



T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BEYİN VE ÜREME ORGANLARININ NİTRİK OKSİT
AKTİVİTESİNİN ESTRUS SIKLUSU İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Tuğba KIRBOĞA

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Şubat 2013

BOLU



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYİN VE ÜREME ORGANLARININ NİTRİK OKSİT
AKTİVİTESİNİN ESTRUS SIKLUSU İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Tuğba KIRBOĞA

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatma TÖRE

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası: 2012.08.01.543)

Şubat 2013

BOLU

Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışmamız jürimiz tarafından oy birliği ile Fizyoloji Anabilim Dalında
Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Kenan GÜMÜŞTEKİN

Fizyoloji Anabilim Dalı, AİBÜ

Prof.Dr. Fatma TÖRE

Fizyoloji Anabilim Dalı, AİBÜ

Prof.Dr. Aysel KÜKNER

Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, AİBÜ



Tarih: 12/02/2013

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Tuğba Kırboğa'nın
Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

ÖZET

BEYİN ve ÜREME ORGANLARININ NİTRİK OKSİT AKTİVİTESİNİN ESTRUS SIKLUSU İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nitrik oksit (NO) çok yönlü bir biyolojik haberci ve farklı biyolojik etkilere sahip bir moleküldür. NO hemen hemen bütün ovaryum fonksiyonlarında yer alır; steroidogenezis, foliküler gelişim, folikül yırtılması, ovulasyon, korpus luteum fonksiyonlarının düzenlenmesi ve korpus luteum gerilemesinde etkilidir. NO uterus düz kasının kasılmasında, menstrüasyonun düzenlenmesinde, implantasyonun kolaylaşmasında ve dismenoreden koruyucu etkisi vardır. Nitrik oksit sentaz (NOS) ekspresyonu gonadal hormonlar tarafından düzenlenir. Gonadal hormonlar NOS ekspresyonu tarafından modüle edilir. Bu çalışmada, sıçan estrus siklusu evrelerinde beyin ve üreme organlarının NO aktivitesi arasındaki ilişki araştırılmıştır.

32 dişi sıçan vajinal smear takibiyle farklı estrus siklusu evrelerinde (proestrus, estrus, metestrus ve diestrus) sakrifiye edildi ve plazma, beyin, uterus ve ovaryumları alındı. NO konsantrasyonunu ölçmek için onun stabil son ürünleri olan nitrat ve nitrit kolorimetrik yöntemle ölçüldü. Plazma LH, FSH ve estradiol düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü.

Bu çalışmada estrusun farklı evrelerinde NO düzeyi anlamlı farklı çıkmıştır. Beyin dokusunda NO düzeyi metestrusta anlamlı yüksekken, uterus dokusunda estrusta anlamlı yüksek bulunmuştur. Plazma ve ovaryum NO düzeyleri estrus evrelerinde diğer evrelere göre yüksekti ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak estrus evrelerinde plazma, üreme organları ve NO düzeyi değişmektedir. Bu değişiklik NO'nın menstrüel siklusta fizyolojik rollerini ve kadınlarda daha sık görülen hastalıkların fizyopatolojisindeki rollerine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Estrus, Nitrik Oksit, Sıçan, Üreme.

ABSTRACT

RELATION BETWEEN BRAIN and REPRODUCTIVE ORGANS and ACTIVITY of NITRIC OXIDE DURING ESTRUS CYCLE

Nitric oxide (NO) is a biological messenger and has various biological actions. NO is involved in all the ovarian functions; steroidogenesis, follicular development, follicle rupture, ovulation, regulation of corpus luteum functions and atresia of corpus luteum. NO plays a crucial role as a modulator of uterus smooth muscle contractility, regulation of menstruation, facilitate implantation and prevent dismenore. The expression of nitric oxide synthase (NOS) is regulated by gonadal hormones and gonadal hormones regulated by NOS expression. In this study, we investigated the relation between reproductive organs and brain and activity of NO during estrus cycle.

32 female rats were separated by vaginal smear into four phases of estrus cycle (proestrus, estrus, metestrus, diestrus) and sacrificed. Then, plasma, brain, uterus and ovaries were taken. For determining the NO concentration, its stable end product nitrite and nitrate measured by the colorimetric assay. Plasma estradiol, LH and FSH levels analyzed by ELISA.

In this study, there is significant difference among the different tissue NO levels at different phases of estrus cycle. Brain NO level was significantly high in metestrus, when uterus NO level was high in estrus phase. The NO levels of plasma and ovaries high in estrus, but the difference was not statistically significant.

In conclusion, plasma, reproductive organs and brain NO levels are changing during estrus cycle. This differences indicate that physiological roles of NO on menstrual cycle and pathophysiology of diseases which is most common in women.

Key Words: Estrus, Nitric Oxide, Rat, Reproduction.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her koşulda bana yardımcı ve manevi destek olan, tezimin hazırlanması, düzenlenmesi, deneylerim ve değerlendirilmesi sürecinde değerli bilgileri ile bana yol gösteren sayın danışman hocam Prof. Dr. Fatma TÖRE'ye, tezimi hazırlarken desteğini eksik etmeyen Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Kenan GÜMÜŞTEKİN'e, laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen ve teknik cihazlarından faydalanmamıza olanak veren AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü ve Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Erol AYAZ'a ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarımda destek olan Vet. Hekim. Ayhan ÇETİNKAYA, Dr. Özlem BUCAK ve Uzm. Şeyda KARABÖRK'e, yüksek lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi desteğini eksik etmeyen canım arkadaşım Hatice Kübra ÖZCENGİZ'e, tez dönemim boyunca moral ve motivasyon desteğini hiç eksik etmeyen, zor zamanlarımda yanımda olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili eşim Cesim KIRBOĞA'ya içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

• ONAY SAYFASI	iii
• ÖZET	iv
• ABSTRACT	v
• TEŞEKKÜR	vi
• İÇİNDEKİLER	vii
• TABLOLAR	x
• ŞEKİLLER	xi
• SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nitrik Oksit tarihçesi	3
2.2. Nitrik Oksit Sentezi	3
2.3. Nitrik Oksit Sentaz İzofomları	4
2.3.1. Nöronal nitrik oksit sentaz (NOS1)	4
2.3.2. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS2)	5
2.3.3. Endotelyal nitrik oksit sentaz (NOS3)	6
2.3.4. Mitokondri nitrik oksit sentazı (mtNOS)	8
2.4. Nitrik Oksit Etki Mekanizması	8
2.5. Nitrik Oksit Difüzyonu ve Ortamdan Uzaklaştırılması	9
2.6. Nitrik Oksit Donör ve İnhibitörleri	10
2.7. Nitrik Oksit İnhibitörlerinin Önemi	11
2.8. Nitrik Oksit'in Fizyolojik ve Patolojik Etkileri	12
2.8.1. Nitrik oksit'in damar sistemine etkisi	13
2.8.1.1.Nitrik oksit'in damarlar üzerine etkileri	13
2.8.1.2. Nitrik oksit'in platelet agregasyonu üzerine etkileri	14
2.8.1.3.Nitrik oksit'in damar düz kas hücrelerinin çoğalmasına etkisi	14
2.8.2. Travma ve Enfeksiyonda Nitrik Oksit	15
2.8.3. Nitrik Oksit'in Sinir Sistemine Etkileri	16
2.8.4. Nitrik Oksit'in İmmün Sistem Üzerine Etkileri	17

2.8.5. Nitrik Oksit'in Apoptotik Etkileri	18
3. DIŞI ÜREME SİSTEMİ ve NİTRİK OKSİTİN DIŞI ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ	19
3.1. Dişi Üreme Sistemi	19
3.2. Over Döngüsü	20
3.3. Ovaryum İşlevlerinin Kontrolü	22
3.4. Uterus Döngüsü	24
3.5. Estrus Döngüsü	26
3.6. Nitrik Oksit'in Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	28
3.6.1. Nitrik oksit'in ovaryum üzerine etkileri	28
3.6.2. Nitrik oksit'in uterüs üzerine etkileri	29
3.6.3. Nitrik oksit 'in hipotalamus hipofiz-gonadal aksdaki rolü	30
3.7. Menstrüel siklusla ilişkili hastalıklar	31
4.GEREÇ ve YÖNTEM	32
4.1. Hayvan Deneyi Uygulaması	32
4.2. Papa Nicolou (PAP) Boyama	33
4.3. Plazma Hormonlarının Ölçümü	34
4.3.1. Estradiol Ölçümü	34
4.3.2. LH Ölçümü	35
4.3.3. FSH Ölçümü	36
4.4.Nitrik Oksit Ölçümü	36
4.4.1. Doku homajenatları ve plazma örneklerinin hazırlanması	37
4.4.2. Nitrat + Nitrit ölçümü	37
4.5. İstatiksel Analiz	38
5.BULGULAR	39
5.1. Estrus Evreleri	39
5.2 Plazma Hormon Düzeyleri	40
5.2.1. Estrus siklusu evrelerinde plazma estradiol düzeyleri	40
5.2.2. Estrus siklusu evrelerinde plazma LH düzeyleri	41
5.2.3. Estrus siklusu evrelerinde plazma FSH düzeyleri	42
5.3. Doku Ağırlıkları	43

5.4. Doku Nitrat+Nitrit Düzeyleri	43
5.4.1.Beyin nitrat+nitrit düzeyi	44
5.4.2. Uterus nitrat+nitrit düzeyi	45
5.4.3.Ovaryum nitrat+nitrit düzeyi	46
5.4. Plazma nitrat+nitrit Düzeyi	47
6. TARTIŞMA	49
7. SONUÇ ve ÖNERİLER	53
8. KAYNAKLAR	54
9. EKLER	61
10. ÖZGEÇMİŞ	62

TABLÖLAR

Tablo

2.1. NOS izoformlarının özellikleri	7
5.1. Estrus siklusu evrelerinde plazma hormon düzeyleri	43
5.2. Doku ağırlıkları	43
5.3. Estrus siklusu evrelerinde beyin, uterus ve ovaryumda nitrat+nitrit düzeyleri	46
5.4.Estrus siklusu evrelerinde plazma nitrat + nitrit düzeyleri	48

ŞEKİLLER

Şekil

2.1. NO sentez reaksiyonu	4
2.2. (1-3) Nitrik oksit sentezi, (4-7) nitrik oksit sentez inhibitörleri	11
2.3. Nitrik oksitin çok yönlü etkileri	13
3.1. Dişi üreme sistemi (a) pelvisin enine kesiti, (b) üreme organları arasındaki anatomik ilişki	20
3.2. İnsan oosit ve ovaryum folikülünün büyümesi	21
3.3. Ovaryumda folikülün gelişme evreleri, korpus luteum oluşumu ve folikül atrezisi	22
3.4. Menstrüel döngü boyunca hormonal değişimler	23
3.5. Menstrüel döngü boyunca ovaryum ve uterus değişiklikleri arasındaki ilişki	24
3.6. Menstrüel döngü sürecinde uterus değişiklikleri ve hormonal değişiklikler arasındaki ilişki	25
3.7. (A) Menstrüel döngü, (B) Sıçan estrus siklusu	27
4.1. Sıçan ovaryum ve uterusun çıkarılması	32
4.2. Sıçan beyninin çıkarılması	33
4.3. Plazma hormon ölçümünde stop solüsyon eklendiğinde görülen renk değişimi	35
4.4. Griess Reagent 2 eklendiğinde oluşan renk değişimi	38
5.1. Estrus siklusu evrelerinde vajinal sitolojik görünüm; (A) proestrus evresi, (B) estrus evresi, (C) metestrus evresi, (D) diestrus evresi	39
5.2. Plazma estradiol standart eğrisi	40
5.3. Estrus siklusu evrelerinde plazma estradiol düzeyi	40
5.4. Plazma LH standart eğrisi	41
5.5. Estrus siklusu evrelerinde plazma LH düzeyi	41
5.6. Plazma FSH standart eğrisi	42
5.7. Estrus siklusu evrelerinde plazma FSH düzeyi	42
5.8. Doku nitrat + nitrit standart eğrisi	44
5.9. Estrus siklusu evrelerinde beyin nitrat+nitrit düzeyi	44

5.10. Estrus siklusu evrelerinde uterus nitrat+nitrit düzeyi	45
5.11. Estrus siklusu evrelerinde ovaryum nitrat+nitrit düzeyi	46
5.12. Plazma nitrat+nitrit standart eğrisi	47
5.13. Estrus siklusu evrelerinde plazma nitrat+nitrit düzeyi	47

KISALTMALAR

ARC:	Arkuat nükleus
BAOT:	Aksesör olfaktör bölgenin bed nükleusu
BST:	Stria terminalisin bed nükleusu
Ca ²⁺ :	Kalsiyum
CA1:	Hipokampüste bellekle alakalı bir bölge
CA2:	Hipokampüste bellekle alakalı bir bölge
CA3:	Hipokampüste bellekle alakalı bir bölge
CaM:	Kalmodülin
cAMP:	Siklik adenozin monofosfat
cGMP:	Siklik guanizin monofosfat
cNOS:	Yapısal nitrik oksit sentaz
CRH:	Kortkotropin salıcı hormon
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDRF:	Endotel kaynaklı gevşetici faktör
ELISA:	Enzim bağımlı immunosorbent test
EREs:	Östrojen yanıt elemanları
eNOS:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
FAD:	Flavin adenin dinükleotid
FMN:	Flavin
FSH:	Folikül uyarıcı hormon
GHRH:	Büyüme hormonu salıcı hormon
GnRH:	Gonadotropin salıcı hormon
hCG:	İnsan koryogonik gonadotropini
HPG:	Hipotalamus-hipofiz-gonadal aks
iNOS:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LH:	Luteinleştirici hormon
LHRH:	Luteinleştirici hormon salıcı hormon
L-NA:	L-nitro-L-arjinin

L-NAA:	N-amino-L-arjinin
L-NAME:	N-nitro-L-arjinin metil ester
L-NIL:	N-iminoetil-L-lizin
L-NIO:	N-iminoetil-L-ornitin
L-NNA:	N-metil-L-arjinin
L-NMA:	N-metilarjinin
L-NMMA:	N-monometil-L-arjinin
LPS:	Lipopolisakkarit
L-SMTC:	S-metil-L-tiyositrulin
L-TC:	L-tiyositrulin
LTP:	Uzun dönem potansiyalizasyon
MPA:	Medial preoptik alan
MPOM:	Medial preoptik nükleus
MSS:	Merkezi Sinir Sistemi
mtNOS:	Mitokondri Nitrik Oksit Sentazı
N ₂ :	Azot
NADP:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (yükseltgenmiş hali)
NK:	Doğal öldürücü hücre (natural killer)
NANC:	Nonadrenerjik-nonkolinerjik
NO:	Nitrik oksit
nNOS:	Nöronal nitrik oksit
NMDA:	N-metil-D-aspartat
NOS:	Nitrik oksit sentaz
NO _x :	Reaktif nitrik oksit türevleri
O ₂ :	Oksijen
PAP:	Papa Nicolou Boyama
PGF _{2α} :	Prostaglandin F ₂ alfa
PVN:	Paraventriküler nükleus
P53:	Tümör protein 53
SNAP:	S-nitrozoasetilpenisilamin

THB:	Tettrahidrobiopterin
TNF:	Tümör nekroz faktörü
WMH:	Ventromedial nükleus
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Anorganik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO) küçük, kararsız ve difüzyonla hücre zarını geçebilen bir moleküldür. Son zamanlarda, nitrik oksitin bir çok fizyolojik sistemde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Vasküler sistemde NO; vazodilatasyonu başlatır, platelet agregasyonunu inhibe eder, endotel hücrelerini nötrofil ve platelet bağlanmasından korur, programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) düzenler, endotel hücre bariyer fonksiyonunu sağlar. NO nörotransmitter olarak nöronlarda, mikroplara karşı antimikrobiyel ajan olarak makrofajlarda üretilir. Sinir hücreleri, kan damarları ve immün sistem üreme organlarının bir parçası olduğu için NO üreme sistemi biyolojisi ve fizyolojisinde önemli bir düzenleyicidir.

Nitrik oksit dişi üreme sisteminde birçok oluşumun parakrin bir aracısı olarak rol oynar. Ovaryumda NO, vazodilatasyona neden olur ve kısmen foliküler gelişim boyunca, preovulatuvar dönemde ve korpus luteum oluşumunda kan akımının hızlanmasına sebep olur. NO, uterusun biyolojisi ve patofizyolojisinde rol oynamaktadır. NO, uterusun en önemli fonksiyonu olan gebeliğin başarılı bir şekilde devam etmesinde etkilidir. Gebelikle ilgili bu etkisi, uterusun spontan kontraksiyonunu ve düz kas hücrelerinin kasılmasını düzenlemesiyle ortaya çıkar. Yapılan çalışmalarda uterus dokusu içinde NOS enzimlerinin varlığı ve NO üretiminin yapıldığı belirlenmiştir. NOS enzimleri uterus damar ve sinirlerinde, glandular epitelde, endometrial stromal hücrelerde, myometrium hücrelerinde tespit edilmiştir. Reprodüktif olaylarda meydana gelen değişiklikler uterus NO seviyesini etkiler.

Estradiol ovaryumda aromataz enzimi ile androjenlerden sentezlenmektedir. Bir çok araştırmada NO ile aromataz enzimi ilişkisi kanıtlanmıştır. NO aromataz etkinliğini inhibe etmektedir, dolayısıyla ovulasyon ve estradiol sentezini düzenlemektedir. NOS inhibitörü L-NNA ile NO'nun azaltılması, ovaryumdan östrojen üretimini arttırdığı, estrus siklusunu estrus/proestrus'u uzatarak sonlandırdığı görülmüştür. NOS inhibitörlerinin hem *in vivo* hem *in vitro* çalışmalarda ovulasyon oranını azalttığı bulunmuştur. NO'nun östradiol üretimini direk veya ovaryumdan androstenoid sentezini azaltarak inhibe ettiği bilinmektedir.

NO, merkezi ve periferik sinir sisteminde nörotransmitter olarak görev yapar. Ancak, konvansiyonel nörotransmitterlerden farklı olarak bir amino asit, amin ya da peptid değildir, sinaptik veziküllerde depolanmaz ve egzozitoz yolu ile salgılanmaz. NO, gaz yapısında bir bileşiktir ve üretilir üretilmez hücre membranından basit difüzyonla salınarak etkisini gösterir. NO'nun sinapta hem antegrad hem de retrograd sinyallerle ilişkisi vardır. NO etkisini çözülebilir guanil siklaz ile hücre içi siklik guanizin monofosfat (cGMP) yi artırarak cGMP bağımlı protein fosforilasyon kaskadını aktive ederek gösterir.

NO nöroendokrin aksda ve üremenin kontrolünde nörotransmitter ve biyolojik mediatör olarak görev aldığı kanıtlanmıştır ancak siklik ratlarda NO salınımında nöral faktörler arasındaki ilişkiye dair çok az bilgi vardır. Kadın cinsiyet hormonları ile etkileşerek astım, alerji, fibromiyalji, kolit, osteoporozis, Alzheimer, aterosklerozis gibi hastalıkların patofizyolojisinde rol oynar. Ayrıca, kadınlarda migren menstrual döngünün menstrüasyon evresinde şiddetli olduğu görülmüştür. Yapılan literatür taramasında döngüsel olarak üreme organlarının NO miktarı ve santral NO miktarı arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bilgiler ışığında sunulan çalışmada sıçan östrus siklusunun proestrus, estrus, metestrus ve diestrus evrelerinde beyin ve üreme organları uterus ve ovaryum nitrik oksit düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmadan elde edilecek veriler NO'nun aracılık ettiği menstrüal siklus ile ilişkili hastalıkların fizyopatolojisine bilgi sağlayacaktır. Dolayısıyla bu hastalıkların tedavisinde yeni tedavi yaklaşımlarına temel oluşturabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

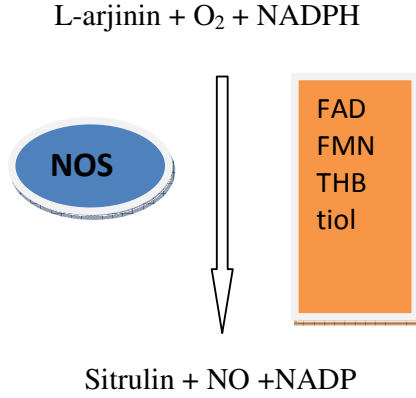
2.1. Nitrik Oksit Tarihçesi

1900’lü yıllarda memelilerde nitrojen oksitlerin varlığı gösterilse de kaynağı 1900’lerin sonunda bulunmuştur. Furchgott ve Zavadski 1980 yılında vasküler ringde asetil kolin başlangıçlı gevşemenin endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) aracılığı ile olduğu kanıtlanmıştır. Daha sonra 1985’te Stuehr ve Marletta aktifleşmiş makrofajların nitrit/nitrat sentezlediğini rapor etmiştir. 1987’de Palmer ve arkadaşları ve Ignarro ve arkadaşları birbirlerinden bağımsız olarak endotel kaynaklı gevşetici faktörün (EDRF) NO olduğunu kanıtlamıştır. 1988 de Palmer ve arkadaşları ile Marletta ve arkadaşları NO’nin L-argininden sentezlendiğini rapor ettiler. Garthwaite ve arkadaşları 1988 de NO’nin beyinde sentezlendiğini bulmuştur. 1988 ve 1992 yılları arasında NO biyolojisi ve fonksiyonları üzerindeki araştırmalar hızla artmıştır ve 1992 yılında Science dergisi tarafından “Yılın Molekülü” ilan edilmiştir [1,2].

