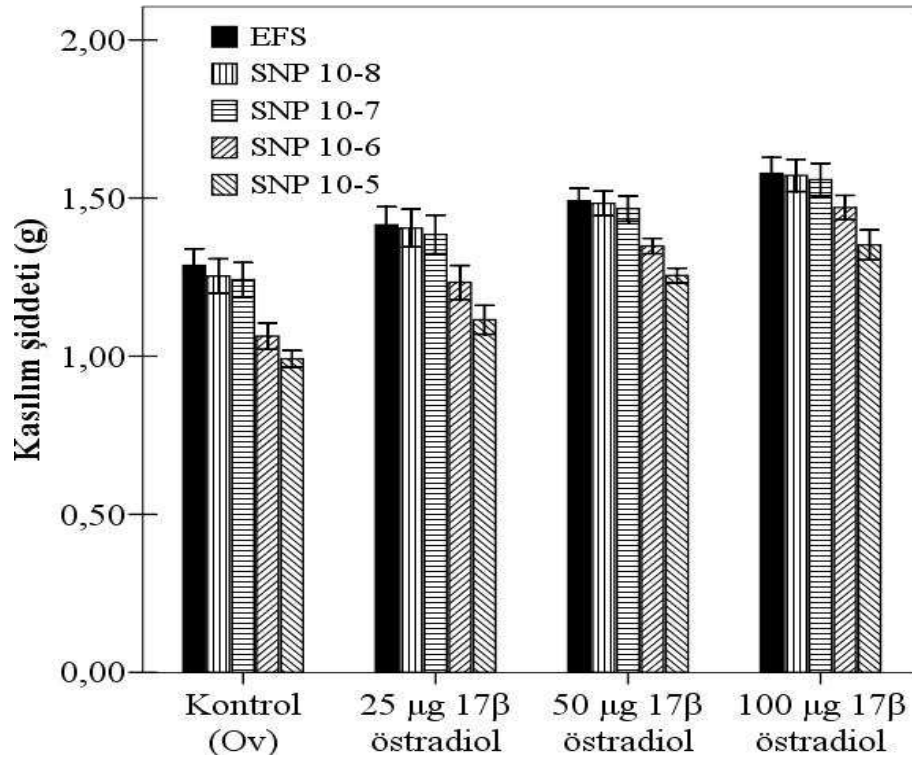
3.3. SNP Uygulamasının Kasılım Şiddetine Etkisi

Uterus düz kası üzerine 18'inci saate çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri ve doz-cevap eğrisi Tablo 3.10 ve grafik 3.7'de gösterilmiştir. Tüm gruplarda 18 saat sonunda SNP'nin en düşük iki dozu etkili olmazken, SNP'nin en yüksek dozlarında doza bağımlı olarak gevşeme şekillendiği saptandı.

Tablo 3.10: Gruplarda 18'inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6).

	EFS	SNP 10^{-8}	SNP 10^{-7}	SNP 10^{-6}	SNP 10^{-5}	P
Kontrol (Ov)	1,28±0,05 ^a	1,25±0,05 ^a	1,24±0,05 ^a	1,06±0,04 ^b	0,99±0,02 ^b	0,000***
25 µg 17β-östradiol	1,41±0,05 ^a	1,40±0,05 ^a	1,38±0,06 ^{ab}	1,23±0,05 ^{bc}	1,11±0,04 ^c	0,002**
50 µg 17β-östradiol	1,49±0,03 ^a	1,48±0,03 ^a	1,46±0,03 ^a	1,34±0,02 ^b	1,25±0,02 ^b	0,000***
100 µg 17β-östradiol	1,50±0,05 ^a	1,57±0,05 ^a	1,55±0,05 ^a	1,47±0,03 ^{ab}	1,35±0,04 ^b	0,011*

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): $p<0.05$; (**): $p<0.01$; (***) : $p<0.001$



Grafik 3.7: Gruplarda 18'inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri

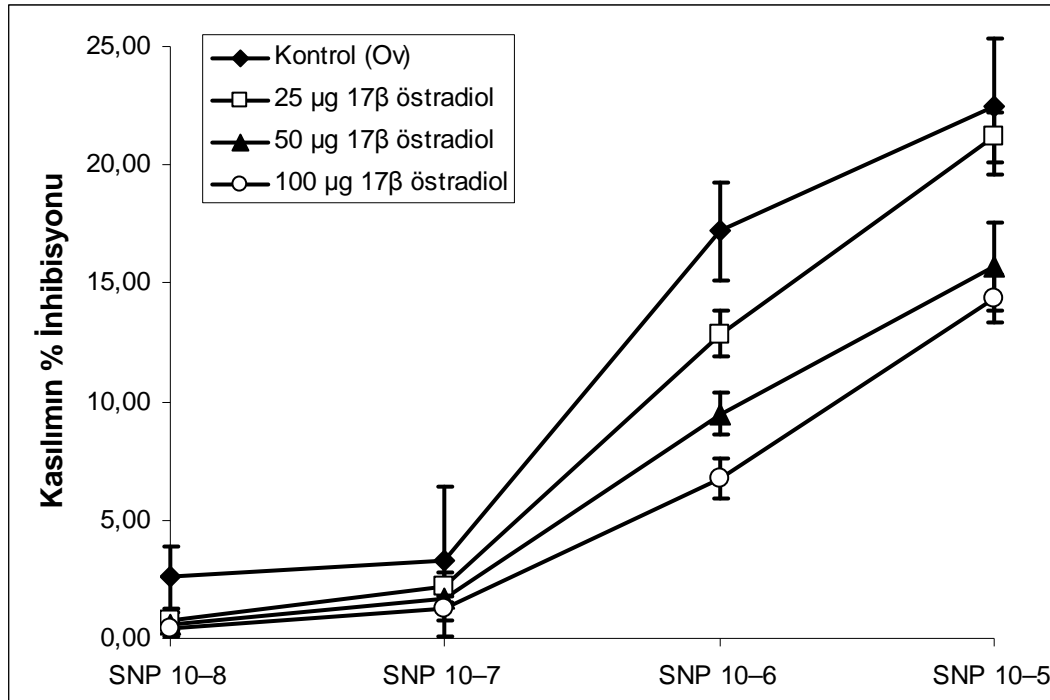
Uterus düz kası üzerine 18'inci saatte çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) uygulaması sonrasında görülen kasılımın % inhibisyon

değerleri Tablo 3.11 ve Grafik 3.8’de gösterilmiştir. Gruplar arasında yapılan değerlendirme sonucunda SNP’nin en düşük dozunda kasılım şiddetinin gruplar arasında fark oluşturmadığı gözlemlendi. SNP’nin en yüksek iki dozunda (10^{-6} ve 10^{-5} M) ise kontrol ve 25 μ g 17 β -östradiol grubunda 50 ve 100 μ g 17 β -östradiol gruplarına göre kasılım şiddetini daha fazla engellediği belirlendi.

Tablo 3.11: Gruplarda 18’inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımın % inhibisyonu.

	Kontrol (Ov)	25 μ g 17 β -östradiol	50 μ g 17 β -östradiol	100 μ g 17 β -östradiol	P
SNP 10^{-8}	2,58 \pm 1,33	0,74 \pm 0,33	0,55 \pm 0,19	0,43 \pm 0,31	0,144
SNP 10^{-7}	3,29 \pm 3,17	2,18 \pm 0,64	1,69 \pm 0,17	1,27 \pm 0,54	0,838
SNP 10^{-6}	17,21 \pm 2,06 ^a	12,87 \pm 0,97 ^b	9,50 \pm 0,91 ^{bc}	6,76 \pm 0,83 ^c	0,000**
SNP 10^{-5}	22,48 \pm 2,86 ^a	21,16 \pm 1,04 ^{ab}	15,69 \pm 1,87 ^{bc}	14,37 \pm 1,00 ^c	0,013*

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): p<0.05; (**): p<0.001



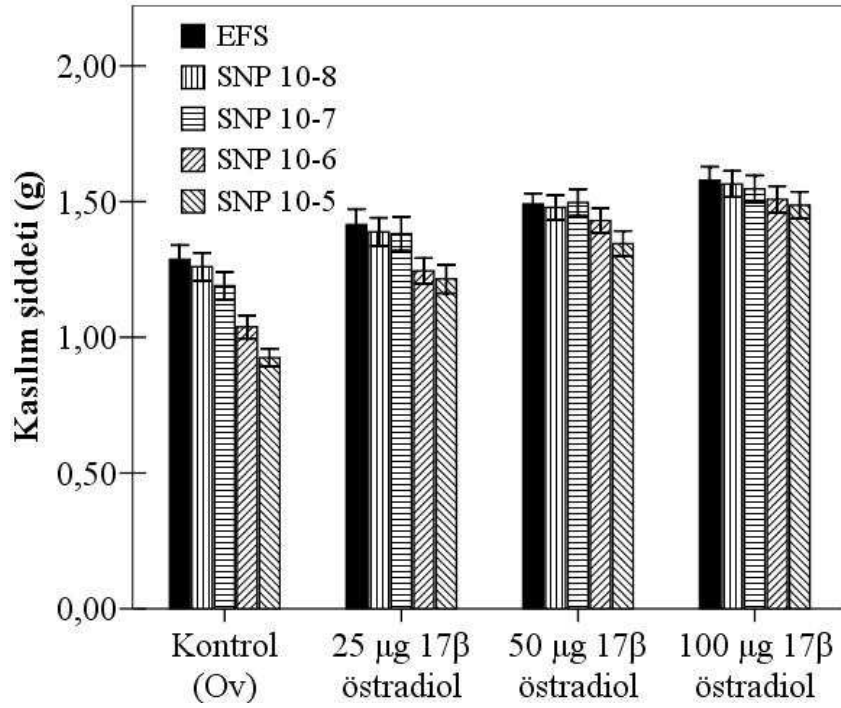
Grafik 3.8: Gruplarda 18’inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımın % inhibisyonu

Myometriyum düz kası üzerine 90'inci saatte çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri ve doz-cevap eğrisi Tablo 3.12 ve Grafik 3.9'da gösterilmiştir. Kontrol grubunda 90'inci saat sonunda SNP'nin en yüksek iki dozunda gevşeme gözlenirken 25 μ g 17 β -östradiol dozunda sadece SNP'nin en yüksek dozu olan 10^{-5} M düzeyinde gevşeme görüldü. 50 ve 100 μ g 17 β -östradiol gruplarında ise 90'inci saat sonunda SNP'nin en yüksek dozlarında bile doza bağımlı olarak herhangi bir gevşemeye rastlanmadı.

Tablo 3.12: Gruplarda 90'inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6).

	EFS	SNP 10^{-8}	SNP 10^{-7}	SNP 10^{-6}	SNP 10^{-5}	P
Kontrol (Ov)	1,28 \pm 0,05 ^a	1,26 \pm 0,05 ^a	1,19 \pm 0,05 ^a	1,03 \pm 0,04 ^b	0,92 \pm 0,03 ^b	0,000**
25 μ g 17 β -östradiol	1,41 \pm 0,05 ^a	1,38 \pm 0,05 ^a	1,38 \pm 0,06 ^{ab}	1,24 \pm 0,04 ^{ab}	1,21 \pm 0,05 ^b	0,045*
50 μ g 17 β -östradiol	1,49 \pm 0,03	1,47 \pm 0,04	1,47 \pm 0,05	1,40 \pm 0,03	1,34 \pm 0,04	0,092
100 μ g 17 β -östradiol	1,57 \pm 0,05	1,56 \pm 0,04	1,54 \pm 0,04	1,50 \pm 0,04	1,48 \pm 0,04	0,656

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiki olarak fark bulunmuştur. (*): $p < 0.05$; (**): $p < 0.001$



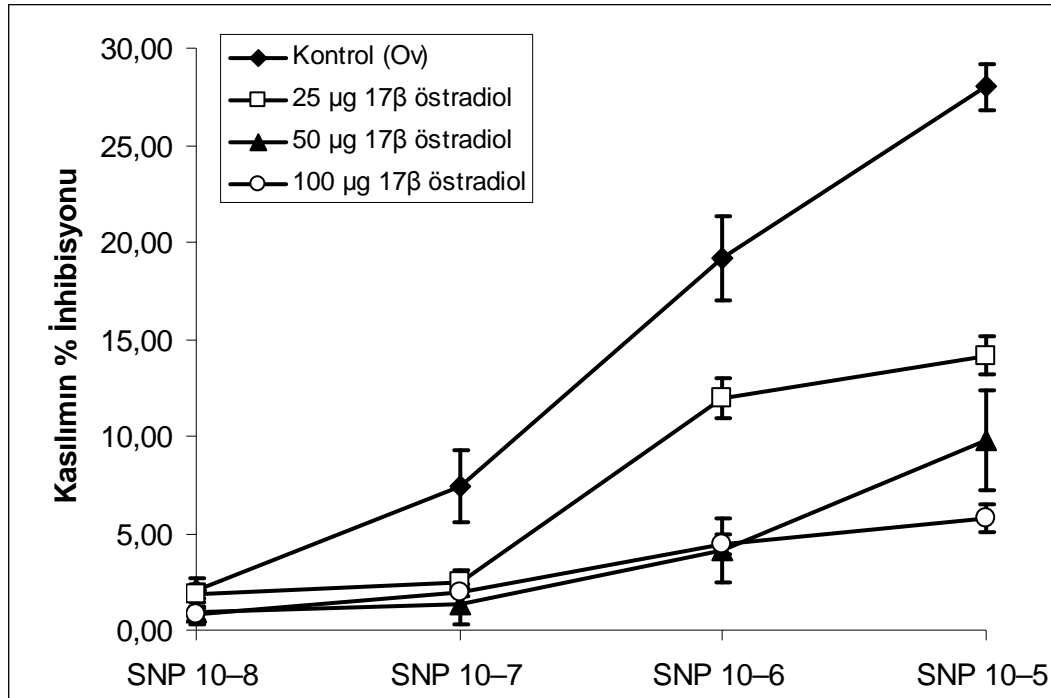
Grafik 3.9: Gruplarda 90'ıncı saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri

Uterus düz kası üzerine 90'ıncı saatte çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) uygulaması sonrasında görülen kasılımın % inhibisyon değerleri Tablo 3.13 ve Grafik 3.10'da gösterilmiştir. Gruplar arasında yapılan değerlendirme sonucunda SNP'nin en düşük dozunda kasılım şiddetinde gruplar arasında fark gözlenmedi. SNP'nin yüksek dozlarında ise Ov grubundaki kasılım şiddetinin 17β -östradiol verilen gruplara göre daha fazla engellediği belirlendi.

Tablo 3.13: Gruplarda 90'inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımin % inhibisyonu.

	Kontrol (Ov)	25 µg 17β-östradiol	50 µg 17β-östradiol	100µg 17β-östradiol	P
SNP 10^{-8}	2,06±0,60	1,81±0,53	0,94±0,68	0,82±0,30	0,314
SNP 10^{-7}	7,42±1,9 ^a	2,45±0,69 ^b	1,32±1,01 ^b	2,00±0,20 ^b	0,008*
SNP 10^{-6}	19,14±2,18 ^a	11,93±1,05 ^b	4,14±1,68 ^c	4,44±0,50 ^c	0,000**
SNP 10^{-5}	27,99±1,16 ^a	14,17 0,96 ^b	9,77±2,6 ^{bc}	5,82±0,72 ^c	0,000**

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): $p < 0.01$; (**): $p < 0.001$



Grafik 3.10: Gruplarda 90'inci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımin % inhibisyonu

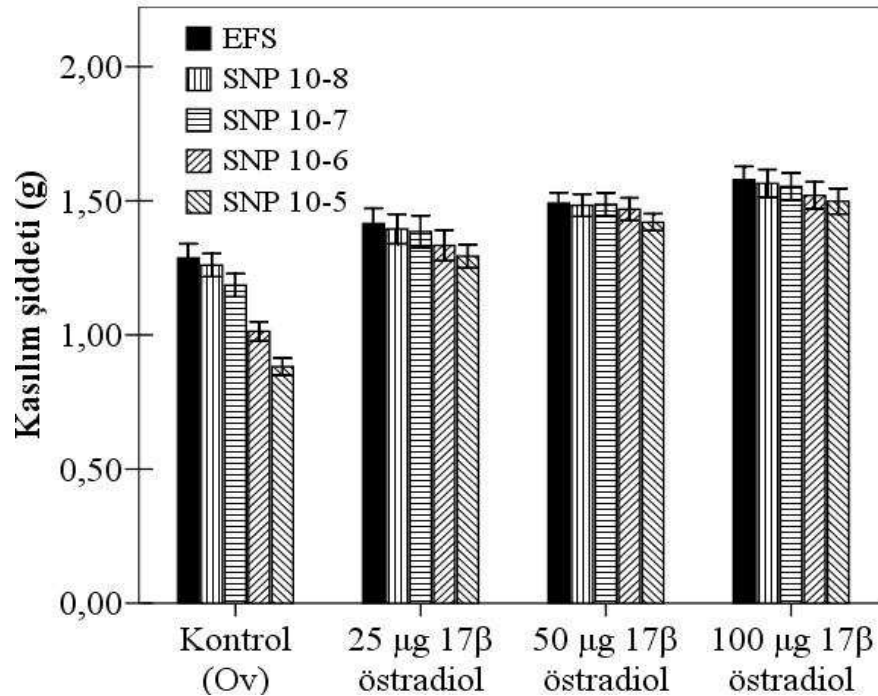
Myometriyum düz kası üzerine 162'nci saatte çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri ve doz-cevab eğrisi Tablo 3.14 ve Grafik 3.11'de gösterilmiştir. 162'nci saat sonunda sadece kontrol grubunda SNP dozuna bağımlı

olarak gevşeme şekillenirken, 17 β -östradiol verilen grupların hiç birisinde SNP'nin gevşemeye yol açmadığı gözlemlendi.

Tablo 3.14: Gruplarda 162'nci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri (n=6).

	EFS	SNP 10^{-8}	SNP 10^{-7}	SNP 10^{-6}	SNP 10^{-5}	P
Kontrol (Ov)	1,28 \pm 0,05 ^a	1,26 \pm 0,04 ^b	1,18 \pm 0,04 ^c	1,01 \pm 0,03 ^c	0,88 \pm 0,03 ^c	0,000*
25 μ g 17 β -östradiol	1,41 \pm 0,05	1,39 \pm 0,05	1,38 \pm 0,06	1,33 \pm 0,05	1,29 \pm 0,04	0,526
50 μ g 17 β -östradiol	1,49 \pm 0,03	1,48 \pm 0,04	1,48 \pm 0,04	1,46 \pm 0,04	1,42 \pm 0,03	0,707
100 μ g 17 β -östradiol	1,57 \pm 0,05	1,56 \pm 0,05	1,55 \pm 0,05	1,52 \pm 0,05	1,49 \pm 0,04	0,782

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): p<0.001



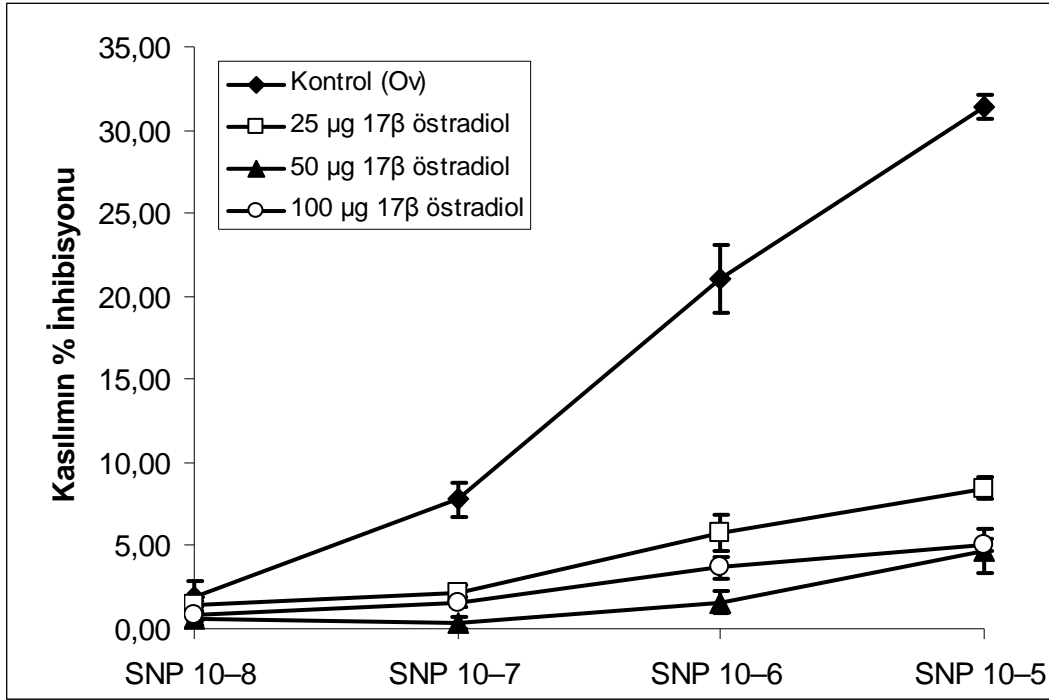
Grafik 3.11: Gruplarda 162'nci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımlara ait amplitüt değerleri

Uterus düz kası üzerine 162'nci saatte çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) uygulaması sonrasında görülen kasılımın % inhibisyon değerleri Tablo 3.15 ve Grafik 3.12'de gösterilmiştir. Gruplar arasında yapılan değerlendirme sonucunda 162'nci saat sonunda SNP'nin en düşük dozunda (10^{-8} M) kasılım şiddetinin gruplar arasında fark etmediği gözlemlendi. SNP'nin diğer dozlarında (10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M) ise Ov grubu ile 17 β -östradiol grupları arasında kasılım şiddeti yönünden fark bulundu. Yüksek SNP dozları Ov grubundaki kasılım şiddetini daha fazla engellediği belirlendi.

Tablo 3.15: Gruplarda 162'nci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılımın % inhibisyonu.

	Kontrol (Ov)	25 μ g 17 β -östradiol	50 μ g 17 β -östradiol	100 μ g 17 β -östradiol	P
SNP 10^{-8}	1,93 \pm 1,00	1,39 \pm 0,34	0,58 \pm 0,34	0,86 \pm 0,42	0,416
SNP 10^{-7}	7,78 \pm 1,04 ^a	2,17 \pm 0,44 ^b	0,37 \pm 0,37 ^b	1,59 \pm 0,30 ^b	0,000*
SNP 10^{-6}	21,03 \pm 2,04 ^a	5,78 \pm 1,07 ^b	1,59 \pm 0,65 ^c	3,71 \pm 0,25 ^{bc}	0,000*
SNP 10^{-5}	31,40 \pm 0,71 ^a	8,47 \pm 0,70 ^b	4,71 \pm 1,29 ^c	5,06 \pm 0,40 ^c	0,000*

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): $p < 0.001$



Grafik 3.12: Gruplarda 162'nci saatte uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın (20 V, 1 ms, 32 Hz) oluşturduğu kasılmanın % inhibisyonu

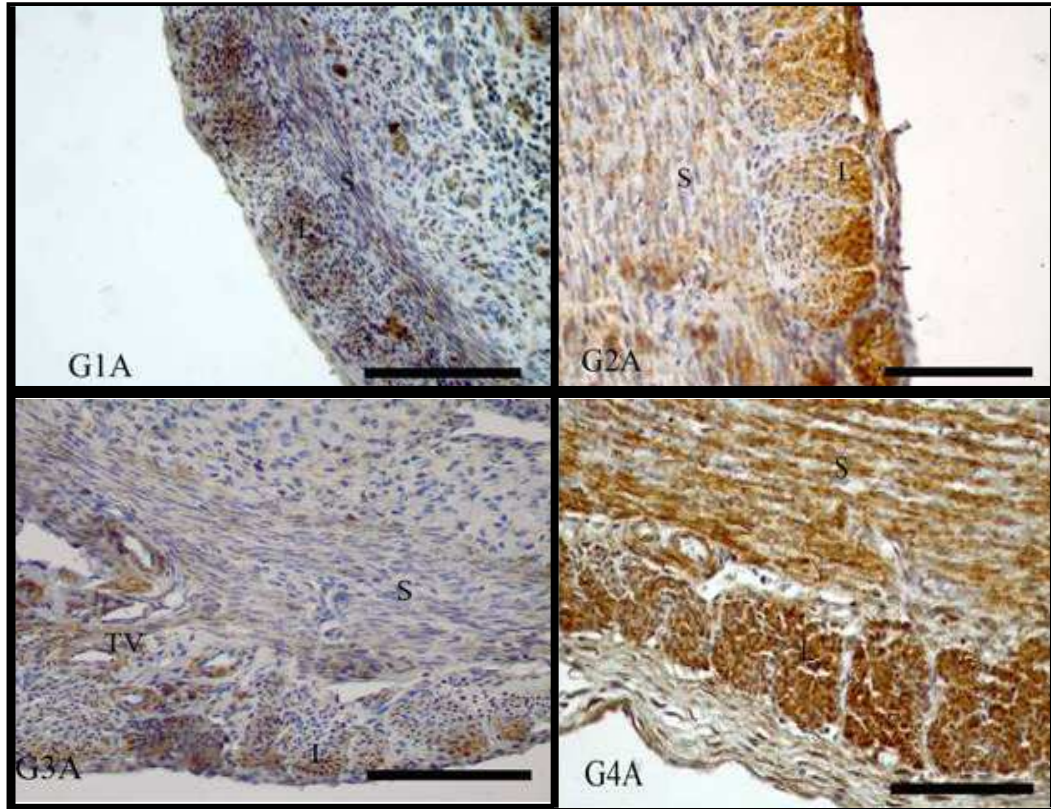
3.4. Östrojenin Doza ve Süreye Bağlı Olarak cGMP-PK1 Dağılımına Etkisi

Gruplarda 18., 90. ve 162'nci saat sonunda cGMP-PK1 immunreaksiyonunun boyama skorları sırasıyla Tablo 3.16, 3.17 ve 3.18'de gösterilmektedir. Uterustaki sirküler kaslarda 18'inci saatte cGMP-PKG boyama skoru değeri 25 ve 100 17β-östradiol gruplarında Ov grubuna göre yüksek bulundu. Sirküler kaslarda 18'inci saatteki en düşük cGMP-PK1 boyama skor değeri 50 µg 17β-östradiol grubunda gözlemlendi (Tablo 3.16).

Tablo 3. 16: Gruplarda 18'inci saatte uterus sirküler ve longitudinal kaslarında cGMP-PK1 boyama skor değeri.

	Kontrol (OV)	25 µg 17β- östradiol	50 µg 17β- östradiol	100 µg 17β- östradiol	P
Sirküler	6.50±0.12 ^b	7.41±0.08 ^a	5.25±0.55 ^c	7.75±0.11 ^a	0.00*
Longitudinal	7.33±0.10 ^a	7.41±0.08 ^a	7.00±0.44 ^a	7.75±0.11 ^a	0.21

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): p<0.001



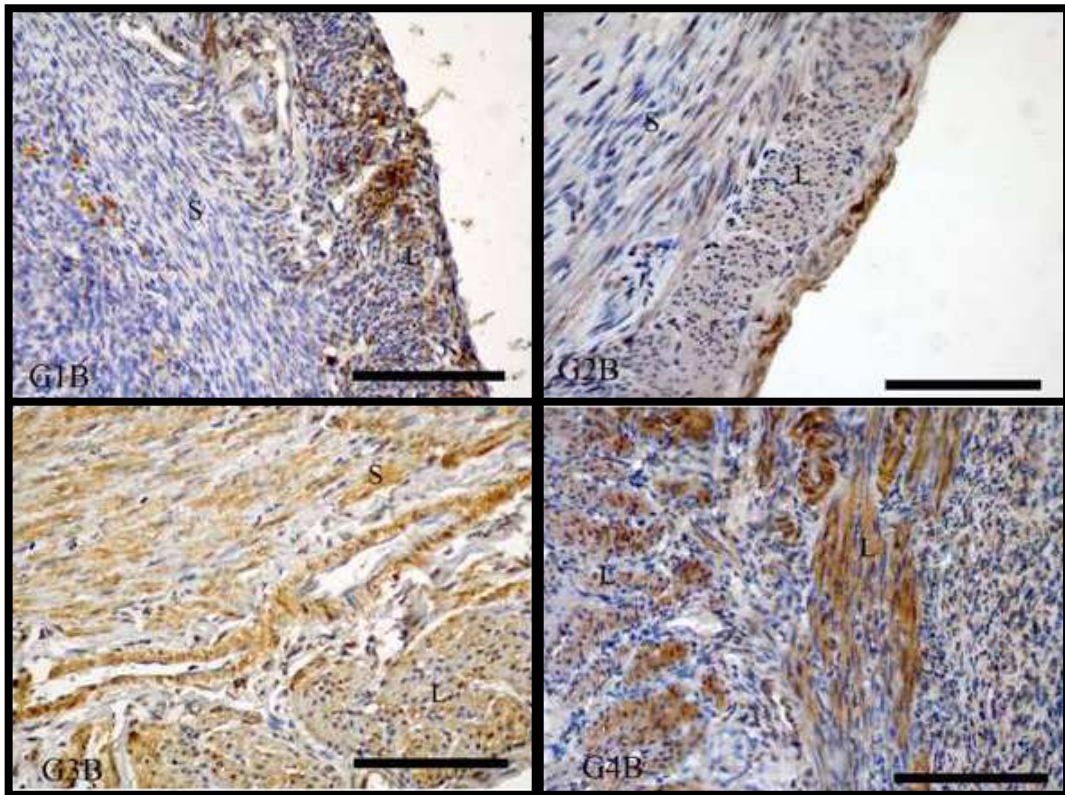
Şekil 3.1: Kontrol (G1A) ve deneme gruplarında (25 µg 17β-östradiol, G2A; 50 µg 17β-östradiol, G3A ve 100 µg 17β-östradiol G4A) 18'inci saatte uterus sirküler (S) ve longitudinal (L) kaslarında cGMP-PK1 dağılımı, bar= 100µm

Myometriyumdaki sirküler kas hücrelerindeki cGMP-PK1 boyama skoru 90'uncı saatte incelendiğinde, Ov ile 50 ve 100 µg 17β-östradiol grupları arasında fark görülmezken 25 µg 17β-östradiol grubunun 50 ve 100 µg 17β-östradiol gruplarına göre azaldığı belirlendi (Tablo 3.17; p<0.001).

Tablo 3. 17: Gruplarda 90'uncı saatte uterus sirküler ve longitudinal kaslarında cGMP-PK1 boyama skoru değeri

	Kontrol (OV)	25 µg 17β-östradiol	50 µg 17β-östradiol	100 µg 17β-östradiol	P
Sirküler	5.33±1.16 ^{ab}	3.50±0.22 ^b	6.83±0.45 ^a	7.00±0.00 ^a	0.00*
Longitudinal	6.58±0.53	6.75±0.11	7.33±0.27	6.50±0.00	0.24

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): p<0.001

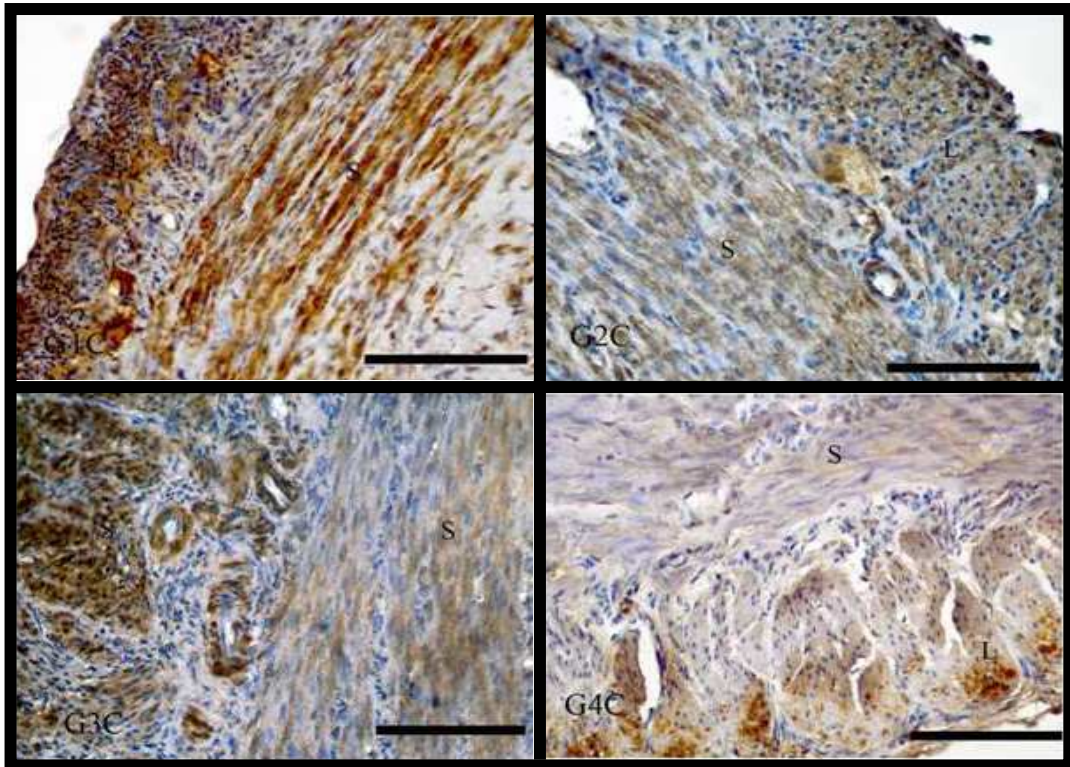


Şekil 3.2: Kontrol (G1B) ve deneme gruplarında (25 µg 17β-östradiol, G2B; 50 µg 17β-östradiol, G3B ve 100 µg 17β-östradiol G4B) 90'uncı saatte uterus sirküler (S) ve longitudinal (L) kaslarında cGMP-PK1 dağılımı, bar= 100µm

Myometriumdaki sirküler kas hücrelerinde 162'nci saat sonunda cGMP-PK1 dağılımında gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmadı (Tablo 3.18). Benzer şekilde uterusdaki longitudinal kaslarda doza ve şiddete bağlı olarak cGMP-PK1 dağılımında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 3.16, 3.17 ve 3.18).

Tablo 3. 18: Gruplarda 162'nci saatte uterus sirküler ve longitudinal kaslarında cGMP-PK1 boyama skoru değeri.

	Kontrol (OV)	25 µg 17β-östradiol	50 µg 17β-östradiol	100 µg 17β-östradiol	P
Sirküler	7.08±0.08	5.00±1.34	6.66±0.47	5.50±0.56	0.21
Longitudinal	7.08±0.08	6.00±0.89	7.25±0.11	6.16±0.73	0.34



Şekil 3.3: Kontrol (G1C) ve deneme gruplarında (25 µg 17β-östradiol, G2C; 50 µg 17β-östradiol, G3C ve 100 µg 17β-östradiol G4C) 162'nci saatte uterus sirküler (S) ve longitudinal (L) kaslarında cGMP-PK1 dağılımı, bar= 100µm

TARTIŞMA

Araştırmada ovaryum steroidlerinden 17β -östradiol'ün doza ve süreye bağlı olarak ratlarda spontan myometrial kasılımlar üzerine olan etkisi incelendi.

Myometriyal kasılımlar bir çok faktör tarafından düzenlendiği için diğer düz kaslardan farklıdır. Myometriyal kasımların etkinliği otonom sinir sisteminin yanı sıra bazı otokoidler özellikle de yerel ve cinsiyet hormonları tarafından düzenlenmektedir (121). Ovaryumdan salgılanan steroid yapıdaki hormonların uterus kasılmaları üzerine doğrudan etkileri bulunmaktadır. Kızgınlık döngüsü ve gebelik gibi fizyolojik olaylarda ovaryum steroidlerinin yoğunluğu ve myometriyal kasılımların özelliği değişmektedir (122).

Östrojen hormonu myometriyal kasılımlar için gerekli olan kontraktıl proteinlerin, düzenleyici enzimlerin ve koneksin 43 sentezlenmesini artırdığından, uterus düz kaslarında kasılmaları da şiddetlendirmektedir (122,123). Östrojen gebe ve gebe olmayan uterustaki oksitosin reseptörlerini ve α -adrenerjik ajanları artırarak membran kalsiyum kanalları üzerine etki etmektedir (124). Östradiol uygulaması sonucunda bazal kasılma düzeylerinde değişiklik meydana gelmekte ve sıçan myometriyal dokularında oksitosin ve $PGF2\alpha$ 'ne karşı duyarlılık artmaktadır (47). Benzer bir şekilde Ov sıçanlarda östrojen tedavisinin $PGF2\alpha$ mRNA düzeylerinde farklılık oluşturmadan $PGF2\alpha$ 'ya karşı duyarlılıkta artışa sebep olduğu gözlenmiştir (125). Ovaryumları çıkartılmış sıçanlarda yapılan in vitro bir çalışmada bir hafta boyunca günlük 10 μg 17β -östradiol uygulamasının uterus kasılım şiddetini artırdığı gösterilmiştir (47). Yine Ov sıçanlarda 10 gün boyunca 10 μg dozunda verilen 17β -östradiol uterustaki kasılımların şiddetini artırmıştır (118). Benzer şekilde insanlarda folliküler dönemde uterustaki kasılım şiddetinin östrojene bağlı olarak arttığı ifade edilmektedir (119,126). Bu çalışmada daha önceki bildirimlere uyumlu olarak (47,118,119,126) 18, 90 ve 162 saat boyunca 25, 50 ve 100 μg 17β -östradiol uygulanan gruplarda uterus spontan kasılımlarının şiddetinin doza ve süreye bağlı olarak arttığı belirlenmiştir ($p < 0.001$). Gruplarda 18. saatte myometriyumda kasılım şiddetinin en yüksek olduğu grup 100 μg 17β -östradiol verilen grup olurken, 90 ve 162. saatte en yüksek kasılım 50 ve 100 μg 17β -östradiol gruplarında gerçekleşmiştir.

Bu araştırmada deneme gruplarında spontan myometrial kasılım sıklığının kontrol grubuna göre önemli oranda düştüğü belirlendi ($p < 0.001$). Myometriyumdaki kasılım sıklığı uygulamanın yapıldığı tüm sreler boyunca (18, 90 ve 162. saat) en yüksek olarak kontrol grubunda bulundu. Kasılım sıklığı 162. saatte en düşük olarak 100 μg 17 β -östradiol grubunda görülürken, 18 ve 90. saatlerde 50 ve 100 μg 17 β -östradiol gruplarında kasılım sıklıkları arasında fark görülmedi. Bu sonuçlara benzer olarak menapoz sonrası kadınlarda ve Ov ratlarda yapılan çalışmada uterustaki kasılım sıklığının arttığı bildirmektedir (47). Ayrıca, sıçanlarda 10 $\mu\text{g/gün}$ 17 β -östradiol uygulaması myometriyal kasılım sıklığını Ov grubuna göre azaltmıştır (118). Araştırmacılar bu artışı Ov ratlarda artan spontan kasılım etkinliğinin ovaryum steroidlerinin genomik ve genomik olmayan baskılayıcı etkilerinin uzaklaştırılmasının myometriyal hücrelerin zarlarının elektriksel kararsızlığa neden olması sonucu olabileceğini bildirmektedir. Buna ilavaten östrojenlerin düz kaslarda hücre dışına K çıkışını uyararak hücreyi hiperpolarize edebildikleri, bu sayede spontane kasılmaların oluşumunu baskıladığını bildirilmiştir (127). Gebeliğin son dönemindeki sıçan uterus düz kaslarında östrojenin hücre içine Ca girişini engellediği (128), voltaja bağımlı Ca akımını engellediği (129), ve hem Ca hem de K kanallarını baskıladığı (130) gözlenmiştir. Bu çalışmada östrojenin doza bağlı olarak uterustaki kasılım sıklığını baskılaması daha önce açıklanan (51) mekanizmalar yoluyla oluşabileceği düşünülmüştür.

