

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

SIÇAN SERVİKSİNİN OLGUNLAŞMASINDA
İNDÜKLENEBİLİR NİTRİK OKSİT SENTAZ'IN (iNOS)
ÖNEMİ VE OLASI ROLÜ

Melike SAÇAN

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2009

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

SIÇAN SERVİKSİNİN OLGUNLAŞMASINDA
İNDÜKLENEBİLİR NİTRİK OKSİT SENTAZ'IN (iNOS)
ÖNEMİ VE OLASI ROLÜ

Melike SAÇAN

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mevlüt ASAR

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
desteklenmiştir (Proje No: 2007.02.0122.012)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Histoloji ve Embriyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.
15/06/09

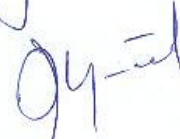
Tez danışmanı: Prof. Dr. Mevlüt ASAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



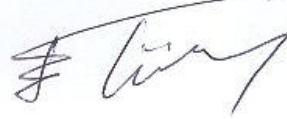
Üye: Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye: Doç. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye: Doç. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



ONAY :

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri
tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../2009 tarih
ve/.... Sayılı kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

Servikal olgunlaşma lökosit infiltrasyonu, ESM'nin su içeriğindeki değişiklikler ve kollajen liflerin yeniden düzenlenmesi dahil inflamatuvar bir reaksiyondur. Bu olayın kontrolü, birçok mediyatörün görev aldığına işaret edilmesine rağmen hala büyük oranda bilinmemektedir. İnflamatuvar bir mediyatör olan NO'nun başka dokularda MMP aktivitesini stimüle ettiği ve proteoglikan sentezini baskıladığı bilindiğinden, bu çalışmada NO'nun gebelik süresinde ve doğumda serviksin yeniden yapılanmasında görev alıp almadığı ışık mikroskopi ile immünohistokimyasal olarak ve TEM düzeyinde belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla daha önce deneye girmemiş 200-250 g arasında 108 adet dişi Wistar sıçan kullanıldı. İki dişiye bir erkek olacak şekilde kafeste bir gece bırakılan dişi sıçanlara vajinal simir yapılarak spermiyum gözlenen dişiler gebeliğin 0. gününde kabul edildi. Östrus ve gebeliğin 18, 20, 21., doğum sonrası 0. günler olmak üzere 5 kontrol, gebeliğin 18, 20, 21., doğum sonrası 0. günler olmak üzere 4 deney grubu oluşturuldu. Deney hayvanlarına sabahları 5 gün süreyle oral yolla 50 mg/gün/sıçan L-NAME verildi. Kontrol ve deney hayvanları belirtilen günün sabahında eter anestezisi altında diseke edildi ve ışık ve tranmisyon elektron mikroskopi için ayrıca nitrit/nitrat ölçümlerinde kullanılmak üzere servikal doku örnekleri alındı. Toplanan örneklerden bir kısmı rutin histolojik ve elektron mikroskop takip işlemlerinden geçirildi. Parafin bloklardan alınan kesitlerde iNOS'un dağılımlarına, keza CD45 immünboyanması ile de genel lökosit yoğunluğuna, TEM için alınan ince kesitlerde hücresel ve lifsel elemanların yapısal değişikliklerine bakıldı. L-NAME uygulanan hayvanların servikal dokularında gebelik boyunca ve PPO. günde kollajen lif düzeninde bozulmalar gözlemlendi. iNOS boyanması kontrole göre daha azdı, nitrit/nitrat değerleri de oldukça düşüktü. CD45 pozitif boyanmış lökosit sayısında, görünüşte östrusa göre kontrol ve deney grubunun gebelik devresinde ve PPO. günlerde artış vardı.

Sonuç olarak; 1) L-NAME uygulanan deney grubunda iNOS boyanma şiddeti ile nitrit/nitrat değerlerinin gebelik devresinde kontrole göre önemlilik düzeyinde düşük olmasından NOS ürünü olan NO'nun sıçan serviksinin olgunlaşma ve doğum olayına katıldığını, 2) L-NAME uygulanmasının doğumla sonuçlanmasından NO'nun yalnız olmadığı başka mediyatörlerin de bu olayda görev aldığını, 3) CD45 pozitif lökosit sayısı iki grupta da görünüşe göre artış gösterdiğinden servikal olgunlaşma ve doğum olayının inflamatuvar bir olay olduğunu ifade edebiliriz.

Anahtar Kelimeler: iNOS, CD45, serviks, sıçan

ABSTRACT

Cervical maturation is an inflammatory reaction which involves infiltration of leukocytes, changes in ECM component elements and restructuring of collagen fibers. Despite many mediators of this event having been known, the exact control mechanism is still largely unknown. The inflammatory mediator NO has been suggested to stimulate MMP activity and to suppress proteoglycan synthesis in some other tissues. Therefore, we aimed to clarify the possible role of NO during pregnancy and cervical reconstruction at birth by using immunohistochemical techniques combined with TEM. In this study, we used 108 female Wistar rats which were 200-250g. Two males per one female were caged together overnight for copulation. The pregnancies were detected by vaginal smear and spermium positive females were accepted as pregnant as of day 0. Estrous day, pre-natal days 18, 20, 21 and post-natal day 0 animals were constituted of the control group. Pre-natal days 18, 20, 21 and post-natal day 0 animals were constituted of the experimental group. The experimental group were treated with orally given L-NAME for 5 days with a dose of 50mg/day/rat. The tissues from both control and experimental groups were taken from the desired days and processed for routine light microscope and transmission electron microscope examinations. One piece of each tissue were also stored for nitrite/nitrate measurements. The iNOS distribution were evaluated in paraffin cervix tissue sections. These sections were also used to detect the leukocyte density with CD45 immunohistochemistry. TEM sections were used to evaluate the cellular and structural changes. In L-NAME treated experimental group, dissolving of collagen fibers were also seen throughout the progression of pregnancy and at post-partum day 0. However, the staining intensity of iNOS and the nitrite/nitrate levels decreased more than in the control group. The number of CD45 positive leukocyte was increased with the progression of pregnancy and in post-partum 0 both in control and experimental groups compared to estrous.

Our conclusions are as follows: 1) Because in L-NAME treated experimental group, the intensity of iNOS staining and the nitrite/nitrate levels were lower than the control group throughout the pregnancy, the NOS product NO might contribute to the cervical maturation and birth, 2) Because the treatment of L-NAME also resulted in birth, mediators other than NO might regulate this event, 3) Because the number of CD45 positive leukocytes seemed to be increased with the progression of pregnancy in both groups, we can tell the cervical maturation and birth events are inflammatory processes.

Key words: iNOS, CD45, cervix, rat

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, projelendirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan proje yürütücüsü ve danışman hocam Prof. Dr. Mevlüt ASAR'a

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına ve çalışanlarına, özellikle Anabilim Dalı teknisyeni Sibel ÖZER ÖZDEN'e,

Temga Ünitesi bünyesinde yapılan çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen TEMGA Ünitesi Başkanı Doç. Dr. Necdet DEMİR'e ve çalışanları; Arife DEMİRTOP ve Hakan ER'e,

Deney modelinde yapılan biyokimyasal çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gültekin YÜCEL, Doç Dr. Mutay ASLAN ve Arş. Gör. Ayşegül ÇÖRT'e,

Tezimin yazım aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen çalışma arkadaşım Arş. Gör. Zeliha ŞAHİN'e,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Son olarak desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve beni yalnız bırakmayan sevgili aileme, en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii

GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
-------------------------------	---

GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Organlarından Serviksin Histolojisi	3
2.1.1. Ekstrasellüler Matriks (ESM)	3
2.1.2. Proteoglikanlar	4
2.1.3. Tutunucu Glikoproteinler	4
2.1.4. ESM Lifleri	4
2.1.5. Nitrik Oksit (NO)	5
2.1.5.1. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) ve İzofomları	5
2.1.5.2. Nitrik Oksit Sentaz Enziminin İnhibitörleri	8
2.1.5.3. Nitrik Oksit Sentezi	9
2.1.5.4. Nitrik Oksit'in Etki Mekanizması	10
2.1.5.5. Nitrik Oksit, İmmünite ve İnflamasyon	11
2.1.5.6. Nitrik Oksit ve Üreme Sistemi	12
2.1.6. Gebelik ve Doğum Esnasında Serviksin Kontrolü	12
2.1.6.1. Serviksin Hazırlanması	13

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Servikal Olgunlaşma Modelinin Oluşturulması	15
3.2. Doku Temini ve Hazırlanması	15
3.3. Işık Mikroskobu Çalışması	15
3.4. İmmünohistokimyasal Protokol	16
3.5. TEM Protokolü	16
3.6. Nitrit/Nitrat Ölçüm Protokolü	17
3.6.1. Nitrojen Metabolitlerinin Miktarının Belirlenmesi	17
3.6.2. Prensip	17
3.6.3. İşlemler	17
3.6.4. Total Nitrit/Nitrat Miktarlarının Hesaplanması	17
3.7. İstatiksel Analiz	18
3.7.1. Semikantitatif Değerlendirme	18
3.7.2. Nitrit/Nitrat Ölçümlerini Değerlendirme	18

BULGULAR		
4.1.	Kontrol Grubunun Sıçan Serviksi	19
4.1.1.	Kontrol Grubunun Sıçan Serviksine Genel Bakış: Hematoksilen – Eozin Boyaması	19
4.1.2.	Kontrol Grubunun Sıçan Serviksinde İmmünohisyokimyasal ve Elektron Mikroskopik Bulgular	20
4.1.2.1.	Östrus Sıçanı Serviksi	20
4.1.2.2.	Gebeliğin 18. günü	22
4.1.2.3.	Gebeliğin 20. günü	23
4.1.2.4.	Gebeliğin 21. günü	25
4.1.2.5.	Doğum Sonrası Sıfırncı (PPO) gün	27
4.2.	Deney Grubunun Sıçan Serviksi	30
4.2.1.	Deney Grubunun Sıçan Serviksinde İmmünohistokimyasal ve Elektron Mikroskopik Bulgular	30
4.2.1.1.	Gebeliğin 18. günü	30
4.2.1.2.	Gebeliğin 20. günü	31
4.2.1.3.	Gebeliğin 21. günü	33
4.2.1.4.	Doğum Sonrası Sıfırncı (PPO) gün	35
TARTIŞMA		39
SONUÇLAR		43
KAYNAKLAR		44
ÖZGEÇMİŞ		50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl	:	Mikro litre
µm	:	Mikro metre
AC	:	Adenilat siklaz
Ach	:	Asetilkolin
ADPRT	:	Adenozin difosfat ribozil transferaz
ATP	:	Adenozin trifosfat
BH₄	:	Tetrahidrobiyopterin
Ca⁺²	:	Kalsiyum
CaM	:	Kalmodulin
cGMP	:	Guanizin 3'-5'-siklik monofosfat
Cl⁻	:	Klorür
cNOS	:	Yapısal nitrik oksit sentaz
COX	:	Siklooksijenaz
Da	:	Dalton
DAB	:	3,3' Diaminobenzidin
DAPH	:	2, 4, -diamino-6-hidroksipirimid
DPI	:	Difenileneiodonyum
EDRF	:	Endotel-kaynaklı gevşetici faktör
eNOS	:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
ESM	:	Ekstrasellüler matriks
FAD	:	Flavin adenin dinükleotid
FMN	:	Flavin mono nükleotid
g	:	Gram
GAG	:	Glukozaminoglikanlar
GC	:	Guanilat siklaz
GSH	:	Glutatyon
HE	:	Hematoksilen eozin

H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HSP	:	Heat shock-related protein
IFN-γ	:	İnterferon-gama
IL	:	İnterlökin
iNOS	:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
K⁺	:	Potasyum
L-ADMA	:	NN-dimetil-l-arjinin
L-NAME	:	N ^G -nitro-L-arjinin metil ester
L-NIL	:	L-N-iminoetil lizin
L-NIO	:	N-iminoetil-l-ornitin
L-NMMA	:	L-N ^G monometil-arjinin
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
MAP	:	Mitojen-aktif protein
MLCP	:	Miyozin hafif zincir fosfataz
mm	:	Milimetre
nm	:	Nanometre
nNOS	:	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	:	Nitrik oksit
NO₂	:	Nitrit
NO₃	:	Nitrat
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
ODQ	:	1H-[1,2,4] Oxadiazolo-[4,3-a] quinoxalin-1-one
ONOO⁻	:	Peroksinitrit
PBS	:	Fosfat borat tamponu
PG	:	Prostaglandin
PGC	:	Partiküllü guanilat siklaz
PK	:	Protein kinaz
SOD	:	Süperoksit dizmutaz
SNP	:	Sodyum nitro prussid
TEM	:	Transmisyon elektron mikroskopu
TGF-β	:	Transforma growth factor beta
TNF-α	:	Tümör nekroz faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Nitrik oksit sentezi	5
2.2.	NOS'un redüktaz ve oksijenaz domeynlerini içeren dimer yapısı	6
2.3.	Endotel hücresinde L-arjininden NO sentezi ve düz kas hücresinde gevşeme oluşturma mekanizmaları	9
2.4.	Doğum sırasında, uterus , serviks ve fetal membranların fazlarının durumu	13
4.1a,b.	Östrus evresinde ve gebeliğin 21. gününde hematoksilen-eozin ile boyanmış sıçan serviksinin ışık mikrografları	20
4.2a,b.	Östrus sıçanı serviksinin iNOS immünboyanması ışık mikrografları	21
4.3a,b.	Östrus sıçanı serviksinde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrografları	21
4.4a,b.	İmmünohistokimyasal boyamalara ait negatif kontroller	21
4.5a,b.	Östrus devresinde sıçan serviksinin TEM mikrografları	22
4.6a,b.	Gebeliğin 18.gününde sıçan serviksinin iNOS immünboyanması ışık mikrografları	22
4.7a,b.	Gebeliğin 18. gününde sıçan serviksinde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrografları	23
4.8a,b.	Kontrol grubunda, 18 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikrografları	23
4.9a-c.	Gebeliğin 20. gününde sıçan serviksinin iNOS immünboyanması ışık mikrografları	24
4.10a,b.	Gebeliğin 20. gününde sıçan serviksinde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrografları	25
4.11a,b.	Kontrol grubunda, 20 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikrografları	25
4.12a-c.	Gebeliğin 21. gününde sıçan serviksinin iNOS immünboyanması ışık mikrografları	26
4.13a,b.	Gebeliğin 21. gününde sıçan serviksinde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrografları	27
4.14a,b.	Kontrol grubunda, 21 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikrografları	27
4.15a-c.	Gebeliğin doğum sonrası sıfırıncı (PPO) gününde sıçan serviksinin iNOS immünboyanması ışık mikrografları	28
4.16a,b.	Sıçan serviksinin doğum sonrası sıfırıncı (PPO) gününde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrografları	29
4.17a,b.	Kontrol grubunda, doğum sonrası sıfırıncı günde (PPO) sıçan serviksinin TEM mikrografları	29

4.18a,b.	L-NAME verilen sıçan serviksinin gebeliğin 18. gününde iNOS immünboyanması ışık mikrografları	30
4.19a,b.	L-NAME verilen sıçan serviksinde gebeliğin 18. gününde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrografları	31
4.20a,b.	Deney grubunda 18 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikrografları	31
4.21a-c.	L-NAME verilen sıçan serviksinin gebeliğin 20. gününde iNOS immünboyanması ışık mikrografları	32
4.22a,b.	L-NAME verilen sıçan serviksinde gebeliğin 20. gününde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrografları	32
4.23a,b.	Deney grubunda 20 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikrografları	33
4.24a,b.	L-NAME verilen sıçan serviksinin gebeliğin 21. gününde iNOS immünboyanması ışık mikrografları	34
4.25a,b.	L-NAME verilen sıçan serviksinde gebeliğin 21. gününde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrografları	34
4.26a,b.	Deney grubunda 21 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikrografları	34
4.27a,b.	L-NAME verilen sıçan serviksinin doğum sonrası sıfırıncı (PP0) gününde iNOS immünboyanması ışık mikrografları	35
4.28a,b.	L-NAME verilen sıçan serviksinin doğum sonrası sıfırıncı (PPO) gününde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrografları	36
4.29a,b.	Deney grubunda, doğum sonrası sıfırıncı günde (PPO) sıçan serviksinin TEM mikrografları	36
4.30.	Kontrol ve deney sıçanı serviksinde; östrusta, gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırıncı (PPO) günlerinde nitrit/nitrat ölçüm değerleri histogramı	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
4.1. Kontrol sıçanı serviksinde östrusta ve gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırncı (PPO) günlerinde iNOS antikoru immünboyanma yoğunluğu	29
4.2. Deney sıçanı serviksinde gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırncı (PPO) günlerinde iNOS antikoru immünboyanma yoğunluğu	36
4.3. Kontrol ve deney sıçanı serviksinde östrusta, gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırncı (PPO) günlerinde nitrit/nitrat ölçüm değerleri	.37
4.4. Kontrol ve deney sıçanı serviksinde; östrusta, gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırncı (PPO) günlerinde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğu HSCORE değerleri	38

GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Son yıllarda araştırmacıların dikkatleri genelde uterus ve servikte gebelikten doğuma geçişi kontrol eden temel mekanizmaların çalışılması üzerine odaklandı. Bu konudaki araştırmacılar progesteron ve antagonistleriyle yaptıkları deneysel ve klinik çalışmalar sonunda doğumun iki kademeli bir olay olduğunu gösterdiler. Uzun süren hazırlık fazında servikal olgunlaşma gerçekleşir. Bunu takip eden kısa süreli ikinci faz olan aktif doğumda da 12-24 saat süren doğum olayı gerçekleşir (1, 2).

Doğumun bu iki temel fazının uterus ve serviks üzerinde endokrin, sinirsel ve immünokontrol mekanizmaların etkileşimi dahil çeşitli sistemlerle koordineli olarak düzenlendiği sanılır. Progesteronla yapılan deneysel ve klinik çalışmalar gebeliğin oluşmasında ve devamında progesteronun merkez bir rol oynadığını göstermektedir (3).

Gebelik esnasında, uterusun kontraktıl fonksiyonu baskılanır. Çünkü serviksin sıkıca kapalı kalması gerekir. Bu devrede uterusun dinlenme hali fetusun normal gelişmesi için esastır (4). Progesteronun dinlenme halindeki uterus üzerinde tam bir kontrolünün olduğu sanılmaktadır (1, 5).

Hazırlık fazında, rijid ve kapalı serviksin yumuşaması ve açılmasına paralel olarak uterus kontraktilesi de inaktiften kuvvetli aktif duruma doğru ilerler. Serviksteki değişim bağ dokusundaki değişikliklerle ve inflamatuvar hücre göçüyle ilgilidir (6). Servikte olanlara benzer hazırlık değişikliklerinin fetal membranlarda da görülmesi muhtemeldir (3).

Biyolojide ve tıpta çok heyecan verici önemli ilerlemelerden biri, diffüze olabilir nitrik oksidin (NO) endotel hücreleri tarafından üretilmesi ve bunun damar tonusunun platelet agregasyonunun, düz kasta periferik nitrejik transmisyonun, santral sinir sisteminde intrasellüler iletişimin ve bakteriyel ürünlerle temasını takiben makrofaj savunma mekanizmalarının düzenlenmesiyle ilgili olduğunun keşfidir (7, 8). NO, aminoasit L-arjinini L-sitrulline ve NO'ya değiştiren nitrik oksit sentaz (9) enzim ailesi tarafından sentezlenir. Bugüne kadar üç yüksek ilgili NOS enzimi belirlendi ve izole edildi. Bunlar endotelyal NOS (ec-NOS, tip III), nöronal NOS (nc-NOS, b-NOS, tip I) ve indüklenebilir NOS (i-NOS, tip II) (10). NO sisteminin insan uterusu ve serviksinde bulunduğu ve servikal fonksiyonun kontrolünün düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmiştir (11).

NO sistemi, gebelik esnasında relaksasyondan, gebeliğin devamından ve uteroplental fetal perfüzyondan sorumlu olan büyük bir mekanizma olabilir (12-14).

iNOS'un term ve preterm doğumda uterus azaldığı (15), servikte ise aksine bir değişim gösterdiği rapor edilmiştir (16). Aalberts ve ark. (17), sıgırda doğum öncesi servikal olgunlaşmada, üçüncü trimesterin başında iNOS ve protein seviyesinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (17).

NO'nun sadece uterustaki üretiminin azalmasını takiben doğumun başlamasıyla ilgili olmadığı, aynı zamanda term ve preterm doğumda servikal olgunlaşma mediyatörü de olabileceği düşünülmektedir. Nitekim bir NO donörü olan sodyum nitro prussid (SNP) kobay servikal kanalına uygulandığında prostaglandin E2 (PGE2) etkisine benzer servikal olgunlaşmayı indüklediği gösterilmiştir (18). NO, lokal vazodilatasyonu indüklemek suretiyle vasküler permeabiliteyi artırarak lökosit infiltrasyonunu gerçekleştirebilir, belki de ekstrasellüler matriksin (ESM) yeniden yapılanmasından sorumlu matriks metalloproteinleri (MMP) ve de başka mekanizmaları aktive ederek servikal olgunlaşmayı gerçekleştirmiş olabilir (4).

Doğumun normal başlayıp ilerleyebilmesi için uterus kontraksiyonlarıyla uyum içinde yeterli servikal olgunlaşmanın sağlanması gereklidir. Bu olaydaki düzensizlikler, örneğin yetersiz servikal olgunlaşmaya bağlı gecikmiş doğum ya da prematür servikal olgunlaşmayla karakterize prematür doğum büyük klinik problemlere neden olmaktadır (19). Gebelikte uterus ve serviksin yeniden yapılanmasını düzenleyen mekanizmalar iyi anlaşılamadığından bu konuda pek çok çalışma yapıldığı halde servikal olgunlaşma eksikliğinde kullanılabilen uygun ajanlar bulunamamıştır. Günümüzde servikal olgunlaşmayla ilgili düzensizliklerin giderilmesinde yeni çalışmalara ve bilgilere ihtiyaç vardır.

Verilen literatür bilgisinden anlaşıldığı gibi, servikal olgunlaşma lökosit infiltrasyonu, doku su içeriğindeki değişiklikler ve kollajen liflerin yeniden düzenlenmesi dahil inflamatuvar bir reaksiyondur. Bu olayın kontrolü, bir çok mediyatörün görev aldığına işaret edilmesine rağmen hala büyük oranda bilinmemektedir. İnflamatuvar bir mediyatör olan NO'nun başka dokularda MMP aktivitesini stimüle ettiği ve proteoglikan sentezini baskıladığı bilindiğinden gebelik süresince serviksin yeniden yapılanmasında da benzer şekilde fonksiyon yapabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla bu çalışmada, normalde ve L-NAME verildiğinde gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırıncı (PPO) günlerinde iNOS ürünü NO'nun sıçan serviksinin olgunlaşmasında görev alıp almadığı, bu olayın beyaz kan hücreleriyle ilişkili olup olmadığı ışık mikroskobu ile immünohistokimyasal olarak ve NO'nun stabil metabolitleri olan nitrit/nitrat ölçümleriyle, keza transmisyon elektron mikroskobunda (TEM) ultrastruktürel düzeyde belirlenmeye çalışıldı.

GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Organlarından Serviksin Histolojisi

Dişi üreme organlarından serviks uterusun vajinaya uzanan son kısmıdır. Üst kısmında, uterus boşluğuyla alt kısmında da vajinayla bağlantıdır (20).

Servikte endometriyum kısa ve dallı plikalar oluşturur. Yapısı korpustakinden biraz farklıdır. Epiteli tek katlı yüksek prizmatik hücrelerden yapılmıştır. Hücrelerin oval nükleusları bazaldedir, apikali mukusla doludur. Tek katlı epitel altında lamina propriya sıkı fibröz bağ dokusundan yapılmıştır. Burada serviks bezleri bulunur. Serviks bezleri korpustakine göre kısa, fakat daha fazla dallıdır. Lümenleri geniştir, yüzey epiteli gibi tek katlı yüksek prizmatik, mukus salgılayan hücrelerle örtülüdür. Serviks mukozası menstrual siklusa katılmaz, ancak siklus sırasında hormonların kandaki düzeyine bağlı olarak salgılama işlevi değişir. Siklusun ortasında salgılama artar, mukus sulu akıcı hale gelir. Gebelikte bu bezler daha da genişler, müköz salgıları artar. Serviksin vajina içine giren kısmı, porsiyö vajinalis çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Yüzey hücreleri glikojen içerir. Çok katlı epitel arasında prizmatik epitel adacıkları bulunur. Çok katlı yassı epitel ile tek katlı prizmatik epitel arasında değişim zonu denilen ani bir epitel değişim zonu vardır. Lamina propriya hemen çok katlı epitelin altında elastik liflerden çok zengindir (20).

Serviksin başlangıcında enine kas tabakasından yapılmış kuvvetli kas tabakası vardır ve tunika mukoza altında kanalı sarar. Serviksin son kısımlarında kas dokusu azalır. Kas demetlerini birbirinden ayıran kollajen ve elastik liflerden zengin bağ dokusu miktarı artar. Porsiyö vajinaliste kas demetleri, arasında bulunan bol bağ dokusu ile birbirinden iyice uzaklaşmış bulunurlar. Bu seyrek kas demetleri aşağıda vajinanın kas demetleriyle karışırlar (20) .

2.1.1. Ekstrasellüler Matriks (ESM)

Serviks, yukarıda da değinildiği gibi çoğunluğunu kollajen ve proteoglikanların oluşturduğu fibröz bağ dokusundan yapılmıştır. Bağ dokusu içeriği serviksin alt kısmında yaklaşık %90-95, üst kısmında ise %75'dir. Servikal olgunlaşmada kollajen ve proteoglikan konsantrasyonunun %50-70 azalmış olması, ESM komponentlerinin bu olayda ne kadar önemli olduğunu göstermesi bakımından ilginçtir (21).

Bütün dokular hücrelerden ve hücrelerde sentezlenen ekstrasellüler matriksten yapılmıştır (20).

ESM içinde liflerin yataklandığı hidratlı jele benzer esas maddeden oluşur. Genelde baskı ve güçlerine karşı direnç gösterebilen özelliktedir (20).

Esas madde; glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve tutunucu glikoproteinlerden yapılmıştır. Bu moleküller birbirleriyle, epitel ve bağ dokusunun hücreleri ve lifleriyle etkileşebilirler (20).

Glikozaminoglikanlar (GAG); uzun esnek olmayan dallanmamış polisakkaritlerdir ve tekrar eden disakkarit zincirlerinden oluşurlar (20).

Tekrar eden iki disakkaritten biri amino şeker; diğeri üronik asittir. Amino şekeri genelde sülfatlıdır ve yapısında sodyum gibi katyonları tutan negatif yüklü karboksil grupları vardır. Yüksek sodyum konsantrasyonu doku sıvısının tutulmasına yardımcı olur (22).

Sülfatlı GAG' lar keratan sülfat, heparan sülfat, heparin, kondroitin 4- sülfat, ve dermatan sülfat içerirler ve genelde proteoglikanları oluşturan protein moleküllerine kovalent bağlarla bağlanırlar. Tek sülfatsız GAG, hiyaluronik asittir. Bu da protein molekülleriyle kovalent bağlantılar yapmayan büyük bir moleküldür (20, 22).

2.1.2. Proteoglikanlar

Sülfatlı GAG'lar bir protein özüyle kovalent bağlar oluşturdıkları zaman proteoglikan denen bir büyük molekül ailesi oluştururlar. Bu yapı görünüşte bir şişe fırçasına benzer. Fırçanın eksenini protein öz oluşturur, yüzeyinden de üç yönde uzanan çeşitli sülfatlı GAG'lar ışınlanır (20).

Proteoglikanlar çeşitli büyüklükte olabilir. Proteoglikanların çok çeşitli fonksiyonları vardır. Büyük hacim işgal ederek baskılara direnç gösterirler. Mikroorganizmaların ve metastatik hücrelerin hızlı hareketini geciktirirler. Bazal laminada, değişik por büyüklükleri yaratarak makro moleküllere karşı moleküler filtreler oluştururlar. Sinyal moleküllerini tutarak engelledikleri gibi, belli noktalarda yoğunlaştırarak yüksek fonksiyonlu noktalar yaratabilirler (20, 22). Bazıları da hücre membranına bağlanarak transmembran protein gibi davranabilirler.

2.1.3. Tutunucu Glikoproteinler

Hücreler, ESM bileşenlerine büyük oranda tutunucu glikoproteinlerle tutunurlar. Bunlar büyük makromoleküllerdir ve birkaç domeynleri vardır. Hücre yüzeyine, kollajen liflere ve proteoglikanlara bağlanarak dokuların çeşitli komponentlerini birbirine bağlarlar. Bunlar fibronektin, laminin, entaktin, tenasin, kondronektin ve osteonektindir (20, 22).

2.1.4. ESM Lifleri

Ekstrasellüler matrikse gerilme direnci ve esneklik sağlayan liflerdir. Klasik histolojik boyamalara göre 3 tipi vardır: Kollajen, elastik ve retiküler lifler. Kollajen lifler, vücuttaki proteinlerin yaklaşık %20'sini oluştururlar, çok boldur. Kollajen esnektir ve gerilme gücü aynı çaptaki çelikten daha büyüktür (23), çapları genelde 10 µm'den daha küçüktür. Elektron mikrograflarında 67 nm'lik düzenli aralıklarla enine bantlar oluştururlar. Lifler, 10-300 nm çapında paralel düzenli daha ince fibrillerden (20, 23), fibrillerde yaklaşık 1,5 nm çapında olan ve 3 polipeptid zincirinin heliks şeklinde sarılarak oluşturduğu tropokollajen moleküllerinden yapılmıştır (20).

Retiküler lifler de kollajen yapısındadır (23). Elastik lifler, bağ dokusuna elastikiyet kazandırır. Bu lifler glisin ve prolince zengin bir protein olan elastinden yapılmıştır.

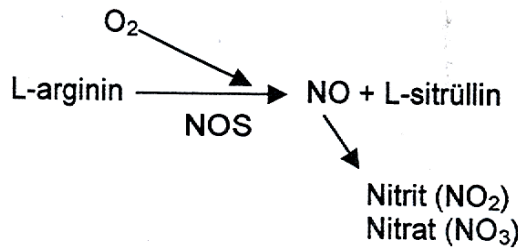
2.1.5. Nitrik Oksit (NO)

İlk olarak, 1980 yılında Furchgott ve Zawadski isimli araştırmacılar (24) asetilkolinin neden olduğu damar gevşemesinin endotelden kaynaklanan gevşetici bir faktör (EDRF; endotel kaynaklı gevşetici faktör) aracılığıyla gerçekleştiğini rapor ettiler. Dr. Furchgott 1986 yılında EDRF ve NO'nun farmakolojik davranışlarındaki benzerliklerinden dolayı EDRF'nin NO olabileceğini bildirdi. 1987'de EDRF'nin NO molekülü olduğu, 1988'de de damar endotel hücrelerinin L-arginin aminoasidini NO sentezinde kullandığı gösterildi (24).

NO, memeli hücrelerinin çoğunda L-arginin aminoasitinden üretilen serbest radikal ve suda eriyebilir bir gazdır (Ş.2.1) (25). NO'nun plazmadaki biyolojik aktif konsantrasyonu 1-100 nM arasında değişir ve 3-5 saniyelik bir yarı ömre sahiptir (24, 26). NO depolanmaz ancak gerektiğinde sentezlenir (27). NO etkilerini, spesifik membran proteinlerine bağlanmaktan ziyade oksijen ve karbondioksit gibi difüzyon yoluyla hücre membranından kolayca geçer ve çevre hücreleri etkileyerek gösterir. NO biyolojik mesajcı olarak görev yapan güçlü bir moleküldür (28).

NO; kan basıncı, mutagenез, apoptozis, kalbin kasılması, penis ereksiyonu gibi birçok işlevi düzenler (29). Solunum yollarında NO'nun vazodilatasyon ve bronş dilatasyonu gibi çeşitli fizyolojik olaylarda rol aldığı ifade edilir (30). NO'nun fonksiyonu çift yönlü bir kılıç gibidir (29). Yararlı etkisinin yanında fazla üretilmesi zararlı olmaktadır. NO'nun, in vitroda sinir hücresi uzantılarının büyümesinde ve farklılaşmasında etkili olduğu, endotel kaynaklı NO'nun damarı koruduğu, nörotransmitter ve hormon üretimine neden olduğu bildirilmiştir (29, 31). NO'nun bilinen genelde 3 klasik fonksiyonu, endotel bağımlı gevşeme, nörotransmisyon ve hücre aracılı immün yanıtıdır (29).

İmmün sistemde NO, tümör hücreleri ve patojenler gibi aktive olmuş makrofajlar ve nötrofiller tarafından üretilir (32).



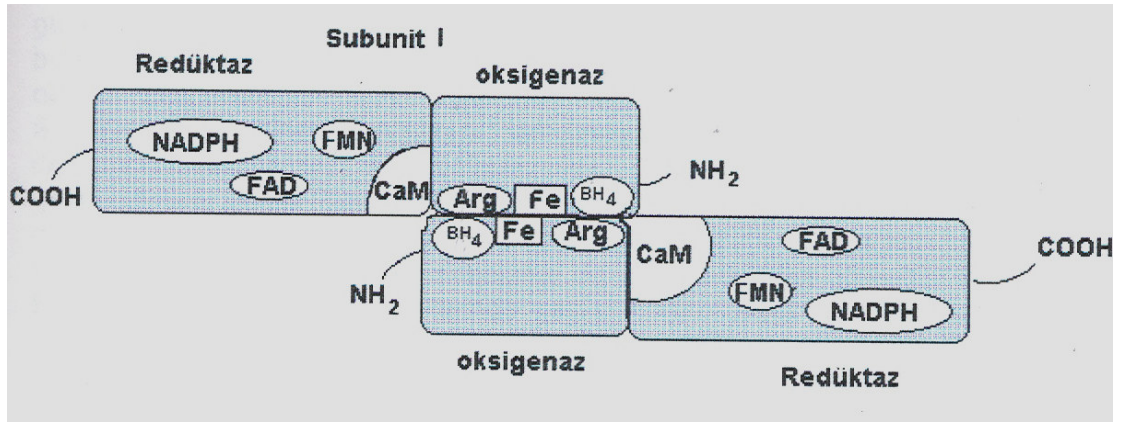
Şekil 2.1. Nitrik oksit sentezi (33)

2.1.5.1. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) ve İzofomları

Genelde NOS enzimi yapısal NOS (cNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere ikiye ayrılır. cNOS hücresel sinyali de içeren kalsiyum/kalmodulin (Ca^{+2}/CaM)-bağımlı tipi iken, iNOS Ca^{+2}/CaM bağımsız tipidir. cNOS'un alt grupları eNOS ve nNOS'dur. iNOS kalsiyumdan bağımsız olarak aktive olur.

cNOS'un aktif olması için hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artması gerekmektedir (26, 29, 34, 35).

İnsanda NOS genleri kromozom 12 (nNOS: 150 kb, 29 exon), kromozom 7 (eNOS: 21-22 kb, 26 exon) ve kromozom 17'de (iNOS: 37 kb, 26 exon) lokalizedir (36). Yapılan son birkaç çalışmada eNOS'un Ca^{+2} bağımsız yolda aktivelebileceği gösterilmiştir (33). Endotel veya düz kas hücrelerinde eNOS ve sinirlerde nNOS'dan kaynaklanan NO arasında ayırım yapılamamaktadır (35). iNOS ve nNOS formları substrat olarak L-arginin metil esteri kullanabildiği halde, eNOS'un kullanamadığı gösterilmiştir (37). İki ayrı monomerden meydana gelen NOS enzimi dimer olarak fonksiyon görmektedir. İki ayrı monomerde fonksiyonel ve yapısal olarak karboksil terminal (redüktaz domeyn) ve amino terminal (oksijenaz domeyn) şeklinde iki ana domeyn halinde bölünmüştür (Şekil 2.2.) (33). Oksijenaz ve redüktaz domeynleri üzerine yapılan çalışmalarda iNOS'da sadece oksijenaz domeyninin dimer oluşmasıyla ilgili olduğu, nNOS ve eNOS'da redüktaz domeynleri arasında, keza redüktaz ve oksijenaz domeynleri arasında dimer oluşmasını sağlayabilecek etkileşmelerin olabileceği ifade edildi (38). Redüktaz grubu NOS'un kofaktörleri olan flavin adenin dinükleotid (FAD), nikotin adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve flavin mononükleotidi (FMN) bağlarken, oksijenaz grubu ise hem ve tetrahydrobiopterini (BH_4) bağlamaktadır (33, 34). NOS L-arginini sitrullin ve NO'ya dönüştürebilmek için NADPH'a ihtiyaç duymaktadır (37). Redüktaz domeyni de sitokrom-c'ye FAD ve FMN yoluyla NADPH'dan elektron transfer edebilir. Oksijenaz domeyni N^G hidroksi-L-arginini, NO ve L-sitrulline dönüştürür. Bu iki ana domeyn arasında CaM bağlanma domeyninide içerir. Bu nedenle iki domeynin de fonksiyonu katalitik olarak farklıdır.



Şekil 2.2. NOS'un redüktaz ve oksijenaz domeynlerini içeren dimer yapısı (33)

Flavin kofaktörlerinin esas rolü NADPH'dan alınan elektronların stabil araçlarla hem'e iletilmesidir. Elektron akışının CaM'ın bulunduğu noktadan kontrol edildiği sanılıyor. CaM-Ca yokluğunda elektron transferi oldukça yavaştır. CaM'in etkisi kinetik değil termodinamiktir (38).

Hem, bu dimer yapısının oluşmasında kofaktör rolündedir, yokluğunda ise NOS monomer olarak bulunur. Redüktaz domeyni içinde NADPH'dan elektron

transferi yeteneği NOS'un dimerik yapısına gerek duymaksızın her bir monomerinde saklıdır. NOS'un üç izoformunun dimerizasyonunda BH₄'ün rolü farklıdır. nNOS ve eNOS'un dimer yapıları BH₄'ün yokluğuunda gerçekleşirken iNOS'da bu görülmez. BH₄, eNOS ve nNOS dimerlerini stabilize ettiği halde iNOS dimerinde aynı durum geçerli değildir. BH₄ için önerilen muhtemel roller arasında NADPH'ın NO'ya oksidasyonu, süperoksit ve hidrojen peroksit oluşmasının inhibisyonu, dimer oluşması ve dimer stabilitesi, arginin bağlanması, hemin modifiyesi, inaktivasyona ve otoaktivasyona karşı korunma, katalizasyonda redoksun aktive edilmesi gibi fonksiyonları sayılabilir (38). L-arginin ve analoglarının iNOS'un dimerizasyonunu kolaylaştırdığı sanılır. Ancak bu sonuçlar NO sentezinin devamı için yetersizdir (33). NOS, ürünleri olan NO ve L-sitrullini oksidize etmede moleküler oksijeni kullanır (39). L-arginin ve BH₄'ün doyunluk seviyelerinde eş zamanlı olarak NO ve süperoksit anyon (O₂⁻) üretimi de gerçekleşir. Glutasyon (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) yokluğuunda peroksinitrit oluşur (33).

a. nNOS

Bu izoform ilk olarak sıçan ve domuz beyinciğinden saflaştırılmıştır (35). nNOS başlıca sinir sistemi, iskelet sistemi, iskelet kası, böbrekte ve plasenta gibi diğer dokularda mevcuttur. Bu enzimin aktivitesi hücre içi Ca⁺² düzeyindeki değışiklerle düzenlenir ve Ca⁺²/CaM bağımlı bir enzimdir (40). nNOS, N terminalindeki 300 aminoasit ilavesinden dolayı üç izoformun en büyüğüdür. Bu bölgesi bir PDZ (PSD-95 /Dlg/ZO-1) domeyni içerir. eNOS gibi nNOS'da caveolinle birleştğinde inhibe edilir (33). nNOS mRNA'sının 9,5 kb, moleköl ağırlığı ise 155 kDa'dur (35).

nNOS mRNA'sının nNOS α , nNOS β ve nNOS γ olmak üzere en az 3 ayrı amino terminal protein çeşitliliğine sahiptir. nNOS α , tamamen enzimatik aktive gösterir. A-syntrofin veya postsinaptik density protein 95 (PSD-95) gibi postsinaptik densite zonu (PSD) ile olası ilişkiyi kuvvetlendiren bir PDZ domeyni içerir. Bu nedenle nNOS α formu membranla ilişkili olabilir. nNOS β ve nNOS γ exon 2 ile şifrelenmiş PDZ domeyni içermez. Bu proteinler sitosolik bir lokalizasyon gösterir. Ayrıca nNOS α mRNA'sının sıçanda nNOS α -a, nNOS α -b ve nNOS α -c olan 3 farklı alt formu belirlenmiştir (41).

b. iNOS

iNOS Ca⁺²/CaM'dan bağımsızdır (31, 32). Sürekli olarak üretilmemektedir (36). FAD'a ihtiyaç duyan sitokinler ve endotoksinlerle uyarılmaktadır (36, 42). Moleköl ağırlığı 130 kDa'dur. Ca⁺² bağımsız olduğundan sürekli olarak aktiftir ve bakteri, virüs ve diğer patojenlerin ortadan kaldırılmasındaki önemi büyüktür. iNOS'un yüksek miktarda olması doku hasarına ve yangılı hastalıklarda yüksek tansiyonun ortaya çıkmasında önemli olan NO üretimine neden olabilir (29, 36). iNOS üretimi, inflamatuvar araçların uygulandığı damarlarda eNOS kaynaklı NO üretimindeki bozulmadan da sorumludur. Bununla beraber iNOS üretimi, allograft arterosklerozun iNOS aracılı baskılanmasında da görüldüğü gibi, bazı durumlarda koruyucu olabilmektedir (33). iNOS, patolojik şartlar altında nöronal ve nöronal olmayan hücrelerde de bulunabilmektedir (43). İki yapısal izoformun tersine iNOS'un spesifik olarak membrana bağlanma özelliğı yoktur. Bununla beraber insan nötrofillerinde ve fare makrofajlarında membranla ilişkili olabilmektedir (33).

Otoimmünitede, iNOS hakkında, mikrobiyal infeksiyon hasarlarına karşı ev sahibini koruduğu görüşü yaygındır (31). iNOS'da süperoksid anyon üretimini katalize edebilme yeteneğindedir. Bu olay nNOS'dan farklı bir mekanizmayla olur. Reduktaz domeyni tarafından katalizlenir ve yalnız L-argininin çok yüksek konsantrasyonunda engellenebilir (33).

iNOS mRNA'sı epitel hücrelerinde ve alveolar makrofajlarda belirlenmekle beraber bu konuda çok az bilgi vardır (31).

c. eNOS

İlk olarak endotel hücrelerinde tanımlanmıştır ve sürekli bir üretimi vardır (29). Endotelden üretilen NO damar gevşetir ve trombosit adezyonunu ve agregasyonunu inhibe eder (36). eNOS'un molekül ağırlığı 130 kDa olarak belirlenmiştir (35). eNOS'da CaM bağlanma bölgesi direk olarak membranla ilişkilidir ve özel olarak anyonik lipidler içerir. eNOS ekspresyonunda hipoksi, östrojen ve egzersiz gibi çeşitli faktörlerin etkileri olduğu bildirilmiştir. eNOS yoluyla süperoksit anyon üretiminin L-arginin ile değil, BH₄ yoluyla inhibe edildiği bilinmektedir (33). eNOS immünreaktivitesinin sinir hücrelerinde de bulunduğu gösterilmiştir (42). eNOS mRNA'sıyla ilgili herhangi bir bilgi yoktur.

2.1.5.2. Nitrik Oksit Sentaz Enziminin İnhibitörleri

NOS inhibitörlerinin keşfi NO ve NOS'la ilgili çalışmaların başarısını büyük oranda etkilemiştir. 1987 yılında Hibbs ve arkadaşları L-NMMA'nın kemirgen makrofajlarında arjinin bağımlı sitotoksik cevabı engellediğini gösterdiklerinde henüz sitotoksik faktörün NO, arjinin-bağımlı enzimin de iNOS olduğu bilinmiyordu (44-46). Prototip NOS inhibitörü olan L-NMMA tüm NOS izoformlarını etkin bir şekilde inhibe eder (44, 47). L-NMMA gibi diğer L-arjinin analogları da her üç NOS tipinin kompetitif inhibitörleridir; ayrıca NO'nin kendisi de NOS enziminin hem kısmı ile reaksiyona girerek bu enzimin aktivitesini inhibe edebilir (48-50). NN-dimetil-L-arjinin (L-ADMA) endojen NOS inhibitörüdür; ancak normal plazma konsantrasyonu düşüktür (45). Bir diğer L-arjinin analogu olan L-NAME de kompetitif non-selektif bir NOS inhibitörüdür; ancak yapısal NOS izoformlarını (eNOS ve nNOS) iNOS'a göre daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (47, 49-51). Çok yaygın kullanılan bir NOS inhibitörü olan L-NAME'in NO üretimini engellemek suretiyle, Ach tarafından indüklenen vazodilatasyonu inhibe ederek arteriyel kan basıncında artışa sebep olduğu, lökosit adezyonunu arttırdığı, damar permeabilitesini arttırarak mikrovasküler sıvı ve protein kaybına sebep olduğu bilinmektedir (47, 52-54).

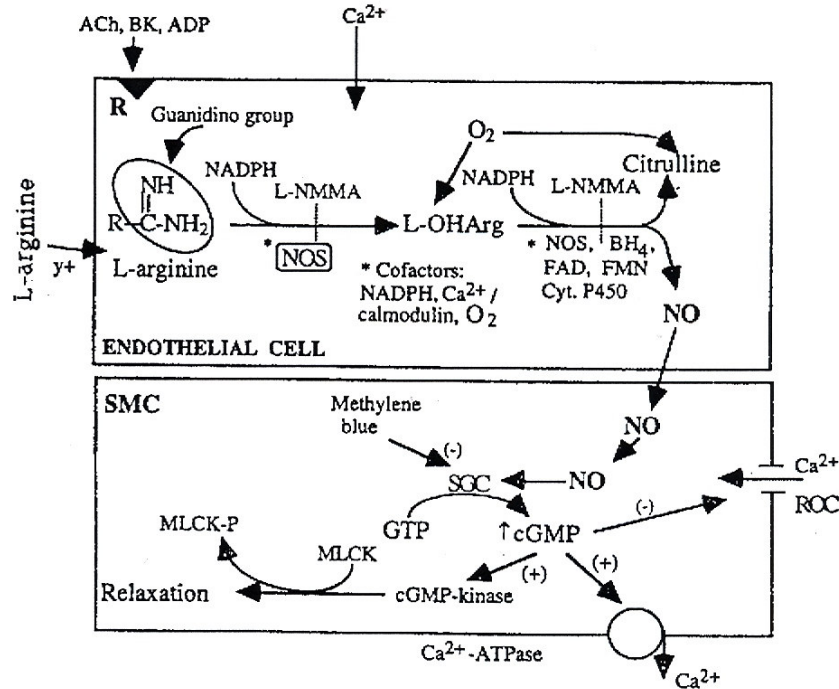
L-Canavine, L-N-(G)-monometilarjinin (L-NMA), N-amino-L-arjinin, aminoguanidin ve N-iminoetil-L-oritin (L-NIO) makrofaj iNOS'unu nNOS ve eNOS'a göre daha fazla inhibe etmektedirler (45, 49). L-N-iminoetil lizin (L-NIL) selektif iNOS inhibitörüdür. Glukokortikoidler, BH₄ sentezini ve L-arjinin taşınmasını engelleyerek iNOS'u inhibe ederler (48). S-metil-izotioüre (SMT) de yaygın kullanılan, oldukça potent spesifik bir iNOS inhibitörüdür (55).

Bazı kofaktör antagonistleri de NOS inhibitörleri olarak kullanılmaktadır. Difenileneiodonyum (DPI) gibi aromatik iodonium bileşikler nükleotide gereksinim gösteren flavoproteinleri inhibe ederek iNOS ve eNOS aktivitesini geri dönüşümsüz

olarak inhibe ederler (45). NOS'u inhibe etmenin bir diğer yolu substrat veya kofaktörlerinden birini sınırlamaktır. 2, 4, -diamino-6-hidroksipirimid (DAHP) gibi BH4 sentez inhibitörleri ve trifluoperazin gibi kalmodulin antagonistleri bu amaçla kullanılmaktadır (45, 49).

2.1.5.3. Nitrik Oksit Sentezi

NO, organizmada pekçok hücrede yapısal veya indüklenebilir NOS enzimi aracılığıyla L-arjininin terminal guanidino nitrojeninden sentezlenir (26, 38, 48-51, 56). Bu sentez iki basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamak L-arjininin N-oksidasyonu ile L-OHArj oluşumunu içerir. İkinci basamakta ise LOHArj'in C=N bağı oksidatif olarak parçalanır, sitrülün ve NO oluşur. Bu basamakta kofaktör olarak tetrahidrobiopterin (BH4), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve sitokrom P450 kullanılır. Ayrıca her iki basamakta da nikotin adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve oksijen tüketilmektedir (38, 49-51, 56, 57) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Endotel hücresinde L-arjininden NO sentezi ve düz kas hücresinde gevşeme oluşturma mekanizmaları (57).

NO sentezleyebilen hücreler arjininin hücre içine aktif olarak alınabildiği bir mekanizmaya sahiptirler. Bu aktif mekanizma başka katyonik aminositlerce de kullanılabilen bir (y⁺) taşıyıcıdır (45). Yapısal NOS (cNOS) aktivasyonu veya iNOS indüksiyonu endotel hücreleri veya makrofajlara L-arjinin taşınma hızını artırır (47). L-N^G- metilarjinin ve L-iminoetilornitin gibi bazı NOS inhibitörleri bu taşıyıcı için arjinin ile yarışmaya girerek etki ederler (49, 50).

NO'nin sentez ve salınımı, Ca^{++} 'a bağımlı olaylardır. Endotel hücresine Ca^{++} girişinin reseptör-aracılı bir iyon kanalıyla ve daha az olarak da hücre içi depolardan Ca^{++} salınımı şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir (57).

2.1.5.4. Nitrik Oksit'in Etki Mekanizması

Serotonin, Ach, trombin, ATP, histamin, substans P, bradikinin, Ca^{++} , araşidonik asit, kan basıncı değişiklikleri, kayma kuvveti (shear stres), damar duvarının pulsatil gerimleri, hipoksi ve elektriksel stimulasyon gibi geniş yelpazeli bir grup agonist veya fizyolojik stimulusa cevap olarak endotel hücrelerinden NOS enzimi aracılığıyla sentezlenen NO, hem damar düz kasına hem de lümen içine difüz olur (44, 45, 48, 57-61).

Organizmada metal içeren ve NO'nin reaksiyona girebildiği enzimler arasında en iyi bilinenlerden biri guanilat siklazdır (GC). GC enziminin eriyebilir ve partiküllü olmak üzere iki tipi mevcuttur (45, 60-62). NO ve karbon monoksit (CO) sitozolik tip olan guanilat siklaz (sGC) ile reaksiyona girerken, membranda yer alan partiküllü guanilat siklazın (PGC) ligandı natriüretik peptid ailesinin üyeleridir (45, 48, 57, 61).

Bazal koşullar altında önemli bir aktivitesi olmayan sGC enzimi bir hem prostetik grubuna sahiptir ve sGC enziminin NO tarafından aktive olabilmesi için şarttır (44, 59, 60, 63). NO, sGC'nin hem prostetik grubuna bağlandığında aksiyal pozisyonundaki bir histidin molekülü salınır ve bu konformasyonel değişiklik enzimin direk stimülasyonuna sebep olarak GTP'den cGMP üretimini sağlar (60, 63). Reaksiyon Mg^{++} iyonuna bağımlıdır (44). sGC 'in aktivitesi NO tarafından 100-200 kat arttırılabilir ve enzim NO için yüksek derecede seçici özelliğe sahiptir (48). Metilen mavisi ve 1H-[1,2,4] Oxadiazolo-[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) gibi bazı bileşikler sGC'ı inhibe ederek NO'nin düz kas üzerindeki etkilerini önleyebilirler. Enzim üzerinde ODQ'nun etkisi daha selektiftir. ODQ enzimin prostetik hem grubunu okside ederek sGC'ı geri dönüşümsüz olarak inhibe eder (58-60, 64). cGMP, NO'nin hücre içi etkilerinin esas aracı molekülü olarak kabul edilir (44, 48, 51, 57, 59-62). Fizyolojik önemi bu derece fazla olan cGMP'nin yıkımı da çok sıkı bir şekilde kontrol altındadır. cGMP'nin ortamdaki uzaklaştırılmasından, onu inaktif 5'nükleotid monofosfatlara çeviren fosfodiesterazlar (PDE) sorumludur (51, 63).

cGMP üç olası reseptör proteininden biri ile reaksiyona girebilir: Bunlar cGMP ile düzenlenen iyon kanalları, cGMP bağlayıcı PDE'lar, ve cGMP bağımlı protein kinazlardır (48, 57, 62, 63). Bunlardan özellikle bir serin / treonin kinaz olan cGMP bağımlı protein kinazın (PKG) aktivasyonunun cGMP'nin hücre içi etkilerinin önemli bir kısmından sorumlu olduğu bildirilmiştir (51, 58). PKG, cGMP'nin bağlanması ile seçici olarak aktive olur. Bir kez aktive olduğunda bir grup hücre içi hedef proteinini fosforiller. Fosforilasyon bu proteinlerin aktivesini düzenler ve bu şekilde düz kas gevşemesini de içeren pek çok hücrel olaydan sorumludur (48, 62, 63). NO-cGMP yolağının oluşturduğu düz kas gevşemesi sıkı bir şekilde düzenlenen aktif bir olay olup, hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunun azaltılması veya kasılma sisteminin Ca^{++} 'a duyarlılığının azaltılması yoluyla sağlanabilir. Her iki mekanizma da cGMP aracılı düz kas gevşemesinde rol oynar (51, 57, 62).

Hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunun azaltılmasının a) Ca^{++} la aktive K^+ kanallarının (K_{ca}) aktivasyonu, b) membran Ca^{++} kanal aktivitesinin direk inhibisyonu, c) plazma membranında Ca^{++} -ATPaz pompasının aktivasyonu, d) sarkoplazmik retikulum Ca^{++} -ATPaz pompasının aktivasyonu, e) inozitol trifosfat reseptörünün inhibisyonu ve f) inozitol trifosfat oluşumunun inhibisyonu yollarının biri veya birkaçıyla gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir (58, 62, 63, 65). Kasılma olayında sistemin Ca^{++} 'a duyarlılığın azaltılmasıyla ilgili mekanizma kesin olarak bilinmemekle beraber, miyozin hafif zincir fosfataz (MLCP) aktivitesinin stimülasyonu, protein kinaz C aktivitesinin inhibisyonu ve/veya küçük bir heat shock-related protein (HSP)'in fosforilasyonu aracılığıyla gerçekleştiği sanılmaktadır (54, 57, 62).

NO'nin gerek düz kas gerekse başka dokulardaki etkilerini ortaya çıkarabilmek için sGC dışında başka enzimlerle de reaksiyona girdiği konusunda çok sayıda çalışma mevcuttur (48, 51, 63, 65-68). NO'nin adenosin difosfat ribozil transferaz (ADPRT) enzimini aktive ederek cGMP'den bağımsız bir mekanizmayla vazodilatasyona sebep olduğu gösterilmiştir (58). Ek olarak, cAMP ve cGMP yolları arasında çapraz etkileşim (cross talk) olduğu bilinmektedir. Bu çapraz etkileşim i) birbirlerinin sentez ve yıkımlarını etkilemek, ii) birbirlerinin protein kinazlarını aktive etmek ve iii) protein kinaz aktivasyonu (PKA) aracılığıyla benzer hedef proteinleri fosforile etmek şeklinde olabilir (48). Kolon hücrelerinde cGMP'nin PKA'yı aktive ederek Cl^- sekresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Tavşan portal ven myositlerinde de PKA'nin çapraz aktivasyonu bildirilmiştir (62). Ayrıca NO direk olarak adenilat siklaz (AC) enzim aktivitesini düzenleyebilmektedir (69). Bu yolağın, NO'nin beyindeki ve kalpte ritmiste üzerindeki etkilerine aracılık ettiği gösterilmiştir (69). NO'nin hücre büyümesi ve fonksiyonunun kontrolü, hücre proliferasyon ve diferansiasyonu, apoptozis, trombosit agregasyonu, ve immün sistem üzerine olan etkilerini I-KB/NF-KB yolağı, Janus-STAT kaskadı veya mitojen-aktive protein (MAP) kinazlar, bazı iyon kanalları, p21 gibi G proteinleri, protein tirozin kinazlar, protein tirozin fosfatazlar, kaspazlar ve AP-1, c-Jun gibi transkripsiyon faktörlerini içeren pek çok yolağı kullanarak ortaya çıkardığı yönünde bilgiler mevcuttur (51, 58, 63).

2.1.5.5. Nitrik Oksit, İmmünite ve İnflamasyon

NO'nin immün sistem üzerine etkileri yaygın olarak incelenmiştir. Günümüzde aktif makrofajların fazla miktarda NOS eksprese ettikleri ve NO ürettikleri bilinmektedir. Makrofajlarda iNOS ekspresyonunu indükleyen sitokinlerin başında IL-1, IFN- γ , TNF-a ve migrasyon inhibitör faktör gelmektedir (44, 48, 57). Üretilen NO, makrofajların intrasellüler ve ekstrasellüler patojenleri öldürme fonksiyonuna katkıda bulunur. Bununla beraber, sitotoksik etkili olan esas molekül olasılıkla NO değil, onun oksijen radikali (O_2^-) ile etkileşimi sonucu meydana gelen peroksinitrit ($ONOO^-$)'tir (44).

Fazla miktarda salınan NO'nin deneysel olarak, graft-versus-host hastalığı ve romatoid artrit gibi hastalıklara sebep olduğu gösterilmiştir (70). Bu nedenle organizmada iNOS ekspresyonu çok dar sınırlar içinde sabit tutulmaktadır. IL-4, IL-10, ve transforming growth factor- β 'yı (TGF- β) kapsayan bir sitokin grubu, makrofajlarda NOS'ın indüksiyonunu bu yönde düzenleyebilir (44). NO'nin kendisi de

feedback inhibisyonu ile NOS aktivitesini azaltabilir ve Th1 hücrelerinden IFN- γ üretimini inhibe edebilir (57). iNOS ekspresyonu sadece makrofaj biyolojisinde değil, bir grup hücrenin inflamasyon ve enfeksiyona verdiği cevapta da çok önemlidir. Sinovyal fibroblastlardan NO üretiminin, özellikle stafilokokkus aureus artritinde sinovyal savunmada önemli olduğu bilinmektedir. Psöriazis ve inflamatuvar dermatozlarda lokal NO sentezinin düzenlenmesinde iNOS'un önemli rolü vardır (70). Ayrıca septik şokta myokard depresyonu, hipotansiyon, mikrovasküler kan akımı bozuklukları ve sitotoksiteden iNOS aktivasyonu sonucu salınan NO'nin sorumlu olduğu bilinmektedir (57, 61, 70).

2.1.5.6. Nitrik Oksit ve Üreme Sistemi

Corpus cavernozum ve penisi besleyen kan damarlarını innerve eden nöral liflerde NOS enzimi mevcuttur ve NO penis ereksiyonuna aracılık eder (48). Penisdeki sinir uçları ve/veya damar endotelinde NO'nin yetersiz üretiminin bozulmuş ereksiyon veya empotansa sebep olduğu bilinmektedir. Kimyasal yapısı sildenafil sitrat olan viagra isimli ilacın izole insan corpus cavernozumunda cGMP'nin yıkımından sorumlu enzim olan PDE5'i inhibe ederek NO'nin düz kası gevşetici etkisini arttırdığı bilinmektedir (48, 59, 70). İnsan spermatozoa hücrelerinde de eNOS ve nNOS enzimleri mevcuttur (70).

Gebelikte NO; plasenta, desidua ve myometriumda sentezlenmektedir. NO'nin potansiyel rollerinden bazıları; implantasyon öncesi ve gebelikte uteroplental ve sistemik sirkülasyonda vazodilatasyon, menstruasyonda trombosit aktivasyonunun inhibisyonu ve gebelikte myometrial kontraktilitenin inhibisyonudur. Menstruasyon esnasında aşırı NO üretimi menorajiye neden olmaktadır. Gebelikte NO üretiminin inhibisyonu intrauterin gelişme geriliğine yol açabilir (71). Uterusta NO, progesteron ile birlikte uterus kontraktilesini inhibe etmektedir (9).

Gebeliğin sonuna doğru uterus ve plasentada NO üretiminin azaldığı, servikte ise arttığı ve metalloenzimlerin aktivasyonu ile servikal olgunlaşmayı uyardığı bildirilmiştir (72).

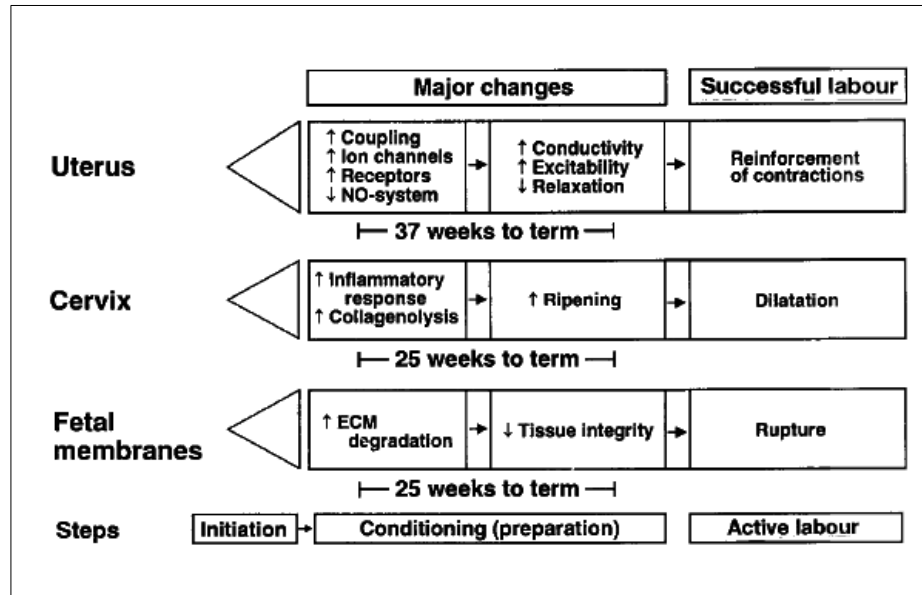
NO uteroplental perfüzyonda, dokularda vasküler tonus veya rezistansın düzenlenmesinde önemli rol oynar. NO, endotel hücrelerden salgılanan potent bir vazodilatatördür. Keza trombosit agregasyonunu ve vasküler endotelial yüzeylere adezyonunu önler. Nitrik oksit sentaz (NOS) umbilikal ven endotelinde amniyon epitelin ve Wharton jelindeki hücrelerde de vardır (73). Dolaşımda nitrit düzeyinin azalmış olması preeklampsi oluşmasına katkıda bulunan faktörlerden biri olarak görülmektedir. Preeklampsi riski yüksek olan kadınlarda diastolik kan akımı artışı için NO donörlerinin kullanıldığı bilinmektedir (74).

2.1.6. Gebelik ve Doğum Esnasında Serviksin Kontrolü

Progesteron antagonistleri kullanılarak yapılan çalışmalarda doğum olayının aktif doğumla takip edilen bir hazırlanma fazından ibaret 2 kademeli bir olay olduğu bildirilmiştir. Doğumun bu 2 fazının uterus ve serviks üzerinde endokrin, sinir ve immünokontrol mekanizmalarının etkileşimi dahil çeşitli sistemlerle koordineli olarak düzenlendiği sanılmaktadır (4). Aktif doğum, kısadır ve bunda plasenta ve

fetüsün dışa verilmesi söz konusudur. Keza, bu olanlar koordineli uterus kontraksiyonlarıyla başlar. Hazırlık fazı oldukça uzundur. Hazırlık kademesinin başlangıcı doğum olayının başlaması olarak kabul edilir (Şekil 2.4.) (16, 40, 75).

Hazırlık fazında uterusun kontraktıl fonksiyonu baskılanır, çünkü serviks sıkıca kapalı olmalıdır. Uterusun gebelik süresince dinlenme halinde olması fetüsün normal gelişmesi için gereklidir. Progesteronun uterusun dinlenme hali üzerinde tam bir kontrolü olduğu sanılır. Bunuda; miyometriyumdaki birçok geni baskılayarak, nitrik oksit sisteminin de dahil olduğu relaksasyon mekanizmalarını düzenleyerek, keza proinflatuvar sitokinlerin salgısını baskılayarak ve prostaglandinleri uygun şekilde azaltarak yapar. Serviksin yumuşamasına neden olan hazırlık fazı uterusunkinden farklı zaman diliminde vuku bulur ve kısmen bağımsız mekanizmalarla düzenlenir. Serviksteeki olaya bağ dokusu kompozisyonundaki değişiklikler ve inflamatuvar hücrelerin göçü dahildir (76). Serviksteeki hazırlık değişikliklerine benzer olayların fetal membranlarda da ortaya çıkması muhtemeldir (Şekil 2.4.)(4, 6). Hazırlık kademesinde bazı noktalarda bu olay irreversibldır ve aktif doğuma neden olur. Bir defa aktif doğum başlandığında geri dönüşüm olmaz.



Şekil 2.4. Doğum sırasında, uterus (miyometriyum), serviks ve fetal membranların fazlarının durumu (4)

2.1.6.1. Serviksin Hazırlanması

Servikal olgunlaşma uterus kontraksiyonlarından bağımsız olarak ortaya çıkan inflamatuvar olaya benzeyen aktif bir biyokimyasal olaydır. Bu olayda inflamatuvar olayların hemen hemen hepsi aktif durumdadır; proinflatuvar sitokinlerin salgılanması, beyaz kan hücrelerinin infiltrasyonu, yıkıcı enzimlerin salgılanması ve aktivasyonu (matriks metalloproteinazlar), ekstrasellüler matriks proteinlerinin ve glikoproteinlerin değişen sentezi, kollajen dönüşümündeki artış, sıkıca düzenlenmiş kollajen liflerin bozulması, dekorin/kollajen oranının değişmesi, hyaluronana bağlı ekstrasellüler sıvı artışı gibi (6). Çeşitli humoral ajanlar örneğin

progesteron, relaksin, prostaglandinler ve proinflatuvar sitokinlerle, NO gibi lokal mediyatörler dahil servikal olgunlaşmayla ilgilidir (26). Ancak servikal yumuşama esnasında ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesinden sorumlu biyokimyasal mekanizmalar henüz yeterince anlaşılmış değildir (77, 78).

Steroid Hormonlar

Progesteronun servikal olgunlaşmanın tümünü kontrol altında tuttuğu sanılır. Antiprogesterinlerin, araştırılan bütün spesieslerde servikal olgunlaşmanın indüklenmesinde etkili ajanlar oldukları bilinmektedir. Sıçanda yapılan son çalışmalar, servikal olgunlaşmanın kandaki progesteron konsantrasyonunun spontan olarak düşmesinden önce başladığını göstermektedir. Bu da servikal olgunlaşmanın progesterondan bağımsız bir mekanizmanın kontrol ettiğini gösterir (5).

Prostaglandinler

Prostaglandinler, özellikle PGE₂, uzun zamandır servikal olgunlaşmanın anahtar mediyatörleri olarak düşünülür (79). Lokal uygulanan prostaglandinlerin servikal değişiklikleri indüklediği, endojen prostaglandinlerin de servikal olgunlaşmayla ilgili olduğunu bildiren pek çok deneysel ve klinik çalışma vardır. Fizyolojik servikal olgunlaşma uterus kontraksiyonlarından bağımsız olarak, örneğin aktif doğumdan ve prostaglandin artışından önce ortaya çıkar. Sıçanda ve kobayda yapılan çalışmalar normal gebelikte serviksin doğumun başlamasından uzun süre önce yumuşamaya başladığını göstermiştir (5). Lokal mediyatörler servikal olgunlaşmada prostaglandinlerden daha önemli olabilir. Örneğin son çalışmalarda pek çok inflamatuvar olayda NO ile COX arasında bir etkileşimin olduğu, NO ile stimule edilen COX-II'nin inflamasyonda prostaglandin sentezini arttırdığı gösterilmiştir (80). Bundan başka NOS inhibitörlerinin akut ve kronik inflamasyon modelinde PGE₂ üretimini baskıladığı bildirilmiştir (81). Bu nedenle, COX-II'nin NO ile regülasyonunu, inflamatuvar cevabın artışından sorumlu olabilecek yeni bir mekanizmayı temsil ettiğine inanılmaktadır. Bu mekanizmanın olgunlaşma olayı esnasında servikte görev alması muhtemeldir.

Sitokinler

İnflatuvar sitokinlerin, örn; IL-1 ve IL-8'in servikal olgunlaşmadaki rollerinin önemli olduğu bilinmektedir (82). Servikte ve uterusta sitokin üretiminin progesteron tarafından düzenlendiği sanılır. Progesteron in vitro insan koryodesidual hücrelerinde IL-8 salgısını stimule eder. Bu nedenle progesteron servikte ve desiduada bir immunosupressor gibi davranabilmekte ise de aksine antiprogesterin uygulandığında sitokin ve lökotriyen akışını keza nötrofil göçünü aktive edebilmektedir. Gerçekte de sitokin akışına cevap olarak servikse infiltre olan nötrofil ve makrofajlar, ekstrasellüler matriks proteinlerini sindirebilen iyi bilinen metalloproteinazların kaynağıdır. Bu yüzden bu enzimlerin servikal olgunlaşmada dokuların yeniden yapılanmasında bir anahtar rolü oynamaları kuvvetle muhtemeldir (83).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Servikal Olgunlaşma Modelinin Oluşturulması

Araştırmada deneye girmemiş ve çiftleşmemiş ortalama ağırlıkları 250-300g olan *Rattus norvegicus* türü ortalama 90 günlük toplam 162 sıçan (108 dişi, 54 erkek) kullanıldı. Çalışmada kullanılan sıçanların gelişim yaşlarına göre dağılımı Tablo 1a ve b’de özetlenmiştir. Deneyde kullanılan hayvanlar A. Ü. Deney Hayvanları Laboratuvarı’ndan temin edildi. Araştırmayla ilgili A. Ü. Hayvan Kullanım ve Bakım Kurulu’nun bilimsel etik onayı daha önce alınmıştı. Hayvanlar normal yem ve musluk suyu ile beslendi. Eşleştirilmek üzere dişi/erkek oranı 2/1 olacak şekilde kafeslerde 1 gece bırakıldı. Ertesi sabah dişi sıçanlara vajinal simir yapıldı ve sperm pozitif olanlar gebeliğin sıfırınıcı gününde kabul edildi. Dişi sıçanlardan; östrusta, gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırınıcı (PPO) günlerde olmak üzere 5 kontrol ve gebeliğin 18, 20, 21 ve PPO. günlerde olmak üzere 4 deney grubu oluşturuldu. Östrus hayvanları vajinal simirle belirlendi. Her grupta 12 dişi hayvan vardı.

Deney grubunu oluşturan hayvanlara oral yolla ve gavajla günde 50mg/gün/sıçan olmak üzere 5 gün süreyle bir NOS inhibitörü olan L-NAME verildi (35). Kontrol ve deney hayvanları eter ile anestezi edildi ve serviksten doku örnekleri alındı.

Deney protokolü, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından Helsinki protokolüne uygun olarak 07-06/04 numara ile onaylanmıştır.

3.2. Doku Temini ve Hazırlanması

Kontrol grubundaki hayvanlar östrus, gebeliğin 18, 20, 21 ve PPO. günlerde, deney grubundaki hayvanlar gebeliğin 18, 20, 21 ve PPO. günlerde eter ile anestezi edildi ve her hayvanın karın ön duvarı açılarak uterus boynuzu altında uzanan serviks kısmından ışık ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) için, ayrıca nitrit/nitrat ölçümleri için doku homojenatı hazırlanmasında kullanılmak üzere doku örnekleri alındı. Işık mikroskobu için alınan doku örnekleri Holland fiksatifinde (1000ml distile suda; %40’lık 100ml formaldehit + 5ml galsiyal asetik asit + 40g pikrik asit + 2,5g bakır asetat) 4-12 saat tesbit edildi. TEM için alınan örneklerde %4’lük gluteraldehitte prefiksasyon ve %1’lik OsO₄’te postfiksasyon için bırakıldı. Doku homojenatı için toplanan doku örnekleri de laboratuvara gönderilmek üzere buz üzerine alındı.

3.3. Işık Mikroskobu Çalışması

Kontrol ve deney hayvanlarından ışık mikroskobu için toplanan serviks dokusu örnekleri fiksasyondan sonra 6-7 saat akar musluk suyunda yıkandı ve sıra ile %70, %80, %90 ve %100’lük alkol serilerinde birer gün tutularak dehidrasyon işlemlerinden geçirildi. Ardından ksilol içinde 3 kez 5 - 7’şer dakika şeffaflaştırıldı

ve 58°C'ye ayarlı etüvde bulunan erimiş parafine konuldu. 3 defa 1'er saatlik parafin banyosunda tutulduktan sonra etüv dışında temiz erimiş parafine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan 5-7 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitlerden bazıları ışık mikroskobu oryantasyonu için hematoksil-eozin ile boyandı bir kısmı da immunohistokimyasal boyamalarda kullanıldı.

3.4. İmmünohistokimyasal Protokol

iNOS ve CD45 immünboyanması için, kontrol ve deney hayvanlarına ait parafin kesitlerden bazıları Poli-L-Lizin kaplı lamlar üzerine alınarak bir gece 56°C'lik etüvde bekletildi. Deparafinasyon için 2 kere 10'ar dakika ksilollerde tutuldu ve her birinde 5'er dakika olmak üzere %100, %90, %80 ve %70'lik alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Sonra, distile suda çalkalandı ve fosfat tamponunda (PBS, Ph: 7.2 -7.4) üç kere beşer dakika yıkandı. Kesitler, antijenik maskenin giderilmesi için 0,2 M borik asit tamponuna (pH:7.0) konularak 60 derecelik etüvde bir gece bekletildi ve etüv dışında 20 dakika soğumaya bırakıldı.

Bunu takiben çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile sudan ve PBS 'den geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için kesitler %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 20 dakika inkübe edildi. Distile suda çalkalanıp PBS 'de yıkanan kesitler oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immunoglobulin bağlanmalarını önlemek amacıyla blokama serumu (LabVision UVBlock) ile 5 dakika muamele edildi serumun fazlası alındı ve bu kesitlerden bazıları, tavşan poliklonal anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SC-651, Rabbit Anti-Rat, USA) primer antikoru ile, bir kısmı da fare monoklonal CD-45 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SC-1178, Mouse Anti-Rat, USA) primer antikoru ile oda sıcaklığında gece boyu inkübe edildi. Kesitler inkübasyon sonunda PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Bunu takiben kesitler, iNOS antikoru için biyotinli anti-rabbit sekonder antikorunda (Vector Lab., Inc., BA-1000, Goat, Burlingame), CD45 antikoru için de biyotinli anti-mouse sekonder antikorunda (Vector Lab., Inc., BA-9200, Goat, Burlingame) 45'er dakika inkübasyona bırakıldı. Kesitler inkübasyon sonunda PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Streptavidin-HRP (Dako, LSAB System-HRP, K0690, USA) ile 45 dakikalık son inkübasyon sonrasında tekrar PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Ardından sinyali geliştirmek için kesitler 3' Diamino benzidin (DAB) kromojeni (DAB+Substrate buffer, K3468, Dako, USA) ile işleme tutuldu ve musluk suyunda yıkandı. Kesitler Mayer'in Hematoksil-eozin'de 10 saniye zıt boyama yapıldıktan sonra alkol serilerinden geçirilerek ksilole getirildi ve 10 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı. Boyanmış kesitler Zeiss Axioplan (Almanya) ışık mikroskobunda değerlendirildi ve fotoğraflandırıldı. Bu şekilde; a) iNOS antikoru ile boyanan kesitlerde iNOS immünboyanmasının dokulardaki dağılımına ve yoğunluğuna bakıldı. b) Genel lökosit belirteci olan CD45 antikoru ile boyanan kesitler de CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğu HSCORE değerlendirilmesi için kullanıldı.

3.5. TEM Protokolü

TEM çalışması için toplanan kontrol ve deney grubuna ait servikal doku örnekleri pre ve post fiksasyon sonrasında %6,5'lük sakkaroz çözeltisinde yıkandı ve dehidrate edildi. Dehidratasyonu takiben %1'lik uranil asetat ile dokular kontrastlandı. Daha sonra %100'lüğe kadar artan alkol serilerinden ve propilen

oksitten geçirildi. Bunu takiben eşit hacimlerde hazırlanan propilen oksit-araldit (Araldit CY212, DDSA, BDMA) karışımında dokular oda sıcaklığında ve rotatorda 1 gece, bunu takiben araldit solusyonunda ve rotatorda 4 saat bırakıldı. Daha sonra araldite alınan dokular polimerizasyon için 60°C'lik etüvde 48 saat bırakıldı. Ultramikrotom (Leica Ultracut UCT) ile araldit bloklardan kalın kesitlerle belirlenen bölgelerden bakır gridler üzerine alınan ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlanarak transmisyon elektron mikroskopunda (TEM LEO 906E, Zeiss Oberkochen, Germany) incelenmeye hazırlandı. Bu şekilde serviks yapısındaki ince yapı değişiklikleri hücre ve doku kollajeni düzeyinde değerlendirildi ve fotoğraflandırıldı.

3.6. Nitrit/Nitrat Ölçüm Protokolü

3.6.1. Nitrojen Metabolitlerinin Miktarının Belirlenmesi

Nitrojen metabolitlerinin (Nitrit/Nitrat) ölçümleri ticari bir kit (Cat. #780001. Cayman Chemical Ann Arbor, MI) ile yapıldı.

3.6.2. Prensip

NO metabolizmasının in vivo son ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-)'dır. NO_2^- ve NO_3^- 'in oranı değişkendir ve ayrı ayrı kesin olarak gösterilemeyebilir. Bu nedenle total NO üretiminin en iyi göstergesi NO_2^- ve NO_3^- 'in her ikisinin toplamının belirlenmesidir. Bu amaçla öncelikle numunedeki tüm nitratlar nitrat redüktaz ile nitrite dönüşür ve nitrit Griess I reaktifindeki sülfanilamidi diazotize eder. Oluşan sülfanilamid- diazonium tuzu Griess II reaktifindeki naftiletilendiaminle reaksiyona girerek spektrofotometrik olarak ölçülebilen koyu mor renkli kromofor oluşturur. Bu bileşiklerin 540 nm'de verdiği absorbans aracılığı ile total nitrit-nitrat tayini yapılır.

3.6.3. İşlemler

Dondurulmuş halde bulunan doku örnekleri pH'sı 7.4 olan PBS tamponunda, buz üzerinde homojenize edilmiş (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc.,Connecticut, USA) ve 4 C°'de 10.000 g'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatanı ayrıldı. Alınan süpernatantlar 10.000 kDa moleküler ağırlığa geçirgen ultrafiltreler içeren ependorflar kullanılarak 100.000 g'de 30 dakika ultrasantrifügasyon yapıldı. Ölçüm için filtre edilen örneklerden 80 µl alındı ve üzerine 10 µl enzim-kofaktör karışımı (flavin adenin dinükleotid, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) ve 10 µl nitrat redüktaz enzim karışımından eklenerek oda ısısında 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda her bir numune üzerine önce 50 µl Griess I reaktifinden (fosforik asit, sülfanilamid içeren) hemen sonra Griess II reaktifinden (naftil etilendiamin içeren) eklendi ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildikten sonra 540 nm'de plate reader kullanarak absorbans okuması yapıldı.

3.6.4. Total Nitrit/Nitrat Miktarlarının Hesaplanması

Kit içerisinde bulunan nitrat standardı aynen numune gibi çalışılarak standart grafiği oluşturuldu ve dokulardaki nitrit/nitrat miktarları bu grafikler yardımıyla hesaplandıktan sonra µM olarak ifade edildi.

Bu şekilde serviks dokusu homojenatlarında nitrit/nitrat ölçümleri ile elde edilen doku NOS aktivitesi değerleri her çalışma grubunda ayrı ayrı incelendi ve değerlendirildi (84, 85).

3.7. İstatiksel Analiz

3.7.1. Semikantitatif Değerlendirme

1. iNOS antikoruna ile boyanmış serviks kesitlerinde immunoreaktif alanların boyanma yoğunlukları +: zayıf pozitif; ++: orta; +++: kuvvetli pozitif; ++++: çok kuvvetli pozitif olarak değerlendirildi.
2. CD45 antikoruna ile boyanmış serviks kesitlerinde uygun büyütme (X400) yapılan CD45 pozitif hücre sayımlarına uygulanan Mann-Whitney U testi ile de CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değerlerine bakıldı.

3.7.2. Nitrit/Nitrat Ölçümlerini Değerlendirme

1. L-NAME uygulanan ve kontrol grupları arasındaki farkın analizinde iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni-t testi,
2. Östrus grubu ile L-NAME ve kontrol grupları arasındaki farkın analizi için tek yönlü varyans analizi ve Dunn's testi kullanıldı.

BULGULAR

Bu araştırmada, 1) kontrol grubunda östrusta ve gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırncı (PPO) günlerinde, 2) L-NAME verilen deney grubunda gebeliğin 18, 20, 21 ve PPO. günlerinde sıçan serviksinin olgunlaşmasında ve doğum olayında iNOS'un rolü ve önemi belirlenmeye çalışıldı. Bunun için östrusta ve gebeliğin farklı evrelerinde olan sıçan serviksinde;

1. Işık mikroskopik düzeyde; a. iNOS antikoru ile iNOS'un doku ve hücrelerdeki boyanma şiddetine ve dağılımlarına, b. CD45 genel lökosit belirteci ile de CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğu HSCORE değerlerine bakıldı.

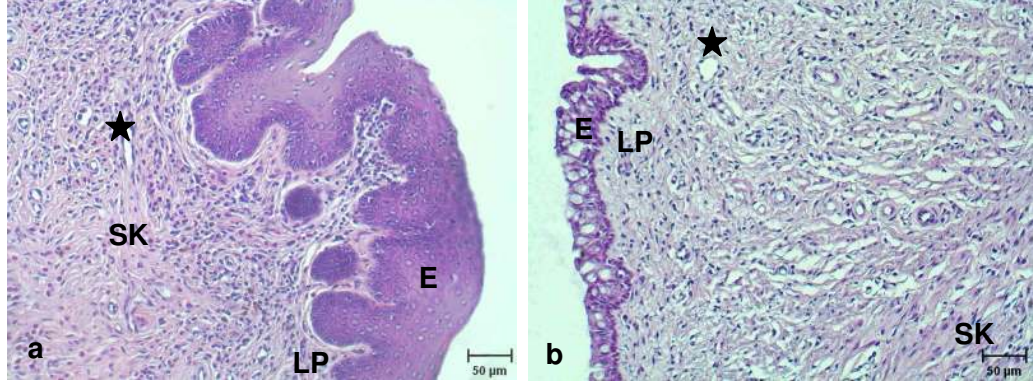
2. Servikal doku homojenatlarında NO'nun stabil metabolitleri olan nitrit/nitrat ölçümleri yapılarak doku NOS aktivitesi düzeyleri belirlendi.

3. Elektron mikroskopik düzeyde, serviks dokusunda hücresel ve lifsel elemanların yapısal değişiklikleri incelendi.

4.1. Kontrol Grubunun Sıçan Serviksi

4.1.1. Kontrol Grubunun Sıçan Serviksine Genel Bakış: Hematoksilen –Eozin Boyaması

Hematoksilen-Eozin (HxE) ile boyanmış kontrol sıçanı serviks dokularına ışık mikroskopu düzeyinde genel olarak bakıldığında; östrus sıçanı serviksinde lümen epitelinin yer yer tek katlı ya da çok katlı epitelden oluştuğu gözlemlendi. Lamina propriya kollajen liflerden ibaret sıkı bağ dokusu görünümündeydi. Duvarın enine ve boyuna kas tabakalarını dıştan tunika seroza tabakası kuşatmıştı (Ş.4.1a). Gebeliğin 18.gününde serviksin yapısı östrus serviksi yapısına benzemektedir. 20. ve 21. gebelik günlerinde lamina propriya bağ dokusunda yer yer açılmalar vardı. Bu küçük açık bölgeler ödem olarak değerlendirildi ve servikal olgunlaşmanın son devresinde olduğunun işareti olarak algılandı. Kas hücreleri arasında da kısmen ayrılmalar vardı. Gebeliğin 20, 21 ve PPO. günlerinde sabit bağ dokusu hücreleri arasında lökosit benzeri hücreler de görüldü (Ş.4.1b).



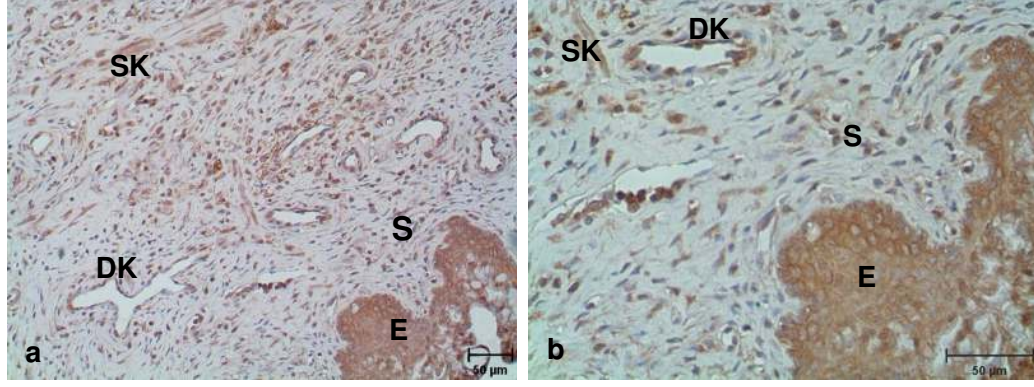
Şekil 4.1a,b. Östrus evresinde (a) ve gebeliğin 21. gününde (b) hematoksilen-eozin ile boyanmış sıçan serviksini ışık mikroskopları. Epitel (E), lamina propriya (LP), servikal düz kas (SK), kan damarı (yıldız), lamina propriya (LP). Objektif Büyütmesi (O.B): a. X20; b. X20.

4.1.2. Kontrol Grubunun Sıçan Serviksinde İmmünohistokimyasal ve Elektron Mikroskopik Bulgular

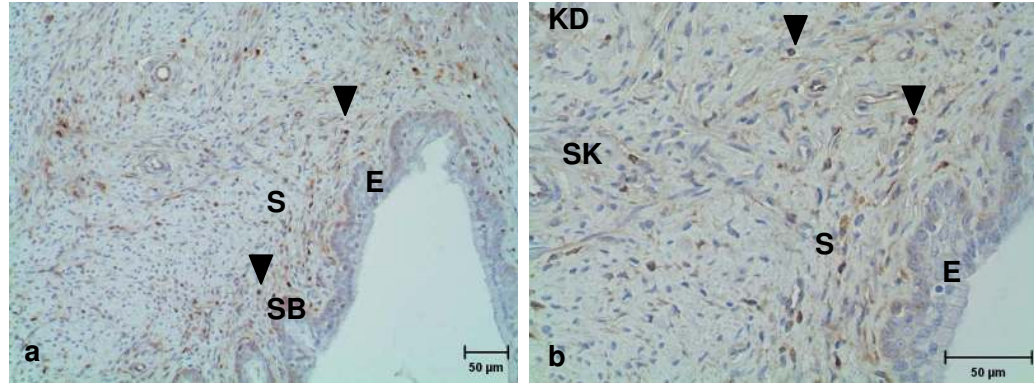
4.1.2.1. Östrus Sıçan Serviksi

Serviks lümeni ışık mikroskopik düzeyde çok katlı yassı epitel tabakası ile örtülmüştü. Miyometriyumda düz kas hücreleri düzensiz demetler halinde organizeydi. Bu devrede iNOS immünboyanması lümen epitelinde ve servikal düz kasta kuvvetli şiddette pozitif. Damar endoteli iNOS antikoruna orta şiddette boyanırken, damar düz kasında immünboyanma kuvvetli şiddette olmak üzere biraz daha yüksekti. Fibroblast benzeri hücrelerde de orta şiddette iNOS immünboyanması vardı (Ş.4.2a,b; Ş.4.4a; Ç.4.1). Nitrit/nitrat ölçüm değeri, normal gebeliğin 20.günü dışında, çalışılan gruplar arasında en yüksekti (Ş.4.30; Ç.4.3). Genelde CD45 pozitif hücreler de normal yoğunlukta görüldüler. Bu devrede CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değeri de gebeliğin 18. günü dışında diğer günlere göre oldukça düşüktü ($P<0.05$) (Ş.4.3a,b; Ş.4.4b; Ç.4.4)

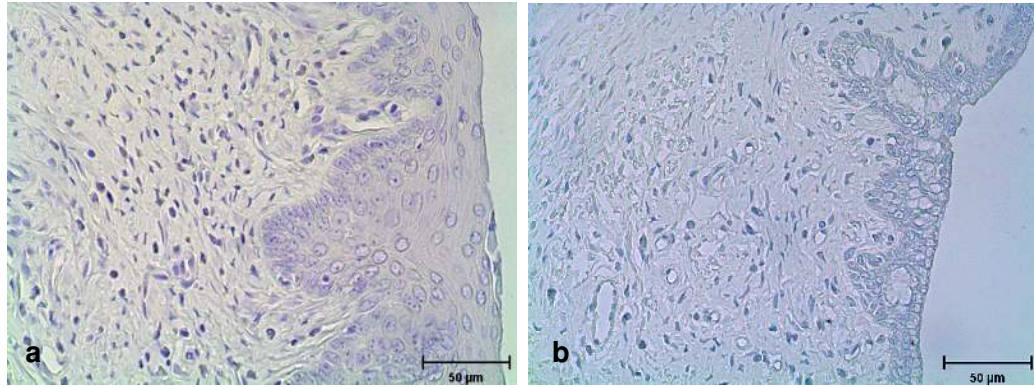
Stromal yapıda ve miyometriyumda kompakt düzenlenmiş kollajen ağ çatısı elektron mikroskopuyla da belirlendi. Ultra ince kesitlerde lamina propriya yoğun paketlenmiş kollajen liflerden yapılmıştı. Kollajen lifler arasında çok az esas madde vardı. Fibroblastlar çok sık gözlenen hücre tiptiydi. Bunların çoğu uzun nükleuslu, sitoplazmik uzantılı ve az sitoplazmalı immatür tiplerdi. Birkaç kaba endoplazmik retikulum profili ve Golgi bulunmaktaydı. Düz kas hücreleri sitoplazmik filamentlerden ve karakteristik mikropinositik veziküllerden zengindi (Şekil 4.5a,b).



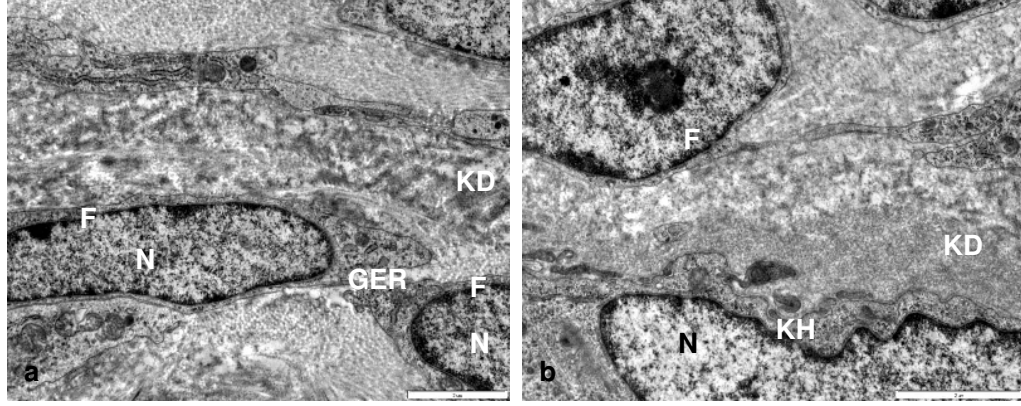
Şekil 4.2a,b. Östrus sıçanı serviksini iNOS immünboyanması ışık mikrolarları. iNOS epitelde (E), servikal (SK) ve damar (DK) düz kasında kuvvetli pozitifdir. Stroma (S) OB: a. X20; b. X40



Şekil 4.3a,b. Östrus sıçanı serviksinde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrolarları. Epitel (E), servikal bez (SB), servikal düz kas (SK), kan damarı (KD), stroma (S), CD45 pozitif lökositler (ok başı). O.B: a. X20; b.X40.



Şekil 4.4a,b. İmmünohistokimyasal boyamalara ait negatif kontroller. a. Östrus sıçanı serviksine ait iNOS antikoruna negatif kontrol. b. 20 günlük gebe sıçan serviksine ait CD45 genel lökosit antikoruna negatif kontrol. OB. a,b X40

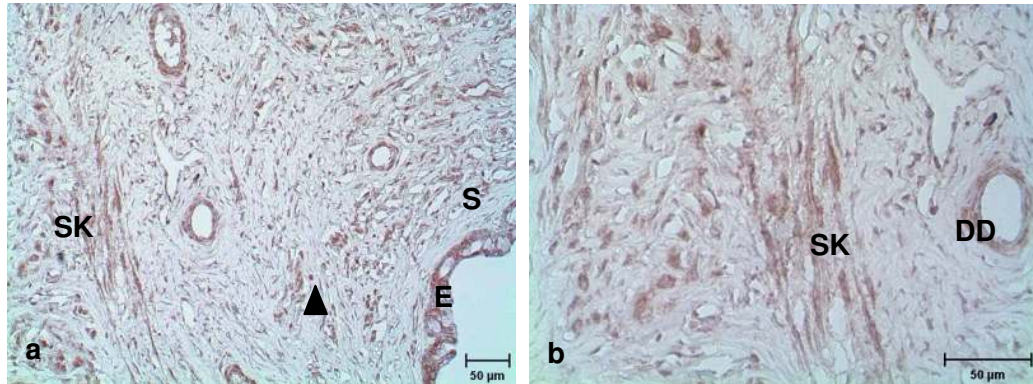


Şekil 4.5a,b. Östrus devresinde sıçan serviksini TEM mikrografları. a. Fibroblast hücreleri (F) ve uzantıları. b. Fibroblast (F), düz kas hücresi (KH). Kollajen demetler (KD), granüllü endoplazmik retikulum (GER), nükleus (N). a. X6000, b. X7750.

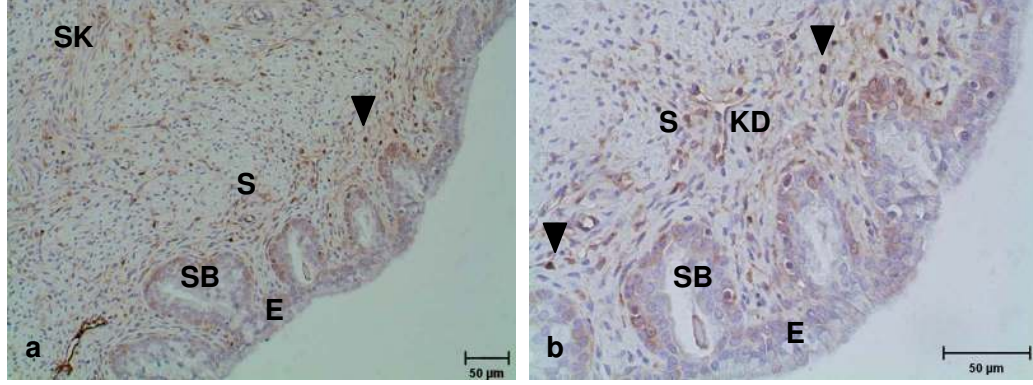
4.1.2.2. Gebeliğin 18. günü

Gebeliğin 18.gününde servikal yapı ışık mikroskopik düzeyde östrus serviksi yapısına benzerdi. iNOS immünboyanma şiddetinin östrusa göre biraz düştüğü görüldü. Lümen epiteli ve servikal düz kasta orta şiddette bir iNOS immünboyanması vardı. Damar endoteli ve damar düz kasında, keza lökosit benzeri hücrelerde de iNOS boyanması orta şiddetteydi. Yalnız fibroblast benzeri hücrelerde iNOS boyanması zayıf şiddette olup, östrusa göre biraz düşmüştü (Ş.4.6a,b; Ç.4.1). Bu devrede nitrit/nitrat ölçüm değerinde östrusa göre istatistiki yönden önemsiz de olsa bir düşme vardı (Ş.4.30; Ç.4.3). Genelde CD45 pozitif hücreler östrustakine benzer şekilde normal yoğunlukta görüldüler. CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değeri de östrustakine benzerdi ($P<0.05$) (Ş.4.7a,b; Ç.4.4).

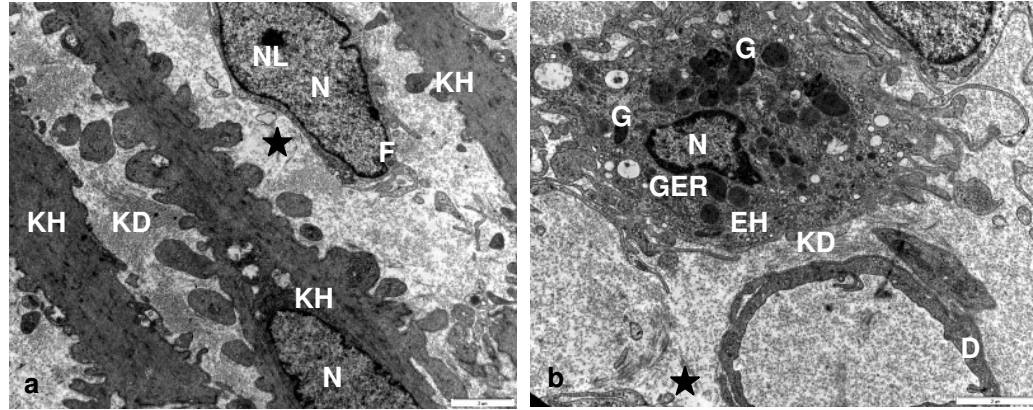
TEM düzeyinde, servikal yapı östrus serviksi yapısına benzerdi. Yoğun kollajen çatısında, servikal olgunlaşmanın başlangıç özelliklerini taşıyan bazı değişiklikler gözlemlendi. Protein sentezi için uygun olan organeller içeren aktif fibroblastlar keza bazı serbest hücreler vardı. Miyometriyumda kollajen demetler düz kas hücreleri çevresinde uniform şekilde uzanmaktaydı (Ş 4.8a-c).



Şekil 4.6a,b. Gebeliğin 18.gününde sıçan serviksini iNOS immünboyanması ışık mikrografları. iNOS immünboyanması epitelde (E), servikal düz kasta (SK) ve damar duvarında (DD) orta şiddette pozitifdir. Lökosit benzeri hücre (ok başı), stroma (S). O.B: a.X20; b.X40.



Şekil 4.7a,b. Gebeliğin 18. gününde sıçan serviksinde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrogramları. Epitel (E), servikal bez (SB), servikal düz kas (SK), kan damarı (KD), stroma (S), CD45 pozitif lökositler (ok başı). O.B: a. X20; b.X40.



Şekil 4.8a,b. Kontrol grubunda, 18 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikrogramları. a. Fibroblast (F) ve düz kas (KH) hücreleri. b. Eozinofil hücre (EH) ve granülleri (G), damar endoteli (D), granüllü endoplazmik retikulum (GER). Kollajen demetler (KD), stromada kollajenin sindirildiğine işaret eden bazı küçük alanlar (yıldız), nükleus (N), nükleolus (NL). a. X3597 , b. X4646.

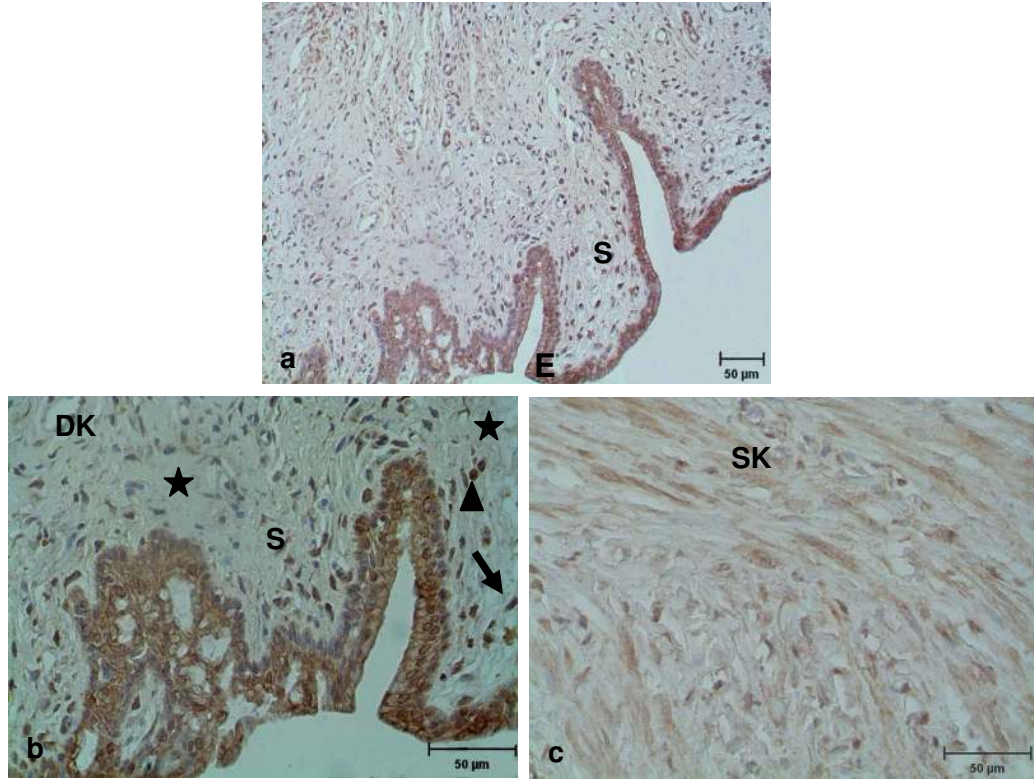
4.1.2.3. Gebeliğin 20. günü

Bu devrede servikste ışık mikroskopik düzeyde olgunlaşmaya işaret eden bazı değişiklikler vardı. Amorf esas madde artışını gösteren ödeme benzer bazı yapılar gözlemlendi. Kollajen demetlerin muhtemelen çözülmesiyle ilgili olduğu düşünülen bu olay stromal serbest ve sabit hücrelerin aktivite göstermesiyle ilişkilendirildi.

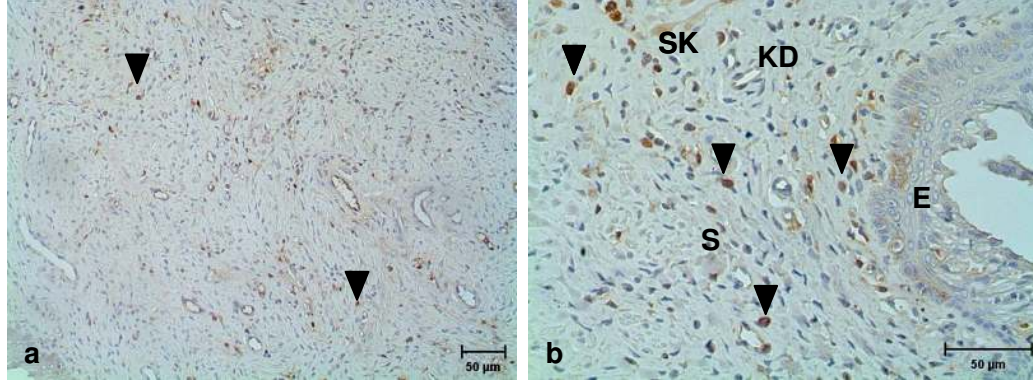
iNOS immünboyanma şiddeti östrustaki düzeyinde görüldü. Lümen epitelinde ve servikal düz kasta kuvvetli şiddette iNOS immünboyanması vardı. Damar endoteli orta şiddette, damar düz kası kuvvetli olarak iNOS antikoru ile boyanmıştı. Lökosit benzeri hücrelerde de iNOS immünboyanması kuvvetli şiddetle pozitif. Fibroblast benzeri hücreler ilk defa 20. günde iNOS antikoru ile kuvvetli pozitif boyanmıştı (Ş.4.9a,b; Ç.4.1). 20. günde nitrit/nitrat ölçüm değeri normal gebeliğin diğer devrelerine göre daha yüksekti. Bu değer, östrusun nitrit/nitrat ölçüm değerinden de yüksek olmakla beraber aralarındaki fark önemli değildi (Ş.4.30; Ç.4.3). Genelde CD45 pozitif hücrelerde östrusa göre görünüşte bir artış vardı.

CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değeri de östrusa göre daha yüksekti ($P<0.05$) (Ş.4.10a,b; Ç.4.4).

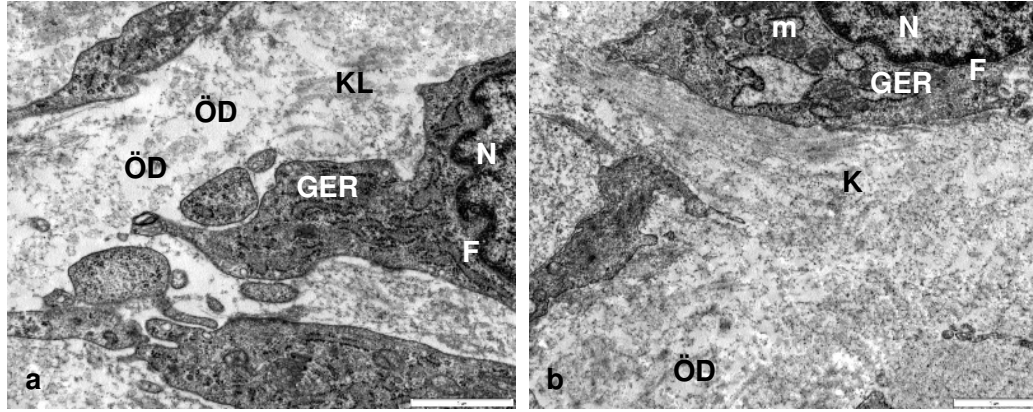
TEM düzeyinde fibröz bağ dokusu komponentlerinin azaldığı görüldü. Amorf esas madde artışını gösteren ödemler vardı. Kollajen demetlerin çözülmesiyle ilgili bu olay, serbest hücre ve aktif fibroblast artışıyla ilişkilendirildi. Kollajen demetlerde fibriller arası esas maddenin artığına işaret eden lifsel ayrılmalar kollajen organizasyonunun ileri düzeyde bozulduğuna işaret etmekteydi (Ş. 4.11a,b).



Şekil 4.9a-c. Gebeliğin 20. gününde sıçan serviksinin iNOS immünboyanması ışık mikrogramları. iNOS immünboyanması epitelde (E), servikal (SK) ve damar (DK) düz kasında kuvvetli şiddette pozitifdir. Lökosit benzeri hücre (ok başı), fibroblast benzeri hücre (ok), ödeme benzer yapı (yıldız), stroma (S). O.B: a. X20; b. X40; c. X40



Şekil 4.10a,b. Gebeliğin 20. gününde sıçan serviksinde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrogramları. Epitel (E), servikal düz kas (SK), kan damarı (KD), stroma (S), CD45 pozitif lökositler (ok başı). O.B: a. X20; b.X40.

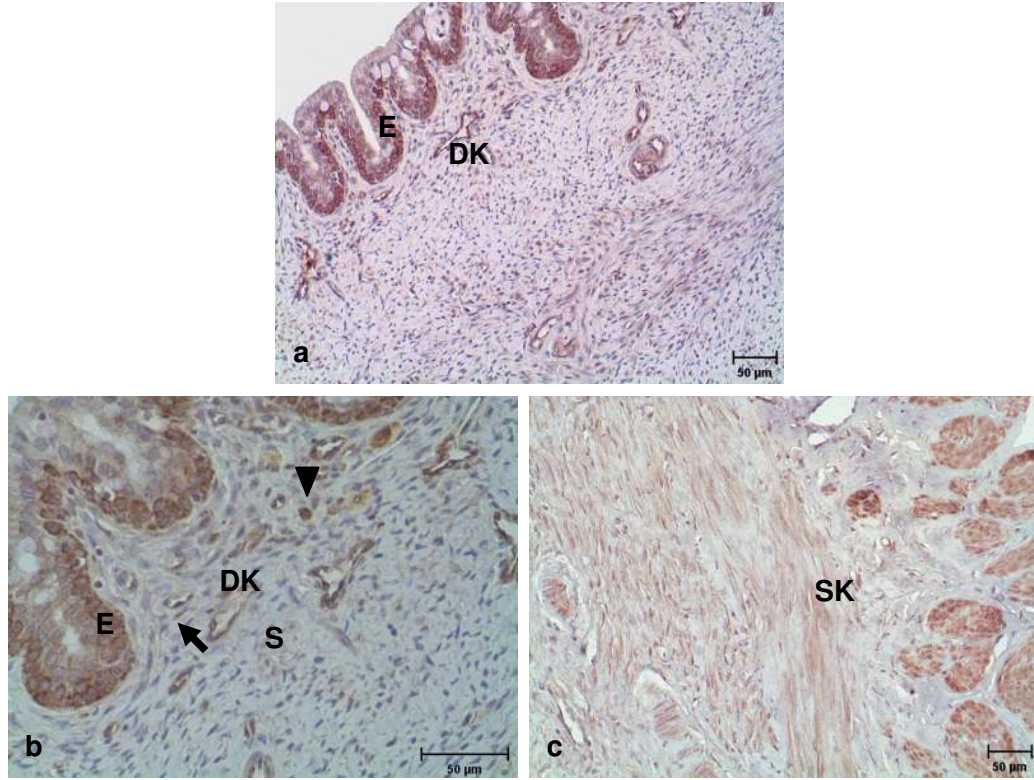


Şekil 4.11a,b. Kontrol grubunda, 20 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikrogramları. a. Fibroblast (F) hücresi. b. Fibroblast (F) hücresi. Kollajenin sindirildiği ödeme benzer açık alanlar (ÖD), demet düzeni bozulmuş kollajen lifler (KL), granüllü endoplazmik retikulum (GER), mitokondriyon (m), nükleus (N). a. X12930, b. X10000.

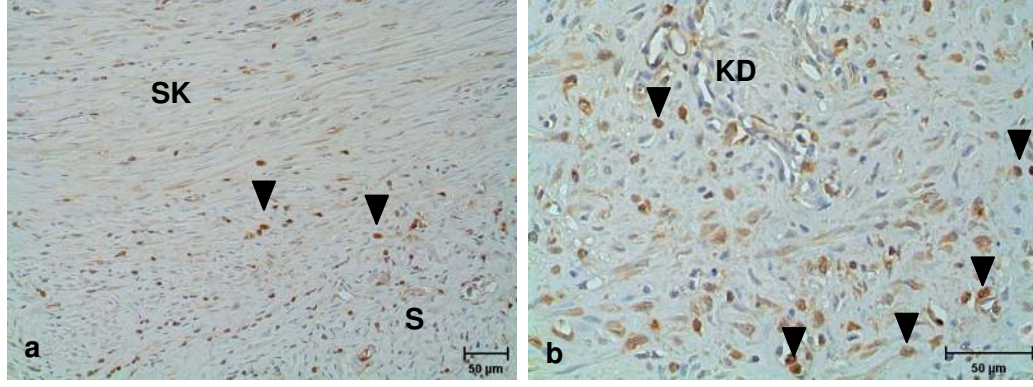
4.1.2.4. Gebeliğin 21. günü

Gebeliğin bu son gününde, ışık mikroskopik düzeyde stromal serbest ve sabit hücre yoğunluğu gebeliğin 20. günündekine benzer görünüyordu. 20. günde fibroblast benzeri hücrelerde kuvvetli pozitif olan iNOS immünboyanması 21. günde zayıf pozitif idi. Ancak diğer servikal doku ve hücrelerdeki iNOS boyanma şiddeti 20. günündekine benzerdi. Lümen epitel ve servikal düz kas kuvvetli şiddette iNOS antikoruyla boyanmıştı. Damar endotel ve damar düz kası iNOS ile kuvvetli şiddette immünboyanmıştı. Damar endotelinin iNOS boyanma şiddeti 21. günde normal gebeliğin diğer devrelerine göre daha yüksekti. Lökosit benzeri hücrelerde de 20. gündeki gibi iNOS boyanması kuvvetli pozitif idi (Ş.4.12a,b,c; Ç.4.1). Nitrit/nitrat ölçüm değeri, 21. günde, 20. güne ve östrusa göre daha düşüktü. Ancak aralarında istatistiki yönden önemli bir fark yoktu (Ş.4.30; T.4.3). Genelde CD45 pozitif hücrelerde östrus ve diğer devrelere göre görünüşte bir artış vardı. Gebeliğin bu son gününde CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değeri östrusa ve gebeliğin diğer devrelerine göre daha yüksekti ($P<0.05$) (Ş.4.13a,b; Ç.4.4).

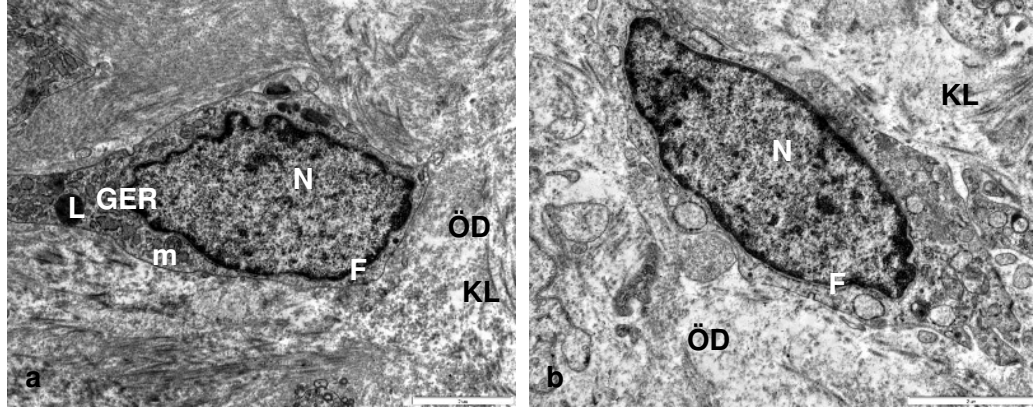
Bu devrede elektron mikroskopu düzeyinde lamina propriyada keza miyometriyumda gözlenen çoğu ultra ince yapı değişiklikleri ekstrasellüler doku kollajeninin yıkımıyla ilişkilendirildi. Kollajen fibriller bir düzen dahilinde değildi, çözülmüşlerdi ve bölünmüşlerdi. Kollajen lifler arasında çoğu açık aralıklarla görüldüğü gibi ödemler vardı. Aktif fibroblastlar belirgin nükleolusları ve kaba ER'ları ile dikkat çekmekteydi. Bu hücreler, kaba ER'un şişkin sisternaları, golgi kompleksleri, mitokondriyonları ve bazen de yoğun boyanmış granülleri ile karakterize edilmişlerdi. Makrofajlardaki fagositoz materyali ekstrasellüler kollajenin heterofagositozla yıkıma uğratıldığını göstermekteydi. Fibroblast ya da makrofaj çevresindeki bazı açık alanların varlığı kollajen fibril kaybının olduğuna bağlandı. Miyometriyumda düz kas hücrelerinde pinositik veziküller vardı (Ş. 4.14a,b).



Şekil 4.12a-c. Gebeliğin 21. gününde sıçan serviksini iNOS immünboyanması ışık mikrografları. iNOS immünboyanması epitelde (E), servikal (SK) ve damar (DK) düz kasında kuvvetli şiddettedir. Lökosit benzeri hücre (ok başı), fibroblast benzeri hücre (ok), stroma (S). O.B: a. X20; b. X40; c. X20.



Şekil 4.13a,b. Gebeliğin 21. gününde sıçan serviksinde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikroyrafları. Servikal düz kas (SK), kan damarı (KD), stroma (S), CD45 pozitif lökositler (ok başı). O.B: a. X20; b.X40.



Şekil 4.14a,b. Kontrol grubunda, 21 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikroyrafları. a. Fibroblast (F) hücresi ve amorf esas madde artışına işaret eden bazı ödem benzeri açık alanlar (ÖD). b. Ekstrasellüler kollajenin yıkıma uğratıldığı ödem benzeri alanlar (ÖD) ve fibroblast (F) hücresi. Granüllü endoplazmik retikulum (GER), mitokondriyon (m), dağılmış kollajen lifler (KL), lizozom (L), nükleus (N). a. X6000, b. X7750.

4.1.2.5. Doğum Sonrası Sıfırncı (PPO) gün

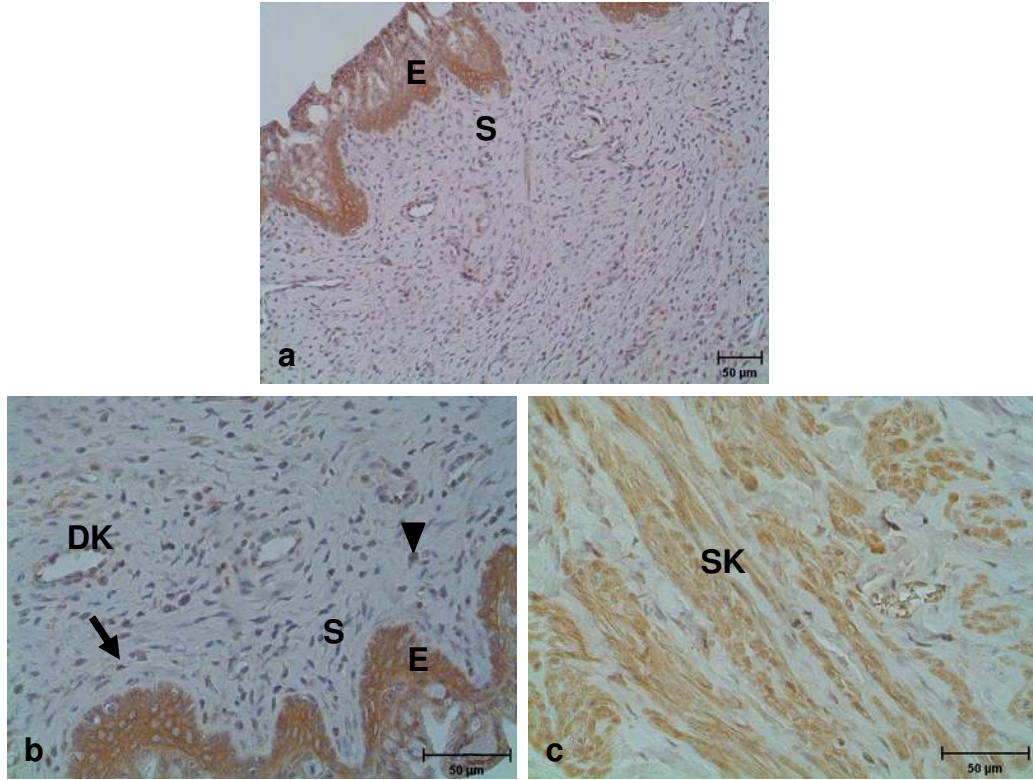
Doğum sonrası sıfırncı günde serviksin histolojik yapısında ışık mikroskopik düzeyde doğum öncesine göre fark edilir bir değişiklik gözlenmedi.

iNOS antikoru ile yalnız lümen epiteli ve servikal düz kas 21. gündeki gibi kuvvetli pozitif boyanmıştı. Damar endotelinde zayıf, damar düz kasında orta şiddette iNOS immünboyanması gözlemlendi. Lökosit ve fibroblast benzeri hücreler elemanlarda, 21. güne göre, iNOS boyanma şiddetinde azalma vardı. Lökosit benzeri hücreler orta şiddette, fibroblast benzeri hücreler zayıf şiddette boyanmıştı (Ş.4.15a,b,c; Ç.4.1). Bu devrede nitrit/nitrat ölçüm değeri östrusa ve 20. güne göre biraz daha düşük olmakla beraber aralarında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmadı (Ş.4.30; Ç.4.3). PPO. günde CD45 pozitif hücre yoğunluğunda 21. güne göre görünüşte bir artış vardı. CD45 hücre yoğunluğu HSCORE değeri östrus ve de

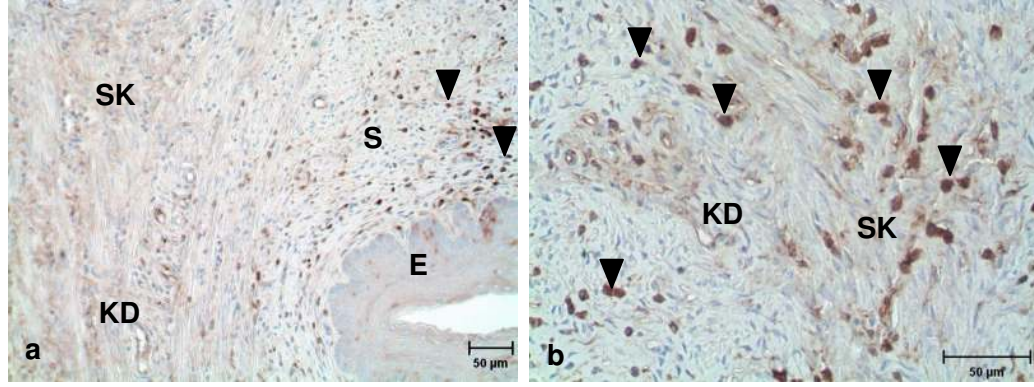
gebelik günlerine göre önemlilik düzeyinde daha yüksekti ($P<0.05$) (Ş.4.16a,b; Ç.4.4).

Kontrol grubunun sıçan serviksinde CD45 antikoruna ile boyanmış pozitif hücre (lökosit) yoğunluğu HSCORE değerlerine genel olarak bakıldığında CD45 pozitif hücre yoğunluğunun östrus ve gebeliğin 18. gününde benzer olduğu ve PPO. güne kadar da tedricen arttığı görülmektedir ($P<0.05$). Gebeliğin 20, 21 ve PPO. günlerdeki CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değerleri arasındaki farklarında istatistiki olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($P<0.05$) (Ç.4.4)

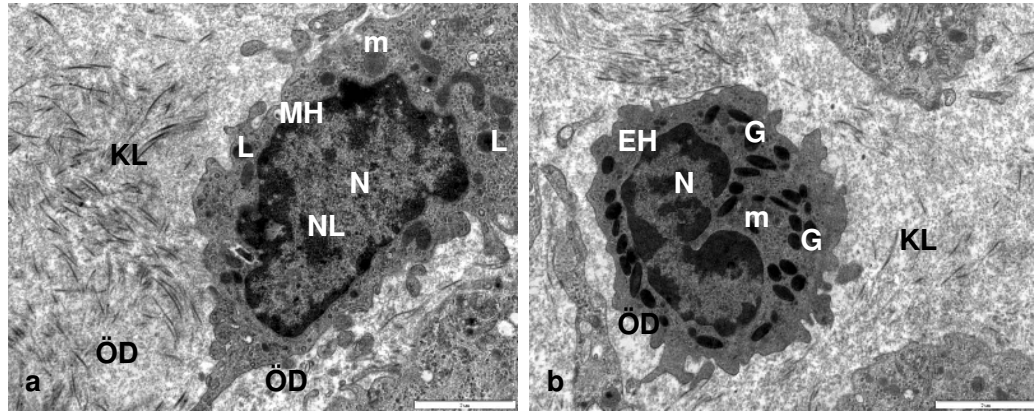
Elektron mikroskopik düzeyde, lamina propriyada kollajenin çözüldüğüne ve fibröz bağ dokusu komponentlerinde bir azalmanın olduğuna işaret eden ödemler gözlemlendi. Aynı durum miyometriyumdaki bağ dokusunda da vardı. Bu devrede bazı fibroblastların ve makrofajların halen aktif oldukları görüldü (Ş. 4.17a,b).



Şekil 4.15a-c. Gebeliğin doğum sonrası sıfırıncı (PPO) gününde sıçan serviksini iNOS immünboyanması ışık mikroyrafları. iNOS immünboyanması epitelde (E), servikal düz kasta (SK) kuvvetli, damar düz kasında (DK) orta şiddettedir. Lökosit benzeri hücre (ok başı), fibroblast benzeri hücre (ok), stroma (S). O.B: a.X20; b. X40; c. X40.



Şekil 4.16a,b. Sıçan serviksini doğum sonrası sıfırncı (PPO) gününde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrogramları. Epitel (E), servikal düz kas (SK), kan damarı (KD), stroma (S), CD45 pozitif lökositler (ok başı). O.B: a. X20; b.X40.



Şekil 4.17a,b. Kontrol grubunda, doğum sonrası sıfırncı günde (PPO) sıçan serviksini TEM mikrogramları. a. Makrofaj hücresi (MH) ve lizozomlar (L). b. Eozinofil hücre (EH) ve granülleri (G). Dağınık durumdaki kollajenler (KL) arasında bazı ödeme benzer açık alanlar (ÖD). mitokondriyon (m), nükleus (N), nükleolus (NL).a. X6000, b. X6000.

Çizelge 4.1. Kontrol sıçanı serviksini östrusta ve gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırncı (PPO) günlerinde iNOS antikorunu immünboyanma yoğunluğu.
+ : zayıf pozitif; ++ :orta; +++ : kuvvetli pozitif; ++++ : çok kuvvetli pozitif

	Östrus	18. gün	20. gün	21. gün	PPO. gün
Lümen epiteli	+++	++	+++	+++	+++
Lökosit benzeri hücre	+++	++	+++	+++	++
Fibroblast benzeri hücre	++	+	+++	+	+
Damar endoteli	++	++	++	+++	+
Damar düz kası	+++	++	+++	+++	++
Servikal düz kas	+++	++	+++	+++	+++

4.2. Deney Grubunun Sıçan Serviksi

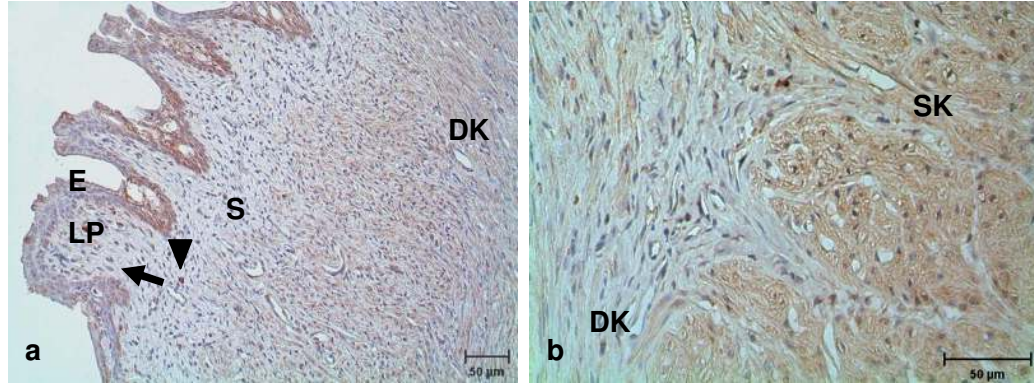
4.2.1. Deney Grubunun Sıçan Serviksine İmmünohistokimyasal ve Elektron Mikroskopik Bulgular

4.2.1.1. Gebeliğin 18. günü

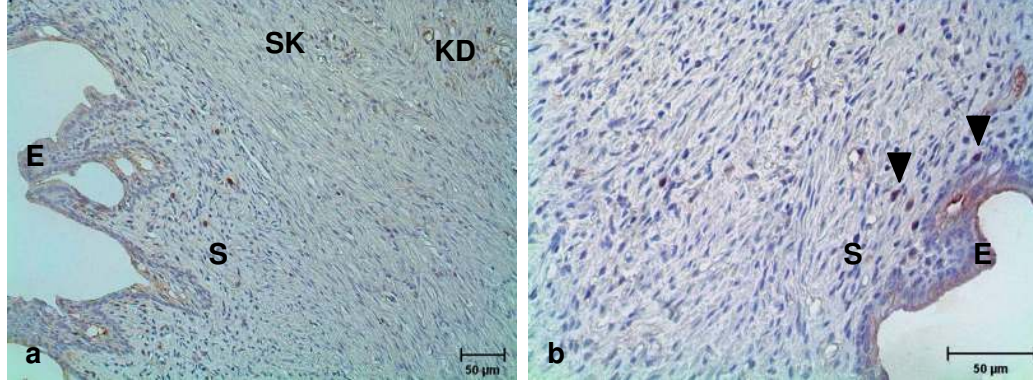
Gebeliğin 18. gününde L-NAME verilen sıçan serviksinin histolojik yapısı ışık mikroskopik düzeyde normal gebeliğin 18.günündeki sıçan serviksine benzemekteydi. Lamina propriyada normal gebeliğin 18. güne göre fark edilir bir değişiklik gözlenmedi.

iNOS antikoruna ile lümen epitel ve servikal düz kas boyanması normal gebe serviksine göre oldukça düşmüştü ve zayıf şiddette pozitif. Aynı şekilde damar endoteli, damar düz kası, lökosit ve fibroblast benzeri hücrelerde de zayıf şiddette iNOS immünboyanması vardı (Ş.4.4a; Ş.4.18a,b; Ç.4.2). Nitrit/nitrat ölçüm değeri de normal gebeliğin 18.gününe göre istatistiki olarak önemlilik düzeyinde düşük görüldü ($P<0.05$), (Ş.4.30; Ç.4.3). Genelde CD45 pozitif hücre yoğunluğu normal gebeliğin aynı günündeki görünüşe göre oldukça düşüktü. Aynı şekilde CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değerinde de düşme vardı ($P<0.05$) (Ş.4.4b; Ş.4.19a,b; Ç.4.4).

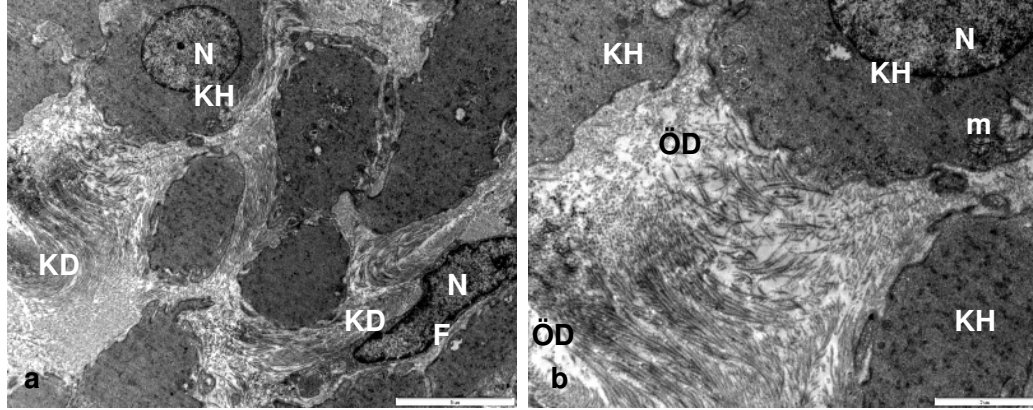
Elektron mikroskopi düzeyinde, yoğun kollajen demetleri yapısında önemli bir değişiklik yoktu. Burada, bazı fagositik özellikli makrofajlar ve aktif fibroblastlar gözlemlendi (Ş.4.20a,b).



Şekil 4.18a,b. L-NAME verilen sıçan serviksinin gebeliğin 18. gününde iNOS immünboyanması ışık mikrografları. iNOS immünboyanması epitelde (E), lamina propriya (LP), servikal (SK) ve damar (DK) düz kasında, lökosit (ok başı) ve fibroblast (ok) benzeri hücrelerde zayıf şiddette pozitif. Stroma (S). O.B: a. X20; b. X40.



Şekil 4.19a,b. L-NAME verilen sıçan serviksinde gebeliğin 18. gününde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrogramları. Epitel (E), servikal düz kas (SK), kan damarı (KD), stroma (S), CD45 pozitif lökositler (ok başı). O.B: a. X20; b.X40.



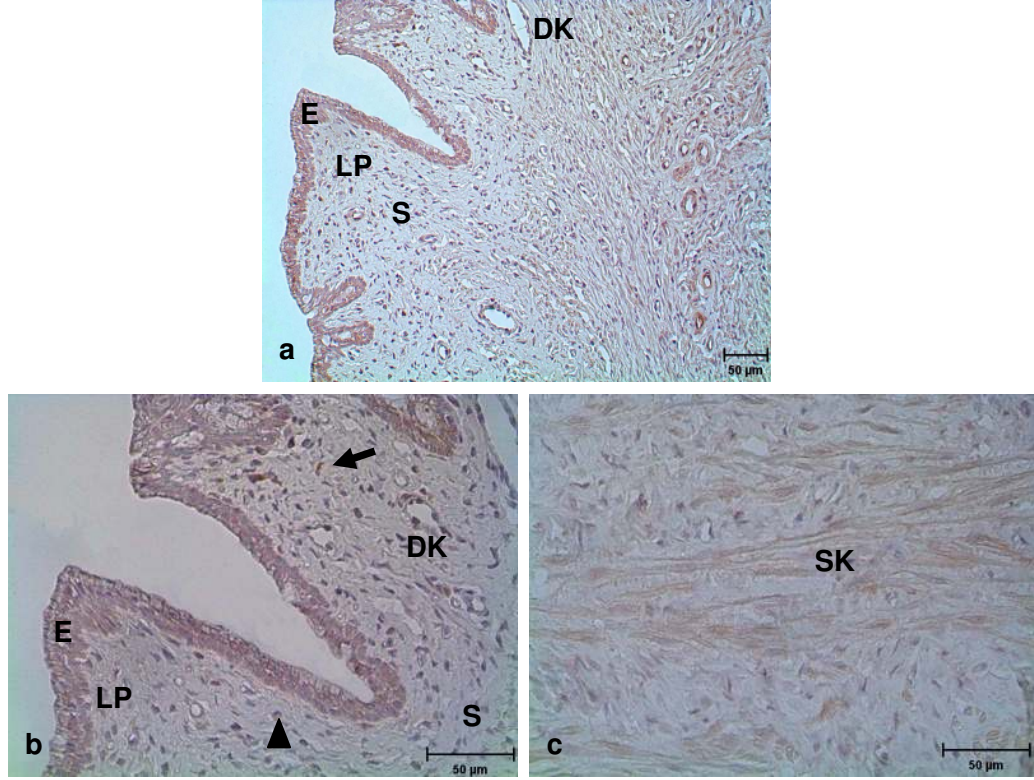
Şekil 4.20a,b. Deney grubunda 18 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikrogramları. a. Kısmen düzenli kollajen demetler (KD) arasında bulunan fibroblast (F) ve kas hücresi (KH). b. Kas hücreleri (KH) ve kollajen düzeninin kısmen bozulduğunun işareti olan ödem benzeri küçük alanlar (ÖD). Mitokondriyon (m), nükleus (N). a. X2784, b. X6000.

4.2.1.2. Gebeliğin 20. günü

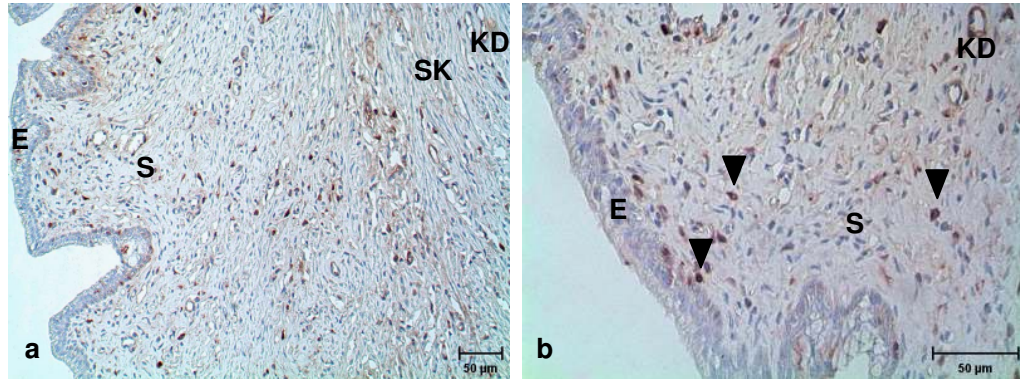
Bu devrede L-NAME verilen sıçan serviksi yapısı, ışık mikroskopik düzeyde normal gebeliğin 20. günündekine benzer görünüşteydi. Lamina propriyada servikal olgunlaşmaya işaret eden ödeme benzer bazı yapılar gözlemlendi.

iNOS immünboyanma şiddeti 18. gündeğine benzemekteydi. Lümen epitelinde, servikal düz kasta, keza damar duvarında lökosit ve fibroblast benzeri hücresel elemanlarda iNOS boyanma şiddeti 18. gündeğine gibi zayıf pozitif (Ş.4.21a,b; Ç.4.2). Nitrit/nitrat ölçüm değeri de 18. günden farklı değildi. Bu devrede iNOS boyanma şiddetinde olduğu gibi nitrit/nitrat ölçüm değeri de kontrole göre düşmüştü ve aralarında istatistiki yönden önemli bir fark vardı ($P<0.05$), (Ş.4.30; Ç.4.3). Bu devrede CD45 pozitif hücre yoğunluğunda görünüşe göre bir artış vardı. CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değeri de normal gebeliğin 20. günündekine benzerdi ($P<0.05$) (Ş.4.22a,b; Ç.4.4).

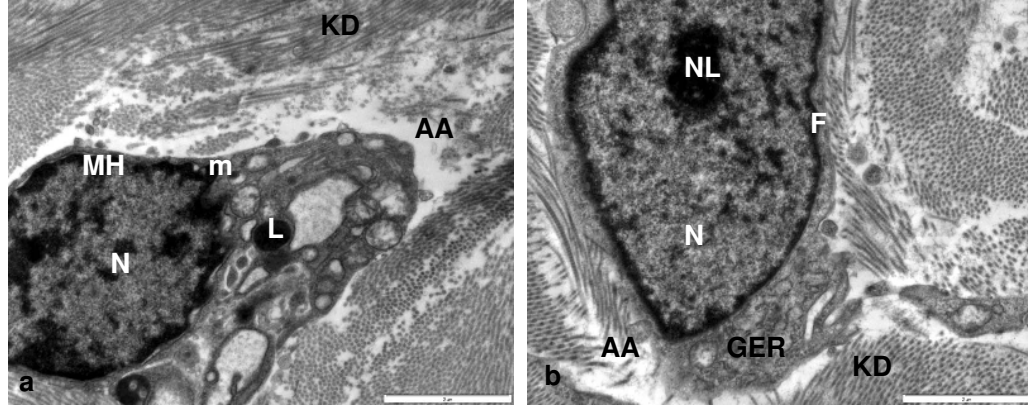
TEM düzeyinde servikal olgunlaşmaya işaret eden ödemler görüldü. Kollajen demetlerin organizasyonu ileri düzeyde bozulmuştu. Kollajen demetlerden lifsel yapıların ayrıldığı açıkça görülmüyordu. Keza fagositik özellikli makrofajlar ve GER'den zengin fibroblastlar da vardı (Ş.4.23a,b).



Şekil 4.21a-c. L-NAME verilen sıçan serviksini gebeliğin 20. gününde iNOS immünboyanması ışık mikrafları. iNOS immünboyanması epitelde (E), lamina propriya (LP), servikal (SK) ve damar (DK) düz kasında, lökosit (ok başı) ve fibroblast (ok) benzeri hücrelerde zayıf şiddette pozitifdir. Stroma (S). O.B: a. X20; b. X40; c.X40



Şekil 4.22a,b. L-NAME verilen sıçan serviksini gebeliğin 20. gününde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrafları. Epitel (E), servikal düz kas (SK), kan damarı (KD), stroma (S), CD45 pozitif lökositler (ok başı). O.B: a. X20; b.X40.

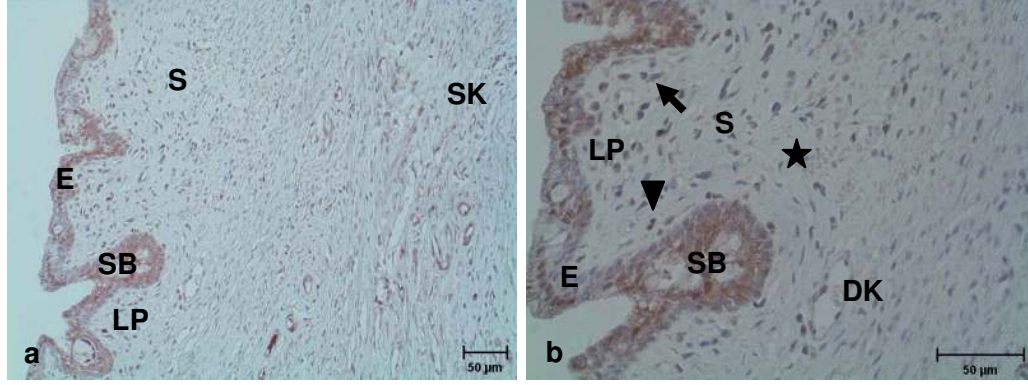


Şekil 4.23a,b. Deney grubunda 20 günlük gebe sıçan serviksinin TEM mikrografları. a. Makrofaj hücresi (MH). b. Fibroblast (F) hücresi. Kısımın kollajenin sindirildiği açık alanlar, kollajen demet (KD), nükleus (N), nükleolus (NL), granüllü endoplazmik retikulum (GER), mitokondriyon (m), lizozom (L). a. X7750, b. X7750.

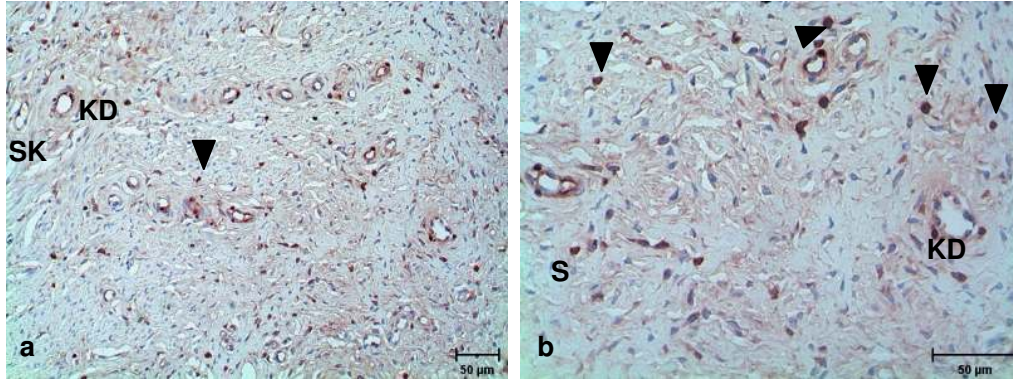
4.2.1.3. Gebeliğin 21. günü

Doğumun gerçekleştiği bu son günde serviksin yapısı ışık mikroskopik düzeyde 20. gündeğine benzerdi. Lamina propriyada ödeme benzer yapılar gözlemlendi. iNOS miktarında ve nitrit/nitrat ölçüm değerlerinde kontrolün aynı gününe göre bir düşme vardı. iNOS boyanması lümen epitelinde ve servikal düz kasta orta şiddette pozitif, damar endotelinde ve damar düz kasında, keza fibroblast benzeri hücrelerde önceki devrelere göre değişmediği görüldü. Lökosit benzeri hücreler de iNOS antikoru ile orta şiddette immünboyanmıştı (§.4.24a,b; Ç.4.2). Nitrit/nitrat değerinde önceki devrelere göre önemli bir artış olmadı, ancak kontrol değerlerine göre önemli bir düşme vardı ($P<0.05$), (§.4.30; Ç.4.3). Bu durum, servikal olgunlaşmada iNOS dışında başka mediyatörlerin de görev alabileceğine işaret etmekteydi. Gebeliğin bu son gününde CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değeri de deney grubunun diğer devrelerine göre önemlilik düzeyinde daha yüksekti ($P<0.05$) (§.4.25a,b; Ç.4.4).

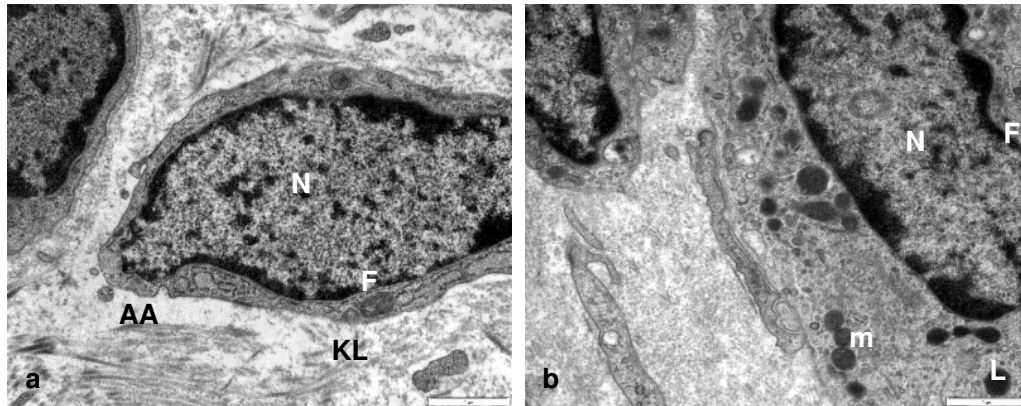
Yukarıdaki bulgular kollajen organizasyonunun bozulduğunu gösteren elektron mikroskopu gözlemleriyle de desteklenmekteydi. Bağ dokusundaki ve miyometriyumdaki ultra ince yapı değişiklikleri ekstrasellüler doku kollajeni yıkımıyla ilişkili görüldü. Makrofajlar ve aktif fibroblastlar normal gebeliğin 21. gününde görülenlere benzerdi (§.4.26a,b).



Şekil 4.24a,b. L-NAME verilen sıçan serviksini gebeliğin 21. gününde iNOS immünboyanması ışık mikroyrafları. iNOS immünboyanması epitelde (E), servikal bez (SB), lamina propriya (LP), servikal (SK) ve damar (DK) düz kasında ve lökosit (ok başı) benzeri hücrelerde orta şiddettedir. Stroma (S), ödeme benzer yapı (yıldız). O.B: a. X20; b. X40.



Şekil 4.25a,b. L-NAME verilen sıçan serviksini gebeliğin 21. gününde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikroyrafları. Servikal düz kas (SK), kan damarı (KD), stroma (S), CD45 pozitif lökositler (ok başı). O.B: a. X20; b.X40.



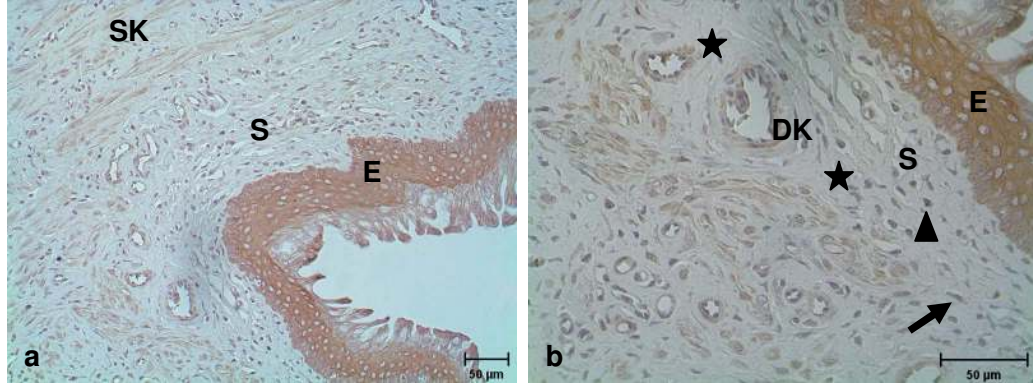
Şekil 4.26a,b. Deney grubunda 21 günlük gebe sıçan serviksini TEM mikroyrafları. a. Fibroblast (F) ve çevresinde esas maddenin baskın olduğu açık alanlar (AA). b. Fibroblast hücresi (F). Stromada dağılmış kollajen lifler (KL), mitokondriyon (m), lizozom (L), nükleus (N). a. X10000, b. X10000.

4.2.1.4. Doğum Sonrası Sıfırncı (PPO) gün

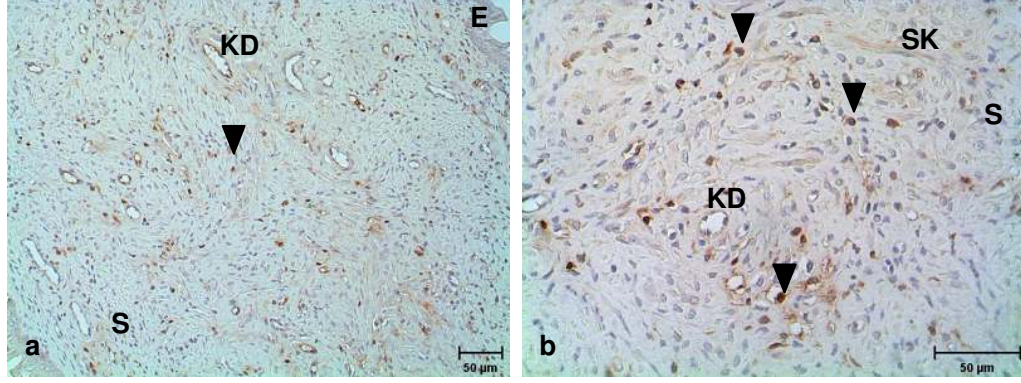
Doğumu takip eden sıfırncı günde L-NAME verilen sıçan serviksi, ışık mikroskopik düzeyde 21. günde benzer yapıda görüldü. Bağ dokusu, östrustakine benzer görünüşte yapılanamamıştı. Halen stromada ödeme benzer bazı yapılar vardı. iNOS boyanması 21. güne göre lümen epitelinde daha şiddetliydi ve kuvvetli şiddette pozitif olmasıyla da normal gebe serviksine benzemekteydi. Servikal düz kastaki iNOS boyanması orta şiddette pozitif ve normal gebe serviksine göre biraz düşüktü. Lökosit benzeri hücrelerde iNOS boyanma şiddeti normal gebe serviksine göre biraz düşmüştü, ancak damar endotelinde, damar düz kasında ve fibroblast benzeri hücrelerde kontrole göre bir fark görülmedi (Ş.4.27a,b; Ç.4.2). Nitrit/nitrat ölçüm değerinde kontrole göre istatistiki olarak önemlilik düzeyinde bir düşme vardı ($P<0.05$), (Ş.4.30; Ç.4.3). CD45 pozitif hücre yoğunluğu görünüşte 21. güne göre benzerdi. Ancak CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değeri deney grubunun 21. gününe göre önemlilik düzeyinde daha yüksekti ($P<0.05$) (Ş.4.28a,b; Ç.4.4).

L-NAME verilen deney grubuna genel olarak bakıldığında en düşük CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğu HSCORE değeri 18. günde görülmektedir. CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değerlerinde 18. günden ileriye doğru önemlilik düzeyinde tedricen bir artış vardır ($P<0.05$). L-NAME verilen gebelik günlerinin CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değerleri arasındaki farklar da istatistiki olarak önemlidir ($P<0.05$). Kontrol grubunun CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değerleri ile deney grubunun aynı değerleri arasında önemlilik düzeyinde bir düşme vardır ($P<0.01$) (T.4).

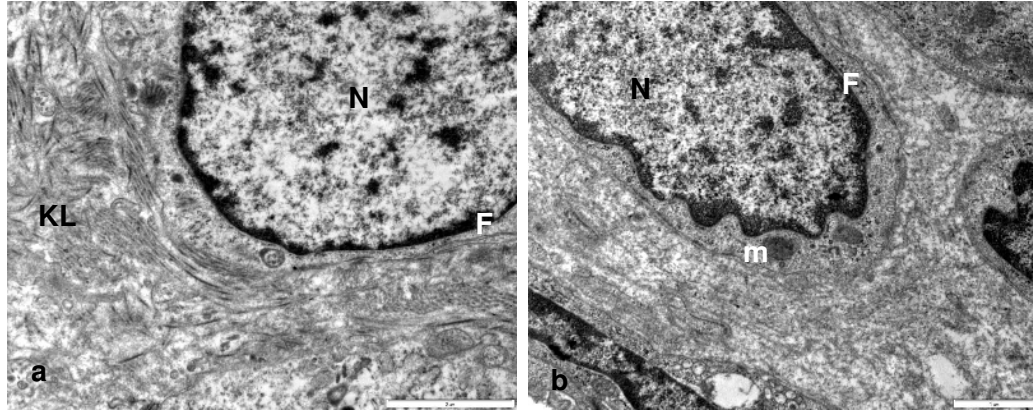
Serviksin elektron mikroskopik yapısı kontrol grubunun PPO. gününe benzerdi. Bağ dokusu komponentlerinde azalma, keza ödemli bölgeler vardı (Ş.4.29a,b).



Şekil 4.27a,b. L-NAME verilen sıçan serviksinin doğum sonrası sıfırncı (PPO) gününde iNOS immünboyanması ışık mikrografları. iNOS immünboyanması epitelde (E) kuvvetli, servikal düz kasta (SK) orta, lökosit (ok başı) ve fibroblast (ok) benzeri hücrelerde zayıf şiddette pozitifdir. Stroma (S), ödeme benzer yapı (yıldız). O.B: a. X20; b. X40.



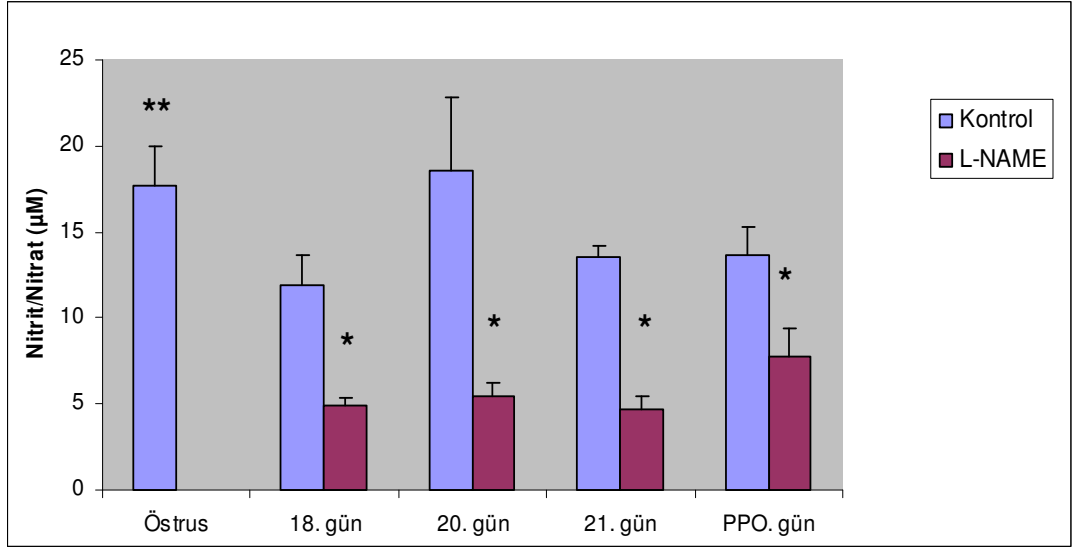
Şekil 4.28a,b. L-NAME verilen sıçan serviksini doğum sonrası sıfırncı (PPO) gününde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğunu gösteren ışık mikrogramları. Epitel (E), servikal düz kas (SK), kan damarı (KD), stroma (S), CD45 pozitif lökositler (ok başı). O.B: a. X20; b.X40.



Şekil 4.29a,b. Deney grubunda, doğum sonrası sıfırncı günde (PPO) sıçan serviksini TEM mikrogramları. a. Fibroblast hücresi (F). b. Fibroblast hücresi (F). Dağılmış kollajen lifler (KL), mitokondriyon (m), nükleus (N). a. X10000, b. X7750.

Çizelge 4.2: Deney sıçanı serviksini gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırncı (PPO) günlerinde iNOS antikorunu immünboyanma yoğunluğu
+ : zayıf pozitif; ++ : orta; +++ : kuvvetli pozitif; ++++ : çok kuvvetli pozitif

	18. gün	20. gün	21. gün	PPO. gün
Lümen epiteli	+	+	++	+++
Lökosit benzeri hücre	+	+	++	+
Fibroblast benzeri hücre	+	+	+	+
Damar endoteli	+	+	+	+
Damar düz kası	+	+	+	++
Servikal düz kas	+	+	+	++



Şekil 4.30. Kontrol ve deney sıçanı serviksinde; östrusta, gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırıncı (PPO) günlerinde nitrit/nitrat ölçüm değerleri histogramı (ortalama ± standart sapma).

** P<0.05 (östrus ile deney günleri karşılaştırıldığında)

* P<0.05 (aynı gün için kontrol ve deney grubu karşılaştırıldığında)

Not: Kontrol grubunda östrus ile diğer günler arasında önemlilik bulunmadı (P>0.05).

Çizelge 4.3. Kontrol ve deney sıçanı serviksinde östrusta, gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırıncı (PPO) günlerinde nitrit/nitrat ölçüm değerleri (µM) (ortalama ± standart sapma).

	Östrus	18. gün	20. gün	21. gün	PPO.gün
Kontrol grubu	17.670±2.350**	11.940±1.800	18.600±4.220	13.500±0.700	13.690±1.600
Deney grubu	—	4.870±0.500*	5.480±0.650*	4.680±0.790*	7.700±1.720*

** P<0.05 (östrus ile deney günleri karşılaştırıldığında)

* P<0.05 (aynı gün için kontrol ve deney grubu karşılaştırıldığında)

Not: Kontrol grubunda östrus ile diğer günler arasında önemlilik bulunmadı (P>0.05).

Çizelge 4.4. Kontrol ve deney sıçanı serviksinde; östrusta, gebeliğin 18, 20, 21 ve doğum sonrası sıfırıncı (PPO) günlerinde CD45 pozitif hücre (lökosit) yoğunluğu HSCORE değerleri (ortalama $\pm$ standart sapma).

	Östrus	18. gün	20.gün	21. gün	PPO. gün
Kontrol grubu	16.50 $\pm$ 3.73 ^a	16.50 $\pm$ 2.17	20.67 $\pm$ 3.67 ^{a, b}	34.17 $\pm$ 3.37 ^{a, b, c}	51.50 $\pm$ 5.75 ^{a, b, c}
Deney grubu	—	9.33 $\pm$ 2.58 ^d	20.67 $\pm$ 3.72 ^{d, e}	25.17 $\pm$ 3.43 ^{d, e, f}	36.67 $\pm$ 4.46 ^{d, e, f, g}

^{a-c}P<0.05

^{d-g}P<0.05

P<0.01 (aynı gün için kontrol ve deney grubu karşılaştırıldığında)

TARTIŞMA

Servikal olgunlaşma (yumuşama, bozulma, dilatasyon) doğumun gerçekleşmesi için mutlak gerekli olan bir olaydır. Gebeliğin başarılı olarak sona ermesi bununla ilgili biyokimyasal ve yapısal değişikliklerin zamanında koordineli olarak yapılmasına bağlıdır (16, 86). Olgunlaşma olayı esnasında servikste ortaya çıkan değişiklikler başlangıçta pasif olarak kabul edilirdi, şimdi ise olgunlaşma olayının servikal değişikliklerle uyumlu aktif bir olay olduğu düşünülmektedir (87, 88). Bugüne kadar bu konuyla ilgili bazı çalışmalar yapılmışsa da servikal olgunlaşma ve doğumu kontrol eden mekanizmalar ve mediyatörler hala büyük oranda bilinmemektedir (16, 21, 89).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar servikal olgunlaşmanın gebelik boyunca ortaya çıkan sürekli bir olay olduğuna işaret etmektedir (86). Sıçan serviksi doğumdan birkaç gün önce yumuşamaya başlar. Bu zaman içinde serviksin kapalı kalması muhtemelen kollajen lif uzunluğu ve düzeniyle ilgilidir (90). Çalışmalarımız rijid servikste (östrusta) kollajenin uzun liflerden ibaret demetler halinde düzenlendiğini gösterdi (86). Bu durum gebeliğin sonuna doğru 21. günde değişmişti. TEM düzeyinde kısa ve ince liflerden ibaret agregatlar oluştuğunda uzun kollajen demetler kaybolmuştu. Kollajen düzenindeki bu değişikliklerle serviks yumuşamış ve bozulmuş halde görüldü (90). Bu, kollajen lif düzeni ve uzunluğunun serviksin rijiditesinin sürekliliği bakımından önemli olduğunu, olgunlaşma olayında da önemli rol oynadığını ifade eder.

Bu çalışmada iNOS; östrusta, normal gebe ve L-NAME verilen gebe sıçanlarda servikal düz kasta, damar düz kasında, endotelde, epitelde, lökosit ve fibroblast benzeri hücrelerde farklı düzeylerde belirlendi. iNOS varlığı, bu gruplarda nitrit/nitrat ölçümleriyle de doğrulandı.

Çalışmamızda L-NAME verilen sıçan serviksinde gebeliğin 18, 20 ve 21. günlerinde iNOS boyanma şiddetinin ve nitrit/nitrat değerlerinin kontrole göre farkedilir düzeyde düştüğü görüldü. L-NAME ile iNOS boyanma şiddetinde ve nitrit/nitrat değerlerindeki bu düşme iNOS aktivitesinin bulunduğunu ve endojen iNOS enzim aktivitesinin fizyolojik servikal olgunlaşma için önemli olduğunu ifade eder. Bu ise NO'nun sıçanda servikal olgunlaşmanın farmakolojik ve fizyolojik regülatörü olabileceği hipotezini de destekler (21).

Gebeliğin farklı zamanlarında L-NAME verilen sıçan serviksinde olgunlaşmaya işaret eden kollajen organizasyonunun bozulması ve 21. günde de doğum olayının gerçekleşmiş olması bu olayda iNOS'un yalnız başına yeterli olmadığını düşündürmektedir. Çalışmamızın bu bulgusu, servikal dokunun yeniden yapılmasında iNOS tarafından üretilen NO'nun yeterli olabileceğini rapor eden araştırmacıların aksine (15), servikal olgunlaşmanın yalnız iNOS ile gerçekleşmediğini

bu olayda başka mediyatörlerin de görev alabileceğini bildiren çalışmaların sonuçlarıyla da uyumlu olması bakımından önemlidir (21).

Önceki çalışmalar L-NAME'in servikal olgunlaşmayı inhibe ettiğini, fakat bunun lokal değil sistemik olarak verildiği için etkili olduğunu bildirmişlerdir (91). Çalışmamızda L-NAME oral yoldan ve gavajla verildiği için servikal olgunlaşmayı önleyememiş ya da iptal edememiş olabilir. Diğer taraftan NO donörleri insan serviksinde 3 saatte etkili olduğu halde kobayda 2-3 günde etkisini göstermiştir (18, 91). Benzer durumun NO inhibitörleri için de geçerli olduğu gösterilmiştir (91).

Bulgularımızda iNOS boyanma şiddetinin normal gebeliğin son 2 gününde östrustaki düzeyinde görülmesi ve nitrit/nitrat değerlerinin de östrusa göre önemlilik düzeyinde bir farklılık göstermemesi, iNOS ürünü NO'nun servikal olgunlaşma olayına 20 ve 21. günlerde önceki günlere göre yüksek düzeyde katıldığını ifade eder. Bu konuda çalışan bazı araştırmacılar kobayda iNOS, insanda iNOS mRNA'sı düzeylerinin terme doğru düştüğünü bildirmişlerse de (92, 93), aksine iNOS ya da NO'nun gebeliğin sonuna doğru arttığını rapor edenler de vardır (21).

Diğer taraftan servikal olgunlaşma terme doğru tedricen gelişirken gebeliğin 20 ve 21. günlerinde görülen iNOS boyanma şiddetindeki artışlar ve nitrit/nitrat düzeyindeki bu yükselmeler NO'nun genişlemenin ileri artış gösterdiği olgunlaşmanın son kademesinde servikal genişlemeyle de ilgili olduğunu göstermektedir (94).

Çalışmamızla önceki çalışmalar arasındaki farklar tekniklerde ya da hayvanın genetiğiyle ilgili olabilir. Bu olayda spesies çeşitliliği, gebelik periyotları gibi farklılıkların yanında uygulamalarda örneğin osmotik minipompa, içme suyu, subkutan ya da lokal intravajinal uygulamalar da farklı sonuçlara götürebilmektedir (91, 95). Keza çalışılan zaman noktalarıyla ilgili olabilir; örneğin yapılan bazı çalışmalarda doğum sonrası 3. gündeki iNOS değerlerinin doğum öncesi değerlerle karşılaştırılması gibi.

NO, başka dokularda MMP aktivitesini stimüle etme ve proteoglikan sentezini baskılama kabiliyetindedir (21, 26, 93). Bu nedenle servikte de benzer şekilde fonksiyon yapabilir. NO'nun insan serviksinde MMP2 ya da MMP9'u aktive etmediği gösterilmişse de başka MMP'ler NO'nun servikal aktivitesinden sorumlu olabilir. NO, benzer şekilde, olgunlaşma olayına fizyolojik olaylarda önemli olabilen bir başka mekanizma olan apoptozisi indüklemeye yoluyla katılabilir (21). NO etkileri, siklooksijenaz (COX) vasıtasıyla prostaglandin sentezindeki bir artışa neden olabilir ve prostaglandinlerde başka inflamatuvar mediyatörleri (örn IL-8) stimüle edebilir (21, 93).

Bazı araştırmacılar, gebelikte iNOS ve COX2 enzimlerinin ekspresyonunu benzer zamanlarda ve benzer dokularda göstermişler ve bunların yolları arasında muhtemel bir etkileşimin olabileceğini ifade etmişlerdir (89, 96). COX'un en az 2 izoformu vardır: COX1 konstitutif olarak pek çok dokuda mevcuttur ve PG üretiminde rolü vardır. COX2, iNOS'a benzer ve sitokinle indüklenebilir ve inflamatuvar hücrelerde sentezlenebilir (97, 98).

Servikal olgunlaşmada ve doğum olayında iNOS ve COX2 enzim aktivitelerinin kontrolünde NO ve PG yolları arasında protein ve ürün düzeyinde bir etkileşimin olması muhtemeldir (26, 96, 98).

Tornblom ve ark. (93) gebelikte mRNA düzeyinde iNOS'un azalmaya yöneldiğini halbuki COX2'nin arttığını ve tersine bir ilişkinin olduğunu göstermişlerdir. iNOS'taki azalma ve COX2'deki artış olgunlaşma olayı esnasında kollajenin bozulmasında görev alan MMP8 ve MMP9'un düzenlenmesiyle ilgili olabilir (99). NO'nun MMP8 ve MMP9'un sentez düzeyini düşürdüğü ya da inhibe ettiği düşünülmektedir (26, 100). Bu nedenle iNOS ekspresyonu ya da NO üretimindeki bir azalma, gebeliğin son devrelerinde MMP8 ve MMP9'daki bir artışa izin verilmesi bakımından önemli olabilir. COX2 ekspresyonunda ya da PG üretimindeki artış ise doğumla ilgili olan muhtemelen IL-8 artışı için gerekli olabilir. IL-8 bilindiği gibi MMP8 ve MMP9'u sentezlediği bilinen nötrofilleri cezbeden kemotaktik bir ajandır (101-103).

Diğer taraftan CD45 pozitif lökosit yoğunluğu HSCORE değerlerinin normal gebeliğin 20 ve 21. günlerinde östrus değerlerine göre önemlilik düzeyinde yüksek olması servikal olgunlaşmanın ileri düzeyde olduğu gebeliğin bu son 2 gününde lökositlerin bu olaya, yüksek düzeyde katıldığını gösterir. Bu son yeniden yapılanma fetüsün zarar görmemesi ve iyi bir doğum için de gereklidir. CD45 pozitif hücrelerin PPO. günde de yüksek olması bu hücrelerin lokal dokuların tamir mekanizmalarında da rol alabileceğini göstermesi bakımından önemlidir (17, 104). Nitekim bazı sitokinlerin (IL-8, IL-6) gebeliğin sonuna kadar 4 kat, doğum sonrasında da 10 kat artış gösterdiği rapor edilmiştir. IL-8'in nötrofilleri çektiği, IL-6'nın da bu hücrelerin proliferasyonunu ve aktivasyonunu stimüle ettiği bildirilmiştir. IL-8 epitel, koryodesidua, stromal serbest ve sabit hücrelerden salgılanabilmektedir (19). Diğer taraftan L-NAME verilen gebelerde CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değerleri normal gebe serviksine göre düşük olduğu halde servikal olgunlaşmanın ve doğum olayının gerçekleşmiş olması bu olayda CD45 pozitif hücrelerin dışında başka hücrelerin de görev alabileceğini ifade eder. İnflamatuvar hücrelerin, örneğin makrofajların iNOS'ca zengin olduğu bilinmektedir (15). Bu hücrelerin servikte NO sentezini düzenlemeleri mümkündür. Ancak inflamatuvar hücrelerin doğumdan önce servikse göç edip etmedikleri açık değildir. Bu nedenle sıçanda bazı başka hücrelerinde (örn: fibroblast, mast hücresi, v.b.) doğum olayında servikte NO senteziyle ilgili olması mümkündür (15). Alberts ve ark. (17) iNOS'un erken dönem biyopsilerinin bağ dokusunda iğ şeklindeki hücrelerde, doğum zamanı biyopsilerinde ise hemen hemen sadece mononükleer inflamatuvar hücrelerde baskın olarak sentezlendiğini bildirmişlerdir (17). Bu araştırmacılar iğ şeklindeki hücrelerin iNOS'unun servikal olgunlaşmada, mononükleer inflamatuvar hücrelerin iNOS'unun ise doğum sonrasında servikal bozulmanın lokal tamir mekanizmalarında rol oynayabileceğini rapor etmişlerdir (17).

Özet olarak; bu çalışmanın sonuçlarından NOS ürünü olan NO'nun, bazı araştırmacılar tarafından da ifade edildiği gibi (96), lokal vazodilatasyonu indükleyerek vasküler permeabiliteyi ve lökosit infiltrasyonunu artırarak, belki de proteoglikan sentezinin modülasyonu gibi ESM'in yeniden yapılanmasından sorumlu MMP'leri

ve diğ er mekanizmaları aktive ederek PG'ler (genelde PGE₂) ile birlikte servikal olgunlaşmanın son metabolik yolunu temsil edebileceğı söylenebilir.

Servikal olgunlaşma olayı henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. İnfantı ölüme götüren önemli nedenlerden biri preterm doğumdur. Preterm doğum bütün infant ölümlerinin %75'inden ve uzun dönem nörolojik düzensizliklerin de %50'sinden sorumludur (105). Verilen bu istatistikler prematür doğumların engellenebilmesi için muhtemel yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde servikal olgunlaşmayı doğumu düzenleyen mekanizmaların anlaşılmasının önemini vurgulaması bakımından oldukça ilginçtir (106). Bu nedenle servikal olgunlaşmayla ilgili düzensizliklerin giderilebilmesi için bu alanda daha çok yeni çalışmaya ve bilgiye ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

Sıçan serviksinin olgunlaşmasında iNOS'un önemi ve rolüyle ilgili bu çalışmanın bulgularına bakarak biz;

1. Sıçan serviksinin doğumdan birkaç gün önce yumuşamaya başladığını, kollajen lif düzeni ve uzunluğundaki değişikliklerin serviksin yumuşamasında, bozulmasında ve genişlemesindeki rolünün önemli olduğunu,

2. Normal gebeliğin son 2 gününde iNOS boyanma şiddetinin artmasından ve nitrit/nitrat değerlerinin yükselmiş olmasından;

a. NO'nun olgunlaşma olayına 20 ve 21. günlerde önceki günlere göre daha yüksek düzeyde katıldığını,

b. Bu mediyatörün, genişlemenin ileri artış gösterdiği olgunlaşmanın son kademesinde servikal genişlemeyle de ilgili olduğunu,

3. L-NAME verilen gebe sıçan serviksinde iNOS boyanma şiddetinin ve nitrit/nitrat değerlerinin normale göre düşmüş olmasından;

a. Endojen iNOS enzim aktivitesinin fizyolojik servikal olgunlaşma için önemli olduğunu; keza NO'nun olgunlaşma olayının fizyolojik regülatörü olabileceğini,

b. Gebelik boyunca serviksin olgunlaşmasında yalnız iNOS'un yeterli olmadığını, bu olayda başka mediyatörlerinde görev alabileceğini,

c. Tam olgunlaşmamış servikte olgunlaşmanın sağlanabilmesi için iNOS'un başka mediyatörlerle birlikte uygulanmasının daha etkili olabileceğini,

4. CD45 pozitif hücre yoğunluğu HSCORE değerlerinin;

a. Normal gebeliğin 20 ve 21. günlerinde diğer günlere göre yüksek olmasından CD45 pozitif hücrelerin gebeliğin bu son 2 gününde servikal olgunlaşma olayına yüksek düzeyde katıldığını

b. L-NAME verilen sıçan serviksinde normal gebelere göre düşük olduğu halde doğumun gerçekleşmiş olmasından servikal olgunlaşmada yalnız CD45 pozitif hücrelerin değil bu olayda başka hücrelerin de görev alabileceğini söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Chwalisz, K. and R.E. Garfield, Antiprogesterins in the induction of labor. *Ann N Y Acad Sci*, **1994**. 734: p. 387-413.
2. Chwalisz, K. and R.E. Garfield, Regulation of the uterus and cervix during pregnancy and labor. Role of progesterone and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*, **1997**. 828: p. 238-53.
3. AI., C., Force of Labour. . **1981**.
4. Garfield, R.E., et al., Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod Update*, **1998**. 4(5): p. 673-95.
5. Shi S.Q., B.H.M., Garfield R.E. and Chwalisz K., Local application of an nitric oxide (NO) donor induces cervical ripening. *J. Soc. Gynecol, Invest*, **1996a**. 3.
6. Schlembach, D., et al., Cervical ripening and insufficiency: from biochemical and molecular studies to in vivo clinical examination. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **2009**. 144 Suppl 1: p. S70-6.
7. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **1980**. 288(5789): p. 373-6.
8. Moncada, S. and A. Higgs, The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, **1993**. 329(27): p. 2002-12.
9. Wolf, J.P., et al., Progesterone antagonist (RU 486) for cervical dilation, labor induction, and delivery in monkeys: effectiveness in combination with oxytocin. *Am J Obstet Gynecol*, **1989**. 160(1): p. 45-7.
10. Nathan, C. and Q.W. Xie, Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, **1994**. 78(6): p. 915-8.
11. Ekerhovd, E., et al., Nitric oxide mediated inhibition of contractile activity in the human uterine cervix. *Mol Hum Reprod*, **1998**. 4(9): p. 915-20.
12. Izumi, H., C. Yallampalli, and R.E. Garfield, Gestational changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle. *Am J Obstet Gynecol*, **1993**. 169(5): p. 1327-37.
13. Natuzzi, E.S., et al., Nitric oxide synthase activity in the pregnant uterus decreases at parturition. *Biochem Biophys Res Commun*, **1993**. 194(1): p. 1-8.
14. Sladek, S.M., et al., Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, **1993**. 169(5): p. 1285-91.
15. Buhimschi, I., et al., Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod*, **1996**. 11(8): p. 1755-66.
16. Ali, M., et al., Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod*, **1997**. 3(11): p. 995-1003.

17. Aalberts, M., et al., High iNOS mRNA and protein levels during early third trimester suggest a role for NO in prelabor cervical ripening in the bovine. *Mol Reprod Dev*, **2007**. 74(3): p. 378-85.
18. Chwalisz, K., et al., Cervical ripening in guinea-pigs after a local application of nitric oxide. *Hum Reprod*, **1997**. 12(10): p. 2093-101.
19. Sennstrom, M.B., et al., Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod*, **2000**. 6(4): p. 375-81.
20. Leslie P.G., H.L.J., *Color Textbook of Histology*. **1998**: W. B Saunders Company. 58-70.
21. Ledingham, M.A., et al., Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod*, **2000**. 6(11): p. 1041-8.
22. Alberts J., L., Raff, Roberts, Walter, *Molecular Biology of The Cell*. **2002**, New York: Garland Science 1090-1110.
23. W., F.D., *A Textbook of Histology* **1993**, New York: Chapman & Hall.
24. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, **1991**. 43(2): p. 109-42.
25. Olsson C., K.P., Coexistence of NADPH-diaphorase and vasoactive intestinal polypeptide in the enteric nervous system of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) and the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Cell Tissue Res.*, **1995**. 280: p. 297-305.
26. Nen-Tommiska, M.H.V.I., Nitric oxide in the human uterine cervix: Endogenous ripening factor. Department of Obstetrics and Gynecology, **2008**. 40: p. 45-55.
27. McConalogue, K. and J.B. Furness, Projections of nitric oxide synthesizing neurons in the guinea-pig colon. *Cell Tissue Res*, **1993**. 271(3): p. 545-53.
28. Hokari, R., et al., Nitric oxide modulates T-lymphocyte migration in Peyer's patches and villous submucosa of rat small intestine. *Gastroenterology*, **1998**. 115(3): p. 618-27.
29. Harald H., S.W.a.W.U., NO at work. *Cell* **1994**. 78: p. 919-925.
30. Guembe, L. and A.C. Villaro, Histochemical demonstration of neuronal nitric oxide synthase during development of mouse respiratory tract. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **1999**. 20(2): p. 342-51.
31. Downen, M., et al., Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. *J Neuropathol Exp Neurol*, **1999**. 58(1): p. 12-21.
32. Huang, P.L., et al., Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*, **1993**. 75(7): p. 1273-86.
33. Andrew, P.J. and B. Mayer, Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, **1999**. 43(3): p. 521-31.
34. Riveros-Moreno, V., C. Beddell, and S. Moncada, Nitric oxide synthase. Structural studies using anti-peptide antibodies. *Eur J Biochem*, **1993**. 215(3): p. 801-8.
35. Takahashi, T. and C. Owyang, Regional differences in the nitrergic innervation between the proximal and the distal colon in rats. *Gastroenterology*, **1998**. 115(6): p. 1504-12.
36. Mayer, B., et al., A synthetic peptide corresponding to the putative dihydrofolate reductase domain of nitric oxide synthase inhibits uncoupled NADPH oxidation. *Nitric Oxide*, **1997**. 1(1): p. 50-5.

37. Hope, B.T., et al., Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1991**. 88(7): p. 2811-4.
38. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, **2001**. 357(Pt 3): p. 593-615.
39. Portbury, A.L., et al., Distribution of neurokinin-2 receptors in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res*, **1996**. 286(3): p. 281-92.
40. Marletta, M.A., Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, **1994**. 78(6): p. 927-30.
41. Huber, A., et al., Characterization and splice variants of neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine. *Am J Physiol*, **1998**. 275(5 Pt 1): p. G1146-56.
42. Gonzalez-Hernandez, T., M.A. Perez de la Cruz, and B. Mantolan-Sarmiento, Histochemical and immunohistochemical detection of neurons that produce nitric oxide: effect of different fixative parameters and immunoreactivity against non-neuronal NOS antisera. *J Histochem Cytochem*, **1996**. 44(12): p. 1399-413.
43. F., C.S.V.a.G., A role for spinal nitric oxide in mediating visceral hyperalgesia in the rat. *Gastroenterology*, **1999**. 116: p. 1399-1408.
44. Bhagat, K. and P. Vallance, Nitric oxide 9 years on. *J R Soc Med*, **1996**. 89(12): p. 667-73.
45. P., H., Nitric oxide and peroxynitrite production by NO-donors and inflammatory cells .
. **2000**, University of Tampere.
46. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **1987**. 327(6122): p. 524-6.
47. Nonami, Y., The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jpn Circ J*, **1997**. 61(2): p. 119-32.
48. Shinde, U.A., A.A. Mehta, and R.K. Goyal, Nitric oxide: a molecule of the millennium. *Indian J Exp Biol*, **2000**. 38(3): p. 201-10.
49. Boucher, J.L., C. Moali, and J.P. Tenu, Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci*, **1999**. 55(8-9): p. 1015-28.
50. Govers, R. and T.J. Rabelink, Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2001**. 280(2): p. F193-206.
51. J., P., Signalling pathways of the nitric oxide *Kidney Blood Press Res.*, **2000**. 23: p. 159-161.
52. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1991**. 88(11): p. 4651-5.
53. Bredt, D.S., et al., Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, **1991**. 351(6329): p. 714-8.
54. Kubes, P. and D.N. Granger, Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol*, **1992**. 262(2 Pt 2): p. H611-5.
55. Furfine, E.S., et al., Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J Biol Chem*, **1994**. 269(43): p. 26677-83.

56. Stuehr, D.J., Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1997**. 37: p. 339-59.
57. Marin, J. and M.A. Rodriguez-Martinez, Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther*, **1997**. 75(2): p. 111-34.
58. Mateo A.O., d.A.M.A., Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. *Pharmacol Res.*, **2000**. 42: p. 421-427.
59. Ignarro, L.J., Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep*, **1999**. 19(2): p. 51-71.
60. Martin, E., et al., Cellular signaling with nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *Semin Perinatol*, **2000**. 24(1): p. 2-6.
61. Lloyd-Jones, D.M. and K.D. Bloch, The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med*, **1996**. 47: p. 365-75.
62. Carvajal, J.A., et al., Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*, **2000**. 184(3): p. 409-20.
63. Schindler, H. and C. Bogdan, NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Int Immunopharmacol*, **2001**. 1(8): p. 1443-55.
64. Perez-Vizcaino, F., et al., Vasodilator effects of sodium nitroprusside, levcromakalim and their combination in isolated rat aorta. *Br J Pharmacol*, **1999**. 128(7): p. 1419-26.
65. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **1996**. 23(12): p. 1082-90.
66. Ahmmed, G.U., et al., Nitric oxide modulates cardiac Na(+) channel via protein kinase A and protein kinase G. *Circ Res*, **2001**. 89(11): p. 1005-13.
67. Pinilla, L., M. Tena-Sempere, and E. Aguilar, Nitric oxide stimulates growth hormone secretion in vitro through a calcium- and cyclic guanosine monophosphate-independent mechanism. *Horm Res*, **1999**. 51(5): p. 242-7.
68. Battinelli, E., et al., Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**. 98(25): p. 14458-63.
69. Klein, C., Nitric oxide and the other cyclic nucleotide. *Cell Signal*, **2002**. 14(6): p. 493-8.
70. Silveri N.G., M.M., Portale G., Carbone I., Nitric Oxide A general review about the different roles of this innocent radical. *Minerva Med*, **2001**. 92: p. 167-171.
71. Chwalisz, K. and R.E. Garfield, Role of nitric oxide in the uterus and cervix: implications for the management of labor. *J Perinat Med*, **1998**. 26(6): p. 448-57.
72. Toth, M., J. Rehnstrom, and A.R. Fuchs, Prostaglandins E and F in cervical mucus of pregnant women. *Am J Perinatol*, **1989**. 6(2): p. 142-4.
73. Sladek S.M., M.R.R., Conrad K.P., Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* **1997**. 272.
74. Ramsay, B., et al., A nitric oxide donor improves uterine artery diastolic blood flow in normal early pregnancy and in women at high risk of pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest*, **1994**. 24(1): p. 76-8.
75. Garfield, R.E.a.Y., C., Control of myometrial contractility and labour. **1993**: p. 1-29.

76. Read, C.P., et al., Cervical remodeling during pregnancy and parturition: molecular characterization of the softening phase in mice. *Reproduction*, **2007**. 134(2): p. 327-40.
77. Leppert, P.C., Cervical softening, effacement and dilatation: a complex biochemical cascade. *J. Maternal Fetal Med.*, **1992**. 1: p. 213-223.
78. Rechberger, T., S.R. Abramson, and J.F. Woessner, Jr., Onapristone and prostaglandin E2 induction of delivery in the rat in late pregnancy: a model for the analysis of cervical softening. *Am J Obstet Gynecol*, **1996**. 175(3 Pt 1): p. 719-23.
79. Kelly, R.W., Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. *Endocr Rev*, **1994**. 15(5): p. 684-706.
80. Salvemini, D., et al., Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1993**. 90(15): p. 7240-4.
81. Salvemini, D., Nitric Oxide and cyclooxygenases. . **1997**: p. 60-73.
82. Ito, A., et al., The role of leukocyte factors on uterine cervical ripening and dilation. *Biol Reprod*, **1987**. 37(3): p. 511-7.
83. Laskin, D.L. and K.J. Pendino, Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1995**. 35: p. 655-77.
84. Aslan, M., et al., Corneal protein nitration in experimental uveitis. *Exp Biol Med (Maywood)*, **2007**. 232(10): p. 1308-13.
85. Aslan, M. and D. Canatan, Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients. *Exp Hematol*, **2008**. 36(11): p. 1535-44.
86. Shi, L., et al., Changes in cervical resistance and collagen fluorescence during gestation in rats. *J Perinat Med*, **1999**. 27(3): p. 188-94.
87. Ito, A., et al., The change in solubility of type I collagen in human uterine cervix in pregnancy at term. *Biochem Med*, **1979**. 21(3): p. 262-70.
88. Leppert, P.C. and S.Y. Yu, Apoptosis in the cervix of pregnant rats in association with cervical softening. *Gynecol Obstet Invest*, **1994**. 37(3): p. 150-4.
89. Marx, S.G., Effects of Progesterone on iNOS, COX-2 and Collagen Expression in the Cervix. Department of Obstetrics and Gynecology, **2006**. 54: p. 623-639.
90. Yu, S.Y., et al., Collagen changes in rat cervix in pregnancy--polarized light microscopic and electron microscopic studies. *Proc Soc Exp Biol Med*, **1995**. 209(4): p. 360-8.
91. Shi, L., et al., Studies of cervical ripening in pregnant rats: effects of various treatments. *Mol Hum Reprod*, **2000**. 6(4): p. 382-9.
92. C., F., Expression of iNOS and COX-2 in guinea pig cervixes during gestation. *J. Soc Gynecol Investing*, **2001**. 8: p. 770.
93. Tornblom, S.A., et al., mRNA expression and localization of bNOS, eNOS and iNOS in human cervix at preterm and term labour. *Reprod Biol Endocrinol*, **2005**. 3: p. 33.
94. Harkness, M.L. and R.D. Harkness, Changes in the physical properties of the uterine cervix of the rat during pregnancy. *J Physiol*, **1959**. 148: p. 524-47.
95. SQ., S., Genetic variability in a preeclampsia-like rat model. *Am J Obstet Gynecol*, **2000a**. 182: p. S88.

96. Ekerhovd, E., et al., Nitric oxide induced cervical ripening in the human: Involvement of cyclic guanosine monophosphate, prostaglandin F(2 alpha), and prostaglandin E(2). *Am J Obstet Gynecol*, **2002**. 186(4): p. 745-50.
97. Xie, W.L., et al., Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1991**. 88(7): p. 2692-6.
98. Stjernholm-Vladic, Y., et al., Factors involved in the inflammatory events of cervical ripening in humans. *Reprod Biol Endocrinol*, **2004**. 2: p. 74.
99. Winkler, M., et al., Parturition at term: parallel increases in interleukin-8 and proteinase concentrations and neutrophil count in the lower uterine segment. *Hum Reprod*, **1999**. 14(4): p. 1096-100.
100. Upchurch, G.R., Jr., et al., Nitric oxide inhibition increases matrix metalloproteinase-9 expression by rat aortic smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Surg*, **2001**. 34(1): p. 76-83.
101. Elliott, C.L., et al., Nuclear factor-kappa B is essential for up-regulation of interleukin-8 expression in human amnion and cervical epithelial cells. *Mol Hum Reprod*, **2001**. 7(8): p. 787-90.
102. Watari, M., et al., Lipopolysaccharide induces interleukin-8 production by human cervical smooth muscle cells. *J Soc Gynecol Investig*, **2003**. 10(2): p. 110-7.
103. Sahlin, L., Impaired leukocyte influx in cervix of postterm women not responding to prostaglandin priming. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2008**.
104. Timmons, B.C., A.M. Fairhurst, and M.S. Mahendroo, Temporal changes in myeloid cells in the cervix during pregnancy and parturition. *J Immunol*, **2009**. 182(5): p. 2700-7.
105. Goldenberg, R.L. and D.J. Rouse, Prevention of premature birth. *N Engl J Med*, **1998**. 339(5): p. 313-20.
106. Iams, J.D., Current status of home uterine activity monitoring. *Clin Obstet Gynecol*, **1995**. 38(4): p. 771-9.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İskenderun’da doğdu. 1994 yılında Namık Kemal İlkokulu’ndan, 1997 yılında Beş Temmuz Ortaokulu’ndan ve 2001 yılında İskenderun Süper Lisesi’nden mezun oldu. 2006 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirerek lisans eğitimini tamamladı. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne bağlı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programına başladı.