2.2. Nitrik Oksit Sentezi

Yüksek miktarda enerji gerektiren bir tepkime olması nedeni ile nitrik oksitin kendini oluşturan elementler olan oksijen ve nitrojenden sentezi güçtür. Bu nedenle atmosferin en bol bulunan iki gazı olan O₂ ve N₂ birbiri ile tepkimeye girerek NO oluşturmazlar. Normal koşullarda NO gazı bozunarak N₂ ve O₂ gazlarını da oluşturmaz. NO sentezi için kullanılan öncül biyomolekül arjinin amino asitidir [3].

NO, L-arjinin amino asidinden sitrulin oluşumu sırasında L-arjinin guanido nitrojeninin nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile oksitlenmesi sonucu sentez edilir. Sentez için nikotinamid adenine dinükleotit fosfat (NADPH), kalmodülin, oksijen, indirgenmiş tiol ve dört kofaktöre (hem, flavin (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), tetrahidrobiopterin (THB) ihtiyaç duymaktadır [1-6].



Şekil 2.1. NO sentez reaksiyonu [7].

2.3. Nitrik Oksit Sentaz İzofomları

Memeli sistemlerinde NO ilk defa damar endoteli, beyin ve makrofajlarda ayırt edilmiştir. Bu nedenle bu enzimler sınıflandırılırken bulunduğu dokuya, fonksiyonel ve yapısal özelliklerine göre sınıflandırılmıştır [4,6,8]. Her ne kadar bu izofomlar hücre tipi ve farklılıklarına göre sınıflandırılmışsa da bir hücre birden fazla NOS izofomu sentezleyebilir [8].

Bu güne kadar farklı gen ürünü ve farklı moleküler ağırlığı olan üç NOS izofomu tanımlanmıştır; beyin ve periferik sinir sisteminde nöronal NOS (nNOS/NOS1), daha çok endotel hücrelerde oluşturulan endotelial NOS (eNOS/NOS3) ve bir çok doku ve organda inflamatuvar uyarı ile makrofaj, hepatosit ve nötrofil tarafından sentezlenen indüklenebilir NOS (iNOS/NOS2) [9,10].

nNOS ve eNOS ayrıca yapısal (constitutive) NOS (cNOS) olarak da bilinir ve vasküler tonus ve nöronal işlevler için bazal seviyede NO salar [1,5]. Her iki izoformda kofaktör olarak kalsiyum kalmoduline bağımlı olup intraselüler Ca²⁺ düzeyini yükselten agonistlerle aktive edilir. Kalsiyumun yükseltilmesi kalmodulinin NOS'a bağlanmasını uyarır ve süratli bir şekilde pikomolar düzeylerde NO sentezlenir [5].

2.3.1. Nöronal nitrik oksit sentaz (NOS1)

İlk olarak serebellar granül hücre kültüründe N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörüne etkisi ile glutamattan ayırt edilmiştir [11]. Nöronal enzimin aktivitesi kalsiyum kalmodulin bağımlıdır [3]. Yapısal olarak zara tutunmasını sağlayan kimyasal grup içermez, sitoplazmik bir enzimdir. 26 ekzondan oluşur ve

12.kromozomdan sentezlenir. Bazı nöronların NMDA veya glutamat ile uyarılmasıyla enzim aktivitesi üç katına çıkar ve aynı zamanda cGMP seviyesi artar. Bu hücrelerdeki NO ve cGMP sentezi N-metil-L-arjinin (L-NMA) ve N-nitro-L-arjinin (L-NNA) tarafından inhibe edilir [3]. Merkezi sinir sisteminde koku sistemi, serebral korteks, diensefalon, beyin sapı, serebellum ve omurilikte yer aldığı bulunmuştur (Tablo2.1). Bu molekül uzun süreli potensiasyon, nöroproteksiyon, nöronal dejenerasyon, peptiderjik sekresyonun düzenlenmesi gibi bir çok fizyolojik etkisi vardır. Ayrıca organizmanın üremesinin her aşamasında önemli rol oynamaktadır [11].

Sinir sistemine ek olarak nNOS iskelet kasında, pankreasın beta hücrelerinde, erkek cinsiyet organında, hipofiz bezinde, adrenal medullada ve böbrekte makula densa ve distal tübülde tespit edilmiştir [8].

2.3.2.İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS2)

Yapısal enzimlerin aksine, fagositik lökositler ve diğer hücre türlerinde bulunan indüklenebilir nitrik oksit sentaz aktivitesi fizyolojik durumlarda ölçülemeyecek kadar az ya da hiç yoktur. Sitoplazmik bir proteindir ve 17. kromozomdan 26 ekzon olarak sentezlenir. Bu enzimin aktifleşmesi için mesajcı moleküllerle protein sentezinin indüklenmesi gerekir. iNOS un indüksiyonu çeşitli bakteriyel ürünlere lipopolisakkarit (LPS) ve proinflamatuvar sitokinlere bağımlıdır [3]. Kalsiyum bağımsız olması ile yapısal NOS'lardan ayrılır [8]. cNOS'un aksine iNOS enziminin her bir alt birimine sıkı tutunmuş kalmodulin içerir. Bundan dolayı iNOS aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artmasına gerek yoktur [1]. Uyarıdan sonra iNOS enziminin sentezi birkaç saat alır. Sitokinlerle indüksiyondan 24 saat sonra NO sentezi en yüksek seviyeye çıkar ve sonra hızla düşer. Yapısal izoformları aksine iNOS çok çeşitli hücre türlerinde yaygın olarak bulunur. Makrofajlar, mast hücreleri, lökositler, T-lenfositler, kondrositler, hepatositler, Kupffer hücreleri, böbrek, retina ve barsak epitelyum hücreleri, mezengial hücreler, beyin endotel hücreleri, mikroglia hücreleri, astrositler, pankreasın Langerhans adacıkları, nöroblastoma hücrelerinde bulunur. NO hem nötrofil adezyonu hem de lenfosit etkinliğini azaltarak immünregülatör rolü vardır (Tablo 2.1). Makrofajlarda büyük miktarda iNOS üretilir ve antimikrobiyel fonksiyonu vardır [11,12]. Normal

fizyolojik koşullarda NO konsantrasyonu pikomolar düzeyde iken iNOS'un aktifleşmesi ile NO konsantrasyonu yüzlerce kat artar [4].

iNOS enziminin indüksiyonu deksametazon, hidrokortizon ve kortizol gibi glukokortikoidler tarafından inhibe edilir. Bu steroidlerin enzim aktivitesine protein düzeyinde etkileri yoktur. Enzimin ürünü olan NO, kendi enziminin indüksiyonunu da etkiler. NO'ı ortamdan hızla uzaklaştıran hemoglobin, iNOS aktivitesinde artışa neden olurken: ortama NO salınımı yapan S-nitrozoasetilpenisilamin (SNAP) gibi NO vericileri enzimin aktivitesini azaltır. Bu bulgular, iNOS tarafından üretilen NO'in, iNOS indüksiyonunu feed-back bir mekanizma ile baskılandığını göstermektedir [3].

2.3.3. Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)

Endotel hücreleri uyarıldıkları zaman anında NO üretmeye başlar. Uyarıya ani cevap oluşması NO sentezini katalizleyen enzimin yapısal bir enzim olduğunu ve uyarıya yanıt için yeni bir protein sentezini gerektirmediğini gösterir. eNOS kofaktör olarak NADPH ve kalsiyum kalmodüline ihtiyaç duyar ve L-NMA ve L-NNA gibi arjinin analogları tarafından kompetitif olarak inhibe edilir. Uyarılarla hücrede geçici olarak yükseltile sitoplazmik kalsiyum, kalsiyum-kalmodülin kompleksi şeklinde eNOS'u aktive eder. NO, difüzyonla düz kas hücrelerine geçerek guanilat siklazı aktive edip cGMP seviyesini arttırır ve düz kaslarda gevşemeye neden olur. Kalsiyum pompalarının sitoplazmik kalsiyum derişimini düşürmesi ile eNOS aktivasyonu sona ereceğinden; eNOS ile kısa süreli ve düşük derişimde NO sentezi sağlanır [3]. Kalmodulin bağımlılığı ile fonksiyon olarak nNOS'a benzer [8] eNOS zarsal/zarla etkileşimde bulunan bir enzimdir. 7.kromozomdan sentezlenir ve 26 ekzondan oluşur. eNOS esas olarak vasküler epitel hücrelerinde bulunur [Tablo 2.1]. Çeşitli dokularda gösterilmişse de, bu aktivitenin kaynağı dokulardaki vasküler endotel hücreleri olduğu kabul edilmektedir. Böbrek tübülleri epitelyum hücrelerinde ve CA1 nöronlarında da eNOS varlığı gösterilmiştir. CA1 nöronlarında eNOS'un hafıza işlevlerinde rol aldığı kabul edilmektedir [3].

Tablo 2.1. NOS izoformlarının özellikleri [13].

<u>iNOS</u>	<u>eNOS</u>	<u>nNOS</u>
• Tip II NOS	• Tip III NOS	• Tip I NOS
• İndüklenebilir formdadır	• Yapısal formdadır	• Yapısal formdadır
• Aktivitesi $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ bağımsızdır	• Aktivitesi $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ bağımlıdır	• Aktivitesi $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ bağımlıdır
• Uzun süreli NO sentezini katalizler	• Kısa süreli NO sentezini katalizler	• Kısa süreli NO sentezini katalizler
• Aktiviteleri glukokortikoidler tarafından engellenebilir	• Aktiviteleri glukokortikoidler tarafından engellenmez	• Aktiviteleri glukokortikoidler tarafından engellenmez
• Genellikle sitoplazmada bulunur	• Hücre zarında bulunur	• Genellikle sitoplazmada bulunur
• Makrofajlar, nötrofiller, solunum yolu epitelyum hücreleri, fibroblastlar ve mast hücrelerinde bulunur	• Endotel hücrelerinde, mast hücrelerinde, trombositlerde, pankreas hücrelerinde, vasküler düz kas hücrelerinde ve nötrofillerde bulunur	• Merkezi ve periferik sinir sisteminde, adrenal bezde, nonadrenerjik-nonkolinerjik nöronlarda ve astrositlerde bulunur
• Lipopolisakkarid, interferon-gama, tümör nekrozis faktör-a&b, interlökin-1&2, lipoteikoik asit ve pikolinik asit tarafından aktive edilebilir	• Serotonin ve trombin tarafından aktive edilebilir	• Asetil kolin, bradikinin, Ca^{2+} iyonoforları, histamin, lökotrienler ve trombosit aktive edici faktörtarafından aktive edilebilir

2.3.4. Mitokondri nitrik oksit sentazı (mtNOS)

Mitokondri de nitrik oksit sentazın olduğu bir organeldir. Bu organeldeki nitrik oksiti sentezleyen enzim mitokondri nitrik oksit sentaz (mtNOS) dır. Bu nedenle mitokondrideki NO'nın etkileri mtNOS tarafından kontrol edilir. Mitokondrideki NO aktivitesi esas olarak mitokondri iç zarı üzerindedir ve NOS inhibitörlerine duyarlıdır. Mitokondri başta süperoksit olmak üzere en fazla oksijen radikallerinin üretildiği organeldir. NO ve süperoksit arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit, süperoksit dismutaz enzimini inaktive edebilir ve mitokondriden kalsiyum salınımına neden olabilir. Her ne kadar ayrı bir izoform olarak tanımlanmış değilse de mtNOS dördüncü bir izoform olarak görünmektedir [3,14].

2.4. Nitrik Oksit Etki Mekanizması

NO bir çok biyolojik etkisini çözünebilir guanilat siklaz ve cGMP'yi aktive ederek gösterir [1, 9]. Hücrelerde cGMP sentezini katalizleyen farklı iki guanilat siklaz enzimi vardır; sitoplazmik (çözünebilir) guanilat siklaz enzimi ve zarsal guanilat siklaz enzimidir [3]. Zarsal guanilat siklaz enzimleri birer transmembran proteinidirler. Enzimin hücre dışına bakan bölgesi reseptör görevi görür ve guanilat siklazı aktive eden peptid ligandları bağlar. Reseptörün sitoplazmik bölgesi guanilat siklaz aktivitesine sahiptir. Sitoplazmik guanilat siklaz enzimini aktive eden faktörler kalsiyum aracılığı ile dolaylı yoldan etkilerini gösterirler. nNOS'un kalsiyum bağımlı aktivasyonu ile sentezlenen NO, sitoplazmik guanilat siklazın *hem* grubuna bağlanarak aktivasyonu sağlar [3]. cGMP farklı kinazları uyarır, potasyum kanallarını aktive eder ve sitozolik kalsiyumu düşürür [9]. Bu enzimin en önemli özelliği NO gibi yaygın bir sinyal molekülünün hedef proteini olmasıdır [3].

Sinyal iletimi için NO hem hücre içi hem de hücreler arası bir mesajcı molekül olarak fonksiyon görür. iNOS sitokinler, interferonlar, TNF ve LPS ile uyarılması ya da yapısal NOS'ların asetilkolin, bradikinin, trombin, kalsiyum, eksitatuvar amino asitler ve lökotrienler ile aktivasyonu NO sentezi ve seviyesini arttırır. NO'nın çok sayıdaki hedeflerinin içerisinde en önemlisi sitoplazmik guanilat siklazdır.

NO etkilerini sadece guanilat siklaz ile göstermez [3]. NO guanilat siklazı aktifleştirmesinin yanı sıra; iyon kanalları, çözünebilir ADP-ribozilasyon enzimleri ve direk gen transkripsiyonu ya da mRNA translasyonunu aktive veya deaktive

ederek de etkisini gösterebilir [9]. Örneğin makrofaj bağımlı sitotoksik etki, glutamat nörotoksitesi cGMP bağımlı değildir. Oysa NO'nin düz kaslardaki ve platelet agregasyonundaki etkileri doğrudan cGMP bağımlıdır [3].

Fizyolojik derişimlerde sentezlenen NO'nin etkisinde cGMP vazgeçilmez ara haberci bir moleküldür [3]. Normal hücrel koşullarda eNOS ve nNOS pikomolar, nanomolar derişimlerde nitrik oksit sentezi sağlarlar. Bu iki izoformun devamlı aktivasyonu ya da iNOS enziminin indüksiyonu, sentezin gerçekleştiği hücrelerde ve komşu hücrelerde nitrik oksitin mikromolar derişimlere çıkmasına neden olur. Böyle durumlarda hem NO'nin hem de cGMP'nin özgül olayan etkileri görölmeye başlar. NO'nin derişiminin artması ile oksijenle tepkimeleri hızlanır ve reaktif türleri oluşur. bu reaktif türler özellikle tiyollerin ve hemoproteinlerin modifikasyonuna neden olur; NO'n sitotoksik etkileri görölmeye başlar [3].

NO-cGMP sinyal iletim yolağı, çok sayıdaki biyolojik mesaj moleküllerine yine çok sayıda farklı hücrel cevapların bir tek sinyal iletim yolu kullanılarak nasıl temin edildiğine güzel bir örnektir. Bu sinyal iletim yolundaki düzensizliğin patolojik durumlarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Örneğin; hipertansiyon, koroner arter hastalığı, septik şok, impotans [3].

2.5. Nitrik Oksitin Difüzyonu ve Ortamdan Uzaklaştırılması

Vücutta üretilen nitrik oksiti ortamdan uzaklaştırmak için herhangi bir özel enzimatik koruma mekanizması yoktur. Bu durum NO'nin kalıcı ya da uzun ömürlü bir bileşik olduğu anlamına gelmez. Tam aksine NO reaktif özelliği nedeniyle protein yapıdaki ya da diğer çok çeşitli bileşiklerle tepkimeye girdiğinden, saniyelerle ifade edilebilecek bir ömre sahiptir [3]. NO'nin yarılanma ömrü bulunduğu dokuya göre değişmekle birlikte 30 saniyeden daha azdır [4]. NO'nin *in vivo*'da oksijeninkine benzer taşıyıcı bir molekülü de yoktur. NO'nin hidrofobik ortamdaki çözünürlüğü sudakinin 70 katı olması nedeniyle biyolojik zarları geçmek için herhangi bir engelle karşılaşmaz. NO' in difüzyonunu kısıtlayan tek faktör kendi reaktivitesidir [3].

Reaktif özelliği nedeniyle, üretildiği andan itibaren NO'nin tepkimeleri ve difüzyonu eş zamanlı olarak gerçekleşir. Üretilen NO hedef moleküllere bağlanabilir veya oksijen ve süperoksit ile tepkimeye girerek reaktif nitrojen türevlerini (NOx) oluşturabilir. Difüzyonla etkisini gösterebileceği komşu hücrelere veya dolaşıma

geçebilir. Alyuvarlara ulaşan NO, oksihemoglobin ile tepkimeye girerek nitrata oksitlenir. Bu son tepkimenin hızı difüzyon limitine yakın olup, NO'ı ortamdaki uzaklaştıran en etkili mekanizmadır. Nitrik oksit aerobik ortamda oksitlenerek kendi değişimini azaltır. Oluşan yeni nitrojen oksit türlerinin biyomoleküllerle tepkimesi çok hızlıdır ve bu türler sonunda nitrit ve nitrat gibi daha stabil türler oluştururlar [3].

NO'nun üretildiği kaynak ve değişimi ile difüzyonu ya da yarı ömrü arasında ters ilişki vardır. NO değişimi arttıkça oksidasyon tepkimeleri de hızlandığından yarı ömrü ve difüzyonu da azalır. Ancak oksidasyon tepkimeleri ile oluşan reaktif türleri biyomoleküllerle tepkimeye girdiğinden, NO üretimindeki artış NO'nun sitotoksik etkilerini de artırır [3].

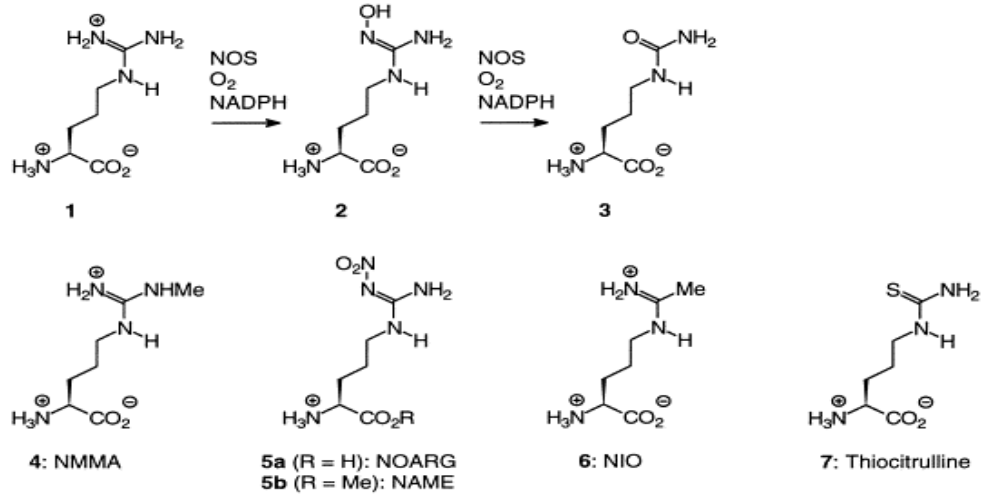
2.6. Nitrik Oksit Donör ve İnhibitörleri

NOS'un katalizlediği reaksiyonlarda L-arjinin tek fizyolojik nitrojen donörüdür, bu yüzden NO oluşum oranını L-arjinin belirler [1].

L-arjininden NO oluşumu, N-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME), N-nitro-L-arjinin (L-NA), N-amino-L-arjinin (L-NAA) ve N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) gibi ajanlar tarafından kompetitif olarak inhibe edilebilir [5]. Bu analoglar genellikle her üç izoformu da inhibe ederler. N-iminoetil-L-lizin (L-NİL) iNOS enzimini seçici olarak inhibe eder [3].

NOS inhibitörleri arasından etkileri en çok çalışılan N-metilarjinin (L-NMA) dır. Bu bileşik aktive olmuş makrofajların arjinin bağımlı sitotoksik etkilerini önler. Yüksek sıcaklıkta (100°C), asidik ve bazik pH'larda dayanıklıdır; sudaki çözünürlüğü yüksek, toksisitesi azdır. *In vivo* koşullarda 5 dakikadan sonra NOS'ı tersinmez olarak inhibe etmeye başlar [3].

Nitroarjinin (L-NNA) ile nitroarjinin metil ester (L-NAME) de L-NMA gibi arjininle yarışa girerek enzimi inhibe ederler. L-NAME, L-NNA'dan daha büyük bir afinite ile enzime bağlanır [3].



Şekil 2.2. (1-3) Nitrik oksit sentezi, (4-7) nitrik oksit sentez inhibitörleri [15].

Sitrülin analogları da NOS enzimlerini kompetitif olarak inhibe ederler. Bu analoglardan L-Tiyositrulin (L-TC), S-metil-L-tiyositrulin (L-SMTC)'in enzime afiniteleri arjininden de fazla olabilir [3].

2.7. Nitrik Oksit İnhibitörlerinin Önemi

Farklı NOS izoenzimleri normal koşullarda ve hastalıklarda, farklı dokularda birbirinden farklı amaçlarla NO sentezlerler. Bu nedenle izoenzimlere özgül inhibitörlerin kullanımı, hastalığın tedavisi sırasında komplikasyonlara neden olmaması için önemlidir [3].

NOS inhibitörleri *in vivo* NO sentezini kontrol etmek amacı ile normal ve patolojik durumlarda da kullanılmıştır. Normal koşullarda inhibitörlerin kullanılması, NO-bağımlı olayların inhibisyonuna neden olacağından; NO'nun fizyolojik fonksiyonlarının tanımlanmasına yardımcı olur. Patolojik durumlarda kullanılmasının amacı ise, artan NO sentezinin toksik etkilerine karşı doku ve hücreleri korumaktır. Fizyolojik değişimin üzerinde NO sentezi her üç NOS izoformunda da görülür. Serebral iskemide kontrolsüz artan kalsiyum, nNOS'u aktive ederek beyinde toksik etkilere neden olabilir. Çeşitli anaflaktik reaksiyonlarda aktive olan eNOS vazoaaktif NO sentezini artırabilir. Çok daha yaygın olan artan NO sentezinin nedeni iNOS izoformudur. iNOS enzimi sentezlendikten sonra aktivitesi kontrol edilemez ve lokal olarak NO değişimini çok artırabilir (10-100 mikromol'a kadar). iNOS'dan kaynaklanan NO, damar geçirgenliğini artırır ve septik şokta

olduğu gibi hipotansiyona neden olur. Diyabet, romatoid artrit, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda doku yıkımına yol açar [3].

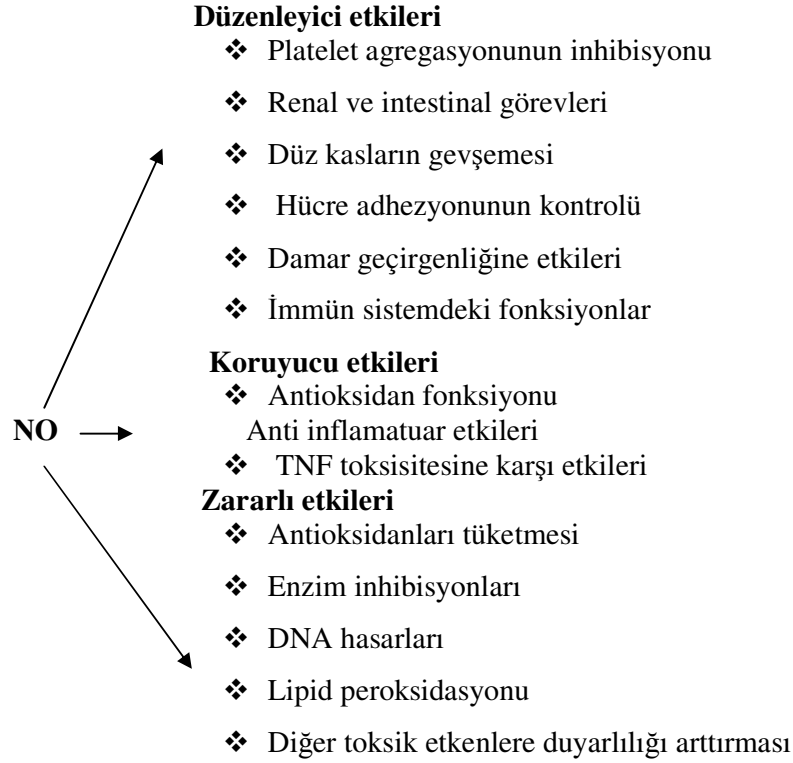
2.8. Nitrik Oksitin Fizyolojik ve Patolojik Etkileri

NO çok yönlü bir biyolojik haberci molekül olup, farklı biyolojik etkilere sahip olabilen bir kimyasal türdür. NO başlangıçta çeşitli biyolojik işlevlerin düzenlenmesinde görev alan, hücre içi ve hücreler arası bir haberci molekül olarak tanımlanmıştır. Bu görevlere tipik örnek olarak sinir sistemindeki nörotransmitter fonksiyonu ve damar düz kaslarının gevşemesine olan etkileri sayılabilir. Daha sonraki çalışmalarda, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmaları ve inflamasyon olan dokulara göç etmesinde, platelet agregasyonunun inhibisyonunda, damar geçirgenliğinin kontrolünde, penil ereksiyonda, immün sistem işlevlerinde, barsaklar ve böbreklerde tuz ve su emiliminde de NO'nin düzenleyici fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Bu gün bilindiği kadarı ile, vücudun hemen her hücresinde NO ile kontrol edilen çok sayıda tepkime ve fonksiyon vardır. Bu nedenle vücudun her hücresinin NO'nin hedefi olduğu söylenebilir [3].

NO'nin sentezlendiği yer ve ortamdaki derişimi, kendisinin hangi tür tepkimelere gireceğini ve ne gibi biyolojik etkilere sahip olacağını belirleyen ana faktördür. Vücut için yararlı ya da zararlı etkilerinden hangilerinin gözleneceği, bu molekülün nerede ve ne kadar üretildiğine bağılıdır [3].

NO'nin düşük derişimlerinde (1 mikromol'un altında) gözlenen etkileri “doğrudan etkileri” olarak adlandırılır. Şekil 2-2. de özetlenen koruyucu ve düzenleyici etkileri NO'nin doğrudan etkileri grubuna girer. Düşük derişimdeki NO daha uzun ömürlüdür ve oksijen ile tepkimeleri daha yavaştır. NO'nin bu kimyasal özelliği doğrudan etkilerinin gerçekleşmesini sağlar [3].

NO'nin fizyolojik fonksiyonları için gerekli olan derişiminin üstündeki yüksek derişimde (1 mikromol'un üstünde) görülen etkileri ise “dolaylı etkileri” diye adlandırılır. NO'nin derişiminin artması ile oksijenle tepkimeleri hızlanır. Ancak NO'nin oksijenli ortamda oksidasyonu ile reaktif türler oluşur. Bu reaktif türler biyolojik moleküllerle tepkimeye girerek dolaylı etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. NO'nin kendisinin biyomoleküllerle tepkimeleri doğrudan etkilerini oluştururken; NO'ten kaynaklanan reaktif türlerin tepkimeleri dolaylı etkilerini oluşturur [3].



Şekil 2.3. NO'in çok yönlü etkileri [3].

2.8.1.Nitrik oksitin damar sistemi üzerine etkileri

2.8.1.1.Nitrik oksitin damarlar üzerine etkileri

Nitrik oksit, kalp damar sistemi homeostazisinin düzenlenmesinde etkili en önemli aracı moleküllerden biri olarak bilinmektedir [16]. Damar endotel hücreleri bazal seviyede NO üretmekte ve böylece damar geçirgenliğinin belli bir düzeyde tutulmasını sağlamaktadır. Küçük çaplı arter ve arteriyoller büyük çaplılara göre daha fazla miktarda NO üretmektedirler. Venlerde bazal NO üretimi arterlere oranla çok daha azdır. Bu bulgular NO'in damar düz kas hücrelerinin gerginliğini ve periferel direnci düzenlediği, böylece kan basıncının kontrolüne önemli bir katkıda bulunduğunu göstermektedir [16].

Hipertansiyon çeşitlerinin çoğunda, artmış olan kan basıncıyla birlikte endotel bağımlı gevşemede azalma meydana gelmektedir. Nitrik oksit sentezinin nitrik oksit inhibitörleriyle engellenmesi belirgin bir şekilde damar daralmasına ve kan basıncının artmasına neden olmaktadır [16,17].

NO sadece sistemik dolaşımın regülasyonunu sağlamakla kalmaz ayrıca kalp, karaciğer, beyin gibi organlarda lokal dolaşımı da sağlar. Nonkolinerjik ve

nonadrenerjik terminallerden salınan NO, vazodilatatör etkiyle kan basıncı ve akışını düzenlemektedir [17].

2.8.1.2. Nitrik oksitin platelet agregasyonu üzerine etkisi

Endotelial hücrelerin başlıca fonksiyonu damar koruyucu ve pıhtılaşmayı engelleyici moleküllerin üretimidir. Bazı moleküller, yapısal olarak sürekli salınırken, bazıları ise bir uyarana cevap olarak üretilir. NO, endotel hücre yüzeyinden salınan ve platelet agregasyonunu baskılayan önemli bir moleküldür. NO, trombin oluşumunun kontrolü ve kan akışkanlığının sağlanmasında oldukça önemli bir rol oynar. In vitro uygulanan NO, plateletlerden zengin plazmada ve tam kanda çeşitli pıhtılaşma faktörlerinin uyardığı agregasyonu engellemiştir. NO, kümeleşmiş plateletlerin dağılmalarına neden olur, plateletlerin, nötrofillerin ve monositlerin adhezyonlarını inhibe eder ve kemotaksislerini düzenler. Kan akımının sağlanması ve trombozdan kaçınılması için plateletlerin kümeleşme ve homeostatik tıkaç oluşturma özellikleri çok iyi dengelenmelidir. Damar lümenine doğru salınan NO difüzyonla plateletlere girerek guanil siklazı aktive eder ve damar düz kas hücrelerindeki benzer biçimde platelet içi Ca^{2+} yoğunluğunu azaltarak plateletlerin yapışması, kümeleşmesi ve etkinliğini engeller [16].

2.8.1.3. Nitrik oksitin damar düz kası hücrelerinin çoğalmasına etkisi

Damar boşluğuna, damar düz kası hücrelerinin çoğalmalarını engelleyici ve uyarıcı aracı maddeler salınmaktadır. Fizyolojik koşullarda, çoğalmayı engelleyici maddeler sayesinde damar düz kası katmanı kalınlığının sabit kalması sağlanmaktadır. Heparan sülfat ve nitrik oksit damar düz kas hücrelerinin göçünü ve çoğalmasını engelleyen güçlü inhibitörlerdir [16,18]. Damar lümeninde, aynı zamanda, endotel hücrelerinin çoğalmalarını uyarıcı epidermal büyüme faktörü, platelet kökenli büyüme faktörü ve anjiyotensin II gibi çeşitli büyüme faktörleri de bulunmaktadır. NO gibi hücre çoğalmasını engelleyici maddelerin eksikliğinde çoğalmayı baskılayıcı etki ortadan kalkmakta ve damar düz kası hücreleri miktarında artış meydana gelmektedir. Bu durum, damar boşluğunun daralmasıyla birlikte şekillenen kalp-damar hastalıklarının temelini oluşturmaktadır [16].

Endotel hücreleri sürekli olarak yaralanmalarla karşı karşıyadır. Özellikle yağlar, immun bileşikler, mikroorganizmalar, toksinler, kan damarları bütünlüğünün ve kan bileşimi homeostazisinin bozulmasında etkili başlıca nedenlerdir. Endotel

yaralanmaları sonucunda; NO gibi koruyucu moleküllerin salınımının azalmasıyla yaralı damar bölgesindeki intima katında plateletlerde, monositler, nötrofiller, kolesterol gibi adheziv moleküller birikmeye başlar [16,18]. NO yokluğunda düz kas hücre aktivasyonu artar ve sonuç olarak hücre proliferasyonu aterosklerozise kadar ilerler. Endotel işlevsizliği ile birlikte NO miktarında meydana gelen azalma arterlerde, özellikle de koroner arterlerde damar gerginliğinde artış ve vazospazm oluşumuna neden olur. Kalp kasını besleyen damarlarda aterosklerotik değişiklikler trombozun da yardımıyla damar lümeninde daralmaya ve sıklıkla miyokard infarktüsü ve kalp krizine neden olmaktadır [16].

Yaşlanma, bilinen kalp-damar hastalıkları risk faktörlerinin yokluğunda bile meydana gelen bir süreçtir. Bu süreç, artan oksidatif strese karşı meydana gelen hücresel cevaplarla veya damar üzerine etkili aracı maddelerin salınımlarının bozulması gibi diğer faktörlerle ilişkili olarak meydana gelebilmektedir. Yapılan birçok çalışmada, endotel bağımlı gevşemenin yaşlanmayla birlikte azaldığı bildirilmektedir. Endotel bağımlı gevşemede meydana gelen bozulma NO'in bazal ve uyarımla oluşan salınımının azalması ile meydana gelmektedir [16].

2.8.2. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksit

NO akut inflamatuvar olaylarda hem koruyucu hem de hasarlayıcı bir molekül olarak etki gösterebilir. NO vazodilatasyonu artırır, ödem oluşturur ve hassas sinir uçlarını etkiler. Tüm bu etkiler inflamatuvar yanıtın önemli göstergelerindendir. Glikokortikoid ve NOS inhibitörleri ile yapılan tedaviler inflamasyonun şiddetinin azaltılmasında etkili olmaktadır [4].

Travma durumunda ise ekstrahepatik arjinaz I ekspresyonu ve aktivasyonu artarken NO sentezi azalır. Endotelden salınan NOS ile sentezlenen NO, damarların gevşemesi, platelet agregasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu engelleyerek, travma sonrasında organlarda kan akımının sürdürülmesini sağlar [4].

Bakterilerin salgıladıkları endotoksinlerin etkisi sonucu dolaşımın zayıflaması ve kan basıncının düşmesi sonucu oluşan durum septik şok olarak tanımlanmaktadır. Sepsisli hastalarda, damar gerginliğinde bir azalma ile birlikte, idrarda nitrik oksitin parçalanma ürünleri olan nitrit ve nitrat miktarındaki artış, septik şokta kalp-damar sisteminde meydana gelen değişimlerin nitrik oksit kaynaklı olduğunu düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda, endotoksinlerin başlangıçta

endotelial NOS kaynaklı NO ve ardından da fazla miktarda iNOS kaynaklı NO salınımına neden olarak hipotansiyon meydana getirdiği belirlenmiştir [16].

2.8.3. Nitrik oksit'in sinir sistemine etkileri

NO'in nörotransmitter işlevine ilişkin en belirgin kanıtlar periferik sinir sistemi üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. nNOS seçici olarak miyenterik pleksusa lokalize olmuştur. Miyenterik nöronların depolarizasyonu, peristaltizm ile ilişkili düz kasların gevşemesine neden olur. nNOS'ın seçici olarak NOS inhibitörlerince bloke edildiği çalışmalarda; NO'in gastrointestinal traktusta nonadrenerjik-nonkolinerjik (NANC) bir nörotransmitter olduğu gösterilmiştir [2].

NO, serebral kan damarlarında yine bir NANC nörotransmitter gibi işlev görür. Serebral kan damarlarının adventisiasının en dış kısmında NOS içeren otonomik sinir hücreleri vardır. Serebral kan akımının kontrolü hem damar endotelinden hem de otonomik sinirlerden salgılanan NO ile sağlanır [2].

NO, merkezi sinir sisteminde (MSS) ilk olarak 1988 yılında Gartweith ve arkadaşları tarafından serebellar granüler hücrelerinde, bu hücrelerin glutamat agonistlerince uyarıldıklarında, NO salgılandığının gözlenmesi sonucu bulunmuştur [2].

NO ve sinyal iletim yolağı beyinde apoptozis, diferansiasyon, sinaptik plastisite, nörosekresyon ve beyin gelişimi gibi hücresel fonksiyonlarda önemli bir moleküldür. NOS aktivitesinin düzenlenmesi normal beyin fonksiyonlarının yerine getirilmesi, nöronal dejenerasyon ve nöron ölümü için kritiktir [19].

NO serebellumda en yüksek, medullada ise en düşük yoğunlukta bulunmaktadır [2,20]. Hipotalamus, orta beyin, striatum, hipokampus ve kortekste de aktivite gösteren NO; MSS'de serebral damar endotel hücreleri, immünolojik olarak uyarılabilen mikroglia ve astrositler, NANC sinirler ve glutaminerjik nöronlar olmak üzere başlıca dört kaynaktan salınır [20].

Normalde inaktif olan NOS presinaptik ve postsinaptik reseptörlerin uyarılması ile aktive olur. Postsinaptik reseptörlerin serotonin, bradikinin, endotelin, asetilkolin ve noradrenalin gibi nörotransmitter ve nöromodülatörlerle uyarılması kalsiyumun hücre içine akımına neden olur. Artan hücre içi kalsiyum nNOS'u aktive eder. Serebellar granül hücreleri, NO için ana kaynağı oluştururlar. Oluşan NO , NO

sentez aktivitesi olmayan serebellar astrositlere de difüze olarak guanilat siklazı aktive eder [20].

Hipokampüste NO, cGMP üzerinden NMDA reseptör aktivasyonu ile oluşan LTP'den sorumludur [2,20]. Glutamat, NMDA reseptörlerini aktive ederek öğrenme ve belleğin temeli olan LTP'yi NO üreterek oluşturur. Ancak glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılımı sonucunda fazla miktarda oluşturulan NO'nin nörodejeneratif hasarlanmalara neden olduğu ileri sürülmektedir. Eksitator amino asitlerin beyin gelişimi, öğrenme ve hafıza üzerine olan etkilerine NO'nin aracılık ettiği gösterilmiştir [20].

NO'nin hipotalamo-hipofizeal aksta rol oynadığı bildirilmiştir. Beyine enjekte edilen NO donörleri CRH salınımını arttırdığı gözlenmiştir [21].

NO, MSS'de serebrovasküler sistemin düzenlenmesi, serebral iskemi, felç, öğrenme, hafıza, iştah, koku alma, susama, ağrı duyumsaması, alkolün neden olduğu beyin hasarı, Alzheimer ve Huntington hastalarındaki nörotoksisite gibi bir çok fizyolojik ve patolojik olaylarda rol almaktadır [20].

2.8.4. Nitrik oksitin immün sistem üzerine etkileri

NO immün cevabda yeralan en önemli moleküllerden biridir [6]. NO NK (naturel killer) hücreleri, mast hücreleri, fagositik hücreler (monositler, makrofaj hücreleri, mikrogliya hücreleri), Kupffer hücreleri, ezonofiller ve nötrofiller gibi birçok immün sistem hücreleri tarafından üretilmesinin yanı sıra; endotel hücreleri, epitel hücreleri, damar düz kas hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, kondrositler, hepatositler, mezengial hücreler ve Schwann hücreleri gibi immün reaksiyonlarda rol alan birçok hücrede de sentezlenmektedir [21].

İmmün sistemde NO, anti-mikrobiyel aktivite, anti-tümör aktivite, anti-inflamatuar aktivite, immün baskılayıcı aktivite, sitokin, kemokin ve büyüme faktörü üretimi ve modülasyonu, T-helper hücrelerinin indüksiyonu ve diferansiasyonu gibi fonsiyonu vardır. Ayrıca sadece iNOS değil nNOS ve eNOS'ta apoptozis, hücre adezyonu, otoimmünite, anti-mikrobiyel savunma gibi immünolojik oluşumlarda yer aldığı bilinmektedir [21].

2.8.5. Nitrik oksitin apoptotik etkileri

Hücre tipine bağılı olarak NO proapoptik ya da antiapoptik etkilere sahiptir. Endotel hücrelerde, hepatositlerde ve nöronlarda antiapoptotik etkili olan NO; düz kas hücrelerinde ve tümör hücrelerinde proapoptotik etkilere sahiptir [3].

NO'nin apoptotik etkileri genel olarak cGMP/protein kinaz G sisteminden bağımsızdır. Düz kas hücrelerinde iNOS indüksiyonu ile sentezlenen NO p53 tümör baskılayıcı proteinin sentezini arttırarak apoptosise neden olur.

NO transkripsiyon sırasında ve transkripsiyon sonrasındaki bazı etkenleri ile apoptosisi baskılayabilir. Örneğin NO karaciğerde antiapoptotik bazı proteinlerin sentezini indükler [3].

Apoptotik sinyal iletiminin anahtar proteini kaspaz enzimleridir. TNF- α ile uyarı, Fas-reseptör aktivasyonu, büyüme faktörlerinin yokluğu durumlarında kaspaz enzimleri aktive olurlar. NO kaspaz enzimlerinin yukarıdaki sinyal iletim yolları ile aktivasyonunu inhibe eder [2]. NO mitokondrileri de stabilize ederek apoptosisi baskılar [3].

NO'nin proapoptik ya da antiapoptik etkilerinden hangisini göstereceği ortamdaki NO derişimine bağılıdır. eNOS tarafından sentezlenen NO antiapoptotik etkilere sahiptir. Yüksek derişimde NO sentezi iNOS enzimi tarafından ve aşırı uyarı durumlarında nNOS enzimi tarafından sağlanır. Bu nedenle iNOS ve nNOS enzimi tarafından sentezlenen NO proapoptotik etkilere sahiptir [3].

3. DİŞİ ÜREME SİSTEMİ ve NİTRİK OKSİTİN DİŞİ ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

3.1. Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi iki ovaryum (yumurtalık) ve kadın üreme kanalından (iki adet fallop tüpü, uterus, serviks ve vajina) meydana gelir [22].

Dişi gametin (yumurtanın) gelişmesi ve ovaryumdan salgılanması (ovulasyon, yumurtlama) periyodiktir. Kadın üreme sisteminin yapısı ve fonksiyonları bu ovaryum döngüleri ile birlikte senkronize edilir. Bu periyodik değişiklikler menstrüel döngü olarak adlandırılır. Menstrüel döngünün süresi bir kadından diğerine önemli farklılık gösterir, fakat genellikle 28 gün olarak kabul edilir. Menstrüasyonun ilk günü, birinci gün olarak belirlenir [22].

Menstrüel döngü sırasında görülen en önemli olay, menstrüel sekresyonların kaynağı olan uterusda meydana gelen değişiklikler sonucu görülen menstrüasyondur. Bununla beraber, uterusda görülen bu menstrüel değişiklikler ovaryumlardan salgılanan hormonlardaki periyodik dalgalanmalar nedeniyle olur. Ovaryumlar aynı zamanda gametlerin olgunlaştığı yerdir [22]. Sonuç olarak iki önemli olay görülür; ilk olarak, normalde, her ay overlerden tek bir olgun yumurta sentezlenir. İkinci olarak, uterus endometriyumunu, ayın belirli günlerinde, döllenmiş yumurtanın yerleşmesi için hazırlar [23].

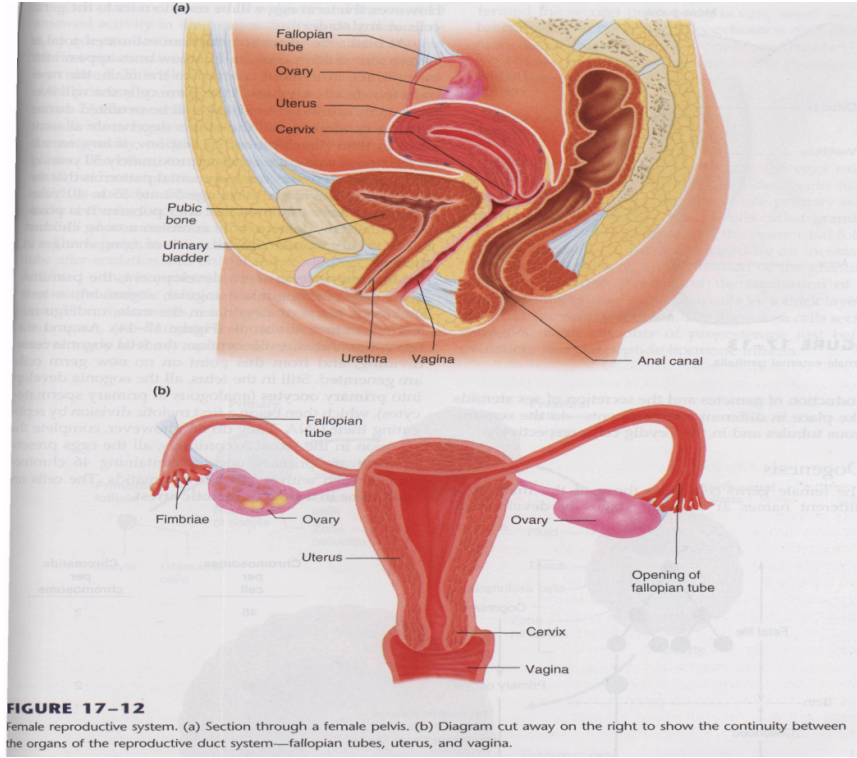


FIGURE 17-12
Female reproductive system. (a) Section through a female pelvis. (b) Diagram cut away on the right to show the continuity between the organs of the reproductive duct system—fallopian tubes, uterus, and vagina.

Şekil 3.1. Dişi üreme sistemi (a): pelvisi enine kesiti, (b) üreme organları (fallop tüpleri, uterus ve vajina) arasındaki anatomik ilişki [22].

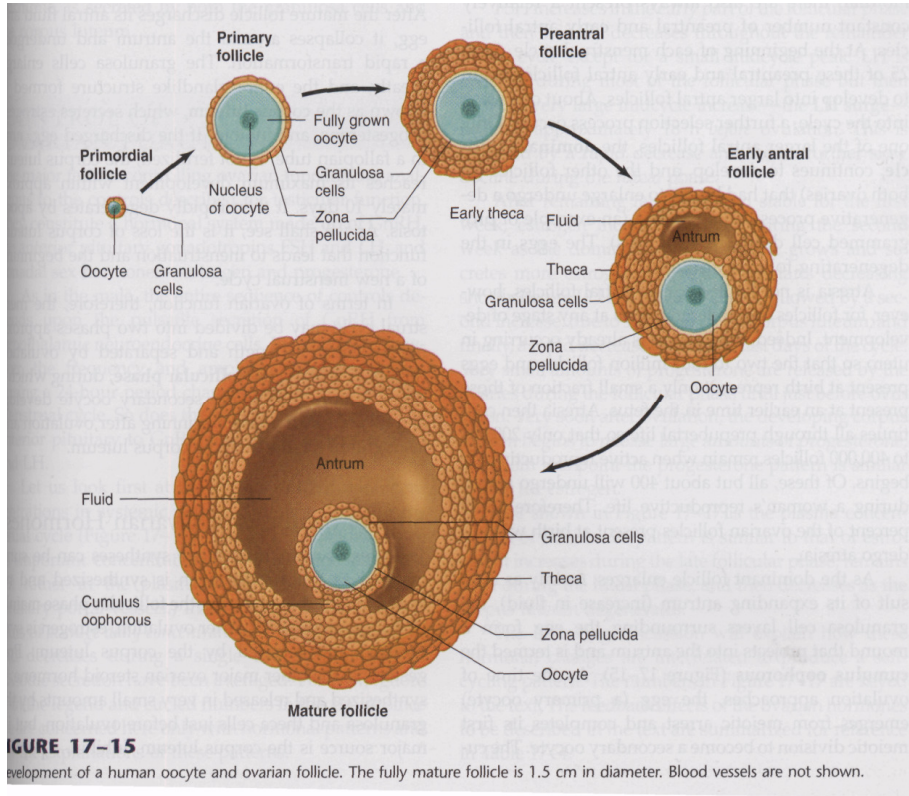
3.2. Over Döngüsü

Ovaryumların bir çok fonksiyonları vardır:

- Oogenez: fetal dönemde gametlerin üretimi
- Oosit oluşması
- Olgun oositin dışarı atılması (ovulasyon)
- Kadın cinsiyet hormonlarının (östrojen ve progesteron) ve ayrıca hormon inhibinin saklanması [22].

Doğumda ovaryumlar yaklaşık olarak iki ile dört milyon yumurta içerirler, ve doğumdan sonra artık yenilenmez. Bu nedenle belirgin şekilde erkektekinden farklı olarak, yenidoğan dişi tüm yaşamı boyunca sahip olacağı germ hücrelerine sahiptir. Sadece bir kısmı, 400 kadarı, bir kadının yaşamı boyunca ovulasyonla atılır. Diğerlerinin tamamı gelişmeleri sırasında dejenere olur, bir kadın 50 yaşına geldiğinde ovaryumlarında sadece birkaç tane yumurta kalmıştır veya hiç yoktur [22].

Ovaryumlardaki tüm yaşamları boyunca yumurtalar, folikül adı verilen yapılar içinde bulunurlar [22]. Doğumdan itibaren over kapsülü altında her biri olgunlaşmamış bir oosit içeren pek çok primordiyal folikül vardır [7]. Primordiyal folikül aşamasından sonraki gelişme, oositin büyümesi, granuloza hücrelerinin birçok tabaka oluşturması ve oositin kalın bir zarla (zona pellusida) granuloza hücrelerinin iç yüzeyinden ayrılması ile karakterizedir. Granuloza hücreleri östrojen, ovulasyondan önce az miktarda progesteron ve inhibin salgılarlar [22].



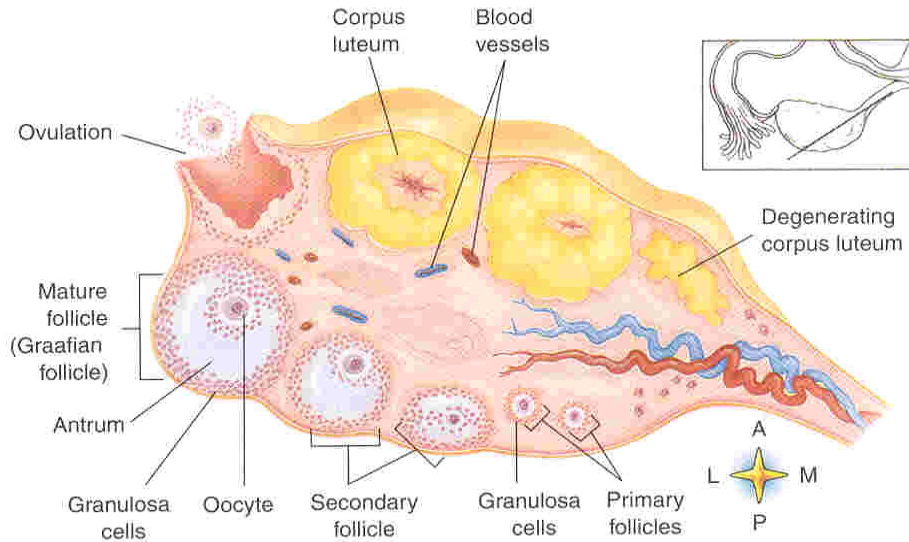
Şekil 3.2. İnsan oosit ve ovaryum folikülünün büyümesi [22].

Granuloza hücrelerinin mitoz bölünmesi ile folikül büyürken, granuloza hücrelerini çevreleyen bağ dokusu hücreleri farklılaşarak teka olarak bilinen tabakaları oluştururlar. Bu tabaka granuloza hücrelerinin androstenoidlerin salgılamasında önemli rol oynar. Bu aşamadan kısa bir süre sonra primer oosit tam büyüklüğüne ulaşır ve sıvı sekresyonunun sonucu olarak granuloza hücrelerinin ortasında içi sıvı ile dolu bir boşluk (antrum) oluşur [22].

Antrum büyümesinin sonucu olarak baskın folikül genişledikçe, yumurtayı çevreleyen granuloza hücreleri antrum içerisine doğru bir uzantı oluşturur ki buna kümülüs ooforus adı verilir (Şekil 3.2). Ovulasyon zamanı yaklaştıkça, yumurta

(primer oosit) ilk mayoz bölünmesini tamamlayarak sekonder oosit olur. Kümülüs folikül duvarından ayrılır ve oosit antrum sıvısı içerisinde serbestçe yüzmeye başlar. Graf folikülü olarak da adlandırılan olgun folikül o kadar büyür ki (yaklaşık 1.5 cm çapında) sonunda ovaryum yüzeyinden balon gibi patlayarak dışarı çıkar [22].

Ovulasyon anında çatlayan folikül hemen kanla dolar ve korpus hemorajikum adı verilen yapıya dönüşür. Folikülü çevreleyen granuloza ve teka hücreleri hemen çoğalmaya başlar ve pıhtılaşmış kanın yerini hızla sarımsı ve lipitten zengin luteal hücreler alarak korpus luteum meydana gelir. Menstrüel döngünün, luteal hücrelerin östrojen ve progesteron salgıladığı luteal fazı başlar [7].



Şekil 3.3. Ovaryumda folikülün gelişme evreleri, korpus luteum oluşumu ve folikül atrezisi [22].

3.3. Ovaryum İşlevlerinin Kontrolü

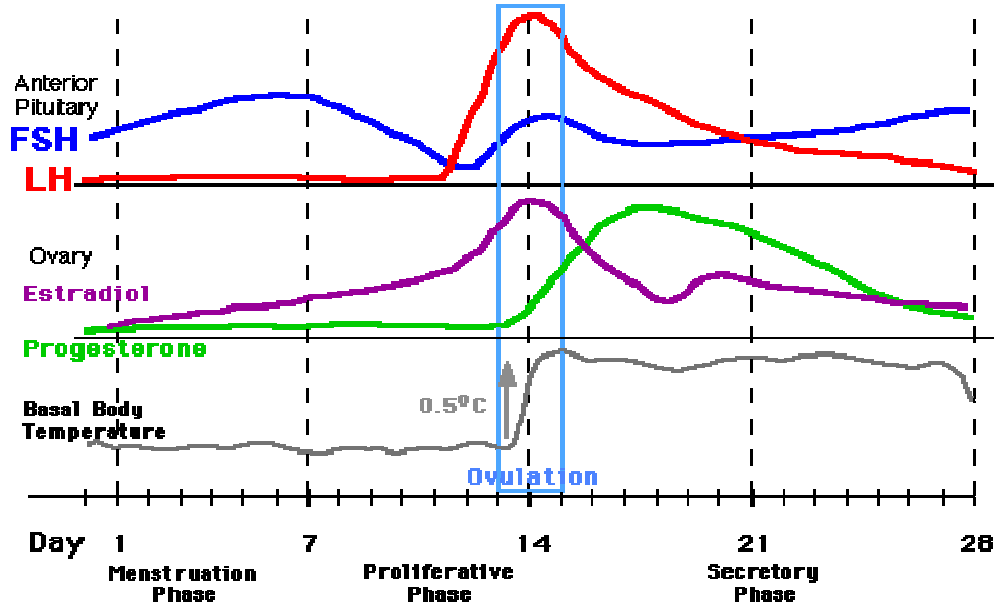
Ovaryum fonksiyonlarını kontrol eden en önemli faktörler GnRH, ön hipofiz gonadotropinleri (LH ve FSH) ve gonadal cinsiyet hormonlarının (östrojen ve progesteron) oluşturduğu hormonal sistemdir. Hormonal kontrol zinciri hipotalamustaki nöroendokrin hücrelerin dalgalı (pulsatil) GnRH sekresyonuna bağlıdır. Bununla birlikte, kadında bu dalgaların 24 saatlik salınım sıklık ve yüksekliği menstrüel döngü boyunca değişir. Hipofiz bezinin GnRH'ya ve ovaryumların FSH ve LH'a duyarlılıkları da benzer şekilde değişiklik gösterir [22].

FSH ve LH overlerdeki hedef hücrelerini, hücre zarlarında bulunan son derece özgül reseptörlere bağlanarak uyarırlar. Aktive olan reseptörler, bu hücrelerde hem salgı, hem de büyüme hızını arttırırlar. Bu uyarıcı etkilerin hemen hepsi hücre

sitoplazmasındaki ikinci haberci cAMP sisteminin aktivasyonu sonucu protein kinaz oluşumuna ve gonadal hormonların sentezini uyarmasına bağlıdır [23].

FSH foliküler evrenin ilk bölümünde yükselir ve sonra döngünün geri kalan sürecinde sabit bir oranda azalma gösterir (döngü ortasında küçük bir artış hariç). Foliküler evrenin büyük kısmında LH sabit oranda salgılanır, fakat daha sonra, ovulasyondan yaklaşık 18 saat önce “LH patlaması” adı verilen ve döngü ortasına rastlayan büyük bir artış gösterir. Bu en yüksek (pik) salgılanmadan sonra LH düzeyi hızla düşer ve daha sonra azalma süreci luteal evre boyunca devam eder [22].

Birinci hafta boyunca oldukça düşük ve sabit miktarda salgılanan östrojen, ikinci hafta dominant ovaryum folikülünün büyümesi ve daha fazla salgı yapması sonucu çok hızlı bir artış gösterir. Korpus luteum salgısı nedeniyle östrojen luteal evrede ikinci bir artış gösterir ve döngünün sonuna doğru hızla azalır. Foliküler evrede, ovulasyona kadar, ovaryumlar çok az miktarda progesteron salgırlar. Ovulasyondan sonra ise oluşan korpus luteum bol miktarda progesteron salgılamaya başlar [22].

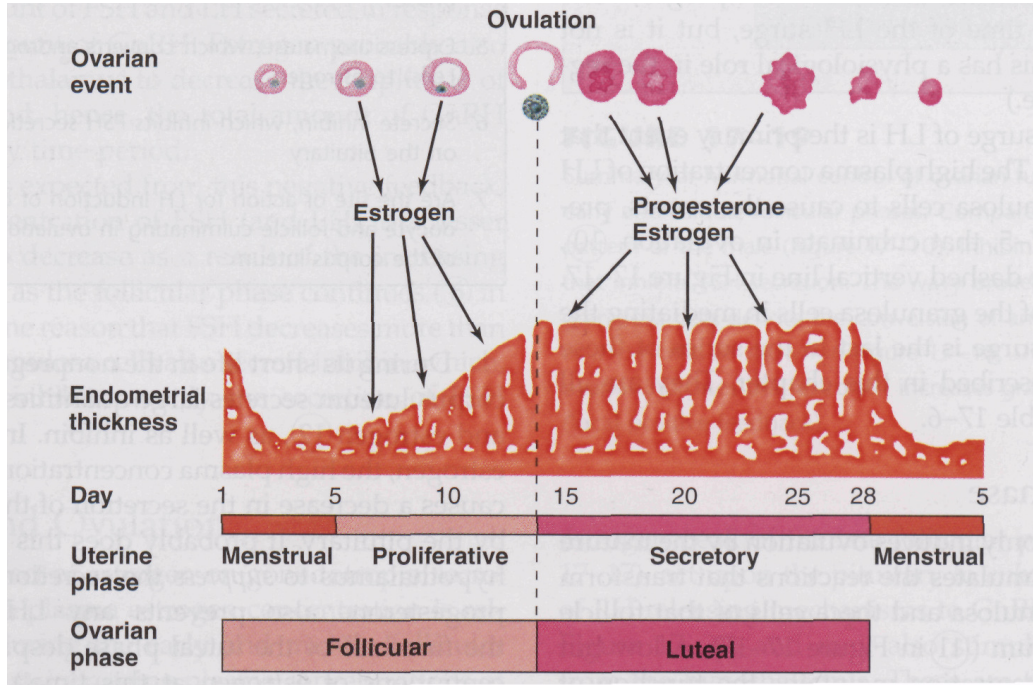


Şekil 3.4. Menstrüel döngü boyunca hormonal değişimler [24].

3.4. Uterus Döngüsü

Menstrüel döngünün evreleri, uterusda meydana gelen değişikliklere göre de tanımlanabilir (şekil 3.5). Menstrüel kanamanın görüldüğü gün birinci gün olarak

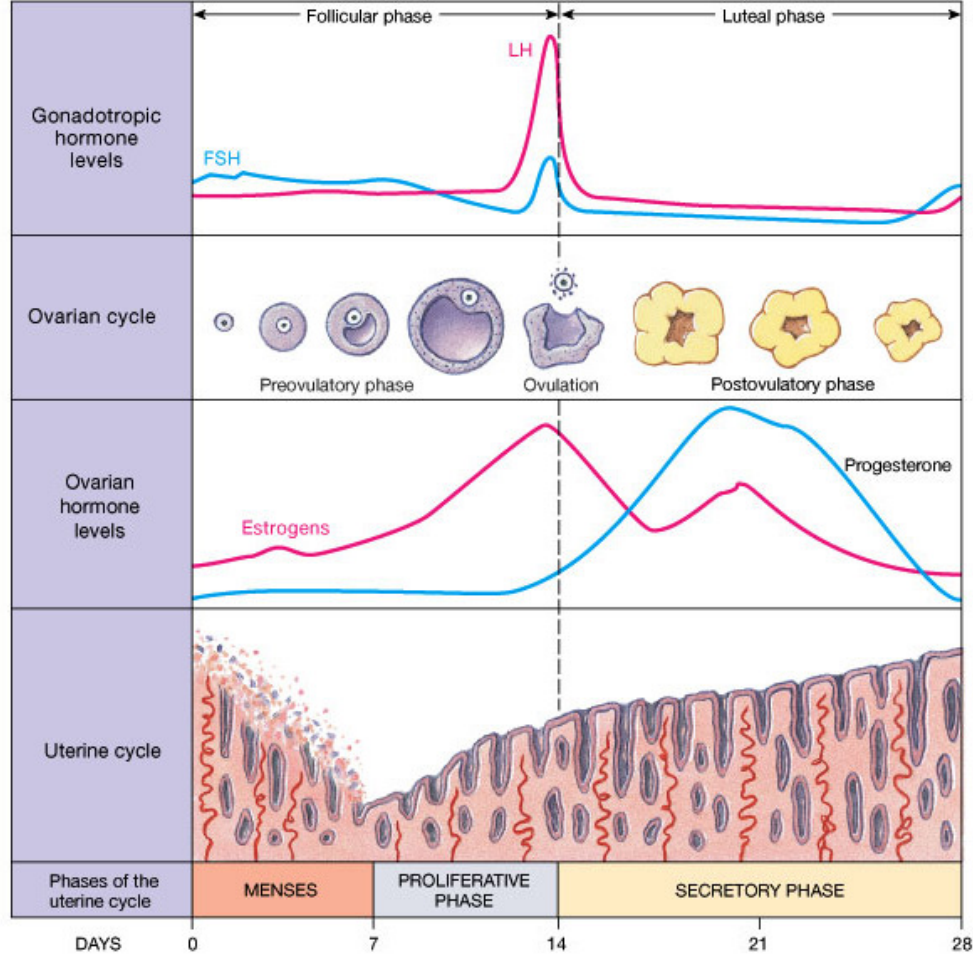
kabul edilir. Menstrüasyon görülen zaman dilimine menstrüel faz (tipik 28 günlük bir döngüde 3-5 gündür). Bu süre zarfında uterus epitel yüzeyi (endometriyum) dejenere olur ve menstrüel akıntı haline gelir. Bu evrenin sonunda menstrüel akıntı tamamen durur ve uterus endometriyumu östrojenin etkisi altında yeniden kalınlaşmaya başlar. Bu büyüme dönemi (proliferatif evre), menstrüasyonun sonu ile ovulasyon arasındaki bölümde yaklaşık 10 gün sürer. Uterus endometriyumu ovulasyondan hemen sonra progesteronun ve östrojenin etkisi altında salgı (sekresyon) aktivitesini artırır. Bu nedenle, menstrüel döngünün ovulasyon ile menstrüasyon başlangıcı arasındaki kısma sekretuar (salgılama) evresi denir [22].



Şekil 3.5. Menstrüel döngü boyunca ovaryum ve uterus değişiklikleri arasındaki ilişki [22].

Uterustaki bu değişiklikler, plazma östrojen ve progesteron düzeylerindeki dalgalanmalar nedeniyle meydana gelir. Proliferatif dönemde, plazma östrojen değerlerinin yükselmesi hem endometriyumun hem de alttaki düz kas tabakasının (myometriyumun) büyümesini uyarır. Östrojen ayrıca, endometriyum hücrelerinde progesteron reseptörlerinin sentezinin artmasını da sağlar. Daha sonra ovulasyonu ve korpus luteum oluşumunu (sekresyon fazı sırasında) takiben, östrojen tarafından hazırlanmış endometriyum üzerine etki ederek aktif bir sekresyon dokusuna

dönüştürür: endometrial bezlerin kıvrımları artar ve glikojenle dolar, kan damarı sayısı artar, enzimler bez ve bağ dokusunda birikir [22].



Şekil 3.6. Menstrüel döngü sürecinde uterus değişiklikleri ve hormonal değişiklikler arasındaki ilişki [25].

Korpus luteumun yıkılması sonucu plazma progesteron ve östrojen seviyelerinin azalması, oldukça kalınlaşmış olan endometriyumu hormonal destekten yoksun bırakır ve menstrüasyona neden olur. İlk olarak uterus kan damarları güçlü bir şekilde vazokonstriksiyon yapar, ve böylece endometrial hücrelere oksijen ve besin taşınması azalır. En altta bulunan ve endometriyumu bir sonraki döngüde yenileyecek olan ince bir tabaka hariç, uterus yüzeyinin tamamında ayrışma başlar. Aynı zamanda, uterus düz kasları da ritmik kasılmaya başlar. Vazokonstriksiyondan sonra endometrial arteriyoller genişler ve zayıflamış damar duvarlarından

hemorajiye neden olur. Menstrüel akıntı bu kan ve endometriyal hücre atıklarından oluşur. Bir menstrüel döngü sırasında meydana gelen kan kaybı ortalama 50 ile 150 ml kadardır [22].

3.5. Estrus Döngüsü

Primatlar dışındaki memelilerde menstrüasyon görülmez ve bunlardaki cinsel döngüye estrus döngüsü adı verilir. Bu adlandırma, normalde dişinin cinsel ilgisinin uyandırılabilirdiği tek zaman olan ovulasyon anındaki belirgin “kızışma” (estrus) dönemine bağlıdır. Sıçan gibi, estrus döngüsü olan, ovulasyonun kendiliğinden geliştiği türlerde, düzenli vajinal kanama gerçekleşmez, fakat altta yatan endokrin olaylar aslında menstrüel döngüdekilerle aynıdır [7].

Rat estrus siklusu ortalama 4-5 gün sürmektedir. Estrus siklusu laboratuvar kolonilerinde mevsimden bağımsız olarak yıl boyu sürmektedir. Siklus 4 dönemi kapsar [26].

Proestrus: Foliküler gelişme dönemidir. 12 saat sürer ve maksimum östrojen seviyesine ulaşılır. Bu evrenin sonunda dişi erkeği kabul etmeye başlar [26,27].

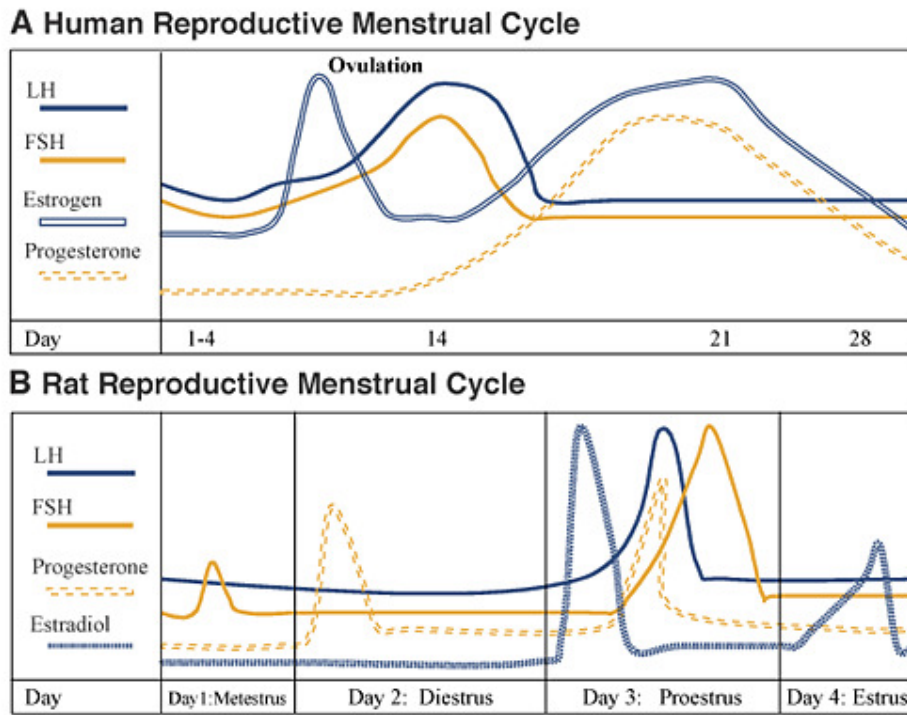
Estrus: Spontan estrus başlangıcından 8-11 saat sonra GnRH, LH, HCG ile ovulasyon başlar. Ovulasyon sırasında yaklaşık 10 oosit atılır. Ortalama 12 saat sürer (9-15). Dişiler erkeği kabul etmeye devam eder [26,27].

Metestrus: Korpus luteum formasyonunun gerçekleştiği dönemdir. 21 saat sürer ve artık dişi erkeği kabul etmez [26,27].

Diestrus: Korpus luteumun aktif olduğu dönemdir. 57 saat sürer ve progesteronun en yüksek, östrojenin en düşük olduğu dönemdir [26].

Korpus luteum en yüksek büyüklüğüne erken diestrus döneminde ulaşır ve en yüksek progesteron değerlerine de estrus siklusunun 2. gününde ulaşılır. Hormonal salınımlar ön hipofizden salınan ve vaginal sitolojik değişimler şeklinde saptanabilen ovaryum ve folliküler değişimlere neden olan gonadotropinler tarafından düzenlenir. LH atımlı (pulsatile) olarak salınır ve en yüksek frekansa proestrusta en düşüğe de estrusta ulaşır. LH atımı (pulse) GnRH salınımının yüksekliğine bağlıdır. Proestrus esnasında salınan LH dalgaları preovulatuvar folliküllerde (preovulatr follikül 0,9-1,0 mm çapında) ovulasyonun meydana gelmesine ve korpus luteumun şekillenmesine neden olur. İki adet preovulatuvar FSH dalgası küçük folliküllerin gelişimini stimule eder. İlk dalga LH dalgası ile alakalı ve ikinci dalga ovulasyon

sonrası inhibindeki azalma ile ilişkilidir. Metestrus boyunca, korpus luteumdan progesteron salınır. Progesteron seviyesi diestrusta azalır ve artan estradiol-17 β 'ya bağlı olarak folliküler gelişim tekrar başlar. Siklus proestrusta meydana gelen östrojen piklerinin ovulasyona neden olan gonadotropin salınımını indüklemesi ile tamamlanır. Prolaktinde luteotropik mekanizmaya katılmaktadır, ancak progesteron salınımını doğrudan desteklememektedir. Ratlarda 5 gün devam eden estrus siklusu, 4 günlük sıklusa benzer fakat LH ve östrojen sekresyonu, luteoliz ve uterus değişiklikleri 24 saat gecikmeli olarak meydana gelir [26].



Şekil 3.7. (A) menstrüel döngü, (B) sıçan estrus döngüsü [28].

3.6. Nitrik Oksitin Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

3.6.1. Nitrik oksitin ovaryum üzerine etkileri

Ovaryum, üreme döngüsünde yapısal ve fonksiyonel değişikliğe uğrayan kompleks endokrin bir organdır. Nitrik oksit üreme sistemi fizyolojisi, biyolojisi ve patofizyolojisinde yer alan hücre içi ve hücreler arası bir mesajcı moleküldür [29]. NO hemen hemen bütün ovaryum fonksiyonlarında yer alır ve üreme sistemi üzerinde önemli rolü vardır [30]. Ovaryumda sentezlenen NO steroidogenesis,

foliküler gelişim, ovulasyon, luteal oluşum ve apoptotik hücre ölümünde etkilidir [31-34].

Ovaryumda fizyolojik rol oynayan iki önemli NOS izoformu sentezlenir. Olgun, döngüsel ovaryumda eNOS ve iNOS sentezlenir fakat nNOS sentezi yoktur [31,33]. eNOS ovaryumun granuloza hücreleri, teka hücre tabakası, ovayum antral foliküllerinin stroması, korpus luteumun parenkimal ve nonparenkimal hücrelerinde bulunur. Luteinleşmiş ovaryumda endotelial ve steroidojenik hücrelerin eNOS sentezlediği görülmüştür. Ayrıca eNOS, ovaryum damarlarının endotelinde, preovulatuvar foliküllerin teka internasında ve granuloza-luteal hücrelerde de bulunur [31]. iNOS primer, sekonder ve küçük antral foliküllerin granuloza hücrelerinde, stroma, teka ve luteal hücrelerde sentezlenir [30]. iNOS olgunlaşmamış granuloza hücrelerinde sentezlenir ve olgunlaşmış ya da atrezik foliküllerde yoktur. NO'nun bu hücrelerde sitostatik etkili olduğunu düşündürmektedir [35]. Her iki izoformun derişimi gonadotropin uyarımına göre değışiklik gösterir [31,32,33].

NO foliküler gelişimi ve apoptozu kontrol eder. Bu etkisini gonadotropinlerle kan-folikül bariyeri üzerinde farklı moleküllerin geçirgenliğini değıştirerek gösterir. NO düşük konsantrasyonlarda apoptozdan korur, yüksek konsantrasyonlarda peroksinitrit oluşumu ile hücre ölümünü tetikler [30,36].

NO ovulasyon ve folikül yırtılmasında da fonksiyonu vardır [31]. Ovulasyon gonadotropinler, steroid hormonlar ve sitokinler, prostaglandinler, lökotrienler, plazminojen aktivatörler ve histamin gibi inflamatuvar reaksiyonlarda yer alan araçlar içeren kompleks bir oluşumdur [32]. NOS/NO ovulasyon mekanizmasına etkisini damarlar ve prostaglandinlere etkisi ile gösterir. Ovulasyon boyunca teka ve stroma hücrelerinde yüksek miktarda eNOS vardır [30]. In vitro ve in vivo da NOS inhibitörlerinin ovulasyon hızını azalttığı görülmüştür [31,32]. NO'nun ovaryumda foliküler apoptozu azalttığı gösterilmiştir, bu da ovulasyon oranının azalma sebebini göstermektedir [29]. NO'nun ovaryum foliküllerinin kontraktıl elemanlarını stimüle ederek, foliküler antruma sıvı sızdırarak, vasküler akışı arttırarak folikül içerisindeki basıncı arttırır ve böylece folikül yırtılmasında etkili olur [30].

Ayrıca NO ile folikül sıvısı, oosit kalitesi ve oosit gelişimi arasında ilişki kurulmuştur [30].

NO korpus luteumun fonksiyoların düzenlenmesinde de etkili bir intraovarian araçtır. NO luteal vaskülarizasyon kontrolünde yer alır. Luteal hücrelerin endotelinden üretilen NO arteriyel düz kasını gevşeterek kan akımını artırır ve kapiller perisitlerde vasküler endotelyal büyüme faktörünü (VEGF) arttırarak anjiyogenesise yardım eder [30].

Korpus luteumun gerilemesinde oksitosin $\text{PGF}_{2\alpha}$ üretimini artırır ve bu etki ovaryum NOS aktivitesini arttırır. Luteoliz boyunca endojen NO üretimi $\text{PGF}_{2\alpha}$ üretimini arttırır [29,31]. Bu durumda luteal gerilemede $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve NO arasında pozitif feed back mekanizması olduğu söylenebilir [8].

Korpus luteumunun son evresinde yüksek miktarda iNOS üretimi proapoptik etki gösterir. NO estradiol üretimini düşürerek apoptozu arttırır ve luteal gerilemede yer alır [30].

3.6.2. Nitrik oksit'in uterus üzerine etkileri

NO uterus fonksiyonlarının yerine getirilmesinde de önemli görevler üstlenmiştir. Molekül, uterusun biyolojisi ve patofizyolojisinde rol oynamaktadır [1,37,38]. NO'ın uterus düz kası kasılmasında, menstrüasyonun düzenlenmesinde, implantasyon kolaylaştırılmasında ve dismenoreden koruyucu etkisi vardır [38-40]. NO ayrıca aşırı menstrüel kanamanın patolojisinde de yer almaktadır [38]. Bunların yanı sıra NO gebeliğin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi ve sürdürülmesinde, uterus-plasenta-fetal dolaşımı sağlanmasında ve doğumdan sonra uterusun tekrar eski haline gelmesinde etkilidir [37,41,42].

NO uterusun bütün hücrelerinde bulunmakla birlikte, menstrüel siklus boyunca en yoğun olarak endometriyel glandular epitelde ve myometriyel kan damarlarında görülmüştür [38]. NO uterus üzerine etkisini guanilat siklazı aktive ederek cGMP yolağını kullanarak ve siklooksijenaz aktivasyonu ile prostanoide salınımı ile gösterir. Uterusta hem yapısal hem de indüklenabilir NOS bulunmuştur [39].

NO endometriyum reseptör aktivitesi, implantasyon ve menstrüasyon gibi endometriyel fonksiyonlarda önemli rol oynar [1,42,43]. eNOS glandular epitelde ve özellikle luteal fazda endometriyum mikrovasküler epitelde bulunur. iNOS menstrüasyon sürecinde endometriyel epitelde, immün cevap veren endometriyum hücrelerinde ve desidual stroma hücrelerinde bulunur ve herhangi bir uyarı olmadan

iNOS'un sentezlendiği nadir dokulardandır [1,43]. NO doku parçalanması, platelet agregasyonunun engellenmesi, damarların gevşemesini sağlayarak menstrüel kanamanın başlaması ve devam etmesini sağlar [38,43]. Endometriyum kaynaklı NO menstrüasyon sürecinde myometriyumun gevşemesine de neden olur [43].

NO myometriyum kasılmasında gevşetici faktördür [1,9,44]. L-arjinin-NOS-NO yolağı cGMP bağımlı ve cGMP bağımsız mekanizmalarla myometriyum kasılmalarını inhibe eder [45]. NO substrat ve donörleri ile gebelikte uterusun ani kasılmalarını inhibe eder [41,44].

3.6.3. Nitrik oksitin hipotalamus-hipofiz-gonadal akstaki rolü

Hipotalamus- hipofiz-gonadal (HPG) aksın kontrolü hipotalamus, hipofiz ve birçok çevresel sinyalleri içeren karmaşık bir ağ tarafından düzenlenir. NO, HPG aksında etkin bir nörotransmitter ve aracıdır [8].

Hipotalamus GnRH ile LH ve FSH gibi gonadotropinlerin salınımı ve gamet oluşumu gibi gonadal fonksiyonların gelişimini düzenleyerek üremenin nörohormonal kontrolünde önemli rol oynar [46,47]. Ön hipofiz fonksiyonlarını düzenleyen gonadotrop hücrelerde ve folikulo-satelat hücrelerde nNOS varlığı gösterilmiştir [8,46,48].

Gonadal hormonlarla NO ilişkisi çift yönlüdür. nNOS ekspresyonu gonadal hormonlar tarafından düzenlenir. Gonadal hormonlar nNOS ekspresyonu tarafından modüle edilirler [49]. Östrojen NO üzerinde hem akut (non-genomik) etki ile hem de uzun süreli genomik etki ile mRNA ve NOS proteinlerini sentezleyerek birçok dokuda NOS etkinliğini arttırdığı bulunmuştur [50]. eNOS ve iNOS u kodlayan genler 5' ucunun promotor bölgelerinde östrojen yanıt elementleri (estrogen response elements-EREs) içerir ve estradiol tarafından düzenlenir [51,52].

Hipotalamusta NO nöronları ve GnRH nöronları arasında yakın ilişki görülmüştür. Bir çok hipotalamik çekirdekte NO nöronları vardır. NO donörleri GnRH ın uyardığı LH salınımını inhibe eder. Tam tersi olarak NOS inhibisyonu LHRH uyarımı ile LH salınımını hızlandırır [8]. NO LH salınımını sonlandıran bir sinyaldir ve LH salınımının karakteristik bir özelliği olan pulsatil salınımda etkili rol oynar [48].

NO hipofizde GHRH indüklenmesini inhibe eder ama bazal GH sekresyonunu inhibe etmez. NO ön hipofiz hormonlarının kontrolünde ikili etki

gösterir; otokrin etkisi ile LH sekresyonunda ve parakrin etkisi ile GH sekresyonunda etkilidir [48].

3.7. Menstrüel siklusla ilişkili hastalıklar

Menstrüel siklus ile bir çok hastalık arasında ilişki kurulmuştur. Bir çok çalışmada kadın cinsiyet hormonlarının astım ve alerjide rol oynadığı gösterilmiştir [53]. Ayrıca cinsiyet hormonları fibromyalji, kolit, osteoporozis, Alzheimer, aterosklerozis gibi hastalıkların patofizyolojisinde rol oynar [54]. Menstrüel siklus ve immune direnç arasında ilişki bulunmuştur [55]. Kadın hastalarda irritable bowel sendromunda menstrual siklusa bağlı semptomlar görülmüştür [56]. Kadınlarda migren erkeklere göre üç kat daha fazladır ve genellikle menstrüel döngünün menstrüasyon evresinde atak görülmüştür [57]. Ayrıca sıçanlarda ağrılı uyarana cevabın estrus siklusundan etkilendiği gösterilmiştir [58]. NO'nin doğrudan ya da dolaylı etkileri ile bu hastalıkların patofizyolojisinde etkili olduğu gösterilmiştir [21, 59, 60]. Nitrik oksit ile menstrual siklus ilişkisini araştırmak bu hastalıkların patofizyolojisine ve dolayısıyla tedavisine önemli katkı sağlayacaktır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

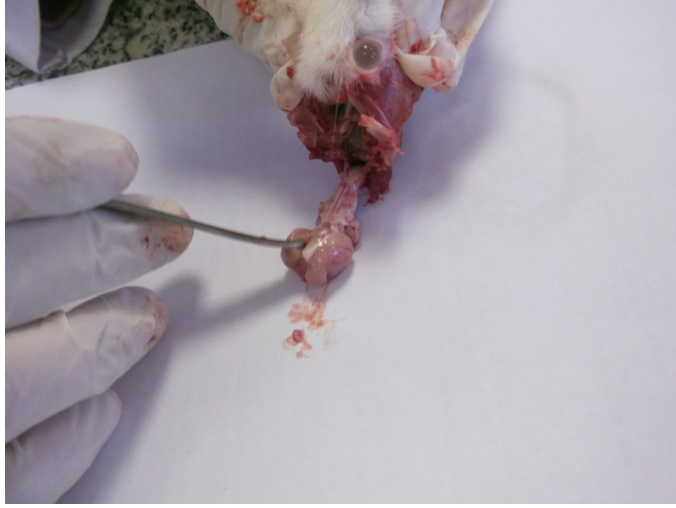
4.1. Hayvan Deneyi Uygulaması

Hayvan deneyi uygulamaları için Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulundan etik onay alındı (11.04.2012 tarihli 2012/16 no'lu karar). Çalışmada AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden sağlanan 2-3 aylık Wistar cinsi 200-300 gr ağırlığındaki 32 adet dişi sıçan kullanıldı. Bütün sıçanlardan sabah 09:00 -11:00 saatlerinde arasında vajinal yayma örnekleri alındı. Plastik pastör pipetine 0,2 ml serum fizyolojik çekildi, vajinadan 2-5 mm girilerek serum fizyolojik içeri verildi. Pipet ile birkaç kez serum fizyolojik çekilip tekrar verildi ve sıvı bulanıklaştığında 2 damla lama konulup üzeri lamelle kapatıldı. Daha sonra mikroskopla incelenerek sıçanların hangi evrede olduğu tespit edildi. Sıçanlarda iki siklus takip edildi.

Her grupta 8 sıçan olacak şekilde 4 grup oluşturuldu; 1-Proestrus evresi, 2-Estrus evresi, 3- Metestrus evresi ve 4- Diestrus evresi. Sıçanlara yüksek dozda intraperitonel ürethan verilerek sakrifiye edildi ve intrakardiyak kanları alındı. Daha sonra her iki ovaryum (şekil 4.1), uterus (şekil 4.1) ve beyin (şekil 4.2) dokuları alınarak hassas terazide tartıldı. Örnekler ölçüm zamanına kadar -80⁰ C de bekletildi.



Şekil 4.1. Sıçan ovaryumu ve uterusun çıkarılması.



Şekil 4.2. Sıçan beyninin çıkarılması.

4.2. Papa Nicolou (PAP) Boyama

Estrus siklusunun evrelerini belirlemek üzere PAP boyaması yapıldı.

Estrus siklusunun farklı dönemlerindeki sıçanlardan alınan vajinal yayma örnekleri kurutuldu. Daha sonra PAP boyama prosedürü uygulandı:

- 1- Örnekler kuruduktan sonra bekletilmeden %96'lık etil alkolde 15 dakika bekletildi.
- 2- Çeşme suyunda 2 dakika yıkandı.
- 3- Hemotoksilende 2 dakika bekletildi.
- 4- Daha sonra çeşme suyunda 2 dakika bekletildi.
- 5- Etil alkolde 2 dakika bekletildi.
- 6- Papanicolou Stain OG 6 ($\geq$ % 70 denaturated ethanol, $\leq$ % 1 Phosohotungstic asit 2 dakika bekletildi.
- 7- Yıkamadan etil alkolde 4 dakika bekletildi.
- 8- Dah sonra Papanicolou Stain EA 50'de ($\geq$ % 95 denaturated ethanol, $\leq$ % 1 Phosphotungstic acid $\leq$ % 1 Lithium carbonate) 2 dakika bekletildi.
- 9- Yıkamadan etil alkolde 4 dakika bekletildi.
- 10- Etüvde kurutuldu.
- 11- Ksilende 13 dakika bekletildi.
- 12- Entellan ile kapatıldı.

Daha sonra Olympos mikroskopla incelenerek fotoğrafları alındı.

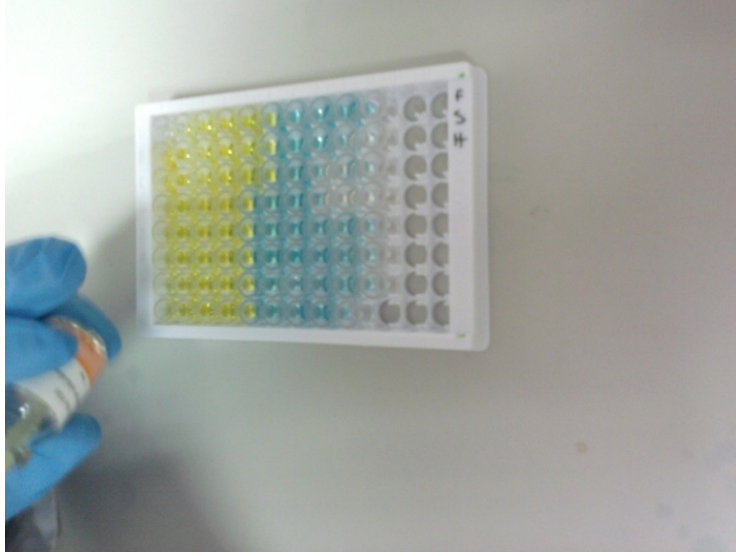
4.3. Plazma Hrmnlarının Ölçümü

Sıçanlardan alınan kan örnekleri 5000 rpm de 10 dakika santrifuj edildi ve plazmaları alındı. Plazmadaki hormon düzeyleri enzim-bağımlı immunosorbent test (ELISA) yöntemi ile ölçüldü.

4.3.1. Estradiol ölçümü

Estradiol ölçümü ELISA KIT (katalog no: CK- E30608, Eastbiopharm Co, LTD) ile yapıldı.

- 1- 960 ng/L orjinal standarttan standart dilüsyon ile sırayla 480 ng/L, 240 ng/l, 120 ng/l, 60 ng/l ve 30 ng/l olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.
- 2- Standartlardan 50 µl kuyucuklara konuldu ve üzerine Streptavidin –HRP eklendi.
- 3- Test kuyucuklarına 40 µl örnek, 10µl E2 antikoru, ve 50 µl Streptavidin-HRP konuldu.
- 4- Membranla üzeri kapatılarak hafifçe sallandı ve 60 dakika 37⁰ C de etüvde bekletildi.
- 5- Otomatik yıkama makinesinde 0.35 ml yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- 6- Daha sonra 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B eklendi ve üzeri membranla kapatıldı.
- 7- 37⁰ C de 10 dakika etüvde bekletildi.
- 8- 50 µl stop solüsyonu eklendi ve renk değişimi gözlemlendi (şekil 4.3).
- 9- 5 dakika içerisinde 450 nm dalgaboyunda ELISA okuyucuda optik dansitesi (OD) okundu.



Şekil 4.3. Plazma hormon ölçümünde stop solüsyonu eklendiğinde görülen renk değişimi.

4.3.2. LH ölçümü

LH ölçümü ELISA KIT (katalog no: CK-E30623, Eastbiopharm Co, LTD) ile yapıldı.

- 1- 64 mIU/ml orjinal standarttan standart diluent ile sırasıyla 32 mIU/ml , 16 mIU/ml, 8 mIU/ml, 4 mIU/ml, 2 mIU/ml olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.
- 2- Standartlardan 50 µl kuyucuklara konuldu ve üzerine Streptavidin –HRP eklendi.
- 3- Test kuyucuklarına 40 µl örnek, 10 µl LH antikoru, ve 50µl Streptavidin-HRP konuldu.
- 4- Membranla üzeri kapatılarak hafifçe sallandı ve 60 dakika 37⁰ C de etüvde bekletildi.
- 5- Otomatik yıkama makinesinde 0.35 ml yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- 6- Daha sonra 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B eklendi ve üzeri membranla kapatıldı.
- 7- 37⁰ C de 10 dakika etüvde bekletildi.
- 8- 50µl stop solüsyonu eklendi ve renk değişimi gözlemlendi.
- 9- 5 dakika içerisinde 450 nm dalgaboyunda ELISA okuyucuda optik dansitesi (OD) okundu.

4.3.3. FSH ölçümü

FSH ölçümü ELISA KIT (katalog no: CK-E30597, Eastbiopharm Co, LTD) ile yapıldı.

- 1- 64 mIU/ml orjinal standarttan standart diluent ile sırasıyla 32 mIU/ml, 16 mIU/ml, 8 mIU/ml, 4 mIU/ml, 2 mIU/ml olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.
- 2- Standartlardan 50 µl kuyucuklara konuldu ve üzerine Streptavidin –HRP eklendi.
- 3- Test kuyucuklarına 40 µl örnek, 10 µl FSH antikoru, ve 50 µl Streptavidin-HRP konuldu.
- 4- Membranla üzeri kapatılarak hafifçe sallandı ve 60 dakika 37⁰ C de etüvde bekletildi.
- 5- Otomatik yıkama makinesinde 0.35 ml yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- 6- Daha sonra 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B eklendi ve üzeri membranla kapatıldı.
- 7- 37⁰ C de 10 dakika etüvde bekletildi.
- 8- 50 µl stop solüsyonu eklendi ve renk değişimi gözlemlendi.
- 9- 5 dakika içerisinde 450 nm dalgaboyunda ELISA okuyucuda optik dansitesi (OD) okundu.

4.4. Nitrik Oksit Ölçümü

Nitrik oksit, atmosferik basınç altında ve oda sıcaklığında gaz halinde bir serbest radikal olduğundan NO konsantrasyonu tayini için NO'nin stabil son ürünü olan nitrit ve nitrat ölçümleri kullanılmaktadır.

Nitrit + nitrat konsantrasyonunun belirlenmesinde; öncelikle ortamdaki nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile nitrite redüklenmekte ve toplam nitrit ölçümü yapılmaktadır. Nitrit ölçümü Griess reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik bir ölçümdür [61]. Griess reaktifinde bulunan fosforik asit (H₃PO₄) ile nitrit reaksiyona girer ve nitroz asit meydana gelir. Nitroz asit sulfonamide ile reaksiyona girerek diazobenzosulfonik asiti oluşturur. Bu bileşik ortamda bulunan naphthyletilendiamin dehidroklorid ile koyu pembe renkli bir bileşik (azo) bileşiği verir. Bu bileşiğin renk şiddeti spektrofotometrede ölçülmektedir [62].

Ölçümler nitrat/nitrit kolorimetrik test kiti ile yapıldı (katalog no: 780001, Cayman Chemical Company).

4.4.1. Doku homejanatlarının ve plazma örneklerinin hazırlanması

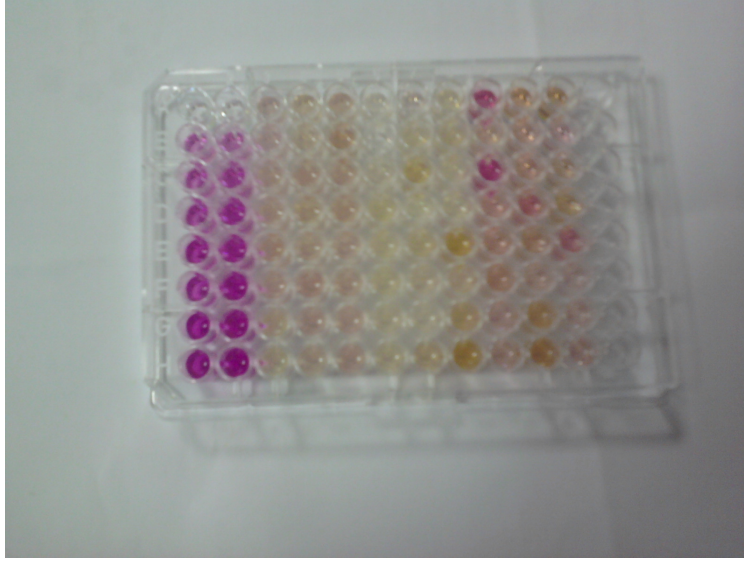
Dokuların üzerine 1 ml 7,4 ph PBS eklendi ve 10,000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Supernatanları alındı ve 15,000 rpm de 30 dakika ultrasantrifüj edildi. 30kDA filtrat ile filtre edildi.

Plazmalar 15,000 rpm de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatanlar ölçümler için kullanıldı.

4.4.2. Nitrat+nitrit ölçümü

Test tüpüne 0,9 ml assay buffer, 0,1ml nitrat standard eklendi ve vortekslendi. Hazırlanan 200 µM olan bu sulandırılmış standart ile nitrat konsantrasyonu 0 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM olacak şekilde 16 kuyucuk hazırlandı.

- 1- 80 µl örnek kuyucuklara konuldu.
- 2- Standart kuyucuklara ve örnek kuyucuklarına 10 µl enzim kofaktör karışımı eklendi.
- 3- Standart kuyucuklar ve örnek kuyucuklarına 10 µl nitrat redüktaz karışımı eklendi.
- 4- Plate membranla kapatıldı ve oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi.
- 5- İnkübasyondan sonra standart ve örnek kuyucuklarına 50 µl Griess Reagent R1 eklendi ve hemen arkasından 50 µl Griess Reagent R2 eklendi.
- 6- 10 dakika renk oluşumu için beklendi ve 550 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okundu.



Şekil 4.4. Griess Reagent 2 eklendiğinde oluşan renk değişimi.

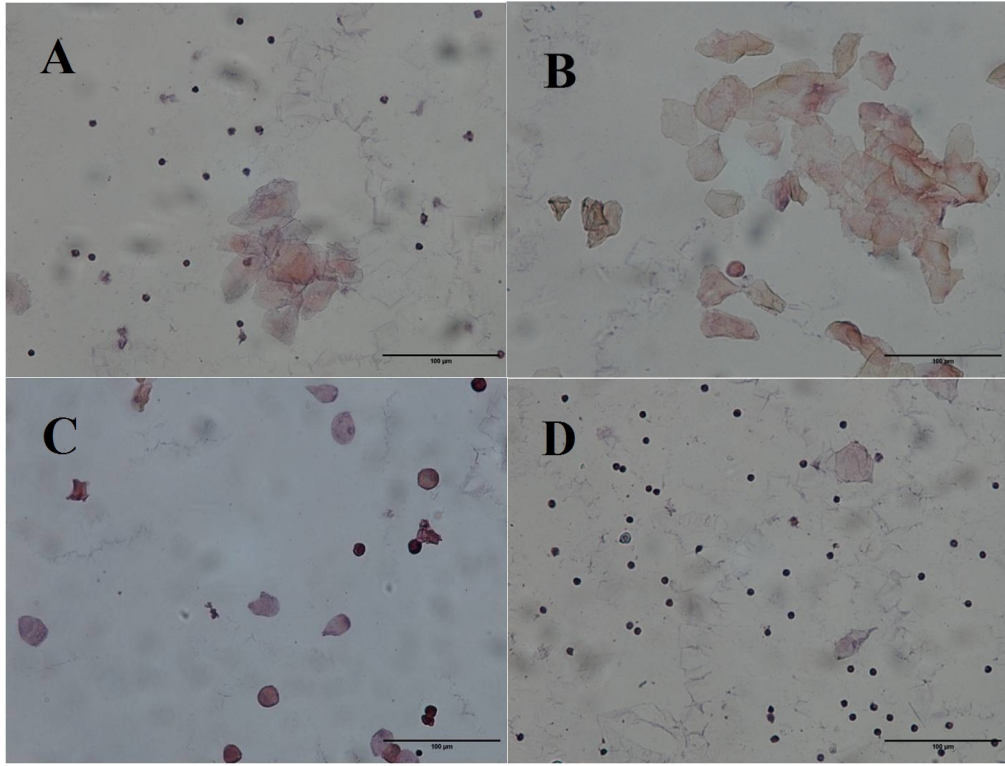
4.5. İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışma sonrası elde edilen veriler Graphpad prism 5.0 istatistik program ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılımı Curve Expert 1.4 programında hesaplandı. Plazma hormon düzeyleri ve doku NO düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesinde One Way Anova Testi ve grup içi karşılaştırmada Tukey testi kullanıldı. Nonparametrik verilerin analizinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı, grup içi karşılaştırmalar Dunn's testi ile yapıldı. Veriler ortalama (mean) $\pm$ standart hata değerleri kullanıldı. $P < 0,05$ anlamlı değer olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Estrus evleri

Tüm gruplarda PAP boyama ile genel morfolojik değerlendirme yapıldı. Kornifiye (keratinize) hücreler, epitel hücreler ve lökositlerin oranlarına bakılarak estrus evresi tayin edildi Proestrusta kümelenmeye başlayan çok sayıda yuvarlak, nükleuslu epitel hücresi görüldü (Şekil5.1.A). Az sayıda lökosit hücresi vardı. Estrusta büyük ve nükleusu olmayan kornifiye hücreler kümelenmiş şekilde görüldü. Lökosit hücresi görülmedi. Metestrusta Çok sayıda lökosit, az sayıda büyük nongranüler nükleussuz epitel hücreler görüldü. Lökositler birbirine temas halinde görüldü. Diestrusta çok sayıda lökosit 1-2 tane epitel hücresi görüldü.

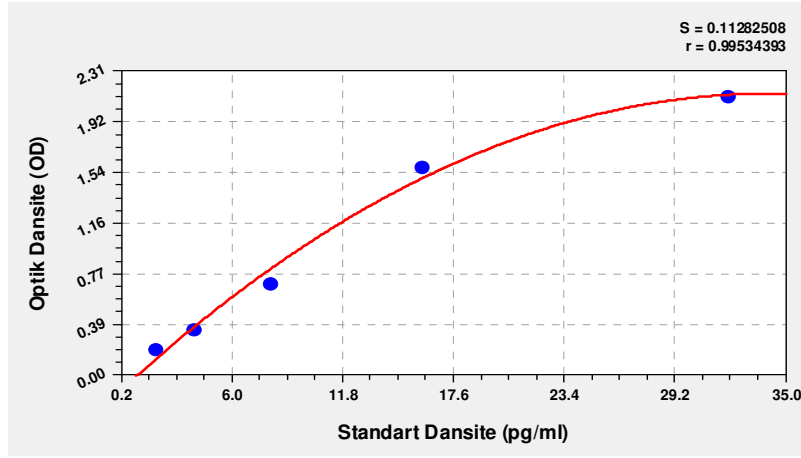


Şekil 5.1. Estrus siklusu evrelerinde vajinal sitolojik görünüm (20X), (A) proestrus evresi (B) estrus evresi , (C) metestrus evresi , (D) diestrus evresi .

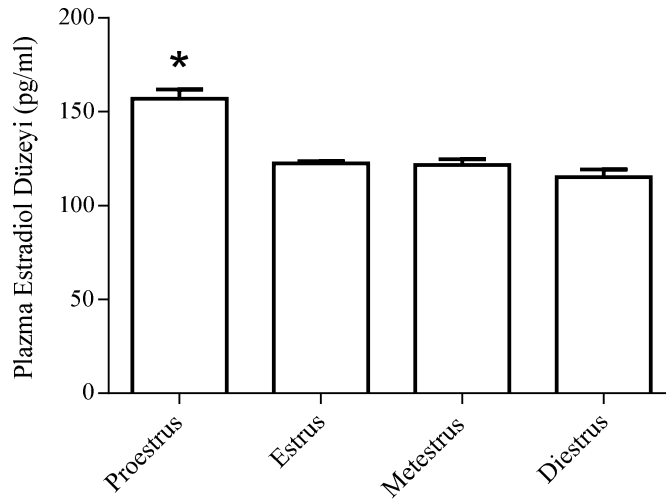
5.2. Plazma Hormon Düzeyleri

Farklı estrus evrelerindeki 32 sıçanın, her grup için n=8 olacak şekilde plazma hormon düzeyleri ELISA testi ile ölçüldü. Standartlar ile ölçülen optik dansitelerin standart eğrisi çıkarılarak örneklerden elde edilen optik dansiteler Estradiol pg/ml, FSH ve LH mIU/ml olarak hesaplandı (Tablo 5.1).

5.2.1. Estrus siklusu evrelerinde plazma estradiol düzeyleri



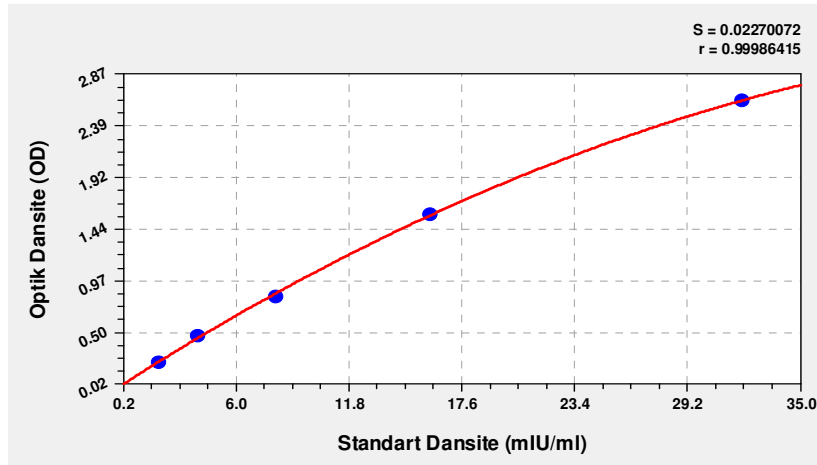
Şekil 5.2. Plazma estradiol standart eğrisi.



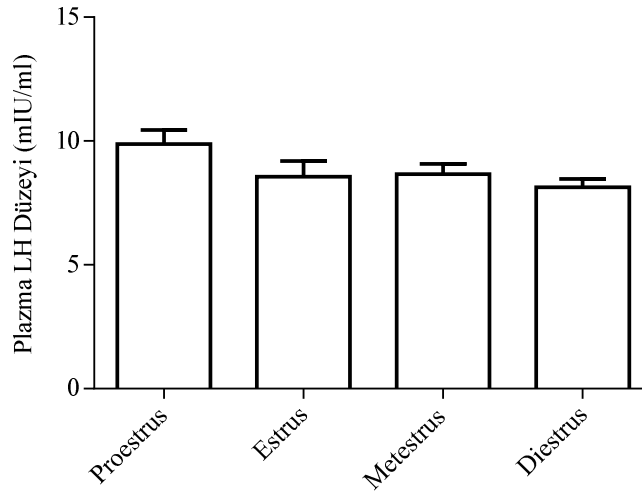
Şekil 5.3. Estrus evrelerinde plazma estradiol düzeyi. * diğer gruplardan anlamlı düzeyde yüksek (p<0,0001).

Estrus siklusu evrelerinde plazma estradiol düzeyleri; proestrusta $156,8 \pm 5,109$ pg/ml, estrusta $122,3 \pm 1,476$ pg/ml, metestrusta $121,5 \pm 3,170$, diestrusta $115,2 \pm 4,045$ pg/ml olarak ölçüldü. Plazma estradiol düzeyi proestrusta; estrus, metestrus ve diestrus evrelerinden anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0,0001$).

5.2.2. Estrus siklusu evrelerinde plazma LH düzeyleri



Şekil 5.4. Plazma LH standart eğrisi.

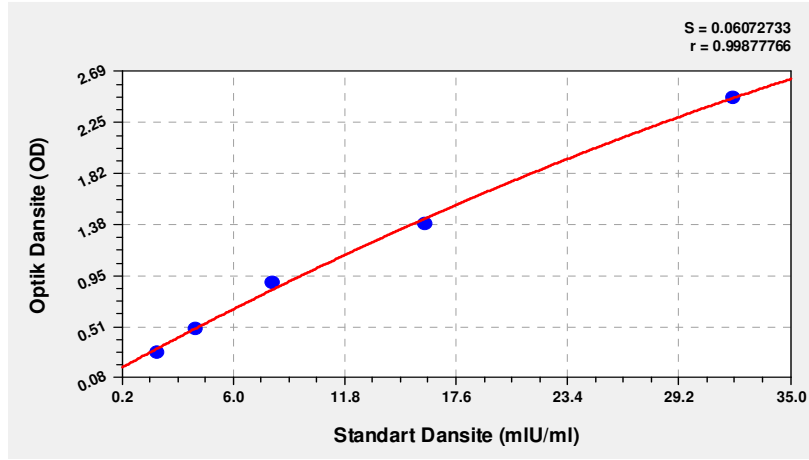


Şekil 5.5. Estrus siklusu evrelerinde plazma LH düzeyi.

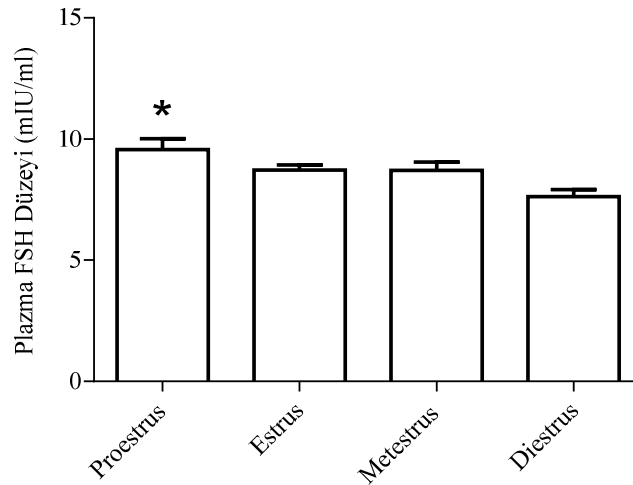
Estrus siklusu evrelerinde plazma LH düzeyi; proestrusta $9,586 \pm 0,5995$ mIU/ml, estrusta $9,007 \pm 0,5419$ mIU/ml, metestrusta $8,657 \pm 0,4093$ mIU/ml ve

diestrusta $8,260 \pm 0,3082$ mIU/ml olarak tespit edildi. Proestrusta diğer gurplara göre yükseklik var ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p < 0,3507$).

5.2.3. Estrus siklusu evrelerinde plazma FSH düzeyleri



Şekil 5.6. Plazma FSH standart eğrisi.



Şekil 5.7. Estrus siklusu evrelerinde plazma FSH düzeyi. * diestrustan anlamlı farklı ($p < 0,009$).

Estrus siklusu evrelerinde plazma FSH seviyeleri; proestrusta $9,569 \pm 0,4544$ mIU/ml, estrusta $8,715 \pm 0,2158$ mIU/ml, metestrusta $8,891 \pm 0,3336$ mIU/ml ve

diestrusta $7,627 \pm 0,2935$ mIU/ml tespit edildi. Plazma FSH düzeyi proestrusta diestrus evresinden anlamlı düzeyde yükdek bulunmuştur ($p < 0,009$).

Tablo 5.1. Estrus siklusu evrelerinde plazma hormon düzeyleri (ortalama $\pm$ standart hata).

	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Estradiol (pg/ml)	$156,8 \pm 5,109$	$122,3 \pm 1,476$	$121,5 \pm 3,170$	$115,2 \pm 4,045$
FSH (mIU/ml)	$9,569 \pm 0,4544$	$8,715 \pm 0,2158$	$8,891 \pm 0,3336$	$7,627 \pm 0,2935$
LH (mIU/ml)	$9,872 \pm 0,5667$	$8,559 \pm 0,6222$	$8,657 \pm 0,4093$	$8,128 \pm 0,3412$

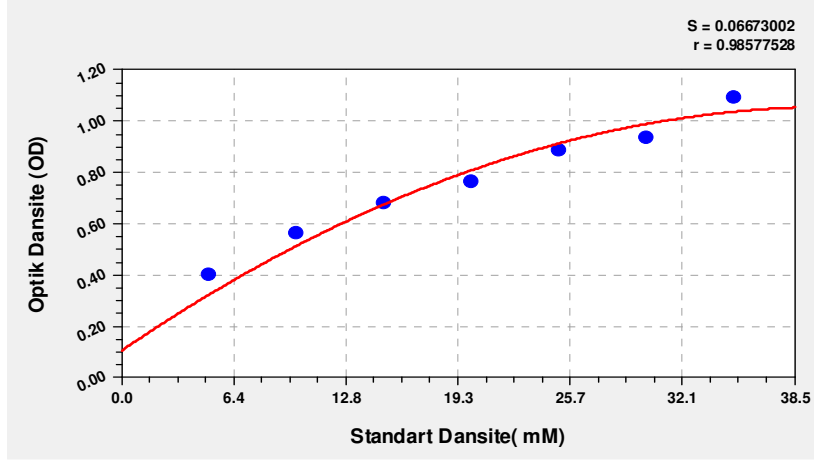
5.3. Doku Ağırlıkları

Tablo 5.2. Estrus siklusu evrelerinde doku ağırlıkları (g) (ortalama $\pm$ standart hata)

	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Beyin	$1,287 \pm 0,02815$	$1,260 \pm 0,03002$	$1,309 \pm 0,01062$	$1,279 \pm 0,03328$
Uterus	$0,7504 \pm 0,07888$	$0,7574 \pm 0,1242$	$0,4971 \pm 0,03652$	$0,4820 \pm 0,04321$
Ovaryum	$0,2555 \pm 0,02089$	$0,2286 \pm 0,02644$	$0,2363 \pm 0,01137$	$0,3071 \pm 0,011325$

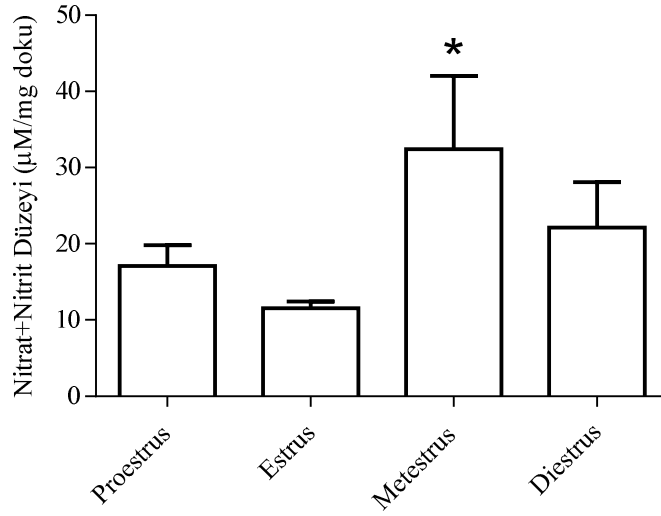
5.4. Doku Nitrat+Nitrit Düzeyleri

Estrus siklusu evrelerinde doku nitrat + nitrit ölçümleri $n=6$ olacak şekilde 24 sıçanda kolorimetrik test ile çalışıldı. . Standartlar ile ölçülen optik dansitelerin standart eğrisi çıkarılarak örneklerden elde edilen optik dansiteler doku ağırlıklıklarına bölündü ve sonuçlar $\mu\text{M}/\text{mg}$ olarak hesaplandı.



Şekil 5.8. Doku nitrat+nitrit standart eğrisi.

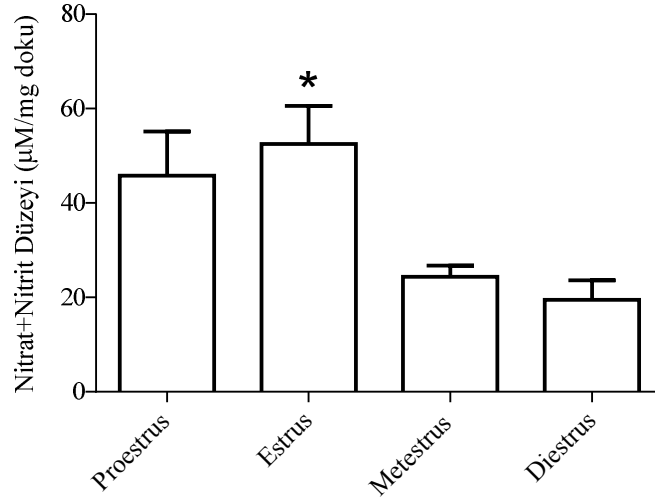
5.4.1. Beyin nitrat+nitrit düzeyi



Şekil 5.9. Estrus siklusu evrelerinde beyin nitrat+nitrit düzeyi. * estrustan anlamlı farklı ($p < 0,0212$).

Estrus siklusu evrelerinde beyin nitrat + nitrit düzeyi; proestrusta $17,10 \pm 2,711 \mu\text{M}$, estrusta $11,56 \pm 0,8933 \mu\text{M}$, metestrusta $32,39 \pm 9,635 \mu\text{M}$ ve diestrusta $22,14 \pm 5,982 \mu\text{M}$ olarak ölçüldü. Beyin nitrat + nitrit düzeyi metestrusta estrus göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0,0212$).

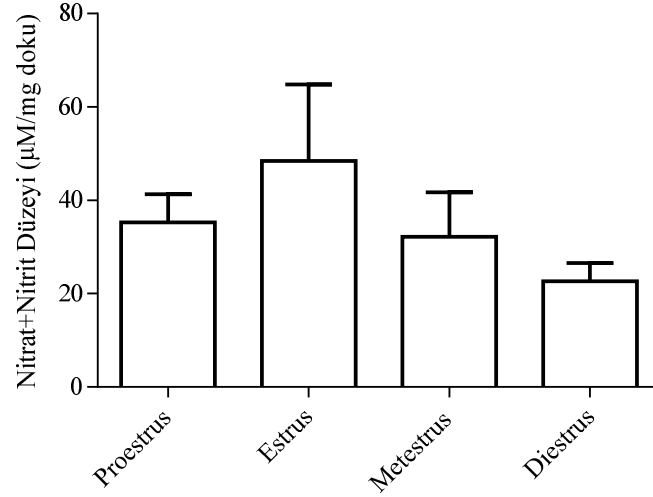
5.4.2. Uterus nitrat + nitrit düzeyi



Şekil 5.10. Estrus siklusu evrelerinde uterus nitrat+nitrit düzeyi. * diğer gruplardan anlamlı farklı (p<0,006).

Estrus siklusu evrelerinde uterus nitrat + nitrit düzeyi; proestrusta $45,85 \pm 9,287 \mu\text{M}$, estrusta $52 \pm 8,061 \mu\text{M}$, metestrusta $24,37 \pm 2,376 \mu\text{M}$ ve diestrusta $19,49 \pm 4,153 \mu\text{M}$ olarak tespit edildi. Uterus nitrat + nitrit düzeyi estrusta; metestrus ve diestrus evrelerine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0,006).

5.4.3. Ovaryum nitrat + nitrit düzeyi



Şekil 5.11. Estrus siklusu evrelerinde ovaryum nitrat+nitrit düzeyi.

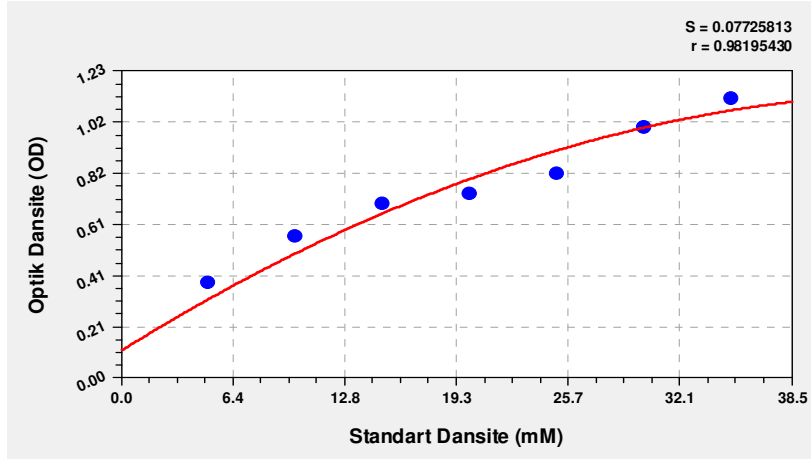
Estrus siklusu evrelerinde ovaryum nitrat + nitrit düzeyi; proestrusta $35,32 \pm 5,948 \mu\text{M}$, estrusta $48,42 \pm 16,42 \mu\text{M}$, metestrusta $32,17 \pm 9,509 \mu\text{M}$ ve diestrusta $22,63 \pm 3,915$ olarak ölçüldü. Estrus evresinde diğer gruplara göre yüksek olmasına karşın ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0,3155$).

Tablo 5.3. Estrus siklusu evrelerinde beyin, uterus ve ovaryumda nitrat+nitrit düzeyleri (ortalama $\pm$ standart hata).

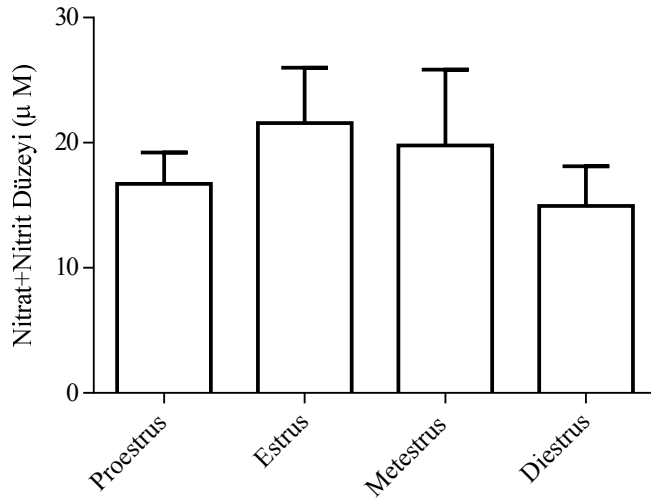
	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Beyin	17,10 $\pm$ 2,711	11,56 $\pm$ 0,8933	32,39 $\pm$ 9,635	22,14 $\pm$ 5,982
Uterus	45,85 $\pm$ 9,287	52,50 $\pm$ 8,061	24,37 $\pm$ 2,376	19,49 $\pm$ 4,153
Ovaryum	35,32 $\pm$ 5,948	48,42 $\pm$ 16,42	32,17 $\pm$ 9,509	22,63 $\pm$ 3,915

5.5. Plazma Nitrat + Nitrit Düzeyi

Estrus siklusu evrelerinde plazma nitrat + nitrit düzeyi 32 sıçan ile n=8 olacak kolorimetrik testle ölçüldü ve değerler μM olarak hesaplandı (Tablo 5.3).



Şekil 5.12. Plazma nitrat+nitrit standart eğrisi.



Şekil 5.13. Estrus siklusu evrelerinde plazma nitrat+nitrit düzeyi.

Estrus siklusu evrelerinde plazma nitrat + nitrit düzeyi; proestrusta $16,707 \pm 2,517 \mu\text{M}$, estrusta $21,56 \pm 4,426 \mu\text{M}$, metestrusta $19,77 \pm 6,077 \mu\text{M}$ ve diestrusta $14,94 \pm 3,186 \mu\text{M}$ olarak tespit edildi. Estrus evresinde diğer gruplara göre yüksek olmasına karşın ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0,6353$).

Tablo 5.4. Estrus siklusu evrelerinde plazma nitrat + nitrit düzeyi (ortalama $\pm$ standart hata)

	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Plazma	16,707 $\pm$ 2,517	21,56 $\pm$ 4,426	19,77 $\pm$ 6,077	14,94 $\pm$ 3,186

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada estrus siklusu evrelerinde NO düzeylerinin dokulara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu durum NO'nin fizyopatolojisine aracılık ettiği hastalıkların, özellikle kadınlarda sık olmasının nedeni olabileceğini düşündürmektedir.

Sadeghipour ve ark. [63], sıçanların anksiyete düzeyleri ve serum NO düzeylerini araştırdığı çalışmalarında plazma NO düzeylerinin estrus siklusu evrelerinde anlamlı farklılık göstermediği ancak ovariectomize sıçanların metestrusa göre daha yüksek NO düzeyine sahip olduğu bulmuştur. Ayrıca anksiyete düzeyleri ile NO düzeyleri arasında negatif bir korelasyon bulmuştur. Bizim çalışmamızda estrus siklusunun farklı evrelerinde plazma nitrat+nitrit düzeylerinde istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır. Bu sonuç literatür ile uyumludur.

NO ovaryum işlevlerinin hemen hemen her aşamasında yer alır. NO'nin luteal hücrelerde estradiol sentezini negatif etkilediği gözlemlenmiştir [31]. NO ovaryum kan-folikül bariyerinin gonadotropin düzenlenmesinde de rol alır. Ayrıca güçlü ve hızlı sinyal iletimi ile belirli kan içeriklerinin foliküler sıvıya geçişini bloke ederek bariyer görevi yapar. NO ovulasyon, folikül yırtılması, vasküler dilatasyon ve ovulatuvar lökosit dağılımında da etkilidir.

Jablonka-Sharrif ve ark., [31], rat ovaryumunda foliküler gelişim ve luteal gelişimde eNOS ve iNOS'un gonadotropinler tarafından düzenlendiğini bulmuştur. Jablonka-Sharrif ve ark., bir diğer çalışmalarında [64], eNOS ve iNOS knockout farelerle normal farelerin estrus siklusu süresini araştırmış ve iNOS *knockout* farelerin estrus siklusu normal farelerden farklı bulunmamış ($4,8 \pm 0,2$ gün) ancak eNOS *knockout* farelerin estrus siklusu daha uzun bulunmuştur ($6,6 \pm 0,6$ gün). eNOS knockout farelerde estrus siklusunda ovulasyon oranı, ovaryum morfolojisi steroidogenezisde bozukluk görülmüştür.

Rosselli ve ark., [65], ilk defa dolaşımda NO'nin stabil son ürünleri olan nitrat+nitrit oluşumunun folikül gelişimi sırasında arttığını ve ovulasyonda azaldığını rapor etmiştir. Zackrisson ve ark., [66], ovaryumda erken luteal fazda (proestrusta) NOS protein konsantrasyonunu yüksek bulmuştur.

Ovaryumda bulunan foliküller, gelişmelerinin her döneminde NO sentezleme yeteneğine sahiptir [67]. Estrus siklusu boyunca ovaryumda eNOS ve iNOS aktivitesi ve üretimi değişmektedir [8]. NO'nun üretilmesini sağlayan NOS izoformlarının folikül hücrelerdeki yerleşimi foliküler gelişimle birlikte değişiklik gösterir. Foliküler gelişimle birlikte preovulatuvar dönemde iNOS seviyesinde azalma, eNOS seviyesinde ise artma görülmektedir [64,68]. Bizim çalışmamızda ovaryum NO düzeyleri özellikle estrus evresinde diğer evrelere göre yüksek bulundu. Ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. NO düzeyi nitrat+nitrit düzeyi bakılarak tayin edildiğinden bu NO'nun kaynağı hakkında bilgi vermese de preovulatuvar dönemde iNOS aktivitesinin azalıp, eNOS aktivitesinin artması son ürün nitrat+nitrit düzeylerini etkilemiş olabilir.

NO uterus fizyolojisinde de önemli rol oynamaktadır. NO endometriyum reseptör aktivitesi, implantasyon ve menstrüasyon gibi endometriyel fonksiyonlarda yer alır [1,42,43]. NO doku parçalanması, platelet agregasyonunun engellenmesi, damarların gevşemesini sağlayarak menstrüasyonun başlaması ve devam etmesini sağlar [38,43].

Uterus damalarının reaktivitesi estrus siklusu boyunca meydana gelen hormonal değişimlere duyarlıdır [69]. Taguchi ve ark. [70], insan uterus damarlarında eNOS aktivitesini araştırmış ve foliküler fazda luteal fazdan anlamlı derecede yüksek bulmuştur. Buhiminschi ve ark. [9], estrus siklusunun diestrus, proestrus evrelerinde NO aktivitesini araştırmış ve proestrusta diestrus ve estrus evrelerine göre yüksek bulmuştur. Suburo ve ark. [39], sıçan estrus siklusunda NO aktivitesini proestrusta daha yüksek bulmuştur. Bu çalışmada yukarıdaki bulguları destekleyecek şekilde; NO düzeyi estrus ve proestrus evrelerinde metestrus ve diestrusa göre yüksek bulundu. Bu yükseklik estrus evresinde daha belirgindi.

Üremenin kontrolü santral düzeyde diğer nörotransmitter sistemlerle etkileşim içinde NO'nun aracılığı ile olur [49]. nNOS estrus siklusu boyunca limbik-hipotalamik sistemde anlamlı değişiklikler göstermektedir. Kemirgenlerde, nNOS-immünoreaktif nöron ağları bir çok hipotalamik ve limbik çekirdeklerde bulunmuştur. Bu çekirdeklerin çoğu üreme kontrolüne dahildir; medial preoptik nükleus (MPOM), paraventriküler nükleus (PVN), supraoptik nükleus, arkuat nükleus (ARC), ventromedial nükleus (WMH), stria terminalisin bed nükleusu

(BST), aksesör olfaktör bölgenin bed nükleusu (BAOT) ve amigdala [11]. Panzica ve ark. [11] ve Sica ve ark. [49], fare ve sıçanların estrus siklusu evresinde NO aktivitesini araştırmış ve medial preoptik alanda (MPA) estrus evresinde proestrus ve diestrus evrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek, aynı şekilde BAOT'da estrusta diestrusa göre yüksek bulmuştur. Ayrıca ARC nükleusta proestrus evresinde metestrus ve diestrusa göre anlamlı derecede yüksek bulmuştur. Sica ve ark. [49], hipotalamik nNOS aktivitesine dişi sıçanlarda estrusun farklı evrelerinde ve erkek sıçanlarda değerlendirmiş WMN, ARC nükleusta değerlendirmiş BOAT ve medial amigdalada nNOS aktivitesini estrus evresinde diestrusa göre anlamlı derecede yüksek bulmuştur.

Lozach ve ark. [46], hipofizde nNOS aktivitesini estrus siklusunun proestrus evresinin farklı saatlerinde araştırmış ve nNOS proestrusun akşam saatlerinde sabah saatlerine göre 3 kat daha fazla, proestrusun akşam saatlerinde GnRH antagonisti verilen grupta 3 kattan daha fazla olduğunu rapor etmiştir. Knauf ve ark. [71], median eminens eNOS aktivitesini estrus siklusunun estrus evresinin sabah saatlerinde, proestrus evresinin sabah, öğlen ve akşam saatlerinde ve diestrus II evresinde değerlendirmiş, proestrusun sabah ve öğlen saatlerinde diestrusa göre anlamlı derecede yüksek bulmuştur.

Gotti ve ark. [52] hipokampusün farklı farklı nöronlarındaki NO aktivitesini estrus siklusu evrelerine göre araştırmıştır. Özellikle CA2 ve CA3 nöronlarında nNOS aktivitesini metestrus evresinde diestrus evresine göre anlamlı düzeyde yüksek bulmuştur. Bizim çalışmamızda beyin NO düzeyi metestrus evresinde estrus evresine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bölgelere ayırmadan toplam beyin nitrat+nitrit ölçümü yapılmıştır. Önceki çalışmalarda bildirildiği gibi nükleuslarda özel artışlar bulunmuştur. Bizim çalışmamızdaki total beyin NO artışı da muhtemelen bu nükleuslardaki artıştan dolayı olmuştur.

Migren kadınlarda erkeklere göre daha sık görülmekte ve büyük çoğunluğunda premenstrual dönemde atak görülmektedir. Bu tipte olanlar premenstrual migren olarak adlandırılmaktadır.

NO'nın migren patofizyolojisinde etkili olduğu bir çok araştırmada gösterilmiştir [60,72]. NO dura materin trigeminal afferentlerinin uyarılmasında doğrudan etkilidir [60]. Hayvan modellerinde estrus siklusu evrelerinde trigeminal

hassasiyet farklılık gösterir. Martin ve ark. [73], proestrusun sonları ve estrus evresi serum estradiol ve progesteron seviyesinin düşüşü trigeminal sitemin duyarlılığını arttırdığını bulmuştur. Capsaisin uuygulanmış sıçanlarda, proestrus ve estrus evrelerinde trigeminal hassasiyetin metestrus ve diestrus evrelerine göre hızlandığını göstermiştir.

Çalışmamızda luteal fazda beyin NO düzeyini artmış bulmamız premenstrüel migrenin etiopatolojisine işaret ediyor olabilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

NO menstrual siklus fizyolojisi ve pek çok hastalığın fizyopatolojisinde anahtar rol oynamaktadır. Bu çalışmada uterus ve ovaryum dokularında NO düzeyinin estrus evresinde yüksek bulunması NO'nin ovulasyon süreçlerine aracılık ettiğini göstermektedir. Bu durum anovulatuvar siklus ile seyreden hastalıklarla özellikle infertilite fizyopatolojisinde etkili olabilir. Beyin dokusunda metestrus evresinde yükselen NO kadınlarda premenstrual dönemdeki artmış irritabilite ve azalmış konsantrasyon ile seyreden premenstrual sendrom ve özellikle premenstrual ataklarla seyreden migren ile ilişkili olabilir.

Çalışmamız bu hastalıkları etiopatolojisine ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine imkan sağlayabilir. Bu hastalıkların deneysel hayvan modelleri ve hasta gruplarında NO ile ilişkilendirilmiş ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- 1) **Roselli M, Keller PJ, Dubey PK.** Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Rep*, **1998**; 4(1): 3-24.
- 2) **Eşsizoglu A, Yıldırım EA.** Nitrik oxide in the psychobiology of mental disorders. *Dicle Tıp Derg*, **2009**; 36(1): 67-74.
- 3) **Kılınç A, Kılınç K.** Nitrik oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Ankara: Palme Yayıncılık, **2003**.
- 4) **Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM, Besler HT.** The role of nitric oxide in trauma and infection. *Ulus Travma Derg*, **2004**; 10(3): 149-159.
- 5) **Atalık KE, Doğan N.** Nitric oxide and its physiological effects. *Genel Tıp Derg*, **1997**; 7(3): 167-169.
- 6) **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol*, **1991**; 43(2): 109-142.
- 7) **Barett KE, Barman SM, Boitano S and Brooks HL.** Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi. 23. Baskı, İstanbul: Nobel Matbaacılık, **2011**.
- 8) **Dixit VD, Parvizi N.** Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal Reprod Sci*, **2001**; 65: 1-16.
- 9) **Buhimschi IA, Yallampalli C, Buhimschi CS, Saade GR, Garfield RE.** Distinct regulation of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production by steroid hormones in the rat uterus. *Mol. Hum. Reprod.*, **2000**; 6(5): 404-414.
- 10) **Ulbrich SE, Rehfeld S, Bauersachs S, Wolf E, Rottmayer R, Hiendleder S, Vermehren M, Sinowatz F, Meyer HHD and Einspainer R.** Region-specific expression of nitric oxide synthases in the bovine oviduct during the oestrous cycle and in vitro. *J Endocrinol.*, **2006**; 188: 205-213.
- 11) **Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Sica M, Gotti S, Martini M, Pinos H, Carrilo B and Collado P.** Effects of gonadal hormones on central nitric oxide producing systems. *J Neurosci*, **2006**; 138: 987-995.

- 12) **Geller DA, and Billiar TR.** Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and Metastasis Reviews*, **1998**;17:7-23.
- 13) **Şahinarslan N.** Nitrik Oksitin Sıçan Ovaryumunda Folikül Gelişimi Üzerine Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2009**.
- 14) **Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C.** Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization and regulation. *J Bioenergetic and Biomembranes*, **2004**; 36: 341-346.
- 15) **Ulhaq S, Chinje EC, Naylor MA, Jaffar M, Stratford IJ, Threadgill MD.** S-2-amino-5-azolylpentaraic acids related to L-ornithine as inhibitors of the isoforms of nitric oxide synthase (NOS). *Bioenergetic and Med Chem*, **1998**; 6(11): 2139-2149.
- 16) **Bülbül A, Soylu SM.** The effects of nitric oxide on cardiovascular system. *Vet Hekim Der Derg*, **2008**; 79(2): 49-54.
- 17) **Türköz Y, Özerol E.** Nitric oxide: actions and pathological roles. *J Turgut Özal Medical Center*, **1997**; 4(4): 453-461.
- 18) **Napoli C, Ignarro LJ.** Focus on nebivolol. Milano-Italy: One-way publishing, **2004**.
- 19) **Tassigny XA, Campagne C, Dehouck B, Leroy D, Holstein GR, Beauvillain JC, Buee-Scherrer V, Prevot V.** Coupling of neuronal nitric oxide synthase to NMDA receptors via postsynaptic density-95 depend on estrogen and contributes to the central control of adult female reproduction. *J Neurosci*, **2007**; 27(23): 6103-6114.
- 20) **Erden F.** Nitrik oksitin anksiyete ve depresyon ile ilişkisi.
Erişim: www.ctf.edu.tr/farma/tfd/tfd2005_097_erden.pdf 2012. Erişim tarihi: 28.08.2012.
- 21) **Bogdan C.** Nitric oxide and the immun response. *Nature Immunol*, **2001**; 2(10): 907-916.
- 22) **Widmaier EP, Raff H, Strang KT.** Vander insan fizyolojisi. 10. Baskı, İzmir: İzmir Güven Kitabevi, **2010**.
- 23) **Guyton AC, Hall JE.** Tıbbi fizyoloji. 11. Basım, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, **2007**.

- 24) **Numez-de la Mora A, Chatterton RT, Chaundry OA, Napolitano DA, Bentley GR.** Childhood conditions influence adult progesterone levels. *Plos Med*, **2007**;15;4(5): e167.
- 25) Female reproductive system.
Erişim: usmlelinks.com/?cat=1080. Erişim tarihi: 25.07.2012.
- 26) **Mlazımoğlu SB, İde T, Aslan S.** Ratlarda reme. *J Clin Analytical Med*, **2011**; 39-44.
- 27) **Soylu SM.** Rat fizyoloğisi. *J Clin Analytical Med*, **2010**; 22-25.
- 28) **Emanuele MA, Wezeman F, Emanuele NV.** Alcohol's effects on female reproductive function. *Alcohol Reseaarch and Health*, **2002**; 26(4): 274-281.
- 29) **Motta AB, Estevez A, Gimeno MF.** The involvement of nitric oxide in corpus luteum in the rat: feedback mechanism between prostaglandin F_{2α} and nitric oxide. *Mol Hum Reprod*, **1999**; 5(1): 1011-1016.
- 30) **Tamanini C, Basini G, Graselli F, Tirelli M.** Nitrik oxide and ovary. *J Anim Sci*, **2003**; 81:E1-E7.
- 31) **Jablonka-Sharriff A, Olson LM.** Hormonal regulation of NOS and their cell-specific expression during follicular devolopment in the rat ovary. *Endocrinol*, **1996**; 138(1): 460-468.
- 32) **Faletti A, Martinez SP, Perotti C, Gimeno MAF.** Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOS) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins production. *Nitrric oxide : Biol and Chem*, **1999**; 3(4):340-347.
- 33) **Voorhis BJV, Moore K, Strijbos PJLM, Nelson S, Baylis SA, Grzybicki D, Weiner CP.** Expression and localization of inducible ntric oxide synthsae and endothelial nitric oxide synthsae in the rat ovary. *J Clin Invest*, **1995**; 96: 2719-2726.
- 34) **Dunnam RC, Hill MJ, Lawson DM, Dunbar JC.** Ovarian hormone secretory response to gonadotropins and nitric oxide following chronic nitric oxide deficiency in the rat. *Biol Reprod*, **1999**; 60: 959-963.
- 35) **Delgado SM, Sosa Z, Dominguez NS, Casais M, Aguado L, Rastrilla AM.** Effect of the relation between neuronal cholinergic action and nitric oxide on avarian steroidogenesis in prepubertal rats. *J Steroid Biochem nad Mol Biol*, **2004**; 91:139-145.

- 36) **Yang H, Bhat GK, Wadley R, Wright KL, Chung BM, Whittaker JA, Dharmarajan AM, Sridaran R.** Gonadotropin-releasing hormone-agonist inhibits synthesis of nitric oxide and steroidogenesis by luteal cells in the pregnant rat. *Biol Reprod*, **2003**; 68: 2222-2231.
- 37) **Çelik HA, Bülbül A.** The effects of nitric oxide on female reproductive system. *J Fac Med Univ Erciyes I*, **2004**; 1(2): 155-160.
- 38) **Norman J, Cameron IT.** Nitric oxide in the human uterus. *Rev Reprod*, **1996**; 1: 61-68.
- 39) **Suburo AM, Chaud M, Franchi A, Polak JM, Gimeno MAF.** Distrubution of neuronal and non-neuronal NADPH diaphorases and nitric oxide synthases in rat uterine horns under different hormonal conditions. *Biol Reprod*, **1995**; 52: 631-637.
- 40) **Norman J.** Nitric oxide and the myometrium. *Pharmacol and Therapeutics*, **1996**; 70(2): 91-100.
- 41) **Garfield RE, Saade G, Buhinski C, Buhimschi I, Shi L, Shi SQ, Chwalisz K.** Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod*, **1998**; 4(5): 673-695.
- 42) **Wieser F, Gruber DM, Tschugged W, Huber JC.** Progesteron and nitric oxide systems. *Zentrabl Gynakol*, **1997**; 119 (2): 6-12.
- 43) **Chwalisz K, Garfield RE.** Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum Reprod*, **2000**; 3: 96-111.
- 44) **Hennan JK, Diamond J.** Evidence that spontaneous contractile activitty in the rat myometrium is not inhibited by NO-mediated increases in tissue levels of cyclic cGMP. *British J Pharmacol*, **1998**; 123: 959-967.
- 45) **Bülbül A, Yağcı A, Altunbaş K, Sevimli A, Çelik HA, Karadeniz A, Akdağ E.** The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. *Theriogenol*, **2007**; 68(8): 1156-1168.
- 46) **Lozach A, Garrel G, Lerrant Y, Berault A, Counis R.** GnRH-dependent up-regulation of nitric oxide synthase I level in pituitary gonadotrophs mediates cGMP elevation during rat proestrus. *Mol and Cel Endocrinol*, **1998**; 143: 43-51.

- 47) **Orozco AV, Sosa Z, Filippa V, Mohamed F, Rastrilla AM.** The cholinergic influence on the mesenteric ganglion affects the liberation of ovarian steroids and nitric oxide in oesrtus day rats: characterization of an *ex vivo* system. *J Endocrinol*, **2006**; 191: 58-598.
- 48) **Ceccatelli S, Hulting AL, Zhang X, Gustafsson L, Villar M, Hökfelt T.** Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of NO in LH secretion. *Neurobiol*, **1993**; 90: 11292-11296.
- 49) **Sica M, Martini M, Panzica CV, Panzica GC.** Estrus cycle influences the expression of neuronal nitric oxide synthase in the hypothalamus and limbic system of female mice. *Neurosci*, **2009**; 10: 78.
- 50) **Santmyire BR, Venkat V, Beinder E, Baylis C.** Impact of the estrus cycle and reduction in estrogen levels with aromatase inhibition, on renal function and nitric oxide activity in female rats. *Steroids*, **2010**; 75: 1011-1015.
- 51) **Grohe C, Kann S, Fink L, Djoufack PC, Paehr M, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Fink KB.** 17-beta estradiol regulates nNOS and eNOS activity in the hippocampus. *Mol Neurosci*, **2004**; 15(1): 89-93.
- 52) **Gotti S, Martini M, Monica P, panzica CV, Panzica GC.** Rapid changes on nitrinergic system in female Mouse hippocampus during the ovarian cycle. *J Chemical neuroanatomy*, **2009**; 38: 117-123.
- 53) **Svanes C, Real FG, Gislason T, Jonsson C, Jögi R, Norman E, Nyström L, Toren K, Omanaas E.** Association of asthma and hay fever with irregular menstruation. *Thorax*, **2005**; 60: 445-450.
- 54) **Fausser BC, Laven JS, Tarlatzis BC, Moley KH, Critchley HO, Taylor RN, Berga SL, Mermelstein PG, Devroey P, Gianordi L, D'Hooge T, Vercellini P, Hummelshoj L, Rubin S, Goverde AJ, De Leo V, Petroglia F.** Sex steroid hormones and reproductive disorders; impact on women's health. *Reprod Sci*, **2011**; 18: 702-712.
- 55) **Sugiura K, Nishikawa M, Ishigura K, Tajima T, Inaba M, Tarii R, Hataya S, Wijewardana V, Kumagai D, Tamada H, Sawada T, Ikehona S, Inaba T.** Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the belge bitch. *Immunobiol*, **2004**; 209: 619-627.

- 56) **Kane SV, Sable K, Hanauer SB.** The menstrual cycle and its effect on inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome; a prevalence study. *The American J Gastroenterol*, **1998**; 93: 1867-1872.
- 57) **Berman NEJ, Puri V, Chandrala S, Puri S, Macgregor R, Liverman CS, Klein RM.** Serotonin in trigeminal ganglia of female rodents; relevance to menstrual migraine. *Hedache*, **2006**; 46: 1230-1245.
- 58) **Fillingim RB, Maixner W, Girdler SS, Light KC, Harris B, Sheps DS, Mason GA.** Ischemic but not thermal pain sensitivity varies across the menstrual cycle. *Psychosomatic Med*, **1997**; 59: 512-520.
- 59) **Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Howarth P, Redington A.** Induction of nitric oxide synthase in asthma. *The Lancet*, **1993**; 342: 1510-1513.
- 60) **Tore F, Korkmaz OT, Ak DD, Tuncel N.** The effects of vasoactive intestinal peptide on dura mater nitric oxide levels and vessel-contraction responses in sympathectomized rats. *J Mol Neurosci*, **2010**; 41: 288-293.
- 61) **Moshage H, Kok B, Huizange JR.** Nitrite and nitrate determinations in plasma; a critical evaluation. *Clin Chem*, **1995**; 41:892-896.
- 62) **Bories PN, Bories C.** Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem*, **1995**; 41(6): 904-907.
- 63) **Sadeghipour HR, Ghasemi M, Sadeghipour H, Riazi K, Soufiabadi M, Fallahi N, Dehpour AR.** Nitric oxide involvement in estrus cycle-dependent changes of the behavioural responses of female rats in the elevated plus-maze test. *Brain Research*, **2007**; 178(1): 10-17.
- 64) **Jablonka-Shariff A, Ravi S, Beltsos AN, Murphy LL, Olson LM.** Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biol Reprod*, **1999**; 61(1): 171-177.
- 65) **Rosselli M, Imthurn B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK.** Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development; indirect evidence for estradiol mediated nitric oxide release. *Biochem Biophys Res Commun*, **1994**; 202:1543-1552.

- 66) **Zackrisson U, Mikuni M, Wallih A, Delbro D, Hedin L, Brannstrom M.** Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum Reprod*, **1996**; 11(12): 2667-2673.
- 67) **Dong YL, Gangula PRR, Fang L, Yallampalli C.** Nitric oxide reverses prostaglandin-induced inhibition in ovarian progesterone secretion in rats. *Hum Reprod*, **1999**; 14(1): 27-32.
- 68) **Matsumi H, Yano T, Koji T, Ogura T, Tsutsumi O, Taketani Y, Esumi H.** Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: a possible involvement of nitric oxide in follicular development. *Biochem Biophys Res Commun*, **1998**, 243(1): 67-72.
- 69) **Lucca JJD, Adeagbo ASO, Alsip NL.** Oestrous cycle and pregnancy alter the reactivity of the rat uterine vasculature. *Hum Reprod*, **2000**; 15(12): 2496-2503.
- 70) **Taguchi M, Alfer J, Chwalisz K, Beier HM, Classen-Linke I.** Endothelial nitric oxide synthase is differently expressed in human endometrial vessels during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*, **2000**; 6(2): 185-190.
- 71) **Knauf C, Ferreira S, Hamdane M, Mailliot C, Prevot V, Beauvillain JC, Croix D.** Variation of endothelial nitric oxide synthase synthesis in the median eminence during the rat estrus cycle; an additional argument for the implication of vascular blood vessel in the control of GnRH release. *Endocrinol*, 2011; 142(10): 4288-4294.
- 72) **Dhillon KS, Singh J, Lyall JS.** A new horizon into the pathobiology, etiology and treatment of migraine. *Med Hypotheses*, 2011; 77(1): 147-151.
- 73) **Martin VT, Lee J, Bebehani MM.** Sensitization of the trigeminal sensory system during different stages of rat estrous cycle: implications for menstrual migraine. *Hedache*, **2007**; 47: 552-563.

EKLER

EK 1: Etik kurul onayı.



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı :B.30.2.ABÜ.0.05.05-050.01.04-472

11/04/2012

Konu: Kararlar.

Sayın; Prof. Dr. Fatma TÖRE

A.İ.B.Ü Tıp Fakültesi
Fizyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu tarafından 2012/16 no.lu'' Beyin ve üreme organlarının nitrik oksit aktivitesinin östrus siklusu ile ilişkisinin araştırılması '' isimli çalışmanız etik olarak uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Aysel KÜKNER
(Başkan)


Prof. Dr. Erol AYAZ
(Üye)

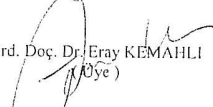

Prof. Dr. Mehmet YAZICI
(Üye)

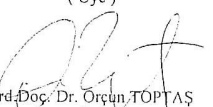
Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL
(Üye)


Doç. Dr. Fatih DEMİRCİOĞLU
(Üye)

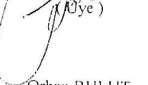

Doç. Dr. Alper KARAKAŞ
(Üye)


Doç. Dr. Serkan ÇAKIR
(Üye)


Yrd. Doç. Dr. Eray KEMAHLLI
(Üye)


Yrd. Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ
(Üye)

Av. Erol ALTINTAŞ
(Üye)


Orhan BULUT
(Veteriner Hekim)

Adres : Abant İzzet Baysal Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu 14280 Gökçöy / BOLU
Telefon : 0374 253 45 68 Fax : 0374 253 45 59

10.ÖZGEÇMİŞ

Tuğba Kırboğa 05.10.1986 tarihinde Tokat'ta doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2005'te girdiği Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2010'da mezun oldu. 2011'de başladığı Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans programına devam etmektedir.