Yakın zamanda NO'in myometriyal kasılmalar üzerine baskılayıcı etkisi önem kazanmıştır. L-arjinin-NO-cGMP yolunun varlığı sıçan (93,131), kobay (132), tavşan (133) ve insan uterusunda (94) gözlenmiştir. Real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile yapılan araştırmalarda NOS izoformlarına ftal membranlarda ve desiduada rastlanmıştır. İnsan myometriyumundaki iNOS mRNA'sına doğum öncesinde en yüksek düzeylerde rastlanırken, doğumda ise en düşük düzeylerde olduğu belirtilmiştir (132). Benzer şekilde gebelikte salgılanan steroid hormonların kandaki miktarları da gebeliğin dönemine göre değişiklik göstermektedir. Sıçanlarda gebelik başlangıcında düşük olan östradiol miktarları, gebeliğin ilerlemesi ile artış göstermekte ve gebeliğin en son döneminde (19-21 gün arası) en yüksek seviyelerine ulaşmaktadır. Plazma stron miktarları da gebeliğin 5. gününden itibaren artış göstermekte ve bu artış linear olarak gebeliğin 21. gününe

kadar devam etmektedir. Gebeliğin başında korpus luteumdan daha sonra ise plasentadan salgılanan progesteronun kandaki seviyeleri özellikle gebeliğin 5. gününden başlayarak artmakta ve gebeliğin 19. gününde bu artış %65 düzeylerine kadar çıkmaktadır. Gebeliğin 21. gününde ise bu hormonun seviyelerinde düşüş meydana gelmektedir (133). Nitrik oksit sistemi ise gebelik sırasında daha aktif hale geçmekte (93,134) ve doğuma kadar uterus kasılmalarını durdurmaktadır. Ayrıca sıçanlarda desidua ve myometriyumdaki NOS aktivitesi gebelikte yüksek düzeyde bulunurken, doğumla birlikte bu aktivitede azalma görülmektedir. Azalan NOS aktivitesinin NO miktarında düşüğe sebep olarak doğum esnasında kasılmaların artmasına yol açtığı düşünülmektedir (132).

Nitrik oksit endojen olarak L-argininden NOS enzimleri aracılığı ile oluşmaktadır (135,136). Bir NO prekürsörü olan L-arginin uygulamasının, insan (132) ve sıçanda (117) NO sentezini artırdığı ve myometriyal kasılmaları baskıladığı belirtilmiştir. Fizyolojik koşullarda sıçan serumundaki L-arginin yoğunluğu yaklaşık 0,2 – 3 mM civarındadır (137). İn vitro ortamdaki düz kasların kasılım etkinliği ise L-Argininin yaklaşık 0.01–1mM yoğunluğunda tamamen ortadan kalkmaktadır (92). Bu araştırmada L-arginin 0.01 – 1mM yoğunluğunda kullanılmıştır. Gebe insan ve sıçan uterusunda (134) ve gebe olmayan insan uterusunda (138) L-argininin doza bağımlı olarak kasılım şiddetini azalttığı bildirilmektedir (117). L-arginin gevşetici etkisinin uterusda doğum anında azaldığı, doğum sonrası 2. günde ise tamamen ortadan kalktığı ifade edilmektedir (92). Ovaryumları çıkartılmış sıçanlarda L-Arginin uygulaması uterus kaslarında gevşemeye yol açarken, L-Arginin uygulaması 10 gün süre ile 10 µg/gün 17β-östradiol verilen sıçanlarda uterus kası üzerine aynı etkiye yol açmamıştır (131). Önceki çalışmalara benzer şekilde yaptığımız bu çalışmada da Ov grubunda L-argininin doza bağımlı olarak uterus kasılım şiddetini azalttığı (p<0.05), 50 ve 100 µg 17β-östradiol gruplarında ise L-argininin dozlarının etkili olmadığı belirlenmiştir. Düşük dozda östrojen uygulanan 25 µg 17β-östradiol grubunda ise L-Argininin gevşetici etkisi 18 ve 90. saatlerde gözlenirken, gevşetici etkinin 162. saatte kaybolduğu görülmüştür. Yine gruplarda 18, 90 ve 162. saatlerde 10^{-3} M dozundaki L-argininin uygulamasının kasılımın % inhibisyonu üzerine etkisi Ov grubunda yüksekken, bu etki yüksek dozda 17β-östradiol uygulaması (50 ve 100 µg 17β-östradiol) ile azalmıştır. Ayrıca, 162. saatte L-argininin kasılımları azaltıcı

etkisi tüm östrojen uygulanan gruplarda baskılanmıştır. Bulgularımız L-argininin uterusu oluşturduğu kasılım şiddetini azaltıcı etkisini östrojenin doza ve süreye bağımlı olarak engellediğini düşündürmektedir.

Gebe rat (92), ve gebe olmayan insan uterusunda (138) yapılan çalışmalarda eksojen NO kaynaklarından biri olan SNP'nin spontan kasılımları tamamen bloke ettiği bildirilmektedir. Benzer şekilde gebelikte SNP'nin spontan myometriyum kasılımlarını tamamen ortadan kaldırdığını fakat KCl ile uyarılmış kasılımlarda etkisi olmadığını ifade etmektedir (133). Oksitosinle uyarılmış uterus kasılımları üzerine SNP'nin 10^{-4} M ve daha düşük dozlarının etkili olmadığı, daha yüksek dozlarının ise toksik etki göstererek dönüşümsüz inhibisyon oluşturduğunu bildirilmektedir (139). Ayrıca SNP uygulamasının Ov sıçanlarda uterusu gevşemeye yol açtığı, fakat bu etkinin 10 gün boyunca 10 µg dozunda 17β-östradiol verilen sıçanlarda ortadan kalktığı gözlenmiştir (117). Yaptığımız bu araştırmada, Ov grubunda 10^{-8} - 10^{-5} M aralığında uygulanan SNP'nin doza bağımlı olarak kasılım şiddetini engellediği, 17β-östradiol verilen gruplarda ise dozun ve sürenin artması ile birlikte SNP'nin etkisinin olmadığı görülmüştür. Argininin gruplardaki etkisine benzer olarak, SNP'nin östrojen gruplarında kasılım şiddetini azaltmaması, 17β-östradiolün SNP'nin uterusu oluşturduğu gevşeme etkisini engellediğini düşündürmektedir. Sodyum nitroprussid uygulamasının uterus düz kasında görülen kasılımın % inhibisyonu üzerine etkisi 17β-östradiolün uygulanma dozuna ve süresine göre değişiklik göstermiştir. Tüm sürelerde en yüksek 17β-östradiol uygulanan grupta SNP'nin kasılımın % inhibisyonu üzerine etkisi minimum olarak gözlenirken, Ov grubunda ise % inhibisyon en yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Genel olarak 17β-östradiol uygulaması SNP'nin etkisini baskımlarken, 18. saatte en düşük 17β-östradiol uygulanan grup ile Ov grubu arasında benzer bir inhibisyona rastlanmıştır. Bulgularımız SNP'nin uterusu oluşturduğu % kasılım inhibisyonunun östrojenin dozuna ve uygulama süresine bağımlı olduğunu düşündürmektedir.

Bir siklik nükleotid ikincil haberci olan cGMP vücudumuzdaki bir çok dokuda çok farklı olayların oluşmasında rol oynamaktadır. Bu olaylardan bir tanesi de düz kaslarda NO etkisiyle gevşeme sağlamasıdır. Uterusta NO sentezlendiği belirtilmiştir (94). Nanomolar düzeydeki NO konsantrasyonları guanilil siklazı aktifleyerek cGMP düzeylerini artırmaktadır. Nitrik oksit-cGMP yolunun

aktiflenmesi ise bir çok düz kas tipinde gevşemeyle sonuçlanmaktadır. Nitrik oksit-cGMP yolu bu etkisini cGMP-PK1 üzerinden miyozin fosfataz aktivitesini artırarak (140) veya sitoplazmik Ca^{+2} miktarını azaltarak gerçekleştirmektedir (141). Düz kas gevşemesi kalsiyum regülasyonu ve iyon transportundan sorumlu olan substratların fosforlanması neticesinde oluşmaktadır (142). İnsanda NO-cGMP yolunun varlığı uterus düz kaslarında da tespit edilmiştir ve gebelikte oluşabilecek uterus kasılmalarını azaltmak için de farmakolojik olarak kullanılmaktadır (94). Östrojen enjekte edilen ratlarda cGMP'nin yüksek PK1 düzeylerinde uterus kasında gevşemeye yol açtığından (143), NO-cGMP yolunun uterus kasılabilirliğini kontrol etmede önemli olabileceği düşünülmektedir (141).

Bu araştırmada Ov sıçanların endometriyumdaki sirküler ve longitudinal kas hücrelerinde zayıf bir cGMP-PK1 ekspresyonu belirlendi. Özellikle endometriumun longitudinal kaslarında çeşitli doz ve sürelerde uygulanan 17β -östradiol hormonunun cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine etkisi minimum olarak bulundu. Sirküler kaslarda ise 18'inci ve 90'uncü saatlerde cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine 17β -östradiolün doza bağımsız bir etkisi görüldü. Bu etki 162'ncü saatte tamamen ortadan kalktı. Yukarıda açıklandığı gibi NO tarafından uyarılan myometriyal gevşemenin başka düz kas hücrelerinde olduğu gibi guanilil siklaz ve cGMP üzerinden olduğu düşünülse de (93,94), değişik çalışmalarda NO'nun uterus gevşemeyi uyarabilmesi için cGMP ve PK1'nin gerekli olmadığını belirtilmektedir (144,145). Kobay uterus düz kaslarında yapılan çalışmada NO'in guanilil siklazı inhibe eden metilen mavisi uygulamasına rağmen uterus kaslarında gevşemeye yol açtığı belirtilmiştir (144). Buna ilaveten uterus düz kasında herhangi bir gevşeme oluşturabilmek için yüksek düzeylerde ($10\mu M$) cGMP analoglarına ihtiyaç duyulmaktadır (146). Maymun ve insan myometriyumunda NO tarafından oluşturulan uterus gevşemesinin cGMP analogları tarafından oluşturulmadığı, guanilil siklaz-cGMP dışındaki bir yolla gerçekleştiği gözlenmiştir (144,145). Bu çalışmalar NO'in uterus gevşemesi sağlayabilmesi için cGMP-PK1 artışına ihtiyaç duymadığını, iyon kanalları yoluyla bu etkisini gösterebileceğini düşündürmektedir (145). Bulgularımızda da uterus bulunan sirküler ve longitudinal kaslarda 17β -östradiolün tüm dozlarının ve sürelerinin cGMP-PK1 dağılımı üzerine etkisinin düşük olduğu gözlenmiştir.

Siklik GMP'nin NO tarafından gerçekleştirilen bütün olaylarda rol almadığı düşüncesi son yıllarda önem kazanmıştır. Buhimschi ve ark (147), sıçan uterusunda gebelikle birlikte NO miktarının artmasına rağmen cGMP düzeylerinde önemli bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada gebe olmayan sıçanlarda uzun süreli östrojen uygulaması uterustaki NO miktarının artmasına cGMP düzeyinin ise azalmasına sebep olduğu belirtilmiştir. Buna ilaveten, uygulanan östrojen tedavisi NO'in cGMP üzerine olan artırıcı etkisini de engellediği konusuna da değinilmiştir (147).

Daha önceki çalışmalar sıçan uterusunda NO'in uterus kasılmalarını durdurduğunu ve NO seviyelerindeki artışın da cGMP yapımını artırdığını bildirilmektedir (93,94). Bununla birlikte myometriyumdaki NO etkisinin guanilil siklazdan bağımsız olarak şekillenebilir (147). Weiner ve ark (148) kobaylarda gebeliğin guanilil siklaz seviyesini azalttığını bildirmiştir. Buhimchi ve ark (147) da prepübertal sıçanlarda östrojenin guanilil siklazın uterustaki oluşumunu baskılayabileceğini bildirmişler ve uterusta cGMP düzeylerindeki değişimlerle NO aktivitesi arasında paralellik kurmanın veya NO aktivitesindeki değişimlerle cGMP düzeylerini bağdaştırmanın yanlış sonuçlar verebileceği kanısına varmışlardır.

Damar düz kasları ile yapılan çalışmalarda damar düz kaslarından elde edilen preperatların, cGMP oluşumu bloklandığı halde, NO uygulaması neticesinde gevşediği görülmüştür (149). Bu tür olgular renal arterlerde (150), serebral mikrosirkülasyonunda (151) ve nöronal hücre iyon kanallarında da (152) rapor edilmiştir. Bu bağlamda myometriyumda NO tarafından gerçekleştirilen gevşemede kalsiyum tarafından aktiflenen potasyum kanallarının (K_{Ca}) rol alabileceği önerilmiştir (153). Bu teori K_{Ca} kanallarını bloke eden akrep toksinlerinin NO tarafından oluşturulan gevşemeyi engellemesi ile desteklenmiştir (144). Dolayısı ile kalsiyum tarafından aktiflenen potasyum kanallarının K_{Ca} kanalları NO'in myometriyumdaki etkisine aracılık eden faktörlerden olabileceği görülmektedir (154).

5. SONUÇ

Ovaryumları çıkarılmış 3 aylık 72 sıçanda östrojen hormonunun doza ve süreye bağlı olarak uterus kasılmaları ve cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanan bu çalışmada östrojen uygulanan gruplarda uterus spontan kasılmalarının şiddetinin doza ve süreye bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, sıçanlarda L-arginin-NOS-NO yolunun uterus kasılım etkinliğini azalttığı ve L-argininin-NOS-NO yolunun etkinliğinin 17 β -östradiol tarafından engellendiği belirlenmiştir. Östrojenin uterusta bulunan longitudinal düz kaslarda cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine etkisinin minimal olduğu gözlenmiş, myometriyumdaki NO etkisinin cGMP-PK1'den bağımsız olarak şekillenebileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Payne A., Hales D.B. (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endoc Rev* 25, 947–70.
2. Simpson E., Rubin G., Clyne C., et al. (1999) Local estrogen biosynthesis in males and females . *Endoc-Rel Cancer* 6, 131-7.
3. Torgov I. V. (1982) Synthesis of steroid hormones. *Bull Acad Sci Chem Sci* 31, 271-84.
4. Burstein S., Gut M. (1976) Intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone: kinetics and mechanism. *Steroids* 28,115–31..
5. O'Donnell L., Robertson K.M., Jones M.E., et al. (2001) Estrogen and Spermatogenesis. *Endoc Rev* 22, 289–318.
6. Oh S.S., Robinson C.H. (1993) Mechanism of human placental aromatase: a new active site model. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44, 389-97.
7. Katagiri M., Kagawa N., Waterman M.R. (1995) The role of cytochrome b5 in the biosynthesis of androgens by human P450c17. *Arch Biochem Biophys* 317, 343–7.
8. Rodgers R.J. (1990) Steroidogenic cytochrome P450 enzymes and ovarian steroidogenesis. *Reprod Fertil Dev* 2, 53–163.
9. McCartney C.R., Gingrich M.B., Hu Y., et al. (2002) Hypothalamic regulation of cyclic ovulation: Evidence that the increase in gonadotropin-releasing hormone pulse frequency during the follicular phase reflects the gradual loss of the restraining effects of progesterone. *J Clin Endocrinol Met* 87, 2194-200.
10. Dafopoulos K., Kotsovassilis C.G., Milingos S. (2004) Changes in pituitary sensitivity to GnRH in estrogen-treated post-menopausal women: evidence that gonadotrophin surge attenuating factor plays a physiological role. *Hum Reprod* 19, 1985–92.
11. Guyton A.C. (1996) *Textbook of Medical physiology* Guyton&Hall, ed: Saunders Company, Missisipi.
12. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., et al. (1996) *Harper's Biochemistry*. 24th ed. Stamford (CT): Appleton & Lange.

13. Rosselli M., Reinhart K., Imthurn B., et al. (2000) Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Human Rep Update* 6, 332-50.
14. Zhu B.T., Conney A.H. (1998) Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* 19, 1–27.
15. Zhu B. T., Lee A. J. (2005) NADPH-dependent metabolism of 17β -estradiol and estrone to polar and nonpolar metabolites by human tissues and cytochrome P450 isoforms. *Steroids* 70, 225–244.
16. Bradlow H.L., Telang N.T, Sepkovic D.W., et al. (1996) 2-Hydroxyestrone: the ‘good’ estrogen. *J Endoc* 150, S259-S65.
17. Zhu B.T., Conney A.H. (1998) Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer Res* 58, 2269-77.
18. Cousse J. F., Korach K. S. (1999) Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endoc Rev* 20, 358–417.
19. Sundarajan C., Liao W. X., Roy A. C. (2001) Association between estrogen receptor- β gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 135–9.
20. Kuiper G.G., Enmark E., Peltö-Huikko M., et al. (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Nation Acad Sci* 93, 5925-30.
21. Mosselman S., Polman J., Dijkema R. (1996) ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49–53.
22. Tremblay G.B., Tremblay A., Copeland N.G., et al. (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor- β . *Mol Endocrinol* 11, 353–65.
23. Enmark E., Peltö-Huikko M., Grandien K., et al. (1997) Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258–65.
24. Kuiper G.G.J.M., Carlsson B., Grandien K., et al. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors- α and - β . *Endocrinol* 138, 863–70.

25. Bagchi M.K., Tsai M.J., O'Malley BW., et al. (1992) Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor-dependent gene activation in cell-free systems. *Endoc Rev* 13, 525–35.
26. Picard D., Kumar V., Chambon P., et al. (1990) Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul* 1, 291–9.
27. Kuiper G.G.J.M., Josephine G. Lemmen G., et al. (1998), Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinol* 139, 4252–63.
28. Orti E., Bodwell J.E., Munck A. (1992) Phosphorilation of steroid hormone receptors. *Endoc Rev* 13, 105–28.
29. Mohla S. Clem-Jackson N., Hunter J. B. (1981) Estrogen receptors and estrogen-induced gene expression in the rat mammary glands and uteri during pregnancy and lactation: Changes in progesterone receptor and RNA polymerase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 14, 501-8.
30. Revelli A., Massobrio M., Tesarik J. (1998) Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endoc Rev* 19, 3–17.
31. Morley P., Whitfield J.F., Vanderhyden B.C., et al. (1992) A new, ongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinol* 131, 1305–12.
32. Shears S.B. (1991) Regulation of the metabolism of 1,2-diacylglycerols and inositol phosphates that respond to receptor activation. *Pharmacol Ther* 49, 79–104.
33. Eppig J.J. (1991) Intercommunication between mammalian oocyte and companion somatic cells. *Bioessays* 13, 569–74.
34. Pietras R.J., Szego C.M. (1975) Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature* 253, 357–9.
35. Pietras R.J., Szego C.M. (1979) Estrogen receptors in uterine plasma membranes. *J Steroid Biochem* 11, 1471–83.
36. Pietras R.J., Szego C.M. (1980) Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem J* 191, 743–60.

37. Rambo C.O., Szego C.M. (1983) Estrogen action at endometrial membranes: alterations in luminal surface detectable within seconds. *J Cell Biol* 97, 679–85.
38. Chinkers M., McKanna J.A., Cohen S. (1979) Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J Cell Biol* 83, 260–5.
39. Tesarik J., Mendoza C. (1995) Nongenomic effects of 17 β -estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 1438–43.
40. Silberstein G.B., Strickland P., Trumpbour V., et al. (1984) *In vivo*, cAMP stimulates growth and morphogenesis of mouse mammary ducts. *Proceed National Acad Sci USA-Biol Sci* 81, 4950–54.
41. Aronica S.M., Katzenellenbogen B.S. (1991) Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estradiol, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and insulin-like growth factor-1 and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors. *Endocrinol* 128, 2045–52.
42. Sumida C., Pasqualini J.R. (1989) Antiestrogen antagonizes the stimulatory effect of epidermal growth factor on the induction of progesterone receptor in fetal uterine cells in culture. *Endocrinol* 124, 591–7.
43. Sumida C., Pasqualini J.R. (1990) Stimulation of progesterone receptors by phorbol ester and cyclicAMP in fetal uterine cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 69, 207–15.
44. Migliaccio A., Di Domenico M., Castoria G., et al. (1995) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15, 1292–300.
45. Beckman D. A., Feuston, M. (2003) Landmarks in the development of the female reproductive system. *Birth Def Res (Pt.B)* 68, 137–43.
46. Jordan D.L., Erb R.E., Malven P.V., et al. (1981) Artificial induction of lactation in cattle: Effect of modified treatments on milk yield, fertility and hormones in blood plasma and milk. *Theriogenology* 16, 315–29.
47. Vedernikov Y.P., Hartke J.R., Long M.A. (2003) Sex hormone effects in non-pregnant rat and human myometrium. *European J Obstet Gynecol Reprod Biol* 108, 59–66.

48. Gordon A. M., Homsher E., Regnier M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 80,853–924.
49. Kamm, K. E., Stull J. T. (2001) Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 276, 4527-30
50. Krueger J.K., Gallagher S.C., Zhi G., et al. (2001) .Activation of myosin light chain kinase requires translocation of bound calmodulin. *J Biol Chem* 276, 4535-38.
51. Webb R. C. (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27: 201–6.
52. Leyendecker G., Kunz G., Herbertz M., et al. (2004) Uterine peristaltic activity and the development of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1034, 338–55.
53. Kunz, G., Beil, D., Deininger, H. et al. (1996) The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract. Evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis (VSUP) and hysterosalpingoscintigraphy (HSSG). *Hum Reprod* 11, 627–32.
54. Salamanca A., Beltran E. (1995). Subendometrial contractility in menstrual phase visualised by transvaginal sonography in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 64, 193–5.
55. Leyendecker, G., Kunz, G., Wildt, L., et al. (1996) Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Hum Reprod* 11, 1542–1551.
56. Kunz G., Herbertz M., Noe M., et al. (1998) Sonographic evidence of a direct impact of the ovarian dominant structure on uterine function during the menstrual cycle. *Hum. Reprod. Update* 4, 667-72.
57. Noe, M., Kunz G., Herbertz M., et al. (1999). The cyclic pattern of the immunocytochemical expression of oestrogen and progesterone receptors in human myometrial and endometrial layers: characterization of the endometrial-subendometrial unit. *Hum Reprod* 14, 101-10.
58. Batra S. (1990) Influence of chronic estrogen treatment on the density of muscarinic cholinergic receptors and calcium channels in the rabbit uterus. *J Endocrinol* 125, 185–90.

59. Zingg H.H., Rosen F., Chu K., et al. (1995) Oxytocin and oxytocin receptor gene expression in the uterus. *Recent Prog Horm Res* 50, 255–73.
60. Furuya K., Mizumoto Y., Makimura N., et al. (1995) Gene expressions of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus cells of human ovary. *Hormone Res* 44, 47-9.
61. Fortune J.E., Voss A.K. (1993) Oxytocin gene-expression and action in bovine preovulatory follicles. *Regulatory Peptides* 45, 257-61.
62. Soloff M.S., Hinko A. (1993) Oxytocin receptors and prostaglandin release in rabbit amnion. *Annals New York Acad. Sci* 689, 207-18 .
63. Telfer J.F., Irvine G.A., Kohnen G., et al. (1997) Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant and decidualized human endometrium. *Mol Human Rep* 3, 69-75.
64. Thomson A. J., Telfer J.F., Kohnen G., et al. (1997) Nitric oxide synthase activity and localization do not change in uterus and placenta during human parturition. *Human Rep* 12, 2546-52.
65. Chaud M, Franchi A.M., Rettori V., et al. (1997) Nitric oxide in the contractile action of bradykinin, oxytocin, and prostaglandin F-2 alpha in the estrogenized rat uterus. *Proc Nat Acad Sci* 94, 11049-54
66. Fuchs A.R., Ivell R., Fields P.A., et al. (1996) Oxytocin receptors in bovine cervix: Distribution and gene expression during the estrous cycle. *Biol Rep* 54, 700-8.
67. Matthews E.L., Ayad V.J. (1994) Characterization and localization of a putative oxytocin receptor in the cervix of the estrous ewe. *J Endocrinol* 142, 397-405.
68. Challis J.R.G., Matthews S. G., Gibb W., et al. (2000) Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endoc Rev* 21, 514–50.
69. Hsu C.J., Sanborn B.M. (1986) Relaxin treatment alters the kinetic properties of myosin light chain kinase activity in rat myometrial cells in culture. *Endocrinol* 118, 499–505.
70. MacKenzie L.W., Word R.A., Casey M.L., et al. (1990) Myosin light chain phosphorylation in human myometrial smooth muscle cells. *Am J Physiol* 258, C92–8.

71. Ohya Y., Sperelakis N. (1989) Fast Na⁺ and slow Ca⁺⁺ channels in single uterine smooth muscle cells from pregnant rats. *Am J Physiol* 257, C408–12.
72. Kuriyama H., Kitamura K., Itoh T., et al. (1998) Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev* 78, 811-920.
73. Pato M.D., Lye S.J., Kerc E. (1991) Purification and characterization of pregnant sheep myometrium myosin light chain kinase. *Arch Biochem Biophys* 287, 24–32.
74. Hartshorne D.J., Ito M., Erdodi F. (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 19, 325–41.
75. Walsh M.P. (1991) Calcium-dependent mechanism of regulation of smooth muscle contraction. *Biochem Cell Biol* 69, 771–800.
76. Asboth G., Phaneuf S., Europe-Finner G.N., et al. (1996) Prostaglandin E2 activates phospholipase C and elevates intracellular calcium in cultured myometrial cells: involvement of EP1 and EP3 receptor subtypes. *Endocrinol* 137, 2572–9.
77. Casey M.L., Smith J., Alsbrook G., et al. (1997) Activation of adenylyl cyclase in human myometrial smooth muscle cells by neuropeptides. *J Clin Endocrinol Met* 82, 3087-92.
78. Feldman R. D., Gros R. (2007) New insights into the regulation of cAMP synthesis beyond GPCR/G protein activation: Implications in cardiovascular regulation. *Life Sci* 81267–71.
79. Denninger J.W., Marletta M.A. (1999) Guanylate cyclase and the (NO)-N-/cGMP signaling pathway *Biochem Biophys Acta-Bioener* 1411, 334-50.
80. Meera P., Anwer K., Monga M., et al. (1995) Relaxin stimulates myometrial calcium-activated potassium channel activity via protein-kinase-A. *Am J Physiol-Cell Physiol* 269, C312-7.
81. Anwer K., Oberti C., Perez G.J., et al. (1993) Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. *Am J Physiol* 265, C976-85.

82. Hamada Y., Nakaya Y., Hamada S., et al. (1994) Activation of K⁺ channels by ritodrine hydrochloride in uterine smooth-muscle cells from pregnant-women. *Europ J Pharmacol* 288, 45-51
83. Song M., Zhu N., Olcese R., et al. (1999) Hormonal control of protein expression and mRNA levels of the Maxi K channel alpha subunit in myometrium. *FEBS Letters* 460, 427-32.
84. Satoh H. (1996) Enhancement of K⁺ currents by stimulation of protein kinase C in the uterine smooth muscle cells of the pregnant rat. *Gen Pharmacol* 27, 455-8.
85. Palmer R. M. J., Ferrige A. G., Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-6.
86. Lowenstein C. J., Dinerman J. L., Snyder S. H. (1994) Nitric Oxide A Physiologic Messenger. *Annals Internal Medicine* 120, 227-37.
87. Palmer R.M.J., Ashton D.F., Moncada S. (1988) Vascular Endothelial Cells Synthesize Nitric Oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666.
88. Arzumanian V., Stankevičius E., Laukevičienė A. (2003) Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. *Medicina* 39, 535-41.
89. Dawson T.M., Dawson V.L., Snyder S.H. (1992) A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 32,297-311.
90. Norwitz, E.R., Robinson J.N., Challis J. R.G. (1999) The control of labor. *New Eng J Med* 341, 660-6.
91. Bansal R.K., Goldsmith P.C., He Y., et al. (1997) A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor and delivery. *J Clin Invest* 99, 2502–8.
92. Yallampali C., Garfield R.E., Byam-Smith M. (1993) Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinol* 133, 1899–1902.
93. Yallampali C., Izumi H., Byam-Smith M., et al. (1994) An l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 170, 175–85.

94. Buhimschi I.A., Yallampali C., Dong Y-L., et al. (1995) Involvement of a nitric-oxide guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 172, 1577–84.
95. Dong Y-L., Gangula P.R.R., Yallampali C. (1996) Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. *J Reprod Fertil* 107, 249–54.
96. Natussi E.S., Ursell P.C., Harrison M., et al. (1993) Nitric oxide synthase activity in the pregnant uterus decreases at parturition. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 1–8.
97. Sladek S.M., Roberts J.M. (1996) Nitric oxide synthase activity in the gravid rat uterus decreases a day before the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 175, 1661–7.
98. Lincoln T.M., Cornwell T.L., Komalavilas P., et al. (1996) The nitric oxide-cyclic GMP signaling system. In: Barany M (ed) *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*. Academic Press, New York, pp 257–68.
99. Jenkin G., Nathanielsz P.W. (1994) Myometrial activity during pregnancy and parturition. In: Thorburn GD, Harding R (eds) *Textbook of Fetal Physiology*. Oxford University Press, New York, pp 405–14.
100. Lopez Bernal A., Rivera J., Europe-Finner GN., et al. (1995) Parturition: activation of stimulatory pathways or loss of uterine quiescence? In: Ivell R, Russell JA (eds) *Advances in Experimental Medicine & Biology— Oxytocin: Cellular & Molecular Approaches in Medicine & Research*. Plenum Press, New York, vol 395, 435–53.
101. Lucas K.A, Pitari G.M., Kazerounian S., et al. (2000) Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52, 375–413.
102. Jaffrey S.R., Snyder S.H. (1995) Nitric oxide: A neural messenger. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11, 417-40.
103. Tamura N., Itoh H., Ogawa Y., et al. (1996) cDNA cloning and gene expression of human type Ia cGMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 27,552–7.

104. Orstavik S., Solberg R., Taske'n K., et al. (1996) Molecular cloning, cDNA structure, and chromosomal localization of the human type II cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 220,759–65.
105. Pfeifer A., Ruth P., Dostmann W., et al. (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135, 105–49.
106. Murthy K.S., Makhlouf G.M. (1998) Differential regulation of phospholipase A2 (PLA2)-dependent Ca²⁺ signaling in smooth muscle by cAMP- and cGMP dependent protein kinases. Inhibitory phosphorylation of Pla2 by cyclic nucleotidedependent protein kinases. *J Biol Chem* 273, 34519–26.
107. Surks H.K., Mochizuki N., Kasai Y., et al. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α . *Science* 286, 1583–7.
108. Vaandrager A.B., Bot A.G., De Jonge H.R. (1997) Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate- dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology* 112,437–43
109. Gambaryan S., Hausler C., Markert T., et al. (1996) Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest* 98,662–70
110. Wagner C., Pfeifer A., Ruth P., et al. (1998) Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102,1576–82.
111. Lohmann S.M., Vaandrager A.B., Smolenski A., et al. (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22,307–12.
112. Murthy K.S., Makhlouf G.M. (1998) Differential regulation of phospholipase A2 (PLA2)-dependent Ca²⁺ signaling in smooth muscle by cAMP- and cGMP dependent protein kinases. Inhibitory phosphorylation of Pla2 by cyclic nucleotidedependent protein kinases. *J Biol Chem* 273,34519–26.
113. Eckly-Michel A., Martin V., Lugnier C. (1997) Involvement of cyclic nucleotide dependent protein kinases in cyclic Amp-mediated vasorelaxation. *Br J Pharmacol* 122:158–64.

114. Chao A.C., de Sauvage F.J., Dong Y.J., et al. (1994) Activation of intestinal Cftr Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J* 13:1065–72.
115. Wang G.R., Zhu Y., Halushka P.V., et al. (1998) Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: In vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic Gmp-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4888–93.
116. Vaandrager A.B., Bot A.G., Ruth P., et al. (2000) Differential role of cyclic Gmp-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. *Gastroenterology* 118, 108–14.
117. Bulbul A., Yagci A., Altunbas K., et al. (2007) The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. *Theriogenology* 68, 1156-68.
118. Bulbul A., Altunbas K., Sevimli A., et al. (2007) The effects of ovarian steroids on myometrial contractions in ovariectomized rats. *Rev Med Vet* 158, 556-61.
119. Oike K., Ishihara K., Kikuchi S. (1990) A study on the endometrial movement and serum hormonal level in connection with uterine contraction, *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 42, 86–92.
120. Misirlioglu D., Nak D., Sevimli A., et al, (2006) Steroid receptor expression and HER-2/neu (c-erbB-2) oncoprotein in the uterus of cats with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 53,225-9.
121. Gart, P., *Human Pharmacology*, ed: Taylor & Francis, New York, (2001). Pp: 107-109.
122. Weiss G. (2000) Endocrinology of parturition, *J Clin Endocrinol Metabol* 12, 4421-25.
123. Petrocelli T., Lye S.J. (1993) Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinol* 133, 284-90.
124. Richter O.N., Kubler K., Schmolling J., et al. (2004) Oxytocin receptor gene expression of estrogen-stimulated human myometrium in extracorporeally perfused non-pregnant uteri. *Mol Hum Reprod* 10, 339–46.

125. Gordan P.L., Jenkins S.L., Wentworth R.A., et al. (1977) Effect of in vivo estradiol administration to bilaterally ovariectomized rats on in vitro myometrial responsiveness to PGF₂ alpha and oxytocin. *Biol Repr* 57,597–601.
126. Abramowicz J.S., Archer D.F. (1990) Uterine endometrial peristalsis: a trans-vaginal ultrasound study. *Fertil Steril*, 54, 451–4.
127. Harder D.R., Coulson P.B. (1979) Estrogen receptors and effect of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. *J Cell Physiol* 100,375–82.
128. Osa T., Ogasawara T. (1984) Effects in vitro of progesterone and 17 β estradiol on contractile and electrical responses in rat myometrium. *Jpn J Physiol* 34,427–41.
129. Yamamoto T. (1995) Effects of estrogens on Ca channels in myometrial cells isolated from pregnant rats. *Am J Physiol* 268, C64–9.
130. Okabe K, Inoue Y., Soeda H. (1999) Estradiol inhibits Ca²⁺ and K⁺ channels in smooth muscle cells from pregnant rat myometrium. *Eur J Pharmacol* 376,101–8.
131. Izumi H., Ichihara J., Uchiumi Y., et al. (1990) Gestational changes in mechanical properties of skinned muscle tissues of human myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 163, 638–47.
132. Challis J.R.G., Matthews S.G., Gibb W., et al. (2000) Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. 21, 514-50 .
133. Lederman S. A., Rosso P. (2004) Steroid hormone changes in pregnant rats. www.taxtexts.com. 1-17.
134. Izumi H., Yallampalli C., Garfield R.E. (1993) Gestational changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle, *Am J Obst Gynecol* 169, 1327–37.
135. Bredt D.S., Snyder S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc Nat Acad Sci USA* 87, 682–5.
136. Forstermann U., Schmidt H.H.W., Pollock J.S., et al. (1991) Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 42, 1849-57.

137. Langrehr J.M., Dull K.E., Ochoa J.B., et al. (1992) Evidence that Nitric oxide production by in vivo allosensitized cells inhibits the development of allospecific CTL, *Transplantation*, 53, 632-40.
138. Hoffmann P., Stanke-Labesque F., Fanchin R., et al. (2003) Effects of L-arginine and sodium nitroprusside on the spontaneous contractility of human non-pregnant uterus, *Hum Reprod*, 18, 148-51.
139. Ann Word R., Cornwell LT. (1998) Regulation of cGMP-induced relaxation and cGMP-dependent protein kinase in rat myometrium during pregnancy, *Am J Physiol* 43, C748 – 56.
140. Surks H.K., Mochizuki N., Kasai Y., et al. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α . *Science* 286, 1583–7.
141. Cornwell T.L., Li J., Sellak H., et al. (2001) Reorganization of myofilament proteins and decreased cGMP-dependent protein kinase in the human uterus during pregnancy *J Clin Endocrinol Metabol* 86, 3981-88.
142. Lincoln T.M., Cornwell T.L. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J* 7, 328–38.
143. Word R.A., Cornwell T.L. (1998) Regulation of cGMP-induced relaxation and cGMP-dependent protein kinase in rat myometrium during pregnancy. *Am J Physiol* 274, C748–C56.
144. Buxton I.L., Kaiser R.A., Malmquist N.A., et al. (2001) NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP. *Br J Pharmacol* 134, 206–14.
145. Kuenzli K.A., Buxton I.L., Bradley M.E. (1998) Nitric oxide regulation of monkey myometrial contractility. *Br J Pharmacol* 124, 63–68.
146. Buxton I.L. (2004) Regulation of Uterine Function: a Biochemical Conundrum in the Regulation of Smooth Muscle Relaxation. *Mol. Pharmacol.* 65, 1051–9.
147. Buhimschi I.A., Yallampali C., Buhimschi C. S., et al. (2000) Distinct regulation of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production by steroid hormones in the rat uterus. *Mol Human Reprod* 6,404-14.

148. Weiner C.P., Lizasoain I., Baylis, S.A., et al. (1994) Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5212–6.
149. Eckman D.M., Weinert J.S., Buxton I. L.O., et al. (1994) Cyclic GMP independent relaxation and hyperpolarization with acetylcholine in guinea pig coronary artery. *Br J Pharmacol* 111, 1053–60.
150. Trottier G., Triggle C.R., O'Neill S.K., et al. (1998) Cyclic GMPdependent and cyclic GMP-independent actions of nitric oxide on the renal afferent arteriole. *Br J Pharmacol* 125, 563–9.
151. Pinilla L., Gonzalez D., Tena-Sempere M., et al. (1998) Nitric oxide (NO) stimulates gonadotropin secretion in vitro through a calcium-dependent, cGMPindependent mechanism. *Neuroendocrinology* 68, 180–6.
152. Ahern G.P., Hsu S.F., Jackson M.B. (1999) Direct actions of nitric oxide on rat neurohypophysial KCa channels. *J Physiol (Lond)* 520, 165–76.
153. Mazzone J.N., Kaiser R.A., Buxton I.L. (2002) Calcium-activated potassium channel expression in human myometrium: effect of pregnancy. *Proc West Pharmacol Soc* 45, 184–6.
154. Shimano M., Nakaya Y., Fukui R., et al. (2000) Activation of Ca⁺²-activated K⁺ channels in human myometrium by nitric oxide. *Gynecol Obstet Invest* 49, 249–54.