

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNEKLERDE SPONTAN OVİDUKT KASILIMLARI ÜZERİNE
NİTRİK OKSİTİN ETKİSİNİN *İN VİTRO* OLARAK
BELİRLENMESİ**

Oktay YILMAZ

**DOĞUM ve JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet UÇAR

**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 07.VF.04
Proje numarası ile desteklenmiştir**

Tez No: 2009-006

2009-AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Doktora programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunması Tarihi: 29.12.2009



Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ
ÜYE



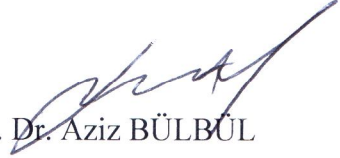
Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ
ÜYE



Prof. Dr. Mehmet UÇAR
ÜYE



Doç. Dr. H. Ahmet ÇELİK
ÜYE



Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL
ÜYE

Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Doktora programı öğrencisi Oktay YILMAZ' ın
'İneklerde Spontan Ovidukt Kasılımları Üzerine Nitrik Oksitin Etkisinin *İn Vitro* Olarak
Belirlenmesi' başlıklı tezi 30.12.2009 günü saat 09:30' da Lisansüstü Eğitim-
Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul
edilmiştir.



Prof. Dr. Zehra BOZKURT
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Sütçü ve damızlık inek yetiştirmelerinde döl verimi yönünden yılda bir yavru elde edebilmek, bu işletmelerin devamlılığını sağlayan en önemli ekonomik girdilerden biridir. Bu süreç, hayvanların gebe bırakılmasıyla başlamakta ve sağlıklı bir şekilde yavruların doğmasına kadar devam etmektedir. Diğer taraftan karşılaşılan infertilite problemleri, bu işletmelerin ekonomik açıdan sürdürülebilirliğini etkileyen temel etmenlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. İnfertilite problemlerinin ortaya çıkmasında pek çok faktör etkili olabilmektedir. Öncelikli olarak en kısa sürede bu problemlerin çözülmesi ve hayvanların tekrar gebe bırakılmaları gerekmektedir. Fertilizasyonun şekillendiği organ olan ovidukt fizyolojik veya patolojik koşullara bağlı olarak gebeliğin oluşmasında ve dolayısıyla döl verimi parametrelerinin değişmesinde etkili olabilmektedir.

Fertilizasyon için optimal ortamı sağlayan oviduktun fonksiyonlarının düzenlenmesinde pek çok faktörün etkili olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kalp damar sistemi üzerine etkileri belirlenen nitrik oksitin, üreme fonksiyonları üzerinde de etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur. Diğer taraftan nitrik oksitin ovidukt fonksiyonlarının düzenlenmesindeki etkinliği hakkındaki bilgiler yeterli seviyede olmamakla birlikte yapılacak araştırmalarla bu konunun daha da fazla aydınlatılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın gerçekleşmesi sırasında öneri ve kritikleri ile katkıda bulunan tez izleme komitesi üyeleri Doç. Dr. H. Ahmet Çelik' e ve Doç. Dr. Aziz Bülbül' e şükranlarımı sunarım. Ayrıca izole organ banyosunun çalışma prensibini öğreten ve tezimin istatistiksel değerlendirmelerini yapan Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Aziz Bülbül' e tekrar teşekkür etmeyi borç bilirim. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi ile ilgili tecrübelerini aktaran Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Alper Sevimli' ye teşekkürlerimi sunarım. Polonya' da bulunan Warmia Mazury Üniversitesi Veteriner Fakültesinde yürüttüğüm çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu ilgiden dolayı Rektör Yardımcısı Prof. Dr. Andrzej Koncicki' ye ve değerli ailesine, tez çalışmam için kıymetli bilim insanlarıyla bir araya gelmemi sağlayan Veteriner Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Sławomir Zduńczyk ve Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Tomasz Edward Janowski' ye içtenlikle teşekkür ederim. İzole organ banyosu kullanımındaki tecrübelerini paylaştıran ve gerekli

kimyasalları temin ederek deneysel çalışma olanağı sağlayan Dekan yardımcısı ve Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Jerzy Jaroszewski' ye, çalışma materyalimi toplamama yardım eden Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Włodzimierz Markiewicz' e ve laboratuvar çalışmalarında göstermiş oldukları yardımlardan dolayı Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalının tüm öğretim elemanlarına saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. İmmünohistokimyasal boyama, Western blot ve RT-PCR analizleri için laboratuvar olanaklarını sağlayan Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mirosław Łakomy' e, bu analizler için gerekli finansal desteği sağlayan ve immünohistokimyasal boyama sonuçlarını değerlendirdiğimiz Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Jarosław Całka' ya ve misafirperverliği için kıymetli ailesine, konfokal mikroskop kullanımında teknik bilgileri paylaşan doktorant Michał Załęcki' ye, RT-PCR ve Western blot analizlerini değerlendirdiğimiz Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Rafał Bukowski' ye ve Doç. Dr. Krzysztof Waşowicz' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tüm çalışmalarım boyunca göstermiş olduğu sonsuz sabırdan dolayı değerli eşim Ebru Yılmaz' a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Önsöz	III
İçindekiler	V
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	VII
Şekiller Dizini	X
Çizelgeler Dizini	XII
ÖZET	XIII
SUMMARY	XV
1. GİRİŞ	1
1.1. Ovidukt	2
1.2. Nitrik Oksit	5
1.2.1. Nitrik Oksitin Oluşumu	5
1.2.2. Nitrik Oksit Etkinliğinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	7
1.2.2.1. İzole Organ ve Doku Banyosu Sistemleri	8
1.2.2.1.1. İzole Organ ve Doku Banyosu Tipleri	8
1.2.2.2. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Western Blot Yöntemi	9
1.3. Nitrik Oksitin Etkileri	10
1.4. Nitrik Oksitin Dişi Reprodüktif Sistem Üzerine Etkileri	11
1.4.1. Ovaryum	11
1.4.1.1. Folliküler Gelişim ve Ovulasyon	11
1.4.1.2. Luteal Yapı	12
1.4.2. Uterus	12
1.4.3. Serviks ve Vagina	13
1.4.4. Seksüel Davranış	13
1.4.5. Ovidukt	14
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Gereç	16
2.2. Yöntem	16
2.2.1. Hayvanların Seçimi ve Seksüel Siklusa Göre Gruplandırılması	16
2.2.2. Kan Progesteron Düzeyinin Belirlenmesi	18
2.2.3. Kan Nitrik Oksit Düzeyinin Belirlenmesi	18

2.2.4. Oviduktların Hazırlanması ve Değerlendirilmesi	20
2.2.4.1. İzole Düz Kas Şeritlerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi	20
2.2.4.2. Ovidukt Dokusunda İmmünohistokimyasal Boyama, Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Western Blot Yöntemleri ile Nitrik Oksit Sentaz Enzimlerinin Varlığının Belirlenmesi	22
2.2.4.2.1. İmmünohistokimyasal Boyama için Doku Örneklerinin Tespit Edilmesi ve Değerlendirilmesi	22
2.2.4.2.2. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Western Blot Yöntemleri için Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi	24
2.2.5. İstatistiksel Değerlendirme	27
3. BULGULAR	28
3.1. Hayvanların Kan Progesteron (P4) Düzeyleri	28
3.2. Hayvanların Kan Nitrik Oksit Düzeyleri	28
3.3. Oviduktta L-arjinin Uygulaması Sonrasında Oluşan İzometrik Kasılım Değerleri (%)	28
3.4. Oviduktta Sodyum Nitro Prusid (SNP) Uygulaması Sonrasında Oluşan İzometrik Kasılım Değerleri (%)	37
3.5. Ovidukt Dokusunda Nitrik Oksit Sentaz Enzimlerinin İmmünohistokimyasal Olarak Dağılımları	43
3.6. Ovidukt Dokusunda Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile Belirlenen Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri	56
3.7. Ovidukt Dokusunda Western Blot Yöntemi ile Belirlenen Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri	57
4. TARTIŞMA	58
5. SONUÇ	70
6. KAYNAKLAR	71

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

ATP	Adenozin trifosfat
BH ₄	Tetrahidrobiopterin
bp	base pair
BSA	Sığır serum albumini
Ca ⁺²	Kalsiyum
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CL	Korpus luteum
CO ₂	Karbondioksit
cGMP	Siklik guanozin 3'-5' monofosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
E2	Östrojen
ECLIA	Elektrokemilüminesans immüno assay
ET-1	Endotelin-1
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FMN	Flavin adenin mononükleotit
iCa	İyonize kalsiyum
ir	İmmunreaktivite
GTP	Guananozin trifosfat
P4	Progesteron
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF ₂ α	Prostaglandin F ₂ Alfa
KS	Krebs solusyonu
kDa	Kilo dalton
L-NAME	<i>N</i> -Nitro-L-arjinin metil ester
L-NNA	<i>N</i> -Monometil-L-arjinin
L-NOARG	L- <i>N</i> ^G -nitro arjinin
L-NMMA	<i>N</i> 5-[imino(methylamino)methyl]-L-ornithine, monoacetate
LPS	Lipopolisakkarid
MB	Metilen mavisi
NADPH	Nikotinamin adenin dinükleotit fosfat
NADPH-d	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat diaforaz

VIII

NaN ₃	Sodyum azid
NEDD	<i>N</i> -(1-naphthyl)ethylenediamin
NO	Nitrik oksit
NO ₂ -Arg	<i>N</i> ^G -nitro-L-arjinin
NOS	Nitrik oksit sentaz
cNOS	Yapısal nitrik oksit sentaz
eNOS	Endoteliyal nitrik oksit sentaz
bNOS	Beyin nitrik oksit sentaz
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OH-L-arg	<i>N</i> ^G -hidroksil-L-arjinin
O ₂	Oksijen
PKG	Protein kinaz G
PBS	Fosfat buffer saline
PBG	Fosfat buffer gliserol
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
sGC	Çözünebilir guanilat siklaz
spermin NONOate	(<i>Z</i>)-1-[N-[3-aminopropyl]-N-[4-(3-aminopropylammonio)butyl]-amino]diazen-1-ium-1,2-diolate
SNAP	<i>N</i> -(acetyloxy)-3-nitrosothiovaline
SNP	Sodyum nitro prusid
TBS	TRIS buffered saline
α	Alfa
β	Beta
Mg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mg	Miligram

nM	Nanomolar
%	Yüzde
g	Gram
nm	Nanomol
°C	Santigrat derece
μM	Mikromolar
M	Molar
l	Litre

Şekiller Dizini

Şekil 1.1: Oviduktun bölümleri ve ovumun ovidukt kanalı boyunca silyumlar aracılığıyla hareketi	3
Şekil 1.2: Farklı nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri aracılığıyla L-arjininden nitrik oksit sentezi	5
Şekil 1.3: Düz kas dokusunda nitrik oksite bağlı gerçekleşen gevşemenin şematize gösterimi	7
Şekil 2.1: Sodyum nitrat konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi	19
Şekil 3.1 : Gruplarda istmusun longitudinal düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arjinin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M), L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) ve MB (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri	31
Şekil 3.2 : Gruplarda istmusun sirküler düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arjinin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M), L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) ve MB (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri	32
Şekil 3.3: Gruplarda ampullanın longitudinal düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arjinin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M), L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) ve MB (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri	35
Şekil 3.4: Gruplarda ampullanın sirküler düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arjinin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M), L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) ve MB (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri	36
Şekil 3.5: Gruplarda istmusun longitudinal düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri	38
Şekil 3.6: Gruplarda istmusun sirküler düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri	39
Şekil 3.7: Gruplarda ampullanın longitudinal düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri	40

Şekil 3.8: Gruplarda ampullanın sirküler düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri	41
Şekil 3.9: İstmusun lamina propria ve muskuler katmanları ile seroza katmanındaki kan damarları endotelinde eNOS-ir	43
Şekil 3.10: Ampullanın seroza ve muskuler katmanları ile lamina propriyasında bulunan kan damarları endotelinde eNOS-ir	43
Şekil 3.11: Gruplarda istmusun epitel hücrelerinin lumene bakan yüzünde çizgi tarzında lokalize olmuş eNOS-ir	45
Şekil 3.12: Gruplarda ampullanın epitel hücrelerinin lumene bakan yüzünde çizgi tarzında lokalize olmuş eNOS-ir	46
Şekil 3.13: Endoteliyal NOS için primer antiserum çıkarılması ve non-immun serumun yer değiştirilmesiyle yapılan kontrol boyamaları	47
Şekil 3.14: Aynı sahada bulunan epitel tabakada primer antiserum ve sadece sekonder antiserum ile boyama sonrası immunfloresans yanıt veren nokta şeklindeki yapılar	47
Şekil 3.15: Gruplarda istmusun epitel hücrelerinin lumene bakan yüzünden lamina propriaya kadar uzanan nNOS-ir	49
Şekil 3.16: Gruplarda ampullanın epitel hücrelerinin lumene bakan yüzünden lamina propriaya kadar uzanan nNOS-ir	50
Şekil 3.17: İstmusta metöstrüs grubunda serozada, erken diöstrüs grubunda muskuler katmanda ve lamina propriada, geç diöstrüs grubunda muskuler katmanda, folliküler evre grubunda lamina propriada ve serozada kan damarları çevresinde sinir fibrilleri	52
Şekil 3.18: Ampullada metöstrüs grubunda muskuler katmanda, erken diöstrüs grubunda serozada, folliküler evre grubunda lamina propriada ve seroza katmanında sinir fibrilleri	54
Şekil 3.19: Nöronal NOS için primer antiserum çıkarılması ve non-immun serumun yer değiştirilmesiyle yapılan kontrol boyamaları	55
Şekil 3.20: Gruplarda istmus ve ampullanın eNOS, nNOS ve iNOS mRNA ekspresyonlarının RT-PCR bulgusu	56
Şekil 3.21: Gruplarda istmus ve ampullanın eNOS, nNOS ve iNOS proteinlerine ait bantların Western Blot bulgusu	57

Çizelgeler Dizini

Çizelge 2.1: Luteal yapının karakterine göre seksüel siklus dönemlerinin belirlenmesi	17
Çizelge 2.2: Sodyum nitrat için okunan absorbans değerler	19
Çizelge 2.3: İsthmus ve ampullanın longitudinal ve sirküler kas şeritlerine uygulanan deney protokolü	22
Çizelge 2.4: Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan primerlerin sekansları, büyüklükleri ve bağlanma sıcaklıkları	26
Çizelge 3.1: Hayvanların gruplara göre serum progesteron düzeyleri	28
Çizelge 3.2: Hayvanların gruplara göre serum nitrik oksit düzeyleri	28
Çizelge 3.3: Gruplara göre istmus ve ampullanın longitudinal ve sirküler kas dokularında logaritmik olarak artan dozlarda uygulanan L-arjinin ve SNP ile L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) ve MB (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) uygulamalarının kasılım şiddetinde oluşturdukları değişimler	42
Çizelge 3.4: Tüm gruplarda istmus ve ampullanın epitel tabakasında izlenen eNOS-ir skorları	44
Çizelge 3.5: Tüm gruplarda istmus ve ampullanın epitelyum tabakasında izlenen nNOS-ir skorları	48
Çizelge 3.6: Gruplarda istmusta pozitif nNOS-ir gösteren sinir fibrillerinin buldukları yerlere göre görülme sıklıkları	51
Çizelge 3.7: Gruplarda ampullada pozitif nNOS-ir gösteren sinir fibrillerinin buldukları yerlere göre görülme sıklıkları	53

ÖZET

İneklerde Spontan Ovidukt Kasılımları Üzerine Nitrik Oksitin Etkisinin *İn Vitro* Olarak Belirlenmesi

Bu çalışmada, östrüs siklusunun farklı evrelerindeki ineklerde, ovidukt'un spontan kasılımları üzerine nitrik oksit (NO)' in etkisinin *in vitro* olarak belirlenmesi ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin ekspresyon modellerinin ortaya konulması amaçlandı.

Özel mezbahalardan elde edilen 64 Holstein ineğin 88 oviduktu değerlendirildi. Hayvanlar seksüel sikluslarına göre metöstrüs, erken diöstrüs, geç diöstrüs ve folliküler evre olmak üzere 4 gruba ayrılarak progesteron (P4) ve NO düzeylerinin belirlenmesi için kanları alındı. İzole organ banyosu çalışmaları için 40 ineğe ait luteal yapı bulunan ovaryum tarafındaki oviduktun istmus ve ampulla kısımlarından longitudinal ve sirküler düz kas şeritleri hazırlandı. Dokularda endojen NO etkinliğini belirlemek amacıyla L-arjinin, Nitro-L-arjinin-metil-ester (L-NAME) + L-arjinin ve metilen mavisi (MB) + L-arjinin uygulanırken, eksojen NO etkinliğini belirlemek için sodyum nitro prusid (SNP) verildi. İmmünohistokimyasal boyama, RT-PCR ve Western blot yöntemleriyle 24 ineğe ait oviduktun istmus ve ampulla kısımları değerlendirilirken, Western blot analizinde bu hayvanların her iki oviduktu da kullanılarak NOS izoformlarının ekspresyonlarına bakıldı.

L-arjininin istmusun longitudinal düz kas dokusunda geç diöstrüs ve folliküler evrede, sirküler düz kasta erken diöstrüste kasılım şiddetini değiştirmediği, diğer gruplarda arttırdiği gözlemlendi. Ampullanın longitudinal düz kasında geç diöstrüs, sirküler düz kasında ise geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım şiddetini değiştirmediği ancak diğer gruplarda arttırdiği belirlendi.

İstmus ve ampullanın longitudinal ve sirküler düz kaslarına metöstrüs, geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında L-NAME sonrası uygulanan L-arjininin, kasılım şiddetini değiştirmediği veya arttırdiği, erken diöstrüste longitudinal düz kasta azalttığı, sirkülerde ise değiştirmediği izlendi. Bu dokularda MB sonrası uygulanan L-

arjininin erken diöstrüs, geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım şiddetini değiştirmediği veya azalttığı, metöstrüste değiştirmediği veya arttırdığı gözlendi.

SNP' in istmusun longitudinal düz kas dokusunda metöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım şiddetini azalttığı, erken diöstrüste fark oluşturmadığı ve geç diöstrüs grubunda arttırdığı görüldü. İstmusun sirküler düz kasında metöstrüs, erken diöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım şiddetini azalttığı, geç diöstrüste fark oluşturmadığı izlendi. Ampullanın longitudinal ve sirküler düz kaslarında metöstrüs ve folliküler evre gruplarında azalma izlenirken, erken ve geç diöstrüs gruplarında SNP' nin etkili olmadığı görüldü.

İmmünohistokimyasal olarak tüm gruplarda istmus ve ampulladaki endotelial NOS (eNOS) ekspresyonu seroza, kas katmanı ve lamina propriadaki kan damarları endotelinde ve epitelyumda gözlendi. Nöronal NOS (nNOS)' un epitel hücreler ile seroza, muskuler katman ve lamina propriada bulunan sinir fibrillerinde pozitif boyama gösterdiği belirlendi. Epitel tabakada eNOS' un istmus ve ampullada metöstrüs grubunda şiddetli, folliküler evrede orta ve diğer gruplarda zayıf reaksiyon, nNOS' un metöstrüs ve folliküler evre gruplarında istmusta şiddetli, ampullada orta derece reaksiyon verdiği gözlendi. Sinir fibrilleri sıklıkla metöstrüs ve folliküler evre gruplarında pozitif boyama gösterdi. RT-PCR analizinde ise bütün gruplarda eNOS, nNOS ve iNOS izoformları belirlendi. Western Blot yönteminde nNOS için herhangi bir bulguya rastlanılmazken, eNOS ve iNOS proteinlerinin ipsilateral ve kontralateral olarak varlığı gözlendi.

Sonuç olarak, ineklerde spontan ovidukt kasılımları üzerine NO' nun *in vitro* olarak bir etkisinin olmadığı, bunun nedeninin NOS enzim etkinliğinden kaynaklanmadığı, aynı zamanda hormonal durumun NOS enzim etkinliğini değiştirebileceği, NOS / NO sisteminin oviduktun kasılım mekanizmasında değil sekretörük ve siliar aktivitelere rol oynayabileceği kanısına varıldı.

Anahtar sözcükler: İnek, nitrik oksit, ovidukt, organ banyosu, nitrik oksit sentaz

SUMMARY

***In Vitro* Determination of The Effect of Nitric Oxide on Spontaneous Oviduct Contractility in Cows**

The objective of this study was to determine the effect of nitric oxide (NO) on spontaneous contractility of oviduct of cows in different sexual cycle *in vitro* and to reveal the expression models of nitric oxide synthase enzymes.

The oviducts (n:88) of 64 Holstein cows obtained from private slaughterhouse were evaluated. Animals were separated into four groups as metestrous, early diestrous, late diestrous and follicular phase, then blood samples were taken to define progesterone (P4) and NO concentration.

Longitudinal and circular isolated strips of isthmus and ampulla of oviducts of cows (n:40) placing on the same side of ovary with luteal structure were prepared for isolated organ bath experiments. L-arginine, Nitro-L-arginine-metil-ester (L-NAME) + L-arginine and methylene blue (MB) + L-arginine were applied to the tissues to determine endogenous NO effect and sodium nitro prusside (SNP) was used to determine exogenous NO effect. The expression of NOS isoforms in isthmus and ampulla parts of oviducts of 24 cows were evaluated for immunohistochemical staining, RT-PCR and Western blotting, but also both oviducts of these cows were used for Western blotting.

In isthmus, it was observed that L-arginine did not alter contractile tension in longitudinal smooth muscle tissues in late diestrous and follicular phase groups and in early diestrous in circular muscles, but raised in other groups. In ampulla, it was determined that contractile tension was not changed not only in longitudinal strips in late diestrous but also in circular smooth muscle tissues in late diestrous and follicular phase. In other groups, the contractile tension was increased.

By using L-arginine applied after L-NAME, it was seen that contractile tension was not changed or increased in metestrous, late diestrous and follicular phase in longitudinal and circular smooth muscle tissues both in isthmus and ampulla. However, it was decreased in early diestrous in longitudinal strips but not changed in circular smooth muscle tissues. In addition, by using L-arginine applied after

methylene blue (MB), the contractile tension was not changed or decreased in early, late diestrous and follicular phase, was not changed or increased in metestrous.

In longitudinal smooth muscle tissues of isthmus, it was determined that contractile tension was decreased in metestrous and follicular phase groups, but was not changed in early diestrous and increased in late diestrous groups, by using sodium nitro prusside (SNP). Beside this, in circular smooth muscle tissues, contractile tension was decreased in metestrous, early diestrous and follicular phase groups and was not changed in late diestrous by SNP. In longitudinal and circular smooth muscle tissues of ampulla, SNP was not effective on contractile tension in early and late diestrous groups while the tension was decreased in metestrous and follicular phase groups by SNP.

Immunohistochemically, in all groups endothelial NOS (eNOS) expression in isthmus and ampulla was observed in endothelium on blood vessels in serosa, muscular layer and lamina propria and epithelium. Neuronal NOS (nNOS) had a positive staining in epithelial cells and nerve fibres in serosa, muscular layer and lamina propria. In epithelial layer of isthmus and ampulla, it was seen that eNOS reaction was strong in metestrous, moderate in follicular phase and weak in other groups, while nNOS reaction was strong in isthmus and moderate in ampulla in metestrous and follicular phase groups. Positive staining of nerve fibres was observed mostly in metestrous and follicular phase groups. In all groups eNOS, nNOS and iNOS isoforms were detected by RT-PCR. In Western blotting, eNOS and iNOS proteins were evident in ipsi-contra lateral oviduct whereas nNOS was undetectable.

In conclusion, it was suggested that NO had no effect on spontaneous oviduct contractility in cows *in vitro*, this effectiveness was not due to NOS enzyme activity however, hormonal status could change the NOS enzyme activity and NOS / NO pathway could play a role in secretory and ciliary functions, but not in contractility in oviduct.

Key words: Cow, nitric oxide, oviduct, organ bath, nitric oxide synthase

1. GİRİŞ

İnek yetiştiriciliğinde reproduktif verimlilik, işletmelerin devamlılığını sağlayan önemli kriterlerden biridir. Günümüze kadar süregelen bilimsel çalışmalar sayesinde verimliliğin artırılması yönünde pek çok gelişme sağlanmıştır. Diğer taraftan reproduktif biyoteknoloji alanındaki çalışmalar halen yürütülmektedir. Bu çalışmalar, ovum ve spermatozoanın sağlıklı bir zigot oluşturma süreci üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Bu süreci spermatozoanın sahip olduğu hareketlilik, ovum ve en önemlisi fertilizasyonun gerçekleştiği organ olan ovidukt etkilemektedir. Diğer taraftan özellikle ineklerde % 4.84 insidansta seyreden ovidukt lezyonlarının (1) infertiliteye sebep olan etmenlerden biri olması nedeniyle de bu organ dışı reproduksiyonunda önemli bir yere sahiptir.

Oviduktun düz kas kontraktilesi ile epitel hücrelerinin siliar ve sekretörük aktiviteleri bu organın en önemli fonksiyonları arasındadır. Ovaryum kökenli hormonların (2), prostaglandinlerin (3), sitokinlerin (4), endotelial büyüme faktörlerinin (5) ve nitrik oksit (NO)' in (6-8) ovidukt fonksiyonlarının düzenlenmesinde etkili olabildiği aktarılmaktadır.

Nitrik oksit, atmosferde bulunan azot (N) ve oksijen (O) gazlarının bileşimiyle oluşan azot monoksit yapısında bir gazdır (9). Bu gaz, kısa ömürlü ve yüksek oranda reaktif serbest bir radikal olup, difüzyon yolu ile membranlardan geçebilen bir moleküldür (10). Nitrik oksit etkisini, oluştuğu hücrenin yakınındaki veya daha uzağındaki hedef hücrelerde göstermektedir. Lipofilik özelliğinden dolayı özel bir taşıyıcıya gereksinim duymamakta ve dolayısıyla damar endotelinden salındığı zaman hücre zarından kolaylıkla geçerek damar düz kas hücrelerinde gevşeme yapabilmektedir (11).

Reproduktif süreçte NO' nun oosit maturasyonu, ovulasyon, implantasyon, gebeliğin devamı ve doğum gibi pek çok fizyolojik olayda etkili olduğu kabul edilmektedir (12-15).

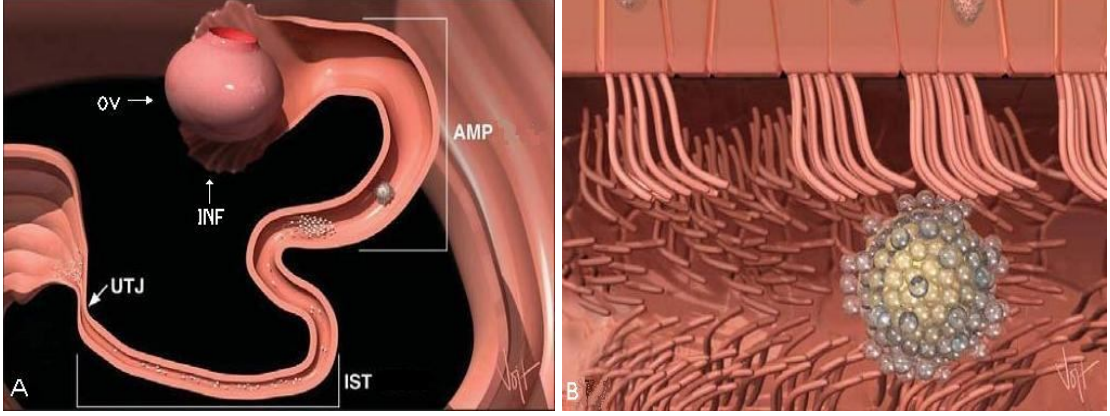
1.2. Ovidukt

Ovidukt, fertilizasyon sırasında optimal ortam koşullarını sağlayan, gametlerin ve erken dönemdeki zigotun uterusu doğru transportunun geręekleřtięi genital organ olması nedeniyle reproduktif açıdan önem taşımaktadır (16). Salpıfinks, Fallopi tüpü, tuba uterina ve yumurta kanalı olarak da adlandırılan ovidukt, Müller kanallarının ön kısmı tarafından şekillendirilen, ligamentum latum uteri üzerinde seyreden, ince duvarlı ve küçük çaplı bir çift borucuk şeklinde ovaryumlarla kornu uteriler arasında yer alan genital organlardan biridir. Ovidukt, ineklerde belirli bir sınır göstermeksizin kornu uterilerin uç kısımlarıyla birleşmektedir (17).

İfundibulum, ampulla ve istmus olarak üç kısma ayrılan ovidukt, içten dışa doğru tunika mukoza, tunika muskularis ve peritonun iç yaprağından köken alan tunika seroza tabakalarından oluşmaktadır (17, 18).

Tunika mukoza oviduktun iç yüzeyini kaplamakta ve ovidukt lumenine doğru pili adı verilen uzantılar oluşturmaktadır. Uzun olan mukoza çıkıntıları fimbria tuba üzerinde bulunmakta ve ovaryum yüzeyine doğru uzanmaktadır (şekil 1.1). Ucu huni şeklinde genişlemiş infundibulumun hareketli olan bu uçları sayesinde oositin alınması ve ovidukta ilerlemesinin sağlandığı aktarılmaktadır (17).

Mukoza tabakası lamina epiteliyalis ve lamina propria katlarından oluşmaktadır. Lamina epiteliyalis tek katlı prizmatik epitel hücrelerinden meydana gelirken lamina propria ise gevşek bağdokudan oluşmaktadır. Bir kısmı kinosilyumlu olan epitel hücrelerinin yükseklikleri uterusu doğru azalmaktadır. Kinosilyumların hareketleri ile ovum uterusu doğru iletilmektedir (şekil 1.1). Kinosilyumlar primatların dışındaki dişilerde sadece folliküler dönemde gelişmektedir. Luteal dönemde ise bunların küçüldüğü görölmektedir. Silyumsuz hücrelerin sitoplazmalarında bulunan salgı granüllerinden üretilen salgılar, ovum ya da embriyonun beslenmesine yardımcı olmaktadır (17,18).



Şekil 1.1: Oviduktun bölümleri (A) ve ovumun ovidukt kanalı boyunca silyumlar aracılığıyla hareketi (B). OV: Ovaryum, INF: İfundibulum, AMP: Ampulla, IST: İstmus, UTJ: Uterus istmus birleşme yeri (19).

Oviduktun düz kas tabakası, temel olarak sirküler ve longitudinal kas demetleri içermektedir. İfundibulum ve ampullada tunika muskularis incedir ve iç tarafta seyreden sirküler katman ile dışta seyreden longitudinal düz kas demetlerinden oluşmaktadır. İstmustaki kas tabakası ise daha belirgin olup uterusun sirküler kas tabakası ile kaynaşmaktadır. Ovum ve zigotun oviduktun bölümleri içerisindeki hareketleri düz kas kasılmaları ile epitel hücrelerin siliar aktiviteleri yardımıyla gerçekleşmektedir. Spermatozoanın ampullaya geçişi, uterus ve ovidukt duvarının musküler kasılmaları tarafından sağlanmaktadır. Hareketsiz partiküllerin ve motil olmayan spermatozoanın motil spermatozoa ile aynı hızda ovidukta ilerleyebilmesi, spermatozoa hareketinin sadece kendine özgü motilitesinden kaynaklanmadığını düşündürmektedir. Nitekim ineklerde spermatozoa çiftleşme sonrası ortalama beş dakika içerisinde ampullaya ulaşabilmektedir. Bu durumun spermatozoanın motilite yeteneği, ovidukt düz kas aktivitesi ve/veya ovidukt hücrelerinin siliar hareketlerinden dolayı oluştuğu ifade edilmektedir (18).

Düz kaslarda meydana gelen kas kontraksiyonları kalsiyum (Ca^{+2}) tarafından düzenlenmektedir. Düz kas miyozini sahip olduğu hafif zincirin (p-hafif zinciri) fosforilasyonu ile kasılma döngüsüne başlamakta ve böylece hücre içine giren Ca^{+2} 'nin kalmodüline bağlanmasıyla, aktif hale geçen kalmodülin miyozin hafif zincir kinazı (miyozinin fosforile edilmesinde katalizör) aktive etmektedir (20). Düz kasın gevşeme mekanizmasında Ca^{+2} 'nin kalmodulinden ayrılması ile kinazın inaktivasyona uğrararak p-hafif zincirine yeni fosfat eklenmediği görülmektedir. Miyozin başının ATP' nin varlığında fibriler aktinden ayrıldığı, defosforile p-hafif

zincirinin varlığından dolayı yeniden bağlanamayarak düz kasta gevşemenin şekillendiği ifade edilmektedir (21). Düz kaslarda diğer başka mekanizmaların da gevşeme oluşturabileceği aktarılmaktadır. Buna göre;

- Siklik guanozin monofosfat (cGMP) ve cGMP bağımlı protein kinazın agonistlerle uyarılmış fosfolipaz C oluşumunu inhibe ederek inositol trifosfat üretiminin engellenmesi,
- Ca^{+2} hücre dışına atılımının uyarılması (Ca^{+2} ATPaz düzenleyici proteinin, cGMP bağımlı protein kinazla fosforilasyonu sonucunda sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz enziminin etkinleştirilmesiyle),
- Miyozinin etkin olmayan formunu stabilize eden miyozin hafif zincirinin defosforilasyonunun arttırılması
- Reseptörle kontrol edilen Ca^{+2} kanallarının engellenmesi,
- Membran Ca^{+2} -ATPaz enziminin uyarılması,
- Potasyum (K^{+}) kanalları yoluyla K^{+} geçirgenliğinde artış (cGMP bağımlı protein kinazın cGMP ile etkinleştirilmesi ve K^{+} kanalların açılması ile membranın hiperpolarize olarak voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalların kapanması ve damar genişlemesinin oluşması) gibi mekanizmalar ile düz kaslarda gevşeme oluşabilmektedir (22).

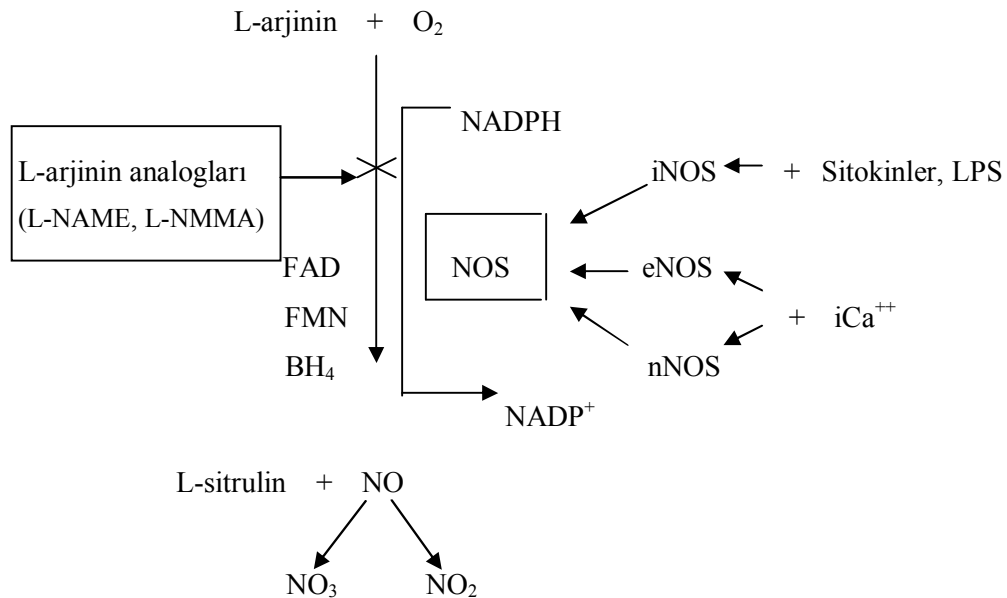
Ovidukt düz kas dokusunun kasılımları sözü edilen mekanizmalar dışında hormonal olarak da etkilenebilmektedir. Yapılan bir araştırmada; Ulbrich ve ark (23), östrojen ve progesteron reseptörlerinin oviduktun farklı bölümlerinde lokalize olduklarını aktarmaktadırlar. Ortiz ve ark (24) ise gebe ratlarda yaptıkları çalışmada östradiolün, ovumun transportunu sürekli olarak hızlandırdığını belirtmektedirler. Fuentealba ve ark (25) da bu etkinin eş zamanlı olarak uygulanan progesteron ile bloke edilebildiğini vurgulamaktadırlar. Buna ek olarak Hermoso ve ark (26) östradiolün, kasılım dalgalarının doku boyunca yayılmasına izin vererek ve şiddetini artırarak, düz kas hücreleri arasında yer alan gap birleşim yerlerinin gelişimini desteklemek suretiyle, oviduktteki kas aktivitesini senkronize ettiğini aktarmaktadırlar. Bir başka çalışmada Lindblom ve ark (27) prostaglandinlerin siklusun değişik evrelerinde farklı ovidukt kısımlarında kasılımları etkilediğini ifade etmektedirler. Buna ilave olarak *in vitro* koşullarda $PGF_{2\alpha}$ ' nin ovidukt kasılımlarını arttırdığı, PGE_2 ' nin sirküler kaslarda inhibisyona, longitudinal kaslarda düşük dozlarında inhibisyona, yüksek dozlarında stimülasyona neden olduğu belirtilmektedir

(27). Kotwica ve ark (28) ise inek oviduktunda oksitosin reseptörünün varlığını belirlediklerini, erken luteal ve folliküler evrede oksitosinin motilite üzerindeki stimülatör etkisinin izlendiğini belirtmektedirler.

1.2. Nitrik Oksit

1.2.1. Nitrik Oksitin Oluşumu

Nitrik oksit, substrat olarak yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arjininin nitrik oksit sentaz enzimleri tarafından sentezlenmesiyle gerçekleşmektedir (29). L-arjinden NO sentezi iki aşamada oluşmaktadır. Birinci aşamada L-arjininin bir molekülü, nikotinamin adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve oksijen varlığında, ara ürün olan N^G -hidroksil-L-arjinin (OH-L-arg) oluşturmak için oksitlendirilmektedir. Son aşamada ise OH-L-arg bir derece daha oksitlenerek, bir molekül NO ve L-sitrülinin oluşması sağlanmaktadır (30-32). Memelilerde L-arjinden NO sentezi, oksijen ve Ca^{+2} , tetrahidrobiopterin, flavin adenin dinükleotid ve flavin adenin mononükleotit gibi kofaktörlerin varlığında meydana gelmektedir (33). Nitrik oksit, hızlı bir şekilde nitrit (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) okside olmaktadır (34) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Farklı nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri aracılığıyla L-arjinden nitrik oksit sentezi (35). FAD: Flavın adenin dinükleotit, FMN: Flavın adenin mononükleotit, BH₄: Tetrahidrobiopterin, NADP: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat, NO: Nitrik oksit, NOS: Nnitrik oksit sentaz, iCa: İyonize kalsiyum, NO₂: Nitrit, NO₃: Nitrat, LPS: Lipopolisakkarid.

Nitrik oksit sentaz bir enzim grubu olup yapısal NOS (cNOS) ve uyarılabilir NOS (iNOS) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır (36,37). Yapısal NOS, NO' nun sürekli bazal seviyede salınımından sorumlu olan izoform I (nNOS, bNOS, NOS I) ve izoform III (eNOS; NOS III)' ten oluşmaktadır. İzofrom I' in ilk olarak sıçan ve sığır beyincisinde (38), İzofrom III' ün de endotel hücrelerde belirlendiği ifade edilmektedir (36). Yapısal NOS aktivitesi için Ca^{2+} /kalmodülün kompleksinin varlığı gerekmektedir. Diğer taraftan, cNOS aktivitesinin östrojen, mekanik faktörler ve endotelin gibi agonistlerle stimüle edilebildiği bildirilmektedir (36, 39, 40). Uyarılabilir NOS (iNOS)' un, ilk olarak makrofajlarda identifiye edildiği (41) ve sitokinler ile lipopolisakkaridlere yanıt olarak ekspresyona uğrayabildiği belirtilmektedir (29). Uyarılabilir NOS, Ca^{2+} varlığına gerek duymadan yüksek miktarlarda NO üretiminden sorumludur (42).

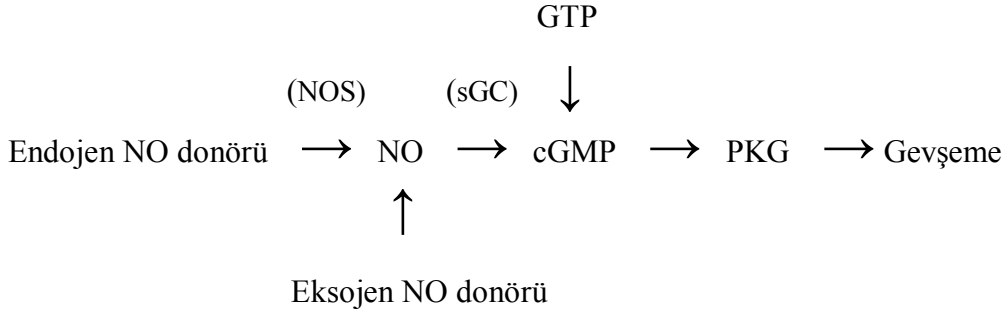
Hücre içerisinde artan Ca^{2+} konsantrasyonu cNOS aktivasyonu ve NO sentezi için birbirini izleyen bazı olayları başlatmaktadır. Hücre içindeki Ca^{2+} , O_2 ve L-arjininin NO ve L-sitrüline dönüşümünü, flavin grupları yoluyla, redüktaz bölgesinde bulunan NADPH' den hem grubuna kalmodülün için elektron transferini düzenlemek suretiyle sağlamaktadır. Ayrıca kalsiyum-kalmodülün kompleksini oluşturmak için kalmodüline bağlanmaktadır (43).

Yapısal NOS' a karşın iNOS, enzimin alt ünitelerine sıkıca bağlanan kalmodüline sahiptir. Bu nedenle hücre içerisinde Ca^{2+} konsantrasyonunda bir artış olmaksızın kalıcı bir aktivasyon göstermektedir (44).

Nöronal NOS (nNOS) ve endotelial NOS (eNOS) tarafından üretilen düşük miktarlardaki NO nörotransmisyon, vasküler tonun devamlılığı, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, endotelial hücrelerde nötrofil/trombosit adezyonunun önlenmesi, apoptozisin düzenlenmesi ve düz kas hücre proliferasyonu ile migrasyonunun inhibisyonu gibi fizyolojik olaylara aracılık etmektedir (33, 39, 45, 46).

Kan damarlarında NO tarafından çözünebilir (soluble) guanilat siklaz (sGC)' ın aktivasyonu endotelial kaynaklı NO' nun düz kas hücrelerinde gevsemeye neden olmasıyla sonuçlanmaktadır (47). Nitrik oksit, guanilil siklaza bağlanarak siklik guanozin monofosfat (cGMP)-spesifik proteinazlar (protein kinaz G, PKG), Na^+ iyonları ve fosfodiesterazları aktive ederek gen ekspresyonunu düzenlemektedir (41).

NO, siklik guanozin 3'-5' monofosfatın (cGMP) üretimini arttırarak damarlarda gevsemeyi etkinleştirmektedir (Şekil 1.3) (48).



Şekil 1.3: Düz kas dokusunda nitrik oksite bağlı gerçekleşen gevşemenin şematize gösterimi (49). NO: Nitrik oksit, NOS: Nitrik oksit sentaz, sGC: Çözünebilir guanilat siklaz, cGMP: Siklik guanozin monofosfat, GTP: Guananozin trifosfat, PKG: Protein kinaz G.

1.3. Nitrik Oksit Etkinliğinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Değişken ve kısa ömürlü bir madde olan NO' nun direkt ölçümler ile ortaya konulması oldukça zordur. Bununla birlikte, doku ve hücre kültürleri ile doku ekstratlarında NOS aktivitesinin veya NO sentezinin değerlendirilmesi gibi bazı teknikler kullanılabilir.

Nitrit ve nitrat *in vitro* olarak farklı doku ve hücre kültürlerinde NO üretimi için bir indeks olarak değerlendirilebilmektedir (50, 51).

Nitrik oksit sentaz aktivitesi analizi için kullanılan diğer bir metot ise NO' nun her molekülü için eş zamanlı salınarak üretilen L-arjininin metaboliti olan L- sitrülünün direk ölçümüdür (38). Buna ek olarak, NOS lokalizasyonunu belirleyen histokimyasal yöntemlerle de NO hakkında yorum yapılabilmektedir (34, 52, 53). Diğer bir alternatif yaklaşım da NADPH diaforaz aktivitesinin (NADPH-d) dağılımının belirlenmesidir. Ancak NADPH-d aktivitesinin diğer pek çok enzim ile NOS' a benzer sonuç verebileceği ifade edilmektedir (54).

Oksidasyon ürünü olan nitritin (NO₂⁻) Griess reaksiyonu adı verilen bir metotla ölçümünün pratik ve güvenli bir yöntem olduğu bildirilmektedir (55, 56).

Guanilat siklaz, cGMP konsantrasyonunu arttırarak NO' nun hücresel etkilerini göstermesine aracılık etmektedir (34). Nitrik oksit, guanilat siklaz ve sitokrom P-450 enzimleri gibi proteinlerle tepkimeye girmektedir (57). Oksidasyon, nitrit yoluyla idrarda nitratın oluşmasına öncülük etmektedir. Okside olmuş NO ayrıca sülfahidril

içeren bileşikleri ile nitrosiyalat molekülleri gibi NO' nun kendisinden daha stabil olan biyolojik olarak aktif türevlerinin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır (58). Düz kas hücrelerinde cGMP' nin, cGMP bağımlı protein kinazı aktive etmesi hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun azalmasına ve sonrasında relaksasyona neden olmaktadır. Bu nedenle cGMP konsantrasyonunun ölçümü, non-spesifik bir yaklaşım olmakla birlikte NO aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (34).

1.3.1. İzole Organ ve Doku Banyosu Sistemleri

Nitrik oksit aktivitesinin değerlendirildiği diğer bir yaklaşım da izole doku ve organ çalışmalarıdır. İzole organ sistemlerinde, organ veya doku vücudun sinirsel ve hormonal etkilerinden uzak olması nedeniyle yapılan değişiklikler kontrol altında tutulabilmekte ve denenen maddeye alınan cevaplar bu deneylerde daha net değerlendirilebilmektedir (59, 60).

İzole organ sistemleri, biyolojik sistem ve ölçü sisteminden meydana gelmektedir. Biyolojik sistemi doku veya organ, organ banyosu, fizyolojik çözelti, gaz akımını sağlayan aparat ve kullanılacak deney maddesinden oluşur. Ölçü sistemi, dönüştürücü sistem (transduser), amplifikatör ve kayıt sisteminden (kimograf, osilograf, bilgisayar) meydana gelmektedir (60-62).

İzole organ deneyleri, açık ve çift duvarlı olarak adlandırılan iki tip organ banyosu kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir (60, 62-64).

Açık tipte, geniş hacimli bir dış banyo ile bunun içine giren, dokunun tespit edildiği küçük hacimli bir iç banyo bulunmaktadır. Termostatik kontrol mekanizması ile dış banyo içindeki ısıtıcı kontrol edilirken, iç banyonun sıcaklığı dış banyoda ısınan su tarafından sağlanır. Fizyolojik çözelti dış banyo içinde ya da organ banyosunun dışında, iç banyo ile bağlantılı ayrı bir bölüme doldurularak iç banyoya iletilmektedir (60, 63).

Çift duvarlı izole organ banyosu fizyolojik çözelti ve termostatik kontrollü su ihtiva eden iki küvetten oluşmaktadır. Sistemin sıcaklığı dış küvet içerisinde dolaşan sıvı tarafından sabit tutulmaktadır. Fizyolojik çözelti, organ banyosunun üst kısmındaki bölümden musluk yardımıyla kadehlere iletilmektedir. Dokunun tespit edildiği kadehin alt ucundaki diğer bir musluk aracılığıyla, gaz karışımı iç küvete verilerek dokunun sürekli şekilde havalandırılması sağlanabilmektedir. Deneye başlamadan önce dokuya 1 veya 2 gramlık gerim uygulanarak ve 10-20 dakikalık

periyotlarda fizyolojik çözelti değiştirilerek dokunun 30–60 dakika süreyle ortama alışması için beklenmesi gerektiği belirtilmektedir (60, 62, 64).

İzole organ sistemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, dokunun tespit edildiği kadeh içerisine araştırılacak kimyasalın etkili doz aralığında eklenmesiyle kimyasalın dokuda oluşturduğu etki bilgisayar ortamında değerlendirilebilmektedir. Ratlarda NO' nun uterusun myometrial spontan kasılmaları üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla izole organ banyo sistemi kullanıldığı ve bu amaçla organ banyosu kadehi içerisine uygun dozlarda NO donörleri olan L-arjinin ve sodyum nitro prusid (SNP) eklendiği aktarılmaktadır (53). L-arjinin, NOS enzimleri aracılığıyla endojen NO oluşmasını sağlayan bir amino asittir (65). Nitrat içeren bir bileşik olan SNP ise eksojen NO oluşumunu sağlamaktadır (66). Böylece her iki bileşiğin izole organ sistemindeki kas dokusunda oluşturduğu etkiler, bu bileşiklerin son ürünleri olan NO' nun doku üzerindeki etkinliği hakkında yorum yapılmasını sağlamaktadır (53). Bununla birlikte, bu tür kimyasalların etki yollarının farklı aşamalarda inhibe edilmesiyle de elde edilen veriler güçlendirilebilmektedir.

Nitrik oksit sentaz etkisiyle üretilen NO, *N*-monometil-L-arjinin (L-NMMA) and *N*-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) gibi L-arjininin analogları tarafından yarışmalı olarak engellenebilmektedir (34). Bunun yanı sıra NO' nun etkinliği metilen mavisi (MB) tarafından da inhibe edilebilmektedir. Metilen mavisi bu etkisini, guanilat siklaz etkinliğini ve dolayısıyla cGMP seviyesini düşürerek göstermektedir (67). Diğer taraftan ovidukt (7), serviks ve vagina (68) gibi dokularda da NO' nun oluşturduğu etkilerin, sözü edilen izole organ sistemi yaklaşımı ile değerlendirildiği aktarılmaktadır.

1.3.2. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Western Blot Yöntemi

Belirtilen yöntemler dışında NO etkinliği revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve Western blot yöntemleriyle de belirlenebilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu, bir organizmaya ait deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA) dizilerinin *in vitro* olarak çoğaltılması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntem, bir gen ya da DNA bölgesinin, bu hedef bölgenin uç kısımlarına bağlanan ve hedef diziye komplementer oligonükleotid primerler

kullanılarak birbirini izleyen ardışık bir dizi döngü ile çoğaltılması olarak da açıklanabilmektedir (69).

Polimeraz zincir reaksiyonunda üç evre bulunmaktadır ve bu üç evre bir döngü olarak kabul edilmektedir. Isıyı düzenleyen otomatik aletler yardımıyla bir döngü yaklaşık 20-60 saniye ve 30 döngü 10-30 dakikada tamamlanabilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan DNA fragmentleri jel elektroforezis ile yürütülerek büyüklüklerine göre ayrılmaktadır. Daha sonra bu fragmentler Etidiyum Bromid ile boyanarak incelenmekte ve ultraviyole ışık altında doğrudan yapılan incelemelerde siyah zemin üzerinde beyaz bantlar halinde gözlenebilmektedir (69).

Western blot yöntemi ise doku ya da ekstrakt içerisindeki spesifik proteinlerin tespit edilmesinde kullanılan bir tekniktir. Jel elektroforezis yardımıyla doğal ya da denature proteinler polipeptidin uzunluğuna veya proteinin yapısına göre ayrılmaktadır. Transfer membranına aktarılan proteinler hedef proteine özgü spesifik anti serumların kullanılmasıyla belirlenebilmektedir (70).

Her iki yöntemde de herhangi bir doku veya organ, araştırılacak olan proteine ya da DNA yapısına sahipse uygun metotlar ile tespit edilmesi mümkündür. Pek çok memeli türünde NOS proteinlerinin Western blot ve/veya RT-PCR yöntemleriyle genital sistemde uterus (49), ovidukt (7, 16, 71, 72), ovaryum (73) ve klitoris (74) gibi dokularda varlığının ortaya konulduğu belirtilmektedir.

1.4. Nitrik Oksitin Etkileri

Nitrik oksit, albümin ve glutasyon eklenmesi ile nitrozotiol şeklinde etkin olarak uzak hedef dokulara taşınmaktadır. Bununla birlikte, hücreden salınır salınmaz hızla etkisini kaybettiği belirtilmektedir (75).

Eksojen nitratların cGMP seviyesini artırdığının ortaya konulmasıyla NO' nun damar düz kaslarında gevşemeye neden olduğu belirlenmiştir. Endotel hücrelerinde meydana gelen NO, damar düz kas hücrelerine difüze olarak cGMP düzeyinin artmasına sebep olmaktadır. Artan cGMP düzeyi ile NO, hücre içi Ca^{2+} düzeyini azaltmakta ve K^{+} kanallarının geçirgenliğini artırmaktadır. Buna bağlı olarak da plazma membranı hiperpolarize hale gelmektedir (76). Diğer taraftan cGMP, hafif miyozin zincirlerinin defosforilasyonuna sebep olan proteinkinazı aktive ederek miyozin/aktin etkileşimini engellemektedir. Böylece damar düz kaslarında gevşeme oluşmaktadır (Şekil 1.3) (22).

Nitrik oksitin kalp damar sistemindeki hayati görevinin yanında mide mukozasının ülserlere (kan akımının desteklenmesinde) (77) ve incebağırsak mukozasının endotoksik şokun zararlarına karşı korunmasında (mukozada kanlanmayı artırması, antioksidan etki) etkili olduğu aktarılmaktadır (75). Bunun yanı sıra böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesinde (böbrek otoregülasyonu, tübüloglomerüler geri bildirim, renin salınımı, basınca bağlı sodyum geri atılımı, böbrek kan basıncının ve tübül işlevlerinin düzenlenmesi) (78) ve diğer sistemlerde önemli etkilere sahip olduğu belirtilmektedir.

1.5. Nitrik Oksitin Dişi Reprodüktif Sistem Üzerine Etkileri

1.5.1. Ovaryum

Ovaryum, östrüs siklusu sırasında pek çok yapısal ve fonksiyonel faktör tarafından kontrol edilen kompleks endokrin bir organdır. Nitrik oksitin anterior hipofiz hormonlarının salınımlarını düzenleyerek ovaryum fonksiyonlarını kontrol ettiği ifade edilmektedir (79). Diğer taraftan NO' nun, direkt veya dolaylı olarak, ovaryumun bütünlüğünü sağlayan steroidojenik hücreler, immun sistem, kan damarları ve nöronları, otokrin ve/veya parakrin bir ajan gibi davranarak etkilediği bildirilmektedir (80).

Ovaryum steroid sentezinin, NO' nun hipofiz gonadotropinlerinin sentez ve salınımindaki rolünün yanında intraovaryan düzenleyici etkinliği nedeniyle, direkt olarak NO tarafından düzenlendiği belirtilmektedir. Nitrik oksit, sitokrom P-450 enzimini ve buna bağlı olarak aromataz etkinliğini inhibe ederek granuloza hücrelerindeki steroid sentezinin azalmasına ve dolayısıyla da östrojen (E2) sentezinin engellenmesine neden olmaktadır (56, 81, 82). Bunun yanı sıra NO' nun östrojen sentezini engellediği bildirilmesine karşın, östrojenin NO sentezine aracılık ederek uyurabileceği de ifade edilmektedir (56, 83).

1.5.1.1. Folliküler Gelişim ve Ovulasyon

Nitrik oksitin folliküler gelişim, ovulasyon ve atreziyi etkilediği (84), östrüs siklusu sırasında özellikle iNOS ile eNOS tarafından üretilen NO' nun folliküler gelişim ve ovulasyona katkıda bulunduğu belirtilmektedir (85). Ovaryumdaki NOS etkinliğinin ve buna bağlı olarak oluşan NO' nun özellikle damar genişletici etkisinden dolayı

follikülün rupturu ve ovulasyonda fonksiyonel bir görevinin olduğu ifade edilmektedir (12, 56, 82).

Rodentlerde *in vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalarda NO inhibitörlerinin ovaryumda NO üretimini durdurmasının ovulasyon oranında azalma ile sonuçlandığı bildirilmektedir (12, 84, 86). Diğer taraftan L-NAME uygulamasının ratlarda ovulasyon oranını arttırdığı belirtilmektedir (87). Bununla birlikte, periovulator safha sırasında NO' nun azlığının oosit maturasyonunda bazı defektlere neden olduğu ifade edilmektedir (13).

1.5.1.2. Luteal Yapı

Luteal dokuyu oluşturan hücrelerin steroid hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi maddeleri ürettiği, bununla birlikte NO' nun da korpus luteum (CL)' un fonksiyonlarını düzenleyebileceği belirtilmektedir (88). Jaroszewski ve ark (89) sığır CL' sinde belirlenen NADPH-d aktivitesinin seksüel siklusun orta ve geç luteal evrelerinde daha yüksek olduğunu bildirmektedirler. Ayrıca eNOS ve iNOS immunohistokimyasal boyamalarının sığır CL' sinde geç diöstrüs evresinde daha güçlü olduğu belirtilmektedir (80). Bazı NOS inhibitörlerinin (L-NAME ve L-NOARG) kültüre edilmiş sığır luteal hücrelerinde P4 sekresyonunu uyardığı ancak PGE₂ veya PGF₂ α üretimini etkilemedikleri ifade edilmektedir (90). Nitrik oksitin rat CL' sinde steroidogenezis üzerindeki negatif etkisi nedeniyle luteolitik bir rolü olduğu belirtilmektedir (86). Bununla birlikte, oksitosinin NO' nun luteolitik etkisine aracılık edebildiği aktarılmaktadır (91).

1.5.2. Uterus

Nitrik oksit sentaz izoformlarının (iNOS, nNOS, eNOS) farklı uterus dokularında değişen düzeylerde izlenebildiği bildirilmektedir (46). İnsan uterusunda NOS enzim aktivitesinin varlığı *in-situ*-hibridizasyon, immunohistokimya ve NADPH-d boyamalarıyla belirlenebilmektedir (92). Bazı NOS izoformlarının (iNOS ve nNOS) normal siklik rat uterusunda immunohistokimyasal olarak ve NADPH-d aktivitesi ile tespit edildiği belirtilmektedir (93). Nitrik oksitin gebelik sırasında uterustaki durgunluğun sağlanmasında etkili olduğu bildirilmektedir (94). Gebe rat uterusunda yapılan *in vitro* çalışmalar NO' nun uterusun kasılımlarının gevşemesine aracılık ettiği göstermektedir (49). Uterustaki NO' nun etkisinin, prostaglandinlerle olan

etkileşiminden kaynaklandığı (57) bunun yanı sıra NO' nun siklooksijenaz enzim aktivitesini arttırdığı belirtilmektedir (95).

Östrojenin genital organlarda ve sirküle eden kanda NO seviyesini arttırmasından dolayı, östrojenin gebelik ve folliküler evre sırasında NO düzeyinin artışından sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (96). Ovaryumları uzaklaştırılmış koyunlarda östrojen uygulamasının uterustaki damarlarda genişlemeyi uyardığı ve bu etkinin L-NAME tarafından antagonize edildiği belirtilmektedir (97). Bu nedenle NO' nun östrojenin bu gevşetici etkisine aracılık ettiği düşünülmektedir (49). Nitrik oksit sentezi üzerinde östrojenin etkisi, östrojenin miktarına ve etki süresine göre değişmektedir. Düşük seviyede seyreden östrojen NO üretimini arttırmaktadır. Erken gebelik döneminde artan östrojen miktarına yanıt olarak NO seviyesinde de bir artış izlenir. Bununla birlikte gebeliğin son dönemlerine doğru artan östrojen, NO salınımını engellemektedir (56, 98).

1.5.3. Serviks ve Vagina

Serviks ve vaginanın diğer genital organlar gibi endojen NO için bir kaynak olduğu belirtilmektedir (46, 56, 68, 99, 100). Üreme organları içinde en yüksek NO aktivitesinin servikste (uterustan beş, vaginadan iki kat fazla) olduğu bildirilmektedir (56, 83).

Rat, tavşan ve insan serviksinde (46, 56, 68, 99, 100), ayrıca gebe ve gebe olmayan kadınların servikslerinde iNOS, eNOS ve nNOS izoformlarının hepsinin de varlığının belirlendiği ifade edilmektedir (99).

Nitrik oksitin vaginada da vaginal sekresyonların oluşturulması ve tavşan ile ratlarda vaginal düz kasların gevşemesindeki etkileri nedeniyle fizyolojik bir görevi olduğu belirtilmektedir (46, 56, 68).

1.5.4. Seksüel Davranış

Seksüel davranışları kontrol eden ve hipotalamik bir merkez gibi davranan ventromedial nukleusun NOS (101) reseptörlerini içerdiği belirtilmektedir. Nükleusun ventrolateral kısmında östrojen reseptörlerinin çok sayıda NADPH-d pozitif nöronları ekprese ettiği, bunun da NO' nun seksüel davranışların şekillenmesinde etkisi olduğunu ortaya koyan bir bulgu olduğu bildirilmektedir (101).

Nitrik oksitin dişi seksüel davranışları üzerine rolünün ortaya konulması için Mani ve ark (102) yaptıkları çalışmada ovariektomize edilmiş östrojen uygulanan ratlara intraserebroventriküler enjeksiyonla L-NMMA tedavisinin lordozisi engellediği, SNP uygulamasının ise lordozisin oluşumuna yardımcı olduğunu bildirmektedirler. Bunun yanı sıra NO-cGMP etkileşiminde NO' nun hücre içi mesajcı gibi davranarak pek çok nörotransmitter ve hormon yardımıyla reproduktif fonksiyonların düzenlenmesinde etkili olduğu belirtilmektedir (103).

1.5.5. Ovidukt

Rosselli ve ark (104), sığır ovidukt epitel hücrelerinin *in vitro* koşullarda endotelin sentezini gerçekleştirdiğini, endotelin-I' in ovidukt kontraksiyonlarını uyarıcı etkisinin *N*-monometil-L-arjinin monoasetat (NOS inhibitörü) varlığında arttığını bildirmektedirler. Rosseli ve ark (105) alışmalarında elde ettikleri bu bulgunun, oviduktta endojen NO sentezinin varlığını ileri süren ilk çalışma olduğunu ifade ederek NO' nun ovidukt fonksiyonlarında etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalar farklı türlerde oviduktta NO etkinliğinin belirlenebilmesi üzerine yoğunlaşmıştır.

İnsan, sığır, rat ve domuz oviduktlarında NOS varlığı bildirilmektedir (6, 29, 106). Uyarılabilir NOS' un tubal epitelyum, düz kas hücreleri ve vasküler endotelyumda gözlemlendiği belirtilmektedir (57). Gawronska ve ark. (71) eNOS immunreaktivitesinin domuz oviduktunun mukozadaki epitelyum hücrelerinde, endotelyumun vasküler dokusunda ve kas tabakasında izlediklerini aktarmaktadırlar. Chatterjee ve ark (107) eNOS aktivitesini rat oviduktunun mukozal epitelyumunda ve kas tabakasında gözlemlediklerini belirtmektedirler. Ekerhovd ve ark (7) insan oviduktunun istmus kısmında eNOS immun boyamasını epitel tabaka ve kan damarları endotelyumunda gözlemlediklerini ifade etmektedirler. Bunun yanı sıra sığır oviduktunda eNOS ve nNOS immunreaktivitesinin epitel hücreler ile kan damarlarında, yalnız nNOS' un epitelyum ve düz kas hücrelerinde belirlendiği ifade edilmektedir (72). İnsan oviduktunda NOS aktivitesinin epitel hücreler, düz kas hücreleri, vasküler endotelyum ve konektif dokuda varlığı bildirilmektedir (6). Domuz oviduktundaki NOS aktivitesinin ise mukoza epitelinde kas tabakasına göre daha fazla olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca istmus epitelindeki aktivitenin diğer bölgelere göre daha yüksek oranda olduğu belirtilmektedir. Östrüs esnasında ovidukt epitelindeki

NOS enzim aktivitesinin azaldığı, kas tabakasındaki NOS enzim aktivitesinin ise ovulasyon sonrasında önce arttığı, daha sonra azaldığı ifade edilmektedir (71).

Nitrik oksitin ovidukt duvarı epitelyumunda sentezlenip kas katmanında etki göstermesi nedeniyle oviduktta parakrin bir özellik gösterebileceği ifade edilmektedir (8). Ovumun oviduktta ayrılmadan önce NOS aktivitesinde ve ekspresyonunda bir azalmanın olduğu ve bundan dolayı endotelin-1 (105) ve $PGF_{2\alpha}$ (108) gibi kontraktıl moleküllerin oviduktta bir motiliteye sebep olduğu belirtilmektedir. Araştırmacılar (8) NOS inhibitörlerinin ratlarda bursa ovarikaya enjeksiyonuyla oviduktta bulunan ovumların sayısında önemli bir azalma olduğunu belirtmektedirler. Bununla birlikte gebe ratlarda spermin NONOate (NO donörü)' nin tek başına ovum transportunu etkilemediğini bildirmektedirler.

Bugüne kadar çeşitli yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda insan, rat, sığır ve domuz ovidukt dokularının NOS enzim etkinliğine sahip olduğu aktarılmaktadır (6-8, 16, 29, 71, 72, 109). Bu çalışmalarda, NOS enzimlerinin varlığından hareketle, ovidukt dokusunda NOS etkinliğine bağlı olarak oluşan endojen bir NO üretiminin gerçekleştiği belirtilmektedir. Bununla birlikte oluşan NO' nun, ovidukt düz kas dokusunda gevşemeye neden olarak motiliteyi etkileyebileceği, bu nedenle NO' nun ovidukt fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynadığı hipotezi ileri sürülmektedir. Ancak seksüel siklusun farklı dönemlerinde bulunan sığırlarda veya diğer memelilerde L-arjinin-SNP / NOS / NO / sGC yolunun oviduktun düz kas kasılımları üzerine *in vivo* ve/veya *in vitro* etkilerinin incelendiği çalışmalara rastlanılmamıştır.

Sunulan çalışmada, östrüs siklusunun farklı evrelerindeki ineklerde, ovidukt düz kas dokusunun spontan kasılımları üzerine NO' nun etkisinin *in vitro* olarak belirlenmesi ve NOS enzimlerinin ekspresyon modellerinin ortaya konulması amaçlandı.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Çalışmada, özel mezbahalardan elde edilen 3-4 yaşlı, multipar, klinik olarak patolojik bir sorunu bulunmayan ve gebe olmayan toplam 64 Holstein ineğin 88 ovidukt kullanıldı.

Çalışma, ineklerde NO' nun spontan ovidukt kasılmalarına etkisinin belirlenmesi ve ovidukt dokusunda NOS enzimlerinin varlığının ortaya konulması amacıyla iki aşamada gerçekleştirildi.

Spontan ovidukt kasılmalarının belirlenmesi için izole organ banyosunda gerçekleştirilen çalışmalar Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yürütüldü. Bu aşamada 40 ineğe ait luteal yapı bulunan ovaryum tarafındaki 40 adet ovidukt kullanıldı.

İmmünohistokimyasal boyama, RT-PCR ve Western blot yöntemleri ile NOS enzimlerinin ovidukt dokusunda tespit edilmesi çalışmaları ise Polonya' da bulunan Warmia Mazury Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Toplam 24 ineğe ait ovidukt bu üç yöntemle değerlendirildi. Western blot analizinde bu hayvanların her iki ovidukt da kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hayvanların Seçimi ve Seksüel Siklusa Göre Gruplandırılması

Spontan ovidukt kasılmalarının belirlenmesi için izole organ banyosunda gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan hayvanlar, Afyonkarahisar ilinde bulunan özel bir mezbahadan elde edildi. Kesim öncesi, mezbahanenin dinlenme padoklarında bulunan hayvanların uterus ve ovaryumları seksüel siklus dönemi, gebelik ve genel sağlık bulguları yönünden rektal palpasyon yoluyla muayene edildi ve kan örnekleri alındı. Kesim sonrası genital organlar muhtemel bir patolojik durum olup olmadığı yönünden makroskobik olarak muayene edildi. Seksüel açıdan aktif ve sağlıklı olarak değerlendirilen hayvanlar çalışmaya dahil edildi.

İmmünohistokimyasal boyama, RT-PCR ve Western blot yöntemleri için kullanılan hayvanlar Polonya' nın Olsztyn şehri yakınlarında bulunan özel bir mezbahadan elde edildi. Kesim öncesi hayvanlar mezbaha veteriner hekimleri tarafından gebelikleri yönünden rektal palpasyon yoluyla muayene edildi. Kesim

salonunda bulunan veteriner hekimlerin karkas ve iç organ muayenelerinden sonra genital organlar herhangi bir patolojik durum olup olmadığı yönünden makroskopik olarak muayene edildi. Seksüel açıdan aktif ve sağlıklı olarak değerlendirilen hayvanlar çalışmaya dahil edildi.

Her hayvana ait ovaryumlar Ireland ve ark (110)'ın bildirdiği şekilde luteal yapının karakterine göre seksüel siklus dönemleri yönünden sınıflandırıldı (Çizelge 2.1). Buna göre hayvanlar, bir siklus süresi 20 gün olarak değerlendirilerek; metöstrüs grubu (1-4. gün), erken diöstrüs grubu (5-10. gün), geç diöstrüs grubu (11-17. gün) ve folliküler evre grubu (18-20. gün) olmak üzere dört grupta sınıflandırıldı.

Çizelge 2.1: Luteal yapının karakterine göre seksüel siklus dönemlerinin belirlenmesi (110).

Luteal Yapının Görünümü	Seksüel Siklus Dönemleri			
	Metöstrüs (1-4. gün)	Erken Diöstrüs (5-10. gün)	Geç Diöstrüs (11-17. gün)	Foliküler Evre (18-20. gün)
Dış Yüzey	kırmızı, ovulasyon henüz oluşmuş, ovulasyon yeri epitelyum tarafından sarılmamış	ovulasyon yeri sarılmış, korpus luteumun apeksi kırmızı veya kahverengi	sarımsı kahverengi veya turuncu	açık sarı-beyaz
İç Yüzey	kırmızı, sıklıkla kan ve organize olmuş hücrelerle dolu	sadece apeks kırmızı veya kahverengi, geri kalan kısım turuncu	turuncu	turuncu-sarı
Vaskularizasyon	gözlenmez	genellikle periferde sınırlı	dönemin sonuna doğru periferden apekse ilerler	gözlenmez

2.2.2. Kan Progesteron Düzeyinin Belirlenmesi

Kan örnekleri, kesim sırasında 10 ml hacminde standart numune alma tüpleri kullanılarak toplandı. Tüpler, termos aracılığıyla soğuk zincirde 20 ± 5 dakika içerisinde laboratuara getirildi. Kan örnekleri $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 1600 devirde 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen serumlar Eppendorf tüplerine (1.5 ml) aktarılarak -20°C ' de saklandı. Elektrokemilüminesans immünolojik test (ECLIA) yöntemi sığır serum progesteron konsantrasyonunun tespiti için kullanıldı (111). ECLIA, immünolojik test analizörlerinde kullanılan ticari test kiti (cobas e, Roche Diagnostics GmbH, Almanya) ile gerçekleştirildi (sensitivite: 0.03 ng/ml).

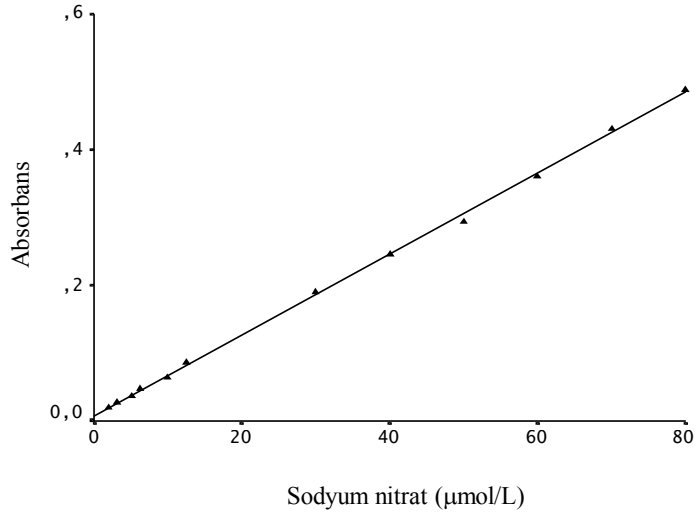
2.2.3. Kan Nitrik Oksit Düzeyinin Belirlenmesi

Serumda nitrik oksit miktarı Miranda ve ark (112)' in belirttiği yöntemle belirlendi. Bu yöntem (Griess reaksiyonu), nitritin asidik ortamda primer bir aromatik aminle (sülfanilamid) diazotizasyonu ve N-(1-naphthyl)ethylenediamin (NEDD) ile renkli bir azo türevi oluşturması esasına dayanmaktadır.

Serumdan alınan 100 μl örnek üzerine, 50 ml hidroklorik asitte 400 mg Vanadium klorür çözündürülmesiyle elde edilen çözeltilerden 100 μl eklendi. Bunun üzerine seri halde % 2'lik hidroklorik asit ile 100 ml' ye tamamlanmış 2 g sülfanilamid çözeltisinden 50 μl ve distile suda hazırlanmış % 0.1' lik NEDD çözeltisinden 50 μl ilave edildi. Örnekler $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra kültür plağı okuyucusuna (Titerteks-Multiskan, M.C., Finlandiya) yerleştirilerek 550 nm'de okundu. Sonuçlar, Çizelge 2.2'de gösterilen ve daha önce değişik konsantrasyonlardaki sodyum nitratın absorbans değerlerine göre hazırlanan kalibrasyon eğrisi (Şekil 2.1) kullanılarak değerlendirildi.

Çizelge 2.2: Sodyum nitrat için okunan absorbans değerler.

Konsantrasyon (μM)	Absorbans	Konsantrasyon (μM)	Absorbans
2	0.020	30	0.190
3.125	0.027	40	0.246
5	0.037	50	0.294
6.25	0.048	60	0.361
10	0.065	70	0.431
12.5	0.087	80	0.489
20	0.127	90	0.542
25	0.153	100	0.596

**Şekil 2.1:** Sodyum nitrat konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

2.2.4. Oviduktların Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Luteal yapının bulunduğu taraftaki oviduktlar, izole organ banyosu ile immünohistokimyasal boyama, RT-PCR ve Western blot yöntemlerinde değerlendirilmek üzere her bir yönetime uygun şekilde hazırlandı.

2.2.4.1. İzole Düz Kas Şeritlerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Kesim sonrası oviduktlar (n:40) 15 dakika içerisinde bir termos aracılığıyla, soğuk zincirde +4 °C' de laboratuvara getirildi. Ovidukt infundibulum, ampulla ve istmusu içine alacak şekilde, içerisinde oksijenize edilen Krebs solusyonu (KS) (NaCl (Fluka, Buchs, İsviçre) 118 mmol/l, KCl (Fluka, Buchs, İsviçre) 4,7 mmol/l, CaCl₂ (Fluka, Buchs, İsviçre) 2,5 mmol/l, MgSO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1 mmol/l, KH₂PO₄ (Fluka, Buchs, İsviçre) 1 mmol/l, glikoz (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 11 mmol/l, NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 25 mmol/l) bulunan diseksiyon kabına konuldu. Her çalışma öncesi taze olarak hazırlanan KS, 7.3-7.4 pH'da, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile preoksijenize olacak şekilde oda sıcaklığında muhafaza edildi. Ovidukt çevresindeki dokular diseksiyon edilerek uzaklaştırıldı. Ucu keskin olmayan 1.5 mm kalınlığındaki bir prob infundibulumdan ilerletilerek probun ilerlemesini engelleyen direnç noktası ampulla-istmus birleşme yeri olarak belirlendi (27). Bu birleşme yerinin istmus tarafında olan kısmından 10-12 mm uzunluğunda bir doku parçası çıkarıldı. Bu doku parçası lumeninden sokulan bir makas yardımıyla uzunlamasına kesildi. Daha sonra bu kısmın, eni 2 mm uzunlukta olacak şekilde, yine longitudinal olarak kesilmesiyle longitudinal istmus kas şeridi elde edildi. Sirküler kas şeridi elde etmek için istmus 2 mm uzunluğunda yüzük (ring) tarzında kesildi. Bu doku parçasının da lumeninden sokulan makas yardımıyla uzunlamasına kesilmesiyle sirküler istmus kas şeridi elde edildi. Aynı şekilde oviduktun ampulla bölgesinden de longitudinal ve sirküler kas şeritleri hazırlandı.

İzometrik Kasılımların Belirlenmesi ve Verilerin Kaydedilmesi

İzole edilen her bir şerit, 37 °C sıcaklıkta ve %95 O₂ - %5 CO₂ gaz karışımı ile sürekli oksijenize edilen, içerisinde 20 ml Krebs solüsyonu bulunan 4 kadehli izole organ banyosu setinde (IOBS 99 Isolated Tissue Bath Stand Set, Commat, Ankara, Türkiye) tespit edildi. Bu amaçla doku şeritlerinin bir ucu platin halka elektrodun alt ucuna, diğer ucu force displacement transducer'e (model 10-A; MAY, Commat, Ankara, Türkiye) ipek iplik yardımıyla bağlanıp tespit edildi. Her bir hayvana ait dokular sırasıyla; istmus longitudinal şerit kadeh I, istmus sirküler şerit kadeh II, ampulla longitudinal şerit kadeh III ve ampulla sirküler şerit kadeh IV olacak şekilde isimlendirildi.

Hazırlanan tüm doku şeritlerine birer gramlık gerim uygulandı. Ortama alışmaları için her 15 dakikada bir değiştirilen KS içerisinde en az bir saat süreyle bekletildi. Normal spontan kasılımların belirlenmesi için 30 dakikalık kasılım periyodu bilgisayarda görüntülendi (Acquisition System; MP30 WSW, Biopac Student Lab PRO Software, Biopac Systems). Daha sonra her bir hayvana ait istmus ve ampullanın longitudinal ve sirküler doku şeritlerinde deney protokolü (Çizelge 2.3) uygulandı. Buna göre;

Endojen NO etkinliğinin belirlenmesi amacıyla L-arjinin (Fluka, Buchs, İsviçre) 10 nM'den 1 mM, eksojen NO yolunun değerlendirilmesi amacıyla SNP (Fluka, Buchs, İsviçre) 10 nM'den 0,1 mM dozlarında logaritmik olarak her on dakikada bir artırılarak uygulandı. Elde edilen en etkili dozlar kayıt altına alındı.

Endojen NO etkinliğinin reseptör düzeyinde ortaya konulması için 10 µM dozunda L-NAME (Nitro-L-arjinin-metil-ester) (Fluka, Buchs, İsviçre) verildikten sonra en etkili dozda L-arjinin uygulandı. Guanil siklaz yolunun etkisinin değerlendirilmesi için örnekler 30 dk 10 µM metilen mavisi (MB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ile inkube edildikten sonra en etkili dozda L-arjinin uygulandı. Tüm uygulamaların mümkün olduğunca aynı oviduktta yapılmasına özen gösterildi.

Çizelge 2.3: İsthumus ve ampullanın longitudinal ve sirküler kas şeritlerine uygulanan deney protokolü.

Uygulama	Deney Protokolü	Amaç
İnkübasyon	Krebs Solusyonunda 1 saat inkübasyon	Ortama uyum
İnkübasyon	Krebs Solusyonunda 30 dakika inkübasyon	Spontan kasılımların belirlenmesi
Uygulama I	L-arjinin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M)	Endojen nitrik oksit etkisinin belirlenmesi
Uygulama II	N-nitro-L-arjinin metil ester (10^{-5} M) + L-arjinin (en etkili doz)	Enzimsel düzeyde endojen nitrik oksit tespiti
Uygulama III	Metilen Mavisi (10^{-5} M) + L-arjinin (en etkili doz)	Guanilat siklaz düzeyde endojen nitrik oksit tespiti
Uygulama IV	Sodyum Nitro Prusid (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M)	Eksojen nitrik oksit etkisinin belirlenmesi

Kasılımların değerlendirilmesi sırasında, her bir gruptaki spontan kasılım şiddeti (amplitüd) 100 olarak kabul edildi. Deney protokolündeki uygulamalar sonrası kasılım şiddetinde oluşan kontraksiyonun ve/veya inhibisyonun % olarak etkisi kayıt altına alındı.

2.2.4.2. Ovidukt Dokusunda İmmünohistokimyasal Boyama, Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Western Blot Yöntemleri ile Nitrik Oksit Sentaz Enzimlerinin Varlığının Belirlenmesi

Oviduktlar öncelikle Lee ve Luna (113)' in bildirdiği şekilde Hematoksilen-Eozin boyaması ile değerlendirildi. Bu boyamalar sonrasında histopatolojik muayenede herhangi bir bulgu göstermeyen dokular çalışmaya dahil edildi.

2.2.4.2.1. İmmünohistokimyasal Boyama için Doku Örneklerinin Tespit Edilmesi ve Değerlendirilmesi

Her bir hayvana ait oviduktlar isthmus (n:24) ve ampulla (n:24) kısmına ayrıldıktan sonra %4 paraformaldehit ile iki saat boyunca tespit edildi. Tespit işleminden sonra

tamponlu fosfat çözeltisi (pH 7.4) ile yıkandı. Daha sonra % 0.01 NaN₃ (sodyum azid) içeren % 18 tamponlu sukroz solüsyonuna aktarılarak saklandı.

İmmünohistokimyasal değerlendirme, doku örneklerinden alınan, krom alum-jelatin kaplı cam slaytlar üzerine yerleştirilen 12 µm kalınlığındaki kriyostat kesitlerinde gerçekleştirildi. Buna göre; oda sıcaklığında 30 dakika boyunca havada kurutulan kesitler, PBS (0.1 M, pH 7.4) içine daldırılarak 20 dakika bekletildi. Daha sonra % 0.1 Triton X-100, % 0.1 bovine serum albumin, % 0.05 thimerosal (bakteriyel ajan), % 0.01 NaN₃ ve % 10 normal goat serum bulunan 0.1 M PBS solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında bir saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra preparatlar PBS içerisinde 10 dakika süreyle üç defa yıkandı. Doku örnekleri bir gece boyunca rabbit polyclonal antihuman nNOS (dilüsyon 1 : 5000 (Chemicon, AB5380, USA), mouse monoclonal antihuman eNOS (dilüsyon 1 : 100 (BD Transduction Laboratories N30020, USA) ve rabbit monoclonal antimouse iNOS (dilüsyon 1 : 800 (Sigma N7782, USA) primer antiserumları ile inkübe edildi. Örnekler oda sıcaklığında PBS içinde üç kez yıkandıktan sonra, % 1 Triton X-100, % 0.1 bovine serum albumin, % 0.05 thimerosal, % 0.01 NaN₃ ve % 10 normal goat serum bulunan 0.01 M PBS içerisinde Alexa-conjugated goat anti-rabbit IgG (nNOS ve iNOS) (Invitrogen A11010, UK) (dilüsyon 1: 500) veya goat anti-mouse IgG (eNOS) (Invitrogen A11003, UK) (dilüsyon 1: 500) ile inkübe edildi. Boyama prosedürü preparatların oda sıcaklığında PBS içerisinde üçlü durulanmasıyla tamamlandı. Son olarak preparatlar PBG (phosphate-buffered glycerol, pH 7.4) ile kaplandı ve örnekler floresans mikroskop (Axiophot, Zeiss, Germany) altında analiz edildi. Nitrik oksit sentaz izoformları için pozitif immunreaktivite istmus ve ampullada epitelium, lamina propria, muskuler katman ve seroza ile kan damarları endotelinde arandı. Preparatlar birbirinden bağımsız farklı iki kişi tarafından (O.Y. ve J.C.) değerlendirildi.

Preparatlarda gözlenen pozitif immün yanıtın şiddeti Bülbül ve ark (53)'ın bildirdikleri gibi;

0: reaksiyon yok

1: zayıf reaksiyon

2: orta derecede reaksiyon

3: şiddetli reaksiyon

4: çok şiddetli reaksiyon olacak şekilde sınıflandırıldı. Elde edilen sonuçlar, ortalamaları alınarak istatistiksel değerlendirmeler için kaydedildi.

Nöronal NOS immünreaktivitesi değerlendirilirken sinir fibrillerinin dağılımı Majewski ve ark (109)' ın bildirdikleri gibi;

(+) : ara sıra gözlenen tek fibril

+ : tek fibril

++ : birkaç adet fibril

+++ : 3-4 adet fibril

++++ : çok sayıda fibril

- : fibril gözlenmedi olacak şekilde sınıflandırıldı.

Preparatlar konfokal mikroskop (BIO-RAD) ile fotoğraflandı.

Primer antiserumun çıkarılması (omission) veya non-immun serumun yer değiştirilmesiyle (replacement) yapılan kontrol boyamalarıyla immünreaksiyonun spesifik olup olmadığı araştırıldı.

2.2.4.2.2. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Western Blot Yöntemleri için Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Her bir hayvana ait doku örnekleri RNA later (Ambion, Cat. 7024) (aqueous doku saklama ayırıcı) içerisinde soğuk zincirde laboratuara getirildi ve değerlendirilmek üzere -20°C' de saklandı. Total RNA, asit fenol-guanidin isotiyosiyanit metoduna göre izole edildi (114). İzole edilen total RNA örnekleri deiyonize formamid

içerisinde çözdürüldü (Sigma, USA) ve konsantrasyonları Ultrospec III spektrofotometre (Pharmacia LKB, Sweden) ile 260 nm’de spektrofotometrik olarak tespit edilerek -20°C’ de saklandı. RNA izolasyonu sonrası kalan fenol, protein izolasyonu için TRIZOL ayırıcında (Gibco BRL, USA) belirtilen protein izolasyonu prosedürüne göre uzaklaştırıldı. Buna göre; örneklere 0.3 ml % 96’ lık etanol eklendi ve santrifüj edildi (5 dakika, 2000 g). DNA içeren presipitat atıldı ve 2 ml isopropanol (POCh, Poland) süpernatanta eklendi. Santrifüj sonrası (10 dakika, 12000 g), süpernatant atıldı ve proteinlerin bulunduğu presipitat soğuk aseton ile yıkandı (POCh, Poland), havada kurutuldu ve % 1 sodyum laurilsülfat (SDS; BioRad, USA) solüsyonunda çözdürüldü. Protein konsantrasyonları Bradford assay ile belirlendi ve protein preparasyonları -20°C’ de saklandı.

Semi-Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu, oviduktlar istmus (n:24) ve ampulla (n:24) kısımlarına ayrıldıktan sonra iki tüp reaksiyonu şeklinde gerçekleştirildi. Her örnekten alınan 2 µg total RNA 0.5 ml’ lik Eppendorf tüplerinde etanol ile çöktürüldü (115) ve daha sonra 14 µl nuclease-free su eklenerek çözdürüldü. Oligo dT (12-18) primerinden (Sigma, USA; 0.5mg/ml) 1 µl eklendi ve tüpler 65 °C’ de 10 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde soğutuldu. Tüplere 10 mM deoksiribonükleotid (dNTPs; 2.5 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP; Pharmacia LKB, Sweden) karışımlarından 2 µl, 4 µl 5 kat yoğunlaştırılmış Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (MMLV-RT) buffer (Fermentas, Litvanya), 20 ünite ribonükleaz inhibitor (Promega, USA) ve 200 ünite MMLV-RT (Fermentas, Litvanya) eklendi. Hacim, nuclease-free su ile 20 µl’ ye tamamlandı. Revers transkriptaz reaksiyonu 42 °C’ de 1 saat olacak şekilde gerçekleştirildi ve ısı 75 °C’ ye (10 dakika) yükseltildikten sonra buz üzerinde soğutuldu. Hazırlanan cDNA preparasyonları, her örnekteki revers transkriptaz ve PCR’ nin uniform etkinliğini tayin etmek amacıyla, sığır nNOS, iNOS, eNOS ve internal bir standart olan 18S rRNA için spesifik primerler ile birlikte sonraki PCR için kullanıldı. PCR tüpleri 1.25 µl 10 kat yoğunlaştırılmış Taq polymerase buffer (Fermentas, Lithuania), her primerden 100 pm, 1.25 µl 10 mM dNTPs karışımı, 0.75 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl cDNA preparasyonu, 0.5 ünite Taq termostabil DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya) ve total hacim 12.5 µl olacak şekilde ultra saf su eklenerek hazırlandı. Denaturasyon 95 °C’ de 10 saniye, bağlanma 58-67 °C’ de 10 saniye ve uzama aşaması 72 °C’ de 1

dakika, 30 siklus olacak şekilde PCR cihazı ayarlandı. Primerlerin sekansları, bağlanma sıcaklıkları ve PCR ürünlerinin beklenen büyüklükleri Çizelge 2.4' de verilmektedir.

Çizelge 2.4: Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan primerlerin sekansları, büyüklükleri ve bağlanma sıcaklıkları.

mRNA	Polimeraz Zincir Reaksiyonu Primerleri	Büyüklük	Sıcaklık
nNOS	5'-gtcatttctgtccgtctcttcaaac-3' 5'-gctgggtcacacggatggtcttg-3'	329bp	66 °C
iNOS	5'-agcacgggaatgagtctcc-3' 5'-cgtcagctgtaggttcttg-3'	394bp	63 °C
eNOS	5'-ccttccgctaccagccaga-3' 5'-cagagatcttcaccgcgttgcca-3'	104bp	67 °C
18SrRNA	5'-gtaaccggtgaacccatt-3' 5'-ccatcaatcggtagtagcg-3'	151bp	58 °C

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri M1 moleküler büyüklük işaretleyicisiyle (DNA Gdańsk, Polanya) TAE buffer içindeki % 0.8 agaroz jelde analiz edildi. DNA fragmentleri Etidyum Bromid (Sigma, USA) ile boyandı ve 302 nm transluminator (Pharmacia LKB, İsveç) ile görüntüledi. Jel 100 ASA 35 mm siyah beyaz film ile fotoğraflandı.

Western Blot Analizi

Oviduktların istmus (n:48) ve ampulla (n:48) kısımları, ipsilateral (luteal yapı bulunan ovaryum ile) ve kontralateral olarak değerlendirildi. Western blot, Laemmli (116)' in bildirdiği şekilde gerçekleştirildi. Her bir protein örneğine (45 µg) % 50 triklorasetik asit (POCH, Polanya), final konsantrasyon %10 olacak şekilde eklendi ve 0°C' de 5 dakika inkübe edildikten sonra santrifüj edildi (2 dakika, 12000 g). Presipitat soğuk aseton ile yıkandı, havada kurutuldu ve 10 µl SDS buffer içerisinde çözdürüldü (116). Örnekler 95 °C'de 5 dakika bekletildi ve oda sıcaklığında soğutulduktan sonra santrifüj edildi (2 dakika, 16000). Süpernatantlar % 10 SDS-polikrilamid jel ile %5 stacking jele aktarıldı. Jelin bir şeridinde 1 µl protein moleküler ağırlık markeri (Broad Range, Bio Rad, USA) buffer içinde çalışıldı. Elektroferezis MiniProtean II jel aparatında (Bio Rad, USA) 200 V, 40 dakikada yürütüldü.

Elektroforezis sonrası proteinler Mini TransBlot aparatı içerisindeki (Bio Rad, USA) PVDF membrana (Immobilon, Bio Rad, USA) elektroblotlandı. Protein bantları PVDF membran üzerinde % 1 asetik asit (POCH, Poland) içinde % 1 Amido Black (Sigma, USA) ile boyandı ve standart bantların moleküler ağırlık pozisyonları yumuşak uçlu bir kurşun kalem ile işaretlendi. Membran TRIS-buffered saline (TBS, pH 7.4) içinde % 10 bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA) ile 42 °C' de 1 saat bloklandı ve uygun primer antikorlarla (rabbit polyclonal antihuman nNOS (dilüsyon 1: 500 (Chemicon, AB5380, USA), mouse monoclonal antihuman eNOS (dilüsyon 1: 100 (BD Transduction Laboratories N30020, USA) ve rabbit monoclonal antimouse iNOS (dilüsyon 1: 1000 (Sigma N7782, USA) inkube edildi. Membranlar TBS ile yıkandı ve uygun biotin konjuge sekonder antikorlarla (nNOS ve iNOS için Alexa-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen A11010, UK) (dilüsyon 1: 400) veya eNOS için goat anti-mouse IgG (Invitrogen A11003, UK) (dilüsyon 1: 400) 30 dakika inkube edildi. İnkübasyon sonrası membranlar TBS ile yıkandı ve alkalın fosfataz konjuge streptavidin (0.5 µg/ml; Sigma, USA) ile 30 dakika inkübe edildi. Membranlar tekrar TBS ile yıkandı ve alkalın fosfataz-aktivasyon buffer (100 mM NaCl, 100mM Tris HCl, pH 9.5) ile inkübe edildikten sonra CDP Star Ready-to-use (Roche, USA) kemiluminisens tespit ayıracağı ile muamele edildi.

Membranlar plastik ambalaja sarılarak 2 dakika boyunca X-ray filme (Retina, Photochemische Werke GmbH, Almanya) aktarıldı. X-ray filmler için Rodinal geliştirici (AGFA, Almanya) kullanıldı. Bantların pozisyonları filme transfer edildi.

2.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

Gruplar arasında kan progesteron, nitrik oksit değerleri ile NOS ekspresyonları bakımından fark olup olmadığının belirlenmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi, farkın hangi gruplardan kaynaklandığını ortaya koymak için ise Duncan Test yapıldı. Aynı şekilde izole organ banyosu sonuçlarının gruplar içerisinde oluşturdukları farkın belirlenmesinde Varyans Analizi ve Duncan Test uygulandı. Sonuçlar Mean + SE olarak verildi. Minimal önemlilik ise $p < 0.05$ olarak kabul edildi. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 10.0 programı kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Hayvanların Kan Progesteron (P4) Düzeyleri

Hayvanların metöstrüs, erken diöstrüs, geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarına göre serum/P4 düzeyleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1: Hayvanların gruplara göre serum progesteron düzeyleri.

	Gruplar			
	Metöstrüs	Erken Diöstrüs	Geç Diöstrüs	Folliküler Evre
P4 (ng/ml)	1.29 ± 0.14 ^c	3.03 ± 0.12 ^b	8.24 ± 1.52 ^a	0.44 ± 0.06 ^c

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

3.2. Hayvanların Kan Nitrik Oksit Düzeyleri

Hayvanların metöstrüs, erken diöstrüs, geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarına göre serum/NO düzeyleri Çizelge 3.2’ de verilmiştir.

Çizelge 3.2: Hayvanların gruplara göre serum nitrik oksit düzeyleri.

	Gruplar			
	Metöstrüs	Erken Diöstrüs	Geç Diöstrüs	Folliküler Evre
NO (µmol/L)	17.22 ± 0.82 ^a	12.01 ± 0.68 ^b	14.03 ± 0.73 ^b	18.12 ± 1.12 ^a

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

3.3. Oviduktta L-arjinin Uygulaması Sonrasında Oluşan İzometrik Kasılım Değerleri (%)

Gruplarda istmusun longitudinal düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arjinin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) varlığında oluşan ortalama yüzde (%) kasılım değerleri ve doz-cevap eğrisi Şekil 3.1’ de verilmiştir. Metöstrüs (p<0.001) ve erken diöstrüs (p<0.001) gruplarında L-arjininin dozuna bağlı olarak kasılım şiddetinin arttığı gözlemlendi. Geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım

şiddetinin değişmediği izlendi. Metöstrüs ve erken diöstrüs gruplarında en etkili L-arjinin dozunun 10^{-3} M olduğu bulundu.

L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) uygulamasının (Şekil 3.1) spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre metöstrüs grubunda kasılım şiddetini arttırdığı ($p<0.001$) izlendi. Erken diöstrüs grubunda kasılım şiddetinin spontan kasılıma göre arttığı ($p<0.001$), L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre azaldığı ($p<0.001$) belirlendi. Geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım şiddetinde spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre rakamsal olarak bir miktar artış olmakla birlikte oluşan fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı.

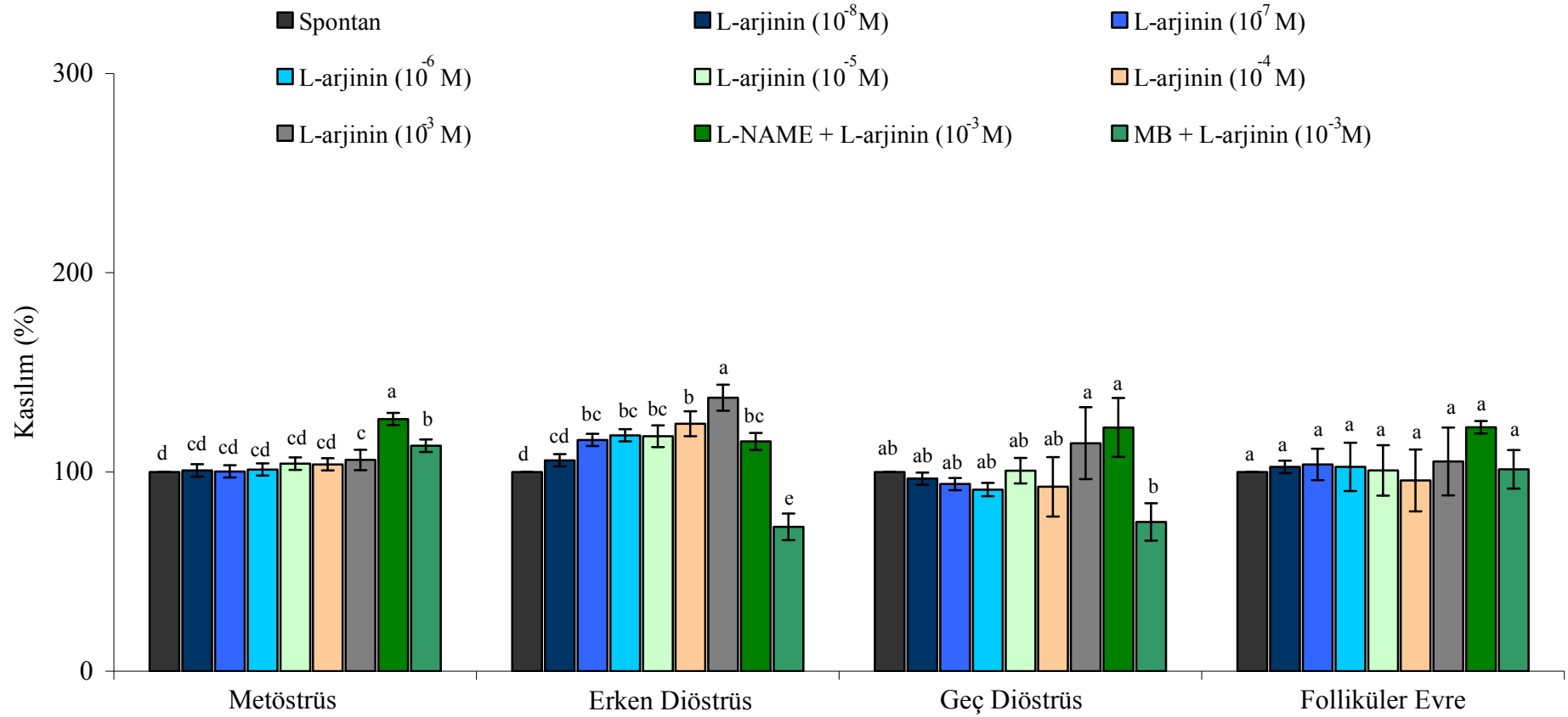
İstmusun longitudinal düz kas dokusunun MB (10^{-5} M) ile inkubasyonu sonrasında uygulanan L-arjininin (10^{-3} M) metöstrüs grubunda spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre kasılım şiddetinde artışa ($p<0.001$), erken diöstrüs grubunda azalmaya ($p<0.001$) neden olduğu belirlendi (Şekil 3.1). Yine aynı şekilde MB ile inkubasyon sonrası geç diöstrüs grubunda kasılım şiddetindeki azalmanın spontan kasılıma göre fark oluşturmadığı fakat L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre farklı olduğu ($p<0.05$) tespit edilirken; folliküler evrede istatistiksel olarak bir fark oluşmadığı belirlendi.

İstmusun sirküler düz kasına artan dozlarda uygulanan L-arjininin metöstrüs grubunda doza bağlı kasılım oluşturduğu ($p<0.001$), erken diöstrüs grubunda fark oluşturmadığı izlendi. Geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında doza bağımlı olarak kasılım şiddetini arttırdığı ($p<0.001$) ve en etkili L-arjinin dozunun 10^{-3} M olduğu belirlendi (Şekil 3.2).

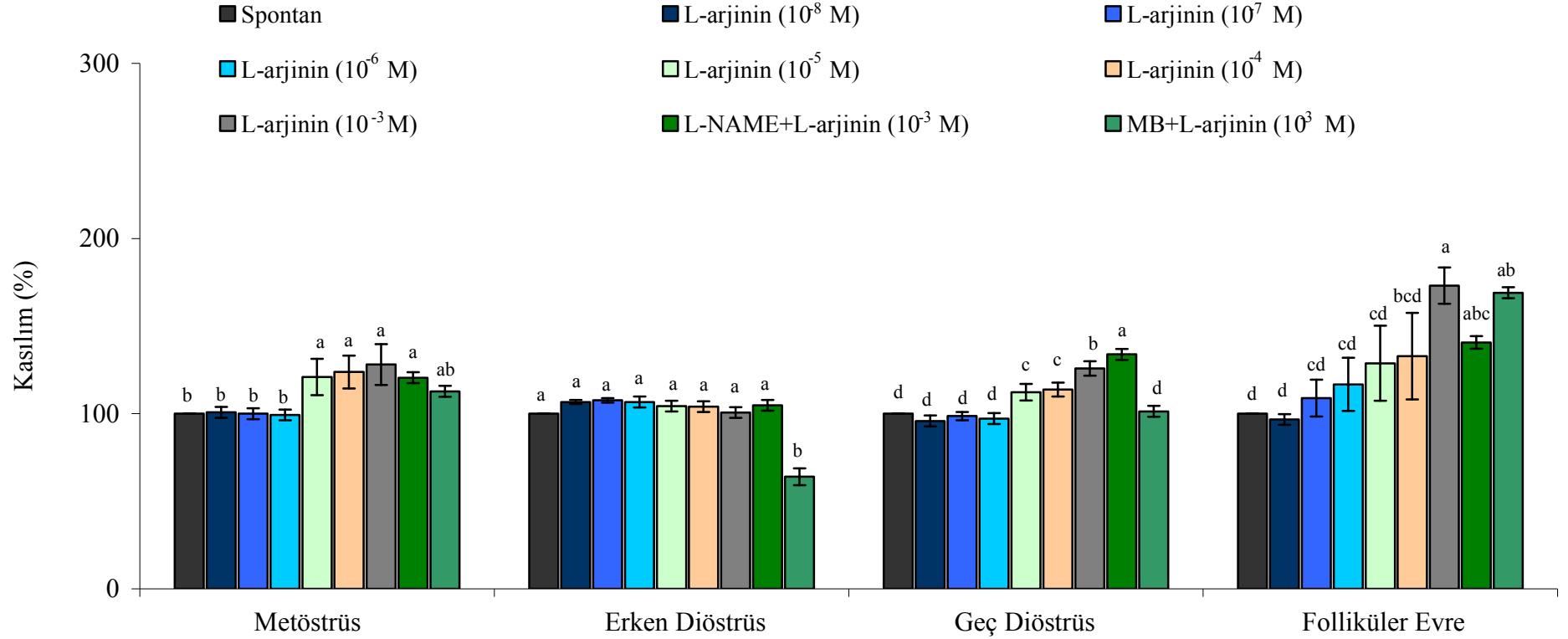
L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) uygulamasının (Şekil 3.2) metöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım şiddetini spontan kasılıma göre arttırdığı ($p<0.001$), L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre istatistiksel olarak fark oluşturmadığı gözlemlendi. Erken diöstrüs grubunda spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre kasılım şiddetinin değişmediği izlendi. Geç diöstrüs grubunda ise kasılım şiddetinin spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre arttığı ($p<0.001$) belirlendi.

İstmusun sirküler düz kas dokusunun MB ile inkubasyonu sonrasında uygulanan L-arjininin (10^{-3} M) (Şekil 3.2) metöstrüs grubunda spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre kasılım şiddetinde istatistiksel olarak

fark oluşturmadığı görüldü. Erken diöstrüs grubunda spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre kasılım şiddetinin azaldığı belirlendi ($p<0.001$). Geç diöstrüs grubunda kasılım şiddetinde spontan kasılıma göre bir fark bulunmazken L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre kasılım şiddetinin azaldığı izlendi ($p<0.001$). Folliküler evrede ise spontan kasılıma göre kasılım şiddetinin arttığı ($p<0.001$), bununla birlikte L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre kasılım şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmadığı saptandı.



Şekil 3.1 : Gruplarda istmusun longitudinal düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 10⁻³ M), L-NAME (10⁻⁵ M) + L-arginin (10⁻³ M) ve MB (10⁻⁵ M) + L-arginin (10⁻³ M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri. Her bir grupta farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur (Metöstrüs p<0.001; Erken Diöstrüs p<0.001; Geç Diöstrüs p<0.05).



Şekil 3.2 : Gruplarda istmusun sirküler düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M), L-NAME (10^{-5} M) + L-arginin (10^{-3} M) ve MB (10^{-5} M) + L-arginin (10^{-3} M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri. Her bir grupta farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur ($p < 0.001$).

Ampullanın longitudinal düz kasına L-arjininin artan dozlarda uygulanmasıyla (Şekil 3.3) metöstrüs ($p<0.001$), erken diöstrüs ($p<0.001$) ve folliküler evre ($p<0.01$) gruplarında doza bağlı şekilde kasılımin arttığı ve en etkili L-arjinin dozunun 10^{-3} M olduğu belirlendi. Geç diöstrüs grubunda kasılım şiddetinin arttığı gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak fark belirlenemedi.

L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) uygulamasının (Şekil 3.3) metöstrüste kasılım şiddetini spontan kasılıma göre arttırdığı ($p<0.001$), L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre fark oluşturmadığı gözlemlendi. Erken diöstrüs grubunda spontan kasılıma göre kasılım şiddetinin arttığı ($p<0.001$), L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre azaldığı ($p<0.001$) görüldü. Geç diöstrüs grubunda kasılım şiddetinin, spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre arttığı ($p<0.001$) izlenirken, folliküler evre grubunda ise kasılım şiddetinde spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre istatistiksel olarak bir fark oluşmadığı saptandı.

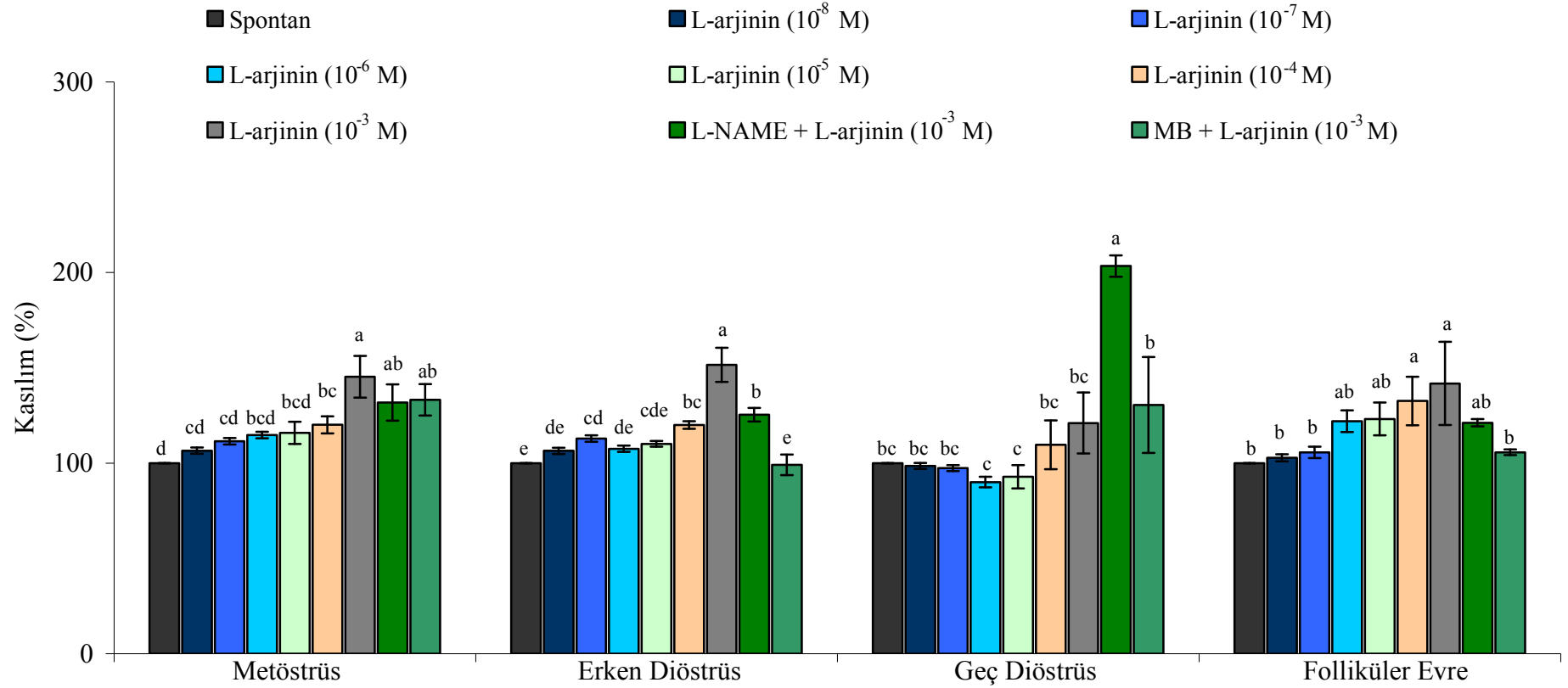
Ampullanın longitudinal düz kas dokusunun MB ile inkubasyonu sonrasında uygulanan L-arjininin (10^{-3} M) (Şekil 3.3) metöstrüs grubunda kasılım şiddetini spontan kasılıma göre arttırdığı ($p<0.001$) ancak L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre istatistiksel olarak fark oluşturmadığı gözlemlendi. Geç diöstrüs grubunda kasılım şiddetinin spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre istatistiksel olarak fark oluşturmadığı saptandı. Bununla birlikte erken diöstrüs ($p<0.001$) ve folliküler evre ($p<0.01$) gruplarında kasılım şiddetinde L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre azalma olduğu, spontan kasılıma göre fark olmadığı bulundu.

Ampullanın sirküler düz kasına L-arjininin artan dozlarda uygulanmasıyla (Şekil 3.4) metöstrüs ve erken diöstrüs gruplarında doza bağlı şekilde kasılımin arttığı ($p<0.001$) ve en etkili L-arjinin dozunun 10^{-3} M olduğu izlenirken, geç diöstrüs ve folliküler evrede kasılım şiddetinde istatistiksel olarak fark oluşmadığı saptandı.

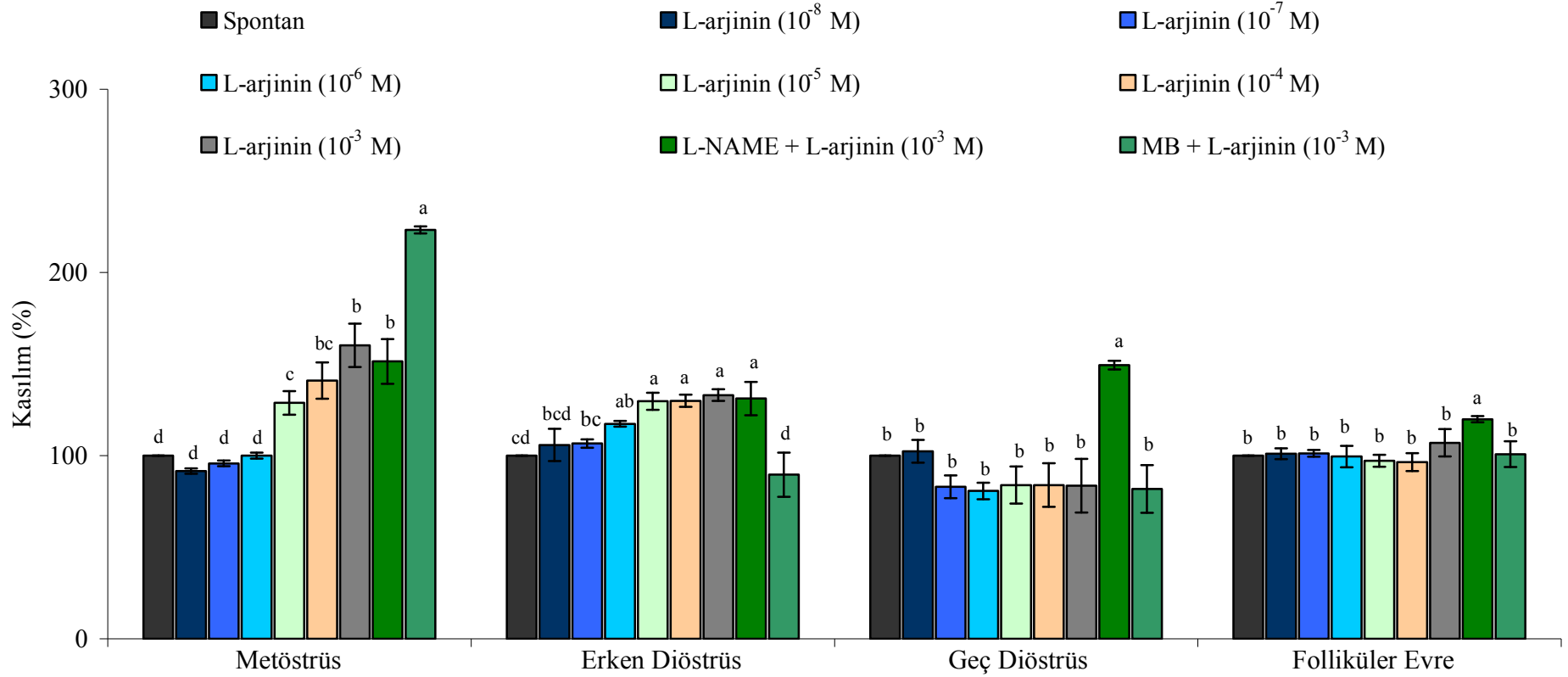
L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) uygulamasının (Şekil 3.4) metöstrüs ve erken diöstrüs gruplarında kasılım şiddetini spontan kasılıma göre arttırdığı ($p<0.001$), L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre değiştirmedığı gözlemlendi. Geç diöstrüs ($p<0.001$) ve folliküler evre ($p<0.01$) gruplarında kasılım şiddetinin spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre arttığı saptandı.

Ampullanın sirküler düz kas dokusunun MB ile inkubasyonu sonrasında uygulanan L-arjininin (10^{-3} M) (Şekil 3.4) metöstrüs grubunda kasılım şiddetini spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre arttırdığı ($p<0.001$) gözlemlendi. Erken diöstrüste kasılım şiddeti ile spontan kasılım arasında fark oluşmazken, L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre azaldığı ($p<0.001$) izlendi. Geç diöstrüs ve folliküler evrede ise kasılım şiddetinin spontan kasılıma ve L-arjininin (10^{-3} M) yalnız uygulanmasına göre istatistiksel olarak fark oluşturmadığı gözlemlendi.

Sunulan çalışmada gruplara göre logaritmik olarak artan dozlarda uygulanan L-arjinin, L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) ve MB (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) uygulamalarının istmus ve ampullanın longitudinal ve sirküler kas dokularında gösterdikleri cevaplar toplu olarak Çizelge 3.3' de verilmiştir.



Şekil 3.3: Gruplarda ampullanın longitudinal düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arjinin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M), L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) ve MB (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri. Her bir grupta farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur (Metöstrüs $p < 0.001$; Erken Diöstrüs $p < 0.001$; Geç Diöstrüs $p < 0.001$; Folliküler Evre $p < 0.01$).



Şekil 3.4: Gruplarda ampullanın sirküler düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 10⁻³ M), L-NAME (10⁻⁵ M) + L-arginin (10⁻³ M) ve MB (10⁻⁵ M) + L-arginin (10⁻³ M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri. Her bir grupta farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur (Metöstrüs p<0.001; Erken Diöstrüs p<0.001; Geç Diöstrüs p<0.001; Folliküler Evre p<0.01).

3.4. Oviduktta Sodyum Nitro Prusid (SNP) Uygulaması Sonrasında Oluşan İzometrik Kasılım Değerleri (%)

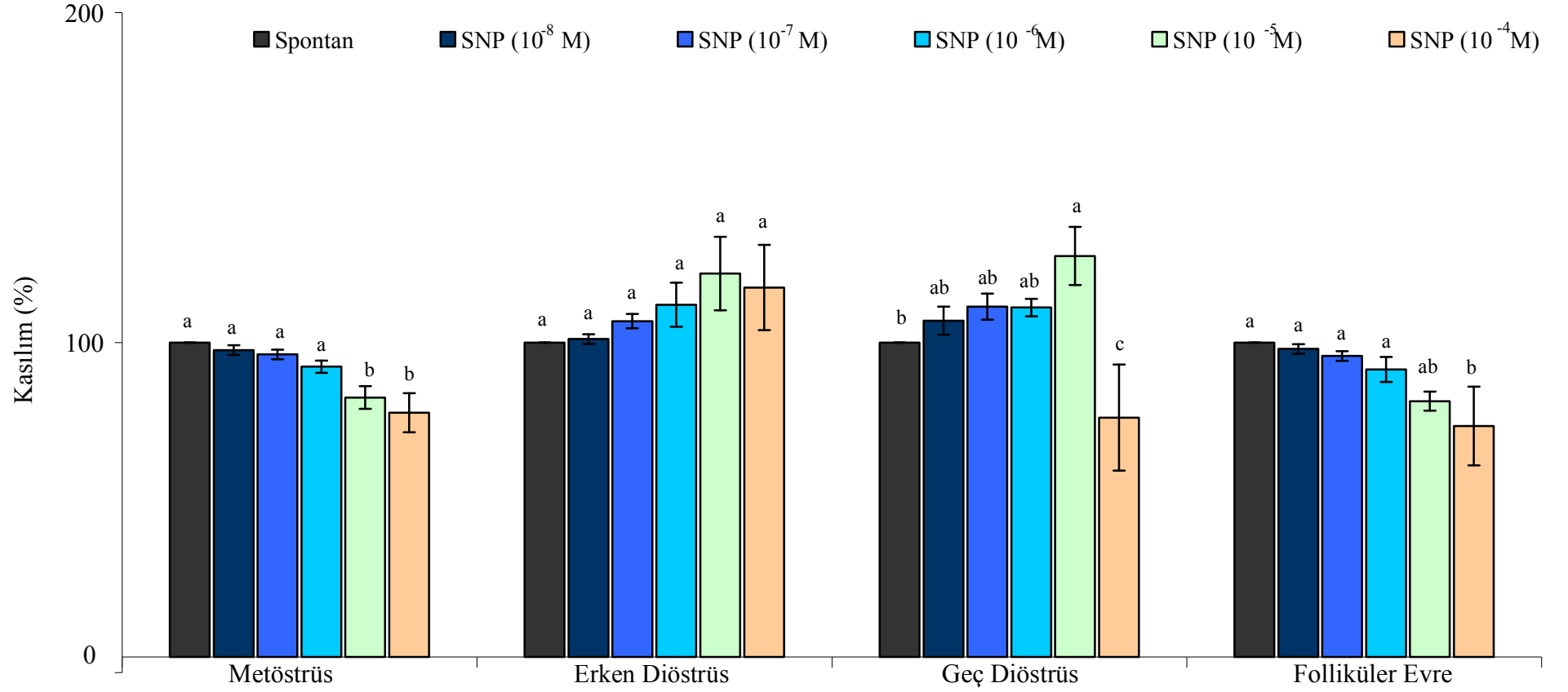
İstmusun longitudinal düz kasına SNP' nin artan dozlarda uygulanmasıyla metöstrüs ($p<0.001$) ve folliküler evre ($p<0.05$) gruplarında doza bağımlı şekilde kasılımda azalmanın meydana geldiği ve SNP' nin 10^{-4} M dozunun toksik doz olduğu izlendi. Erken diöstrüs grubunda kasılım şiddetinde rakamsal olarak bir artış izlenmekle birlikte istatistiksel olarak fark gözlenmedi. Bunun yanı sıra SNP' nin 10^{-4} M dozunun 10^{-5} M dozuna göre kasılım şiddetinde sayısal olarak azalmaya neden olduğu belirlendi. Geç diöstrüs grubunda doza bağımlı şekilde kasılım şiddetinin arttığı ($p<0.001$), SNP' nin 10^{-4} M dozunun ise toksik etki oluşturduğu görüldü (Şekil 3.5).

İstmusun sirküler düz kasına SNP' nin artan dozlarda uygulanmasıyla (Şekil 3.6) metöstrüs, erken diöstrüs, geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım şiddetinde doza bağımlı şekilde azalma olduğu ($p<0.001$) ve SNP' nin 10^{-4} M dozunun toksik etki oluşturduğu görüldü.

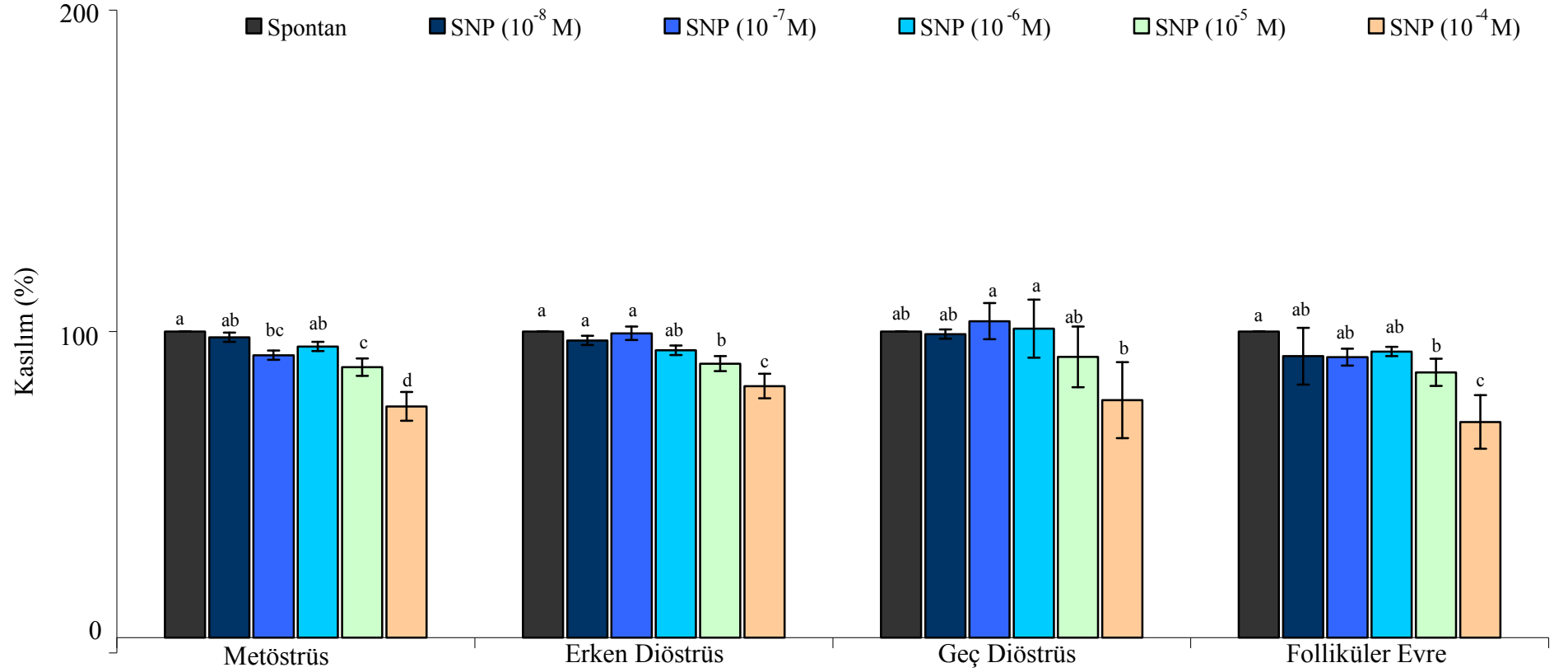
Ampullanın longitudinal düz kasına SNP' nin artan dozlarda uygulanmasıyla (Şekil 3.7) kasılım şiddetinde metöstrüs grubunda doza bağımlı bir azalmanın ($p<0.001$) olduğu izlendi. Erken diöstrüs grubunda istatistiksel olarak fark oluşmadığı gözlemlendi. Geç diöstrüs grubunda kasılım şiddetinde SNP' nin 10^{-6} M dozuna kadar artış ($p<0.05$) belirlenirken SNP' nin 10^{-5} ve 10^{-4} M dozlarının sayısal olarak kasılım şiddetinde azalmaya neden olduğu ancak spontan kasılımla istatistiksel olarak fark oluşturmadığı görüldü. Folliküler evre grubunda kasılım şiddetinde doza bağımlı şekilde azalma olduğu ($p<0.001$) ve SNP' nin 10^{-4} M dozunun toksik doz olduğu izlendi.

Ampullanın sirküler düz kasına SNP' nin artan dozlarda uygulanmasıyla (Şekil 3.8) metöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım şiddetinde doza bağımlı azalma ($p<0.001$) izlenirken, 10^{-4} M dozundaki SNP' nin toksik doz olduğu belirlendi. Erken diöstrüs ve geç diöstrüs gruplarında kasılım şiddetinde istatistiksel olarak fark oluşmadığı gözlemlendi.

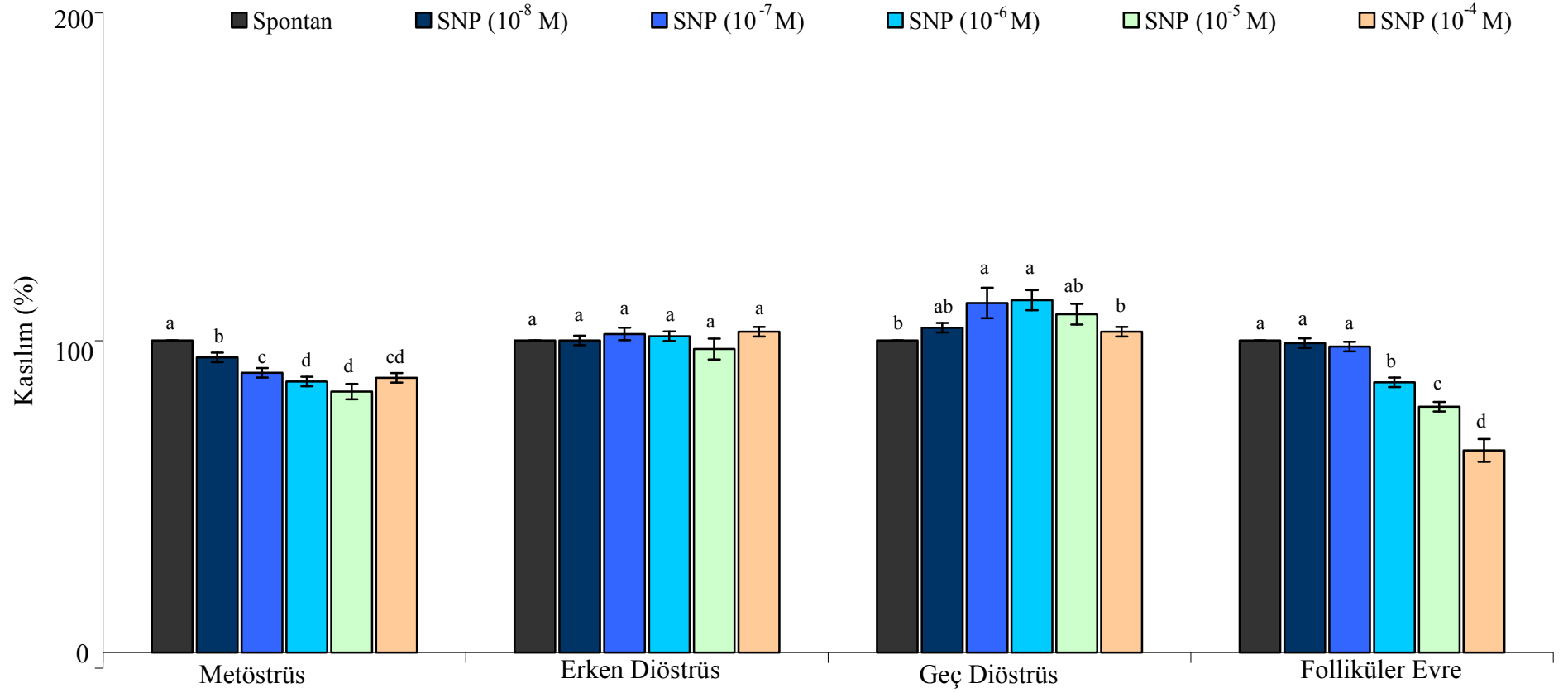
Sunulan çalışmada gruplara göre logaritmik olarak artan dozlarda uygulanan SNP uygulamasının istmus ve ampullanın longitudinal ve sirküler kas dokularında gösterdikleri cevaplar toplu olarak Çizelge 3.3' de verilmiştir.



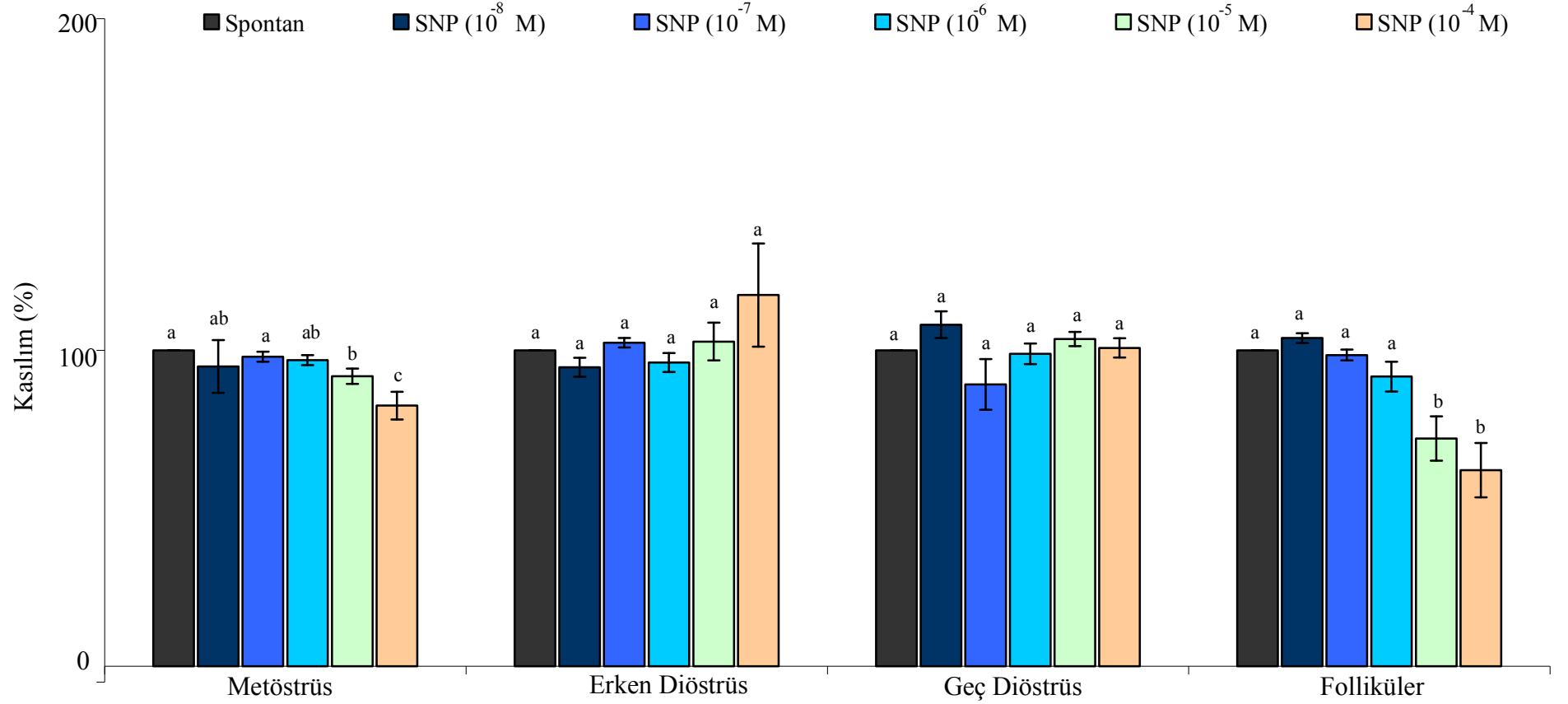
Şekil 3.5: Gruplarda istmusun longitudinal düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri. Her bir grupta farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur (Metöstrüs p<0.001; Geç Diöstrüs p<0.001; Folliküler Evre p<0.05).



Şekil 3.6: Gruplarda istmusun sirküler düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri. Her bir grupta farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 3.7: Gruplarda ampullanın longitudinal düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri. Metöstrüs, geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur (Metöstrüs p<0.001); Geç Diöstrüs p<0.05; Folliküler Evre p<0.001)



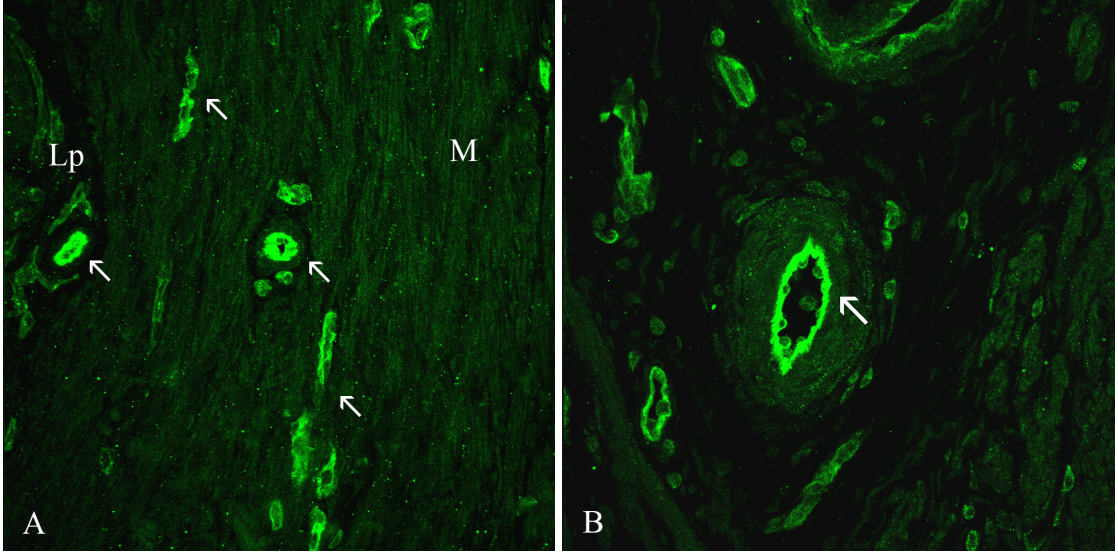
Şekil 3.8: Gruplarda ampullanın sirküler düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M) varlığında oluşan yüzde (%) kasılım değerleri. Metöstrüs ve folliküler evre gruplarında farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur (p<0.001).

Çizelge 3.3: Gruplara göre istmus ve ampullanın longitudinal ve sirküler kas dokularında logaritmik olarak artan dozlarda uygulanan L-arjinin ve SNP ile L-NAME (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) ve MB (10^{-5} M) + L-arjinin (10^{-3} M) uygulamalarının kasılım şiddetinde oluşturdukları değişimler

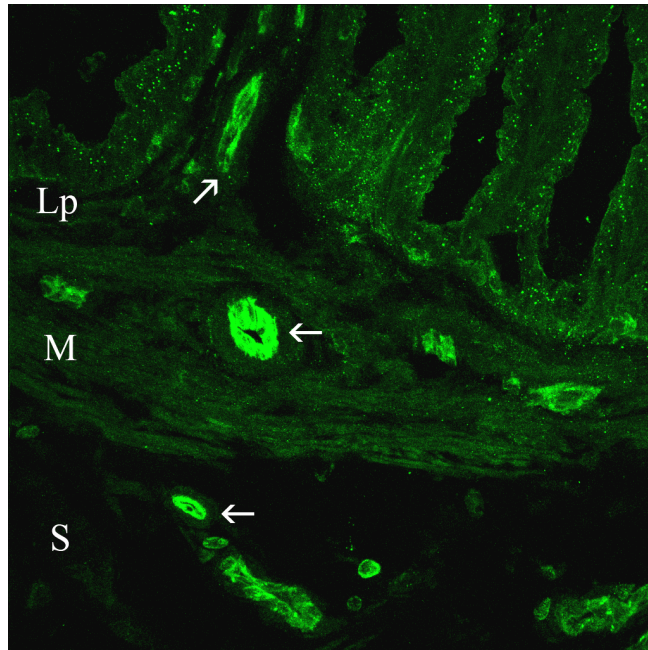
		Metöstrüs	Erken Diöstrüs	Geç Diöstrüs	Foliküler Evre
İstmus Longitudunal	L-arjinin (artan dozlarda)	artış	artış	değişme yok	değişme yok
	SNP (artan dozlarda)	azalma	değişme yok	artış	azalma
	L-NAME+L-arjinin (10^{-3})	artış	azalma	değişme yok	değişme yok
	MB+L-arjinin (10^{-3})	artış	azalma	azalma	değişme yok
İstmus Sirküler	L-arjinin (artan dozlarda)	artış	değişme yok	artış	artış
	SNP (artan dozlarda)	azalma	azalma	azalma	azalma
	L-NAME+L-arjinin (10^{-3})	değişme yok	değişme yok	artış	değişme yok
	MB+L-arjinin (10^{-3})	değişme yok	azalma	azalma	değişme yok
Ampulla Longitudunal	L-arjinin (artan dozlarda)	artış	artış	değişme yok	artış
	SNP (artan dozlarda)	azalma	değişme yok	değişme yok	azalma
	L-NAME+L-arjinin (10^{-3})	değişme yok	azalma	artış	değişme yok
	MB+L-arjinin (10^{-3})	değişme yok	azalma	değişme yok	azalma
Ampulla Sirküler	L-arjinin (artan dozlarda)	artış	artış	değişme yok	değişme yok
	SNP (artan dozlarda)	azalma	değişme yok	değişme yok	azalma
	L-NAME+L-arjinin (10^{-3})	değişme yok	değişme yok	artış	artış
	MB+L-arjinin (10^{-3})	artış	azalma	değişme yok	değişme yok

3.5. Ovidukt Dokusunda Nitrik Oksit Sentaz Enzimlerinin İmmünohistokimyasal Olarak Dağılımları

Endotelial NOS immunreaktivitesi (eNOS-ir)' nin immunohistokimyasal değerlendirmede tüm gruplarda istmus ve ampullanın seroza, kas katmanı ve lamina propriasındaki kan damarları endotelinde pozitif sonuç verdiği gözlemlendi (Şekil 3.9, 3.10).



Şekil 3.9: İstmusun lamina propria ve muskuler katmanları (A) ile seroza katmanındaki (B) kan damarları endotelinde eNOS-ir. Ok: Kan damarı endotel, Lp: Lamina propria, M: Muskuler katman (büyütme: 40x).



Şekil 3.10: Ampullanın seroza ve muskuler katmanları ile lamina propriyasında bulunan kan damarları endotelinde eNOS-ir. Lp: Lamina propria, M: Muskuler katman, S: Seroza (büyütme: 40x).

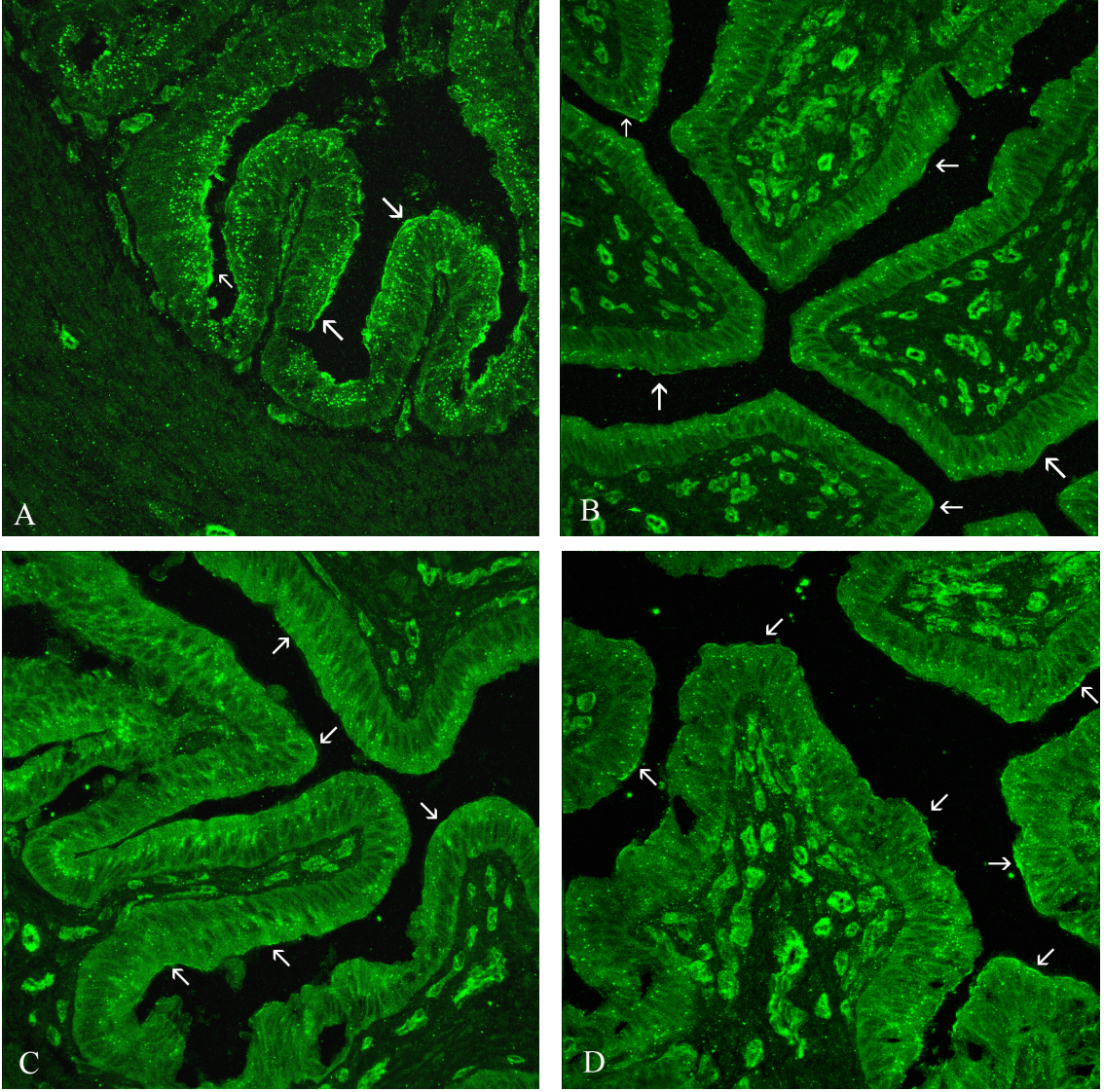
Epitelyumdaki eNOS-ir' in, tüm grupların istmus ve ampullasında epitel hücrelerin lumene bakan yüzünde yer yer ve çizgi tarzında lokalize olduğu gözlemlendi. Diğer taraftan istmustaki boyanmanın ampullaya göre daha belirgin olarak izlenebildiği dikkati çekti. Epitelyumun eNOS ile immunohistokimyasal olarak boyanma şiddetleri incelendiğinde istmus ve ampullada gruplar arasında fark ($p<0.001$) olduğu belirlendi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4: Tüm gruplarda istmus ve ampullanın epitel tabakasında izlenen eNOS-ir skorları.

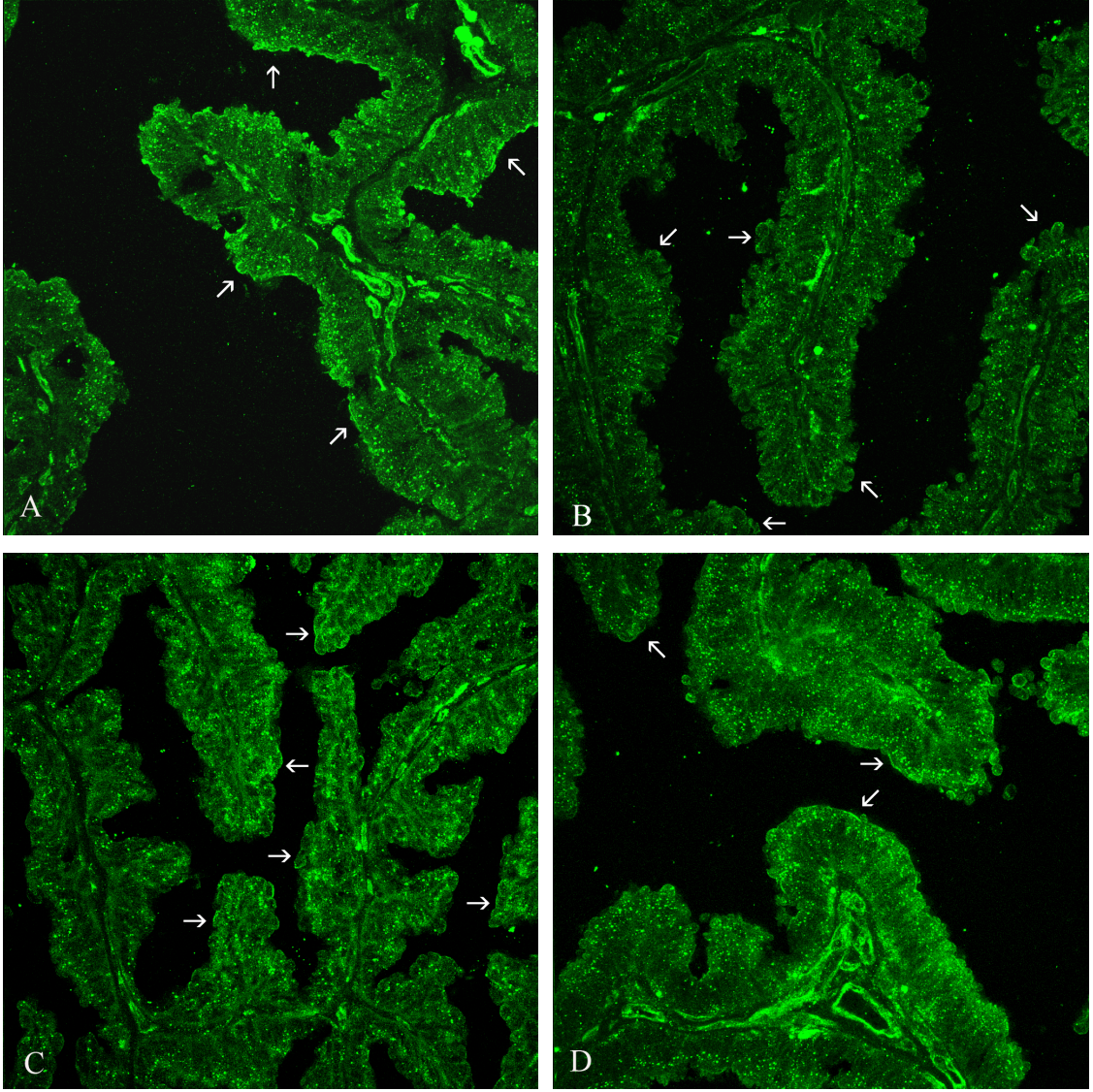
	Gruplar			
	Metöstrüs	Erken Diöstrüs	Geç Diöstrüs	Foliküler Evre
İstmus (n:24)	3.83 ± 0.16 ^a	1.50 ± 0.22 ^c	1.66 ± 0.16 ^c	2.66 ± 0.16 ^b
Ampulla (n:24)	3.50 ± 0.22 ^a	1.33 ± 0.21 ^c	1.50 ± 0.22 ^c	2.33 ± 0.33 ^b

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

İstmus (Şekil 3.11) ve ampullanın (Şekil 3.12) epitelyum tabakasında izlenen eNOS-ir' in, metöstrüs grubunda diğer gruplara göre en şiddetli reaksiyonu gösterdiği ve metöstrüs grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark oluşturduğu gözlemlendi ($p<0.001$). Erken diöstrüs grubunda istmus ve ampullanın epitelyum tabakasındaki boyanma şiddetlerinin geç diöstrüs grubuna göre daha az olduğu ancak istatistiksel olarak fark oluşturmadığı belirlendi. Geç diöstrüs grubunda istmus ve ampulladaki boyanma şiddetlerinin foliküler evre ve metöstrüs gruplarına göre daha az olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). Foliküler evre grubunda ise istmus ve ampullada boyanma şiddetlerinin metöstrüs grubuna göre daha az, erken ve geç diöstrüs gruplarına göre daha fazla olduğu izlenirken, foliküler evre grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p<0.001$).

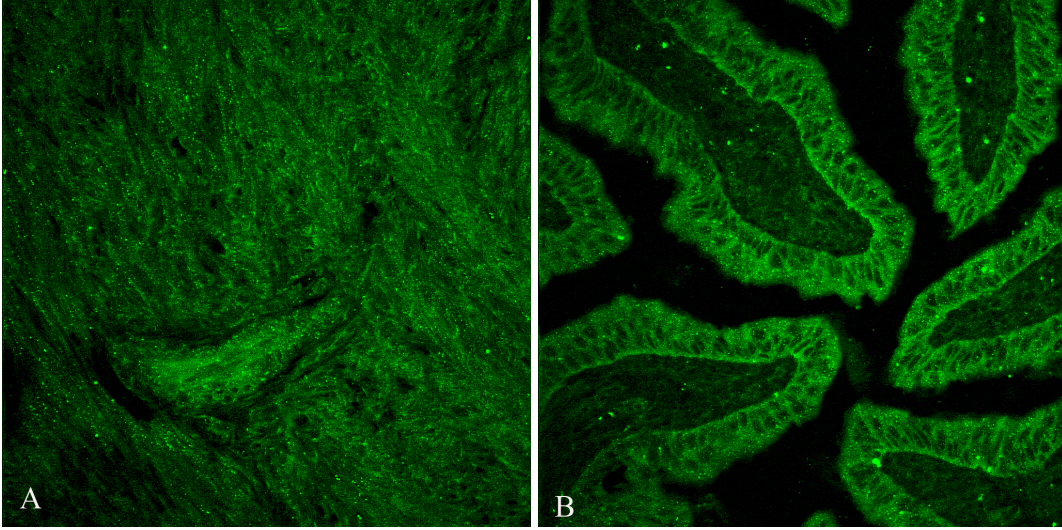


Şekil 3.11: Gruplarda istmusun epitel hücrelerinin lumene bakan yüzünde çizgi tarzında lokalize olmuş eNOS-ir. Metöstrüs grubunda şiddetli (A), erken diöstrüs (B) ile geç diöstrüs (C) gruplarında zayıf ve folliküler evre grubunda orta (D) şiddette reaksiyon gösteren eNOS-ir (büyütme: 40x).



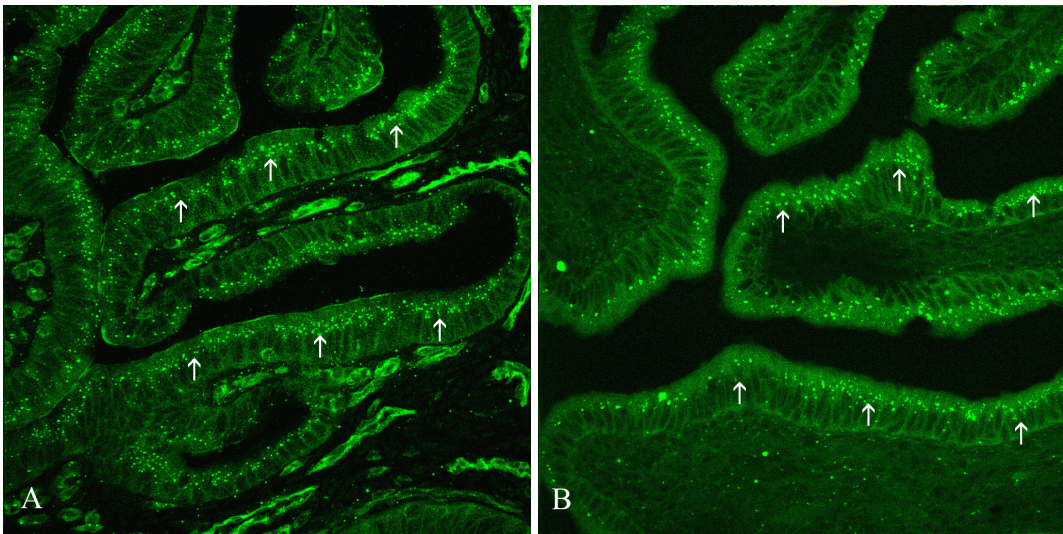
Şekil 3.12: Gruplarda ampullanın epitel hücrelerinin lumene bakan yüzünde çizgi tarzında lokalize olmuş eNOS-ir. Metöstrüs grubunda şiddetli (A), erken diöstrüs (B) ile geç diöstrüs (C) gruplarında zayıf ve folliküler evre grubunda orta (D) şiddette reaksiyon gösteren eNOS-ir (büyütme: 40x).

Primer antiserumun çıkarılması ve non-immun serumun yer değiştirilmesiyle yapılan kontrol boyamalarında eNOS için immunreaksiyonun spesifik olduğu belirlendi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: Endotelial NOS için primer antiserum çıkarılması (A) ve non-immun serumun yer değiştirilmesiyle (B) yapılan kontrol boyamaları (büyütme: 40x).

Tüm gruplarda eNOS yönünden istmus ve ampullada gerçekleştirilen immünohistokimyasal boyamalar sırasında epitelyumda immunfloresans yanıt veren nokta şeklinde yapılar dikkati çekti. Bu nedenle preparatlar sadece sekonder antiserum ile boyanarak incelendi. Daha sonra aynı preparatlar normal prosedüre göre boyandı. Epitelyum tabakasında nokta şeklindeki bu yapıların her iki durumda da immunfloresans yanıt verdiği belirlendi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14: Aynı sahada bulunan epitel tabakada primer antiserum (A) ve sadece sekonder antiserum (B) ile boyama sonrası immunfloresans yanıt veren nokta şeklindeki yapılar (büyütme: 40x).

Nöronal NOS immunreaktivitesi (nNOS-ir) tüm gruplarda istmus ve ampullanın epitel hücrelerinde izlendi. Bununla birlikte, sinir fibrillerinin seroza ve muskuler katman ile lamina propriada pozitif nNOS-ir gösterdiği belirlendi.

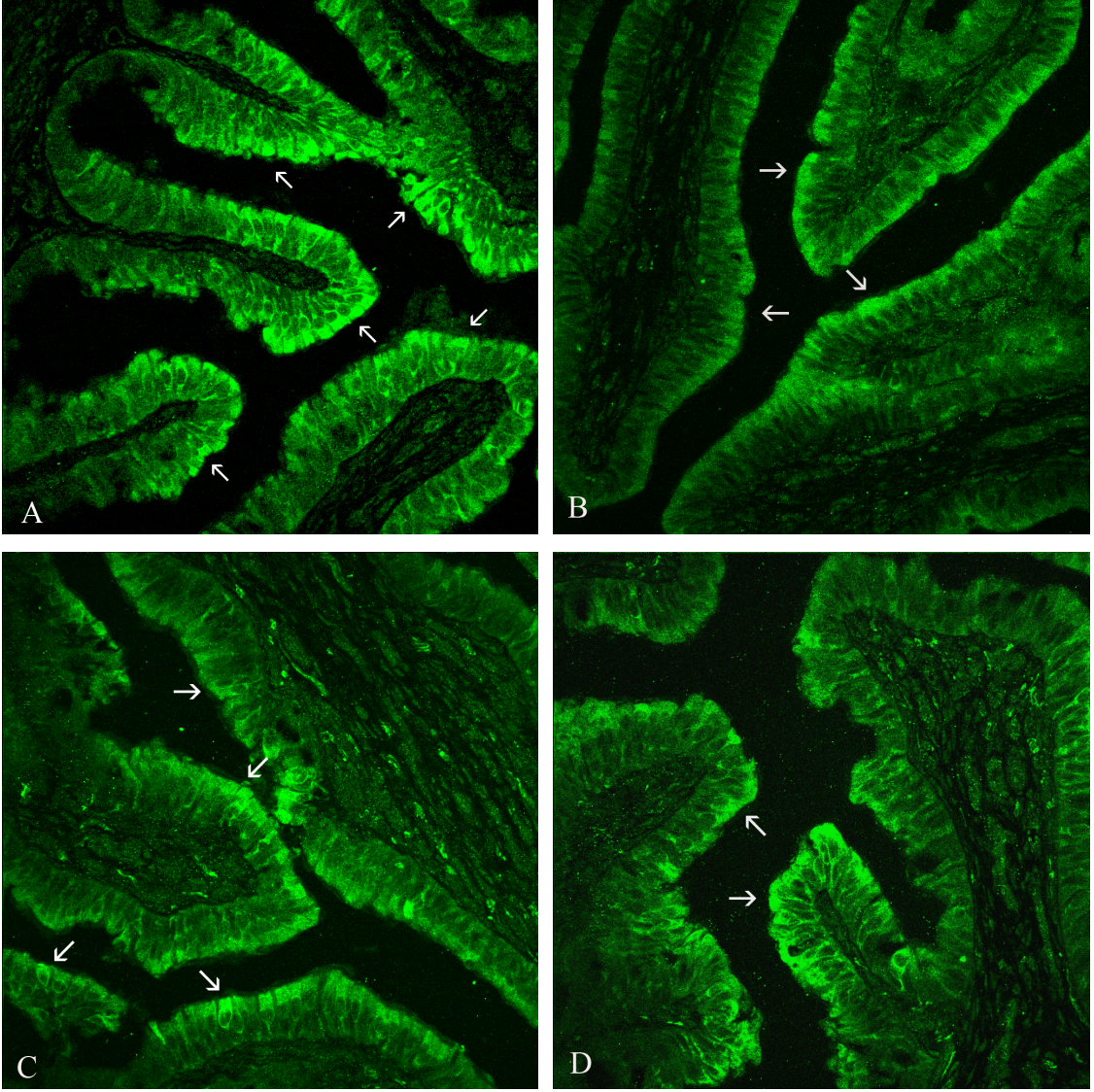
Bütün gruplar içerisinde özellikle istmusun epitel hücrelerindeki boyanmanın ampullaya göre daha belirgin olarak görülebildiği ve boyanmanın epitelyumun lumene bakan yüzünden lamina propriaya kadar uzandığı izlendi. Epitelyumun nNOS ile immunohistokimyasal olarak boyanma şiddetleri incelendiğinde, istmus (Şekil 3.15) ve ampullada (Şekil 3.16) gruplar arasında fark ($p<0.001$) bulundu (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5: Tüm gruplarda istmus ve ampullanın epitelyum tabakasında izlenen nNOS-ir skorları.

	Gruplar			
	Metöstrüs	Erken Diöstrüs	Geç Diöstrüs	Foliküler Evre
İstmus (n:24)	3.66 ± 0.21 ^a	1.83 ± 0.16 ^c	2.66 ± 0.21 ^b	3.33 ± 0.21 ^a
Ampulla (n:24)	2.83 ± 0.16 ^a	1.00 ± 0.25 ^c	1.83 ± 0.16 ^b	2.66 ± 0.42 ^a

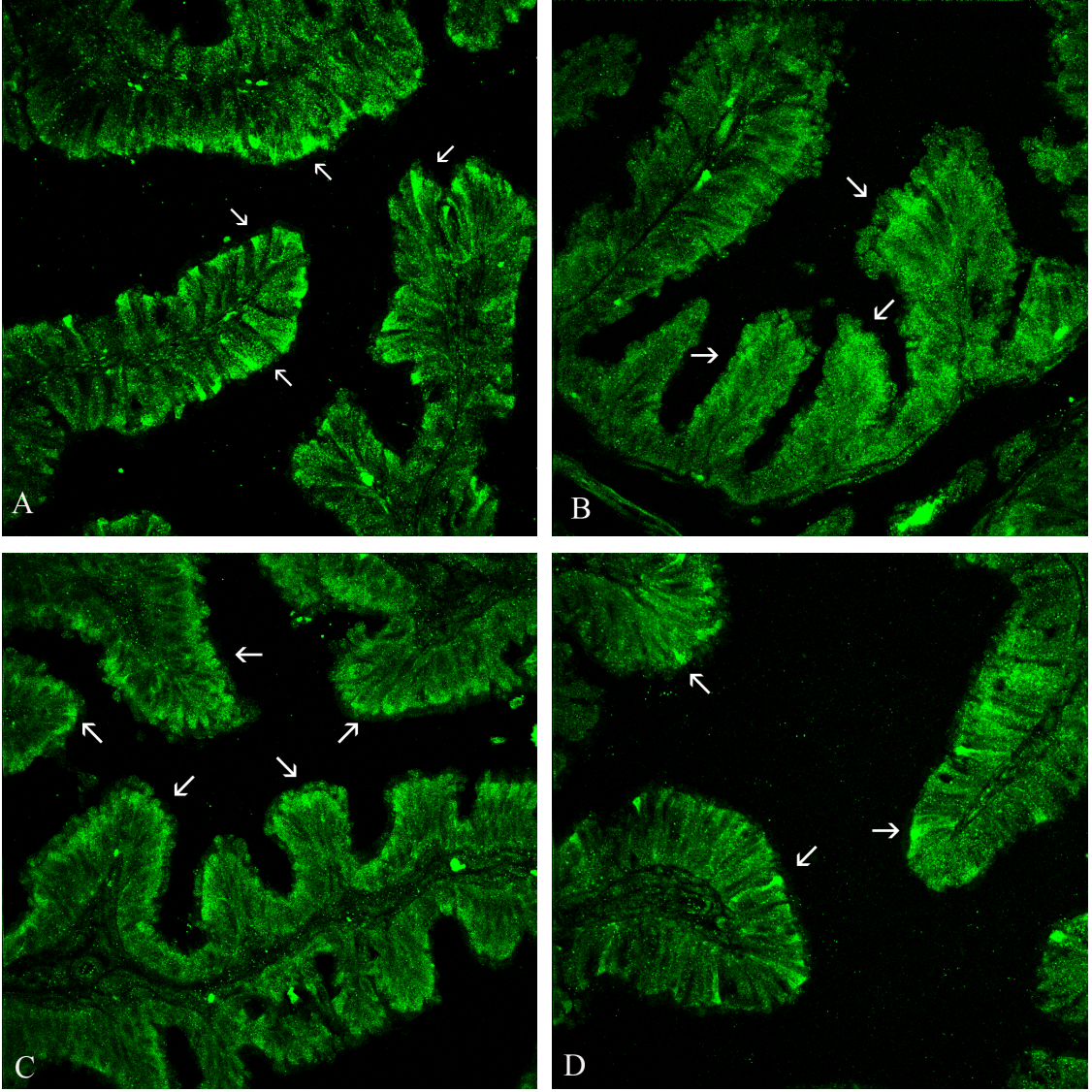
Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur ($p<0.001$).

İstmusun epitelyum tabakasının metöstrüs grubunda şiddetli derecede boyandığı, boyanma şiddeti açısından, erken ve geç diöstrüs grupları ile istatistiksel olarak fark ($p<0.001$) oluşurken foliküler evre grubuyla fark oluşmadığı bulundu. Erken diöstrüs grubunda boyanma şiddetinin zayıf olduğu ve diğer gruplara göre fark olduğu görüldü ($p<0.001$). Geç diöstrüs grubunda boyanma şiddetinin orta derece olduğu ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak fark oluşturduğu belirlendi ($p<0.001$). Foliküler evre grubunda ise şiddetli derecede izlenen nNOS-ir' in erken ve geç diöstrüs gruplarına göre fark oluşturduğu izlendi ($p<0.001$).



Şekil 3.15: Gruplarda istmusun epitel hücrelerinin lumene bakan yüzünden lamina propriaya kadar uzanan nNOS-ir. Metöstrüs grubunda (A) şiddetli, erken diöstrüs (B) grubunda zayıf, geç diöstrüs (C) grubunda orta ve folliküler evre grubunda (D) şiddetli reaksiyon gösteren nNOS-ir (büyütme: 40x).

Ampullanın epitelyum tabakasının metöstrüs ve folliküler evre gruplarında orta derecede, erken diöstrüs ve geç diöstrüs gruplarında zayıf derecede boyanma gösterdiği izlenirken gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$).

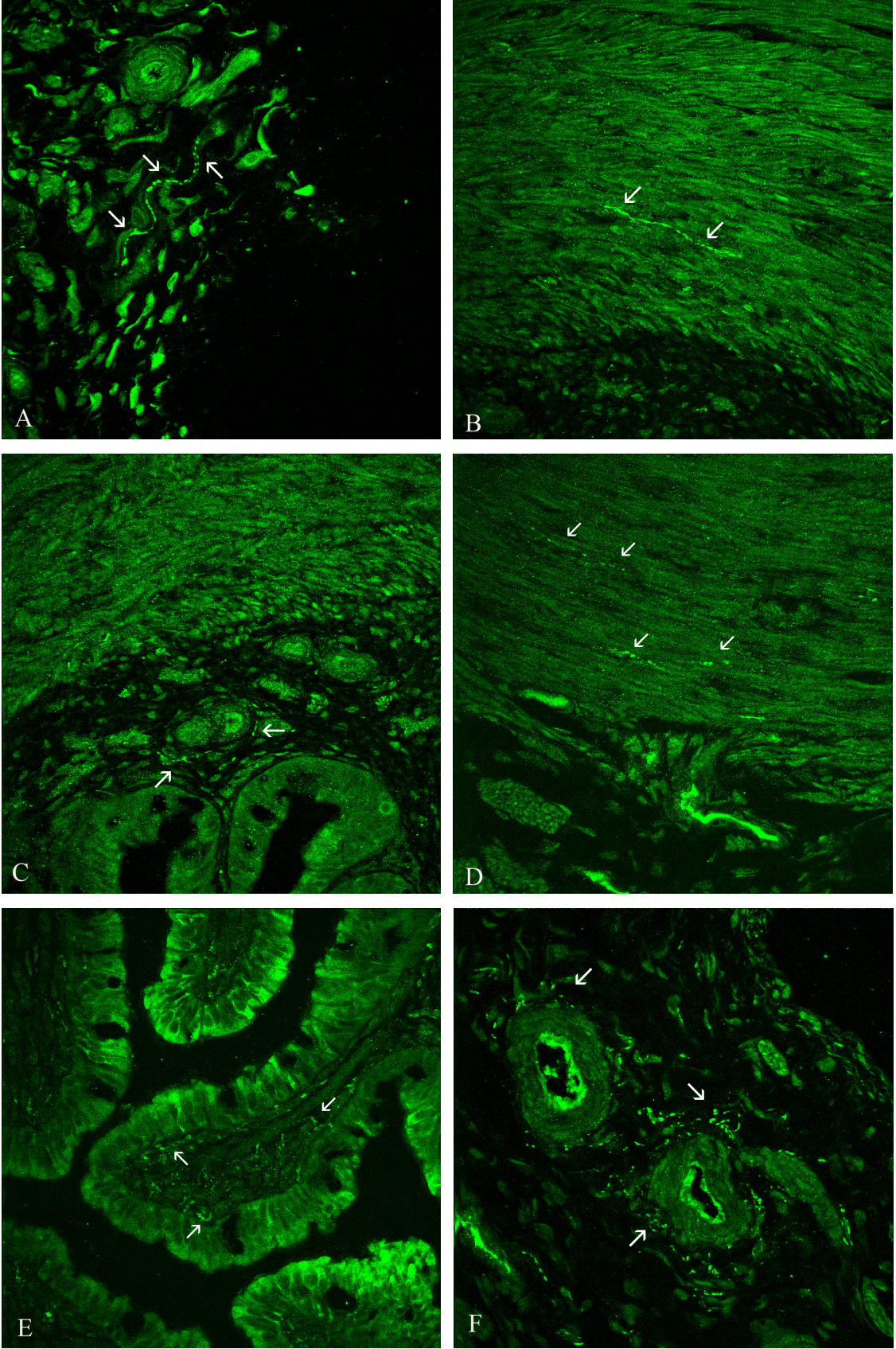


Şekil 3.16: Gruplarda ampulanın epitel hücrelerinin lumene bakan yüzünden lamina propriaya kadar uzanan nNOS-ir. Metöstrüs grubunda (A) orta, erken diöstrüs (B) ve geç diöstrüs (C) gruplarında zayıf ve folliküler evre grubunda (D) orta derecede reaksiyon gösteren nNOS-ir (büyütme: 40x).

İsthmusta seroza ve muskuler katman ile lamina propriada bulunan sinir fibrillerinde pozitif nNOS-ir bütün gruplarda gözlendi (Çizelge 3.6). Follüküler evre grubunda daha fazla sayıda sinir fibrilinin pozitif boyama verdiği belirlendi (Şekil 3.17).

Çizelge 3.6:Gruplarda istmusta pozitif nNOS-ir gösteren sinir fibrillerinin buldukları yerlere göre görülme sıklıkları. S: Seroza katmanı, M: Muskuler katman, Lp: Lamina propria.

	Kan damarları çevresindeki sinir fibrilleri			Sinir fibrilleri		
	S	M	Lp	S	M	Lp
Metöstrüs	(+)	-	-	+	(+)	-
Erken Diöstrüs	+	-	+	(+)	(+)	-
Geç Diöstrüs	++	-	-	+	++	+
Follüküler Evre	++++	-	-	+++	++	++++

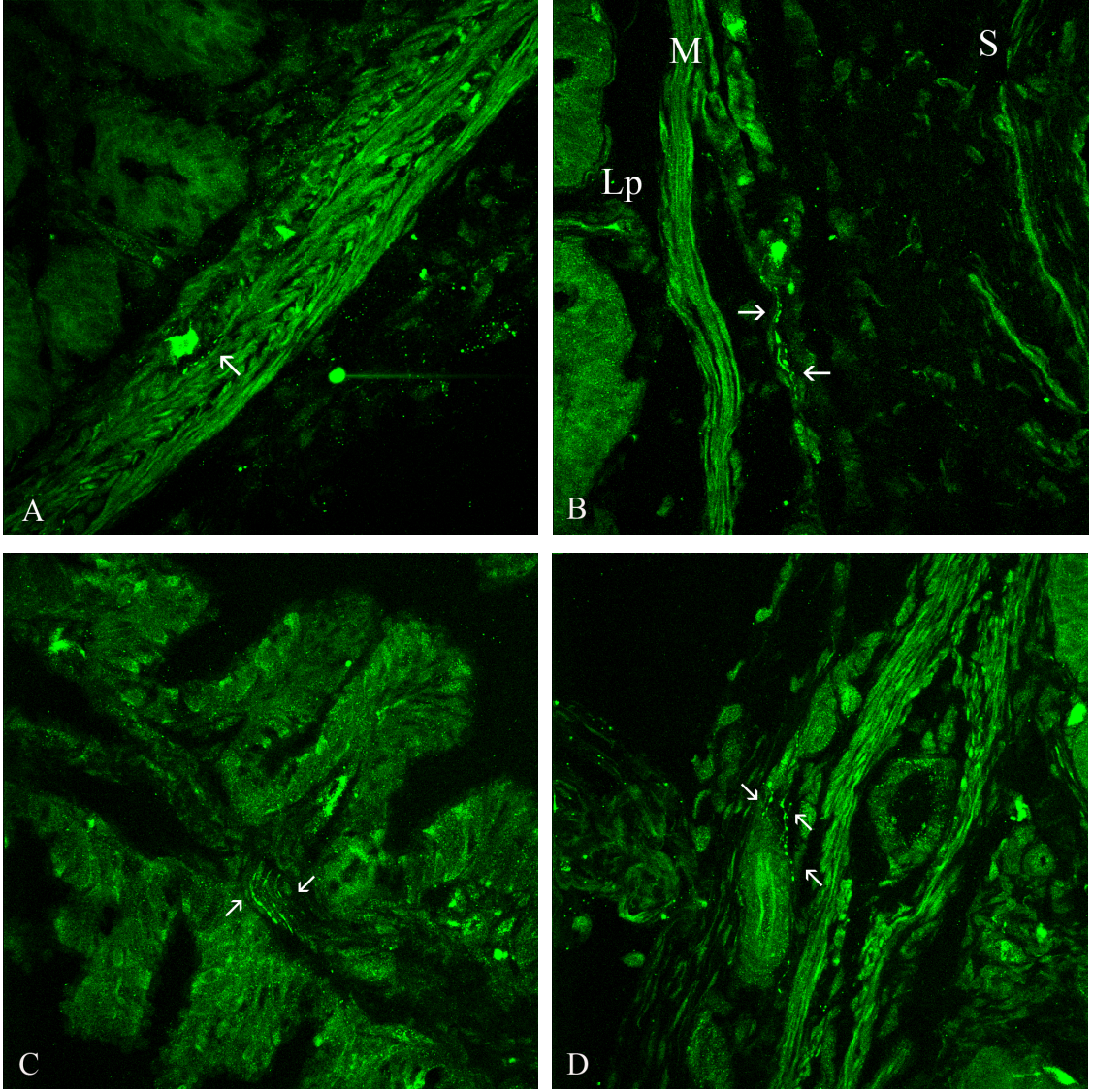


Şekil 3.17: İstmusta metöstrüs grubunda serozada (A), erken diöstrüs grubunda muskuler katmanda (B) ve lamina propriada (C), geç diöstrüs grubunda muskuler katmanda (D), folliküler evre grubunda lamina propriada (E) ve serozada kan damarları çevresinde (F) sinir fibrilleri (büyütme: 40x).

Ampulla kısmında, pozitif boyama gösteren sinir fibrillerinin çoğunlukla perioovulatr evrede olduğu belirlendi (Çizelge 3.7, Şekil 3.18).

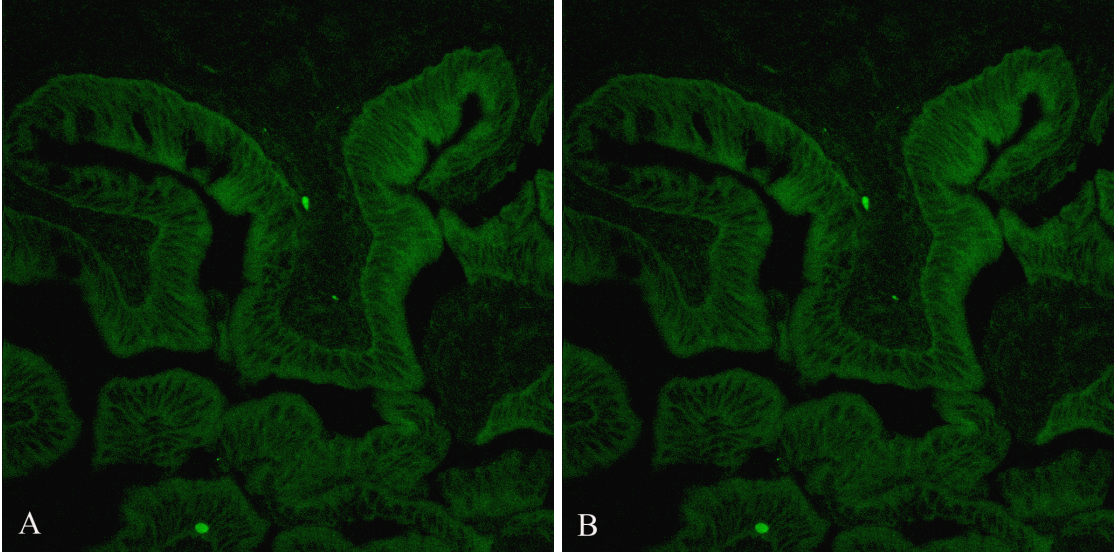
Çizelge 3.7: Gruplarda ampullada pozitif nNOS-ir gösteren sinir fibrillerinin buldukları yerlere göre görülme sıklıkları. S: Seroza katmanı, M: Muskuler katman, Lp: Lamina propria.

	Kan damarları çevresindeki sinir fibrilleri			Sinir fibrilleri		
	S	M	Lp	S	M	Lp
Metöstrüs	+	-	-	+	+	-
Erken Diöstrüs	-	-	-	+	-	-
Geç Diöstrüs	(+)	-	-	-	-	-
Foliküler Evre	+++	-	-	++	++	+++



Şekil 3.18: Ampullada metöstrüs grubunda muskuler katmanda (A), erken diöstrüs grubunda serozada (B), follüküler evre grubunda lamina propriada (C) ve seroza katmanında (D) sinir fibrilleri. S: Seroza katmanı, M: Muskuler katman, Lp: Lamina propria (büyütme: 40x).

Primer antiserumun çıkarılması ve non-immun serumun yer değiştirilmesiyle yapılan kontrol boyamalarında nNOS için immunreaksiyonun spesifik olduğu belirlendi (Şekil 3.19).

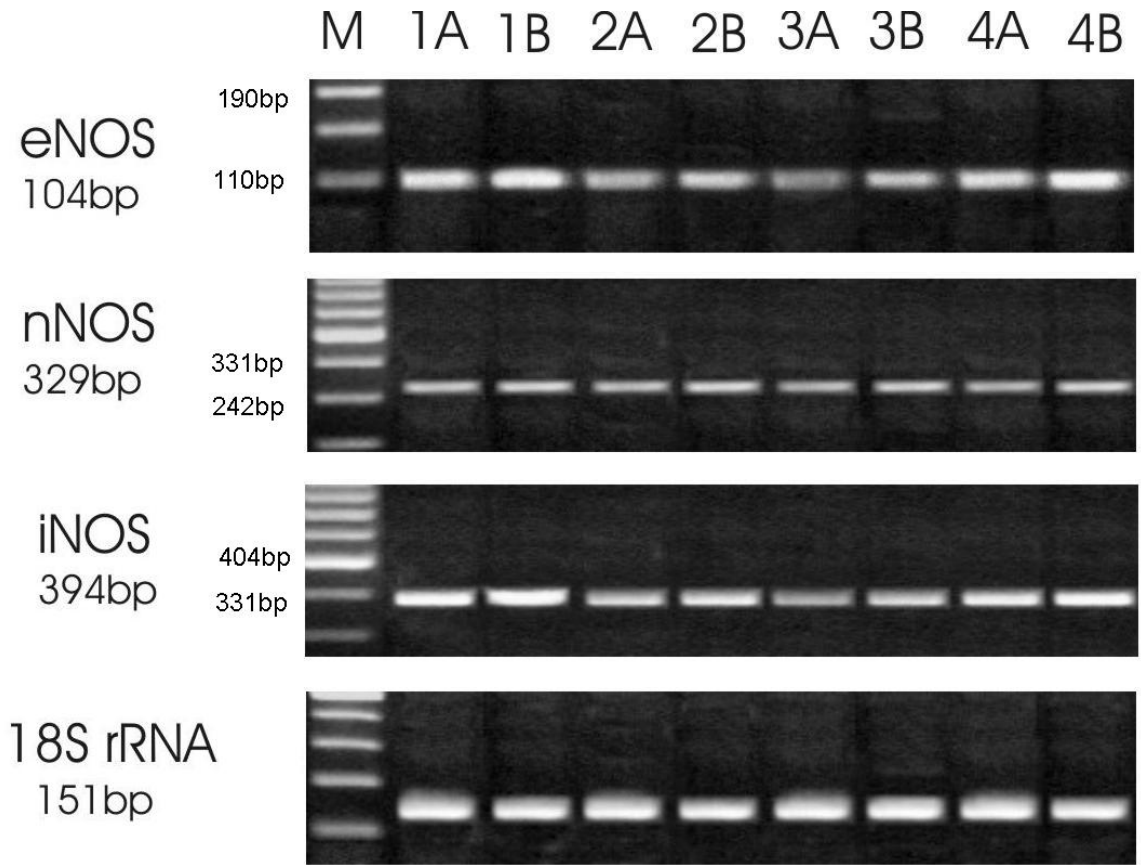


Şekil 3.19: Nöronal NOS için primer antiserum çıkarılması (A) ve non-immun serumun yer değiştirilmesiyle (B) yapılan kontrol boyamaları (büyütme: 40x).

Uyarılabilir NOS (iNOS) için yapılan immunohistokimyasal değerlendirmede kullanılan primer antiserumun ovidukt dokusu için spesifik olmadığı belirlendi.

3.6. Ovidukt Dokusunda Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile Belirlenen Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri

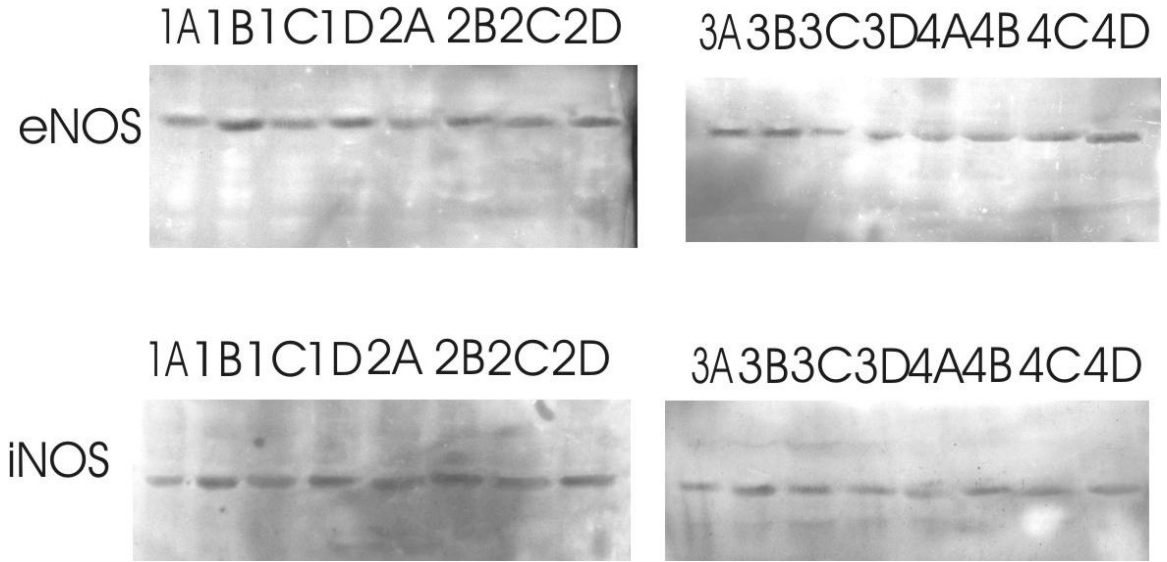
Endotelial NOS, nNOS ve iNOS izoformları RT-PCR analizinde bütün gruplarda belirlenebilirken, istmustaki ekspresyonun ampulladan şiddetli olduğu izlendi. Her üç izoformun ekspresyonlarının perioovulator safhada belirgin olduğu, bununla birlikte eNOS mRNA ekspresyonunun iNOS ile benzer, nNOS'tan şiddetli olduğu gözlemlendi (Şekil 3.20).



Şekil 3.20: Gruplarda istmus ve ampullanın eNOS, nNOS ve iNOS mRNA ekspresyonlarının RT-PCR bulgusu. M: Marker, 1: Metöstrüs grubu, 2: Erken diöstrüs grubu, 3: Geç diöstrüs grubu, 4: Folliküler evre grubu, A: Ampulla, B: İstmus.

3.7. Ovidukt Dokusunda Western Blot Yöntemi ile Belirlenen Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri

Endotelial NOS, nNOS ve iNOS izoformları luteal yapının bulunduğu ovaryuma göre ipsilateral ve kontralateral olarak değerlendirildi. Western Blot analizi sonucunda ipsilateral oviduktta nNOS için herhangi bir bulguya rastlanılmazken, beklenen molekül ağırlıklarındaki eNOS (140 kDa) ve iNOS (130 kDa) proteinlerine ait bantların perioovulatör safhada daha şiddetli bir sinyal verdiği gözlemlendi. Kontraletaral değerlendirmede benzer sonuçların olduğu görüldü. Bunun yanı sıra istmustaki sinyalin ampullaya göre nispeten daha fazla olduğu izlendi (Şekil 3.21)



Şekil 3.21: Gruplarda istmus ve ampullanın eNOS, nNOS ve iNOS proteinlerine ait bantların Western Blot bulgusu. 1: Metöstrüs grubu, 2: Erken diöstrüs grubu, 3: Geç diöstrüs grubu, 4: Folliküler evre grubu, A: İpsilateral Ampulla, B: İpsilateral İstmus, C: Kontralateral Ampulla, D: Kontralateral İstmus.

4. TARTIŞMA

Ovidukt, reproduktif süreçte önemli bir role sahiptir. Gametlerin ve embriyoların transportunu düzenleyerek, fertilizasyon ile embriyonik gelişimin primer safhaları sırasında uygun bir ortam hazırlayarak bu sürece katkıda bulunmaktadır (16). Nitrik oksitin ise oosit maturasyonu, ovulasyon, implantasyon, gebeliğin devamı ve doğum gibi pek çok reproduktif olayı etkilediği bilinmektedir (12-15). İnsan (6, 7, 29), rat (8), domuz (71, 109) ve sığırlarda (16, 29, 72) yapılan çalışmalarda oviduktun NOS enzim aktivitesine sahip olduğu bildirilmektedir. Bu araştırmalar neticesinde, NO' nun ovidukt kasılımlarının düzenlenmesinde rol oynayabileceği ifade edilmektedir. Ancak yapılan çalışmalar bunlarla sınırlı olmakla birlikte gerek NO donörlerinin ovidukt kasılımları üzerine etkisi, gerekse NOS enzimlerinin ovidukt dokusundaki dağılımları konusunda yeterli sayıda araştırma bulunmamaktadır. Sunulan çalışmada, östrüs siklusunun farklı evrelerindeki ineklerde oviduktun spontan kasılımları üzerine NO' nun etkisinin incelenmesi ve NOS enzimlerinin ovidukt dokusundaki ekspresyonlarının ortaya konulmasına çalışıldı.

Luteal yapının morfolojik görünümüne göre seksüel siklus dönemleri gruplandırılan hayvanların, gruplara göre serum/progesteron düzeyleri (Çizelge 3.1) incelendiğinde Ireland ve ark (110)'ın bildirdiği şekilde morfolojik görünüm ile serum/progesteron düzeylerinin uyumlu olduğu belirlenerek seksüel siklusların doğrulanması sağlandı.

Bülbül ve ark (117) sığırlarda NO düzeyinin, östrojen düzeyi yüksek, progesteron düzeyi düşük iken fazla, progesteron düzeyi yüksek iken daha az olduğunu ifade etmektedirler. Bununla birlikte NO' nun folliküler gelişim sürecinde östrojen sentezine (118, 119) ve luteal yapı formasyonunda progesteron sentezine aracılık edebileceği bildirilmektedir (117). Sunulan çalışmada kan NO düzeylerinin (Çizelge 3.2) seksüel siklus dönemlerine göre progesteron seviyesi yükseldiğinde düşük olduğu belirlenirken yukarıdaki araştırmacıların bulgularıyla uyumlu olduğu gözlemlendi.

L-arjinin, NOS enzimleri aracılığıyla NO' ya dönüşen (120) ve bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar için tek fizyolojik endojen nitrojen vericisidir (46). L-arjininin, düz kaslarda *in vitro* ortamda 0.01 – 1 mM yoğunlukları arasında etkinliğini gösterdiği bildirilmektedir (66). Çalışmada, L-arjinin bildirimlere uygun şekilde logaritmik olarak 10 nM - 1 mM dozlarında uygulandı (Çizelge 2.3). Bununla birlikte tüm araştırma gruplarında L-arjininin 10^{-3} M dozunun en etkili doz olduğu belirlendi.

Ekerhovd ve ark (6) insan oviduktunda yaptıkları çalışmalarında L-arjininin kasılım şiddetinde gevşemeye neden olduğunu ifade etmektedirler. Sunulan çalışmada L-arjininin istmusun longitudinal düz kas dokusunda geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında, sirküler düz kas dokusunda erken diöstrüs grubunda kasılım şiddetini değiştirmediği, buna karşın diğer gruplarda kasılım şiddetini arttırdiği gözlendi (şekil 3.1, 3.2, Çizelge 3.3). Ampullanın longitudinal düz kas dokusunda geç diöstrüs grubunda, sirküler düz kas dokusunda ise geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım şiddetini değiştirmediği ancak diğer gruplarda kasılım şiddetini arttırdiği belirlendi (şekil 3.3, 3.4, Çizelge 3.3). Araştırmada elde edilen bulgular L-arjininin düz kas kontraksiyonlarını, bazı zamanlarda değiştirmemekle birlikte, arttırdiğını ortaya koyarken, diğer bildirimlerle uyumlu bulunmamaktadır. Elde edilen veriler doğrultusunda sunulan çalışma L-arjininin kasılım şiddetini arttırdiğını bildiren ilk araştırma olma niteliğindedir. Enzimatik olarak L-arjininden sentezlenen NO (121), düz kas sGC (solubl guanilat siklaz) enzimini aktive ederek cGMP (siklik guanozin monofosfat) düzeyini arttırmakta ve hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu azaltarak cGMP' nin ikincil bir mesajcı gibi hareket etmesine neden olmaktadır. Böylelikle protein kinazın aktivite olmasıyla düz kaslarda gevşeme meydana gelmektedir (120). Dolayısıyla L-arjinin uygulamasından sonra oluşan NO' nun kasılım şiddetinde azalmaya neden olması beklenmektedir. Sunulan çalışmada L-arjinin uygulaması sonrası kasılım şiddetinde artışların izlenmesi bu nedenle önemli bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Rat myometriumunda motilite düşük olduğu zaman NO' nun kontraktil aktiviteyi arttırdiği ve artan prostaglandin sentezinin bu etkiye aracılılık ettiği bildirilmektedir (122). Uterusta gözlenen bu mekanizmanın oviduktta da yer alabileceği (6) ve kasılım şiddetinin bu yüzden arttığı ileri sürülebilir. Buna ilaveten, L-arjininin uterusta kasılım şiddetini inhibe ederken oviduktta arttırması nedeniyle, NOS enzimlerinin türler arasında değişkenlik gösterebilmesinden dolayı (16) bu maddenin de farklı türlerde ve dokularda farklı etkiler oluşturduğu düşünölmektedir.

Sunulan çalışmada, L-arjininin istmus ve ampullada seksüel siklusun diöstrüs ve folliküler evre dönemlerinde kasılım şiddetini değiştirmediği izlendi (şekil 3.1, 3.3, 3.4, Çizelge 3.3). Bu durumun hormonal nedenlerden ve özellikle steroid hormonlardan kaynakladığı ileri sürülebilir. Bununla birlikte L-arjininin kontraktil aktivitesi üzerine, progesteron ve/veya östrojen gibi steroid hormonların etkilerinin araştırılacağı daha ayrıntılı çalışmalar, bu konunun aydınlatılmasına yardımcı olabilir.

İnsan oviduktunun istmus kısmında yapılan bir çalışmada 5×10^{-4} - 5×10^{-2} M dozlarında uygulanan L-arjininin doza bağlı şekilde oviduktta kasılımda artışı başlattığı, ancak bunun geçici olduğu, L-arjininin bu etkisini kasılımda gevşemenin izlediği bildirilmektedir (6). Buna ilaveten aynı araştırmacılar, düz kas tonunda L-arjininin gevşetici etkisinden önce meydana gelen kasılım şiddetindeki artışın beklenmedik bir gözlem olduğunu belirtmektedirler. Sunulan çalışmada, L-arjininin doza bağlı olarak, araştırmacıların (6) da bildirdiği şekilde kasılımda artışı başlattığı gözlemlendi. Ancak araştırmacılardan farklı olarak L-arjininin kasılım şiddetinde herhangi bir azalmaya neden olmadığı izlendi. Araştırmacıların (6) yaptıkları çalışmada L-arjinin uygulanmasıyla kasılım şiddetindeki artışı takiben meydana gelen gevşeme, dokunun kasılım sonrası bir dinlenme periyoduna girmesinden ileri gelebilir. Ne var ki, araştırmacılar L-arjinini fizyolojik sınırların üzerinde (1-2 mmol/l) kullandıkları için dokuda kasılım şiddetinde artıştan sonra bir dinlenme periyodunun izlenmesi muhtemeldir. Diğer taraftan aynı araştırmacılar, sözünü ettikleri gevşemeden sonra dokunun kasılımlara tekrar başladığını da bildirmektedirler. Sunulan çalışma ile araştırmacıların yaptıkları çalışma bulgularının uyumlu olmamasının, farklı türlerdeki oviduktların kullanılması yanında, doz aralıklarından kaynaklandığı ileri sürülebilir. Buna ilaveten sunulan çalışmada deneysel olarak uygulanan 10^{-2} M dozundaki L-arjininin de kasılım şiddetini herhangi bir inhibisyon oluşturmadan arttırmaya devam ettiği görüldü. Bu bulgu, L-arjininin kasılımı arttırıcı etkisinin yanında, ayrıca tür farklılığı ve doz aralıkları yaklaşımını da güçlendirmektedir.

Nitrik oksit sentaz enzim aktivitesinin L-NAME (66) ve bazı diğer arjininin yarışmalı analogları tarafından inhibe edilmesiyle NO üretimi engellenebilmektedir (46). Sunulan çalışmada dokulara L-NAME logaritmik olarak 10 nM – 10 mM dozlarında uygulandı. Bu uygulamalar sırasında da oviduktların 10^{-5} M dozuna kadar kasılım şiddetlerini değiştirmedeği, 10^{-4} M dozunda nispeten azalttığı ve sonraki dozlarındaki azalmanın belirgin olduğu ve 10^{-2} M dozunun kasılımları tamamen inhibe ettiği gözlemlendi. Bu nedenle oviduktların L-NAME ile inkübasyonu sırasında 10^{-5} M dozunun kullanılmasına karar verildi.

Sunulan çalışmada istmus ve ampullanın longitudinal ve sirküler düz kas dokularının, metöstrüs, geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında L-NAME sonrası etkili dozda uygulanan L-arjininin (10^{-3} M), kasılım şiddetini L-arjininin yalnız uygulamasına göre değiştirmedeği veya arttırdığı gözlemlendi (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, Çizelge 3.3). Yallampalli ve ark (66)' in araştırmalarında aktardıkları gibi dokulara

uygulanan L-NAME sonrası NOS enzim aktivitesinin inhibe edilmesiyle, L-arjininden NOS' a bağı NO üretimi engellenmesi sağlandı. Buna rağmen L-arjininin etkisinin ortadan kalkmadığı gözlemlendi. Bu gözlem ovidukt düz kas dokusundaki kasılımların NO dışında gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Perez Martinez ve ark (8) gebe ve siklik farelerde farklı NOS inhibitörlerinin (L-NAME, L-NMMA, NO₂-Arg) ovaryan bursaya lokal olarak uygulanmasıyla ovumun oviduktta transportunun, büyük olasılıkla ovidukt motilitesindeki artış nedeniyle, önemli derecede arttığını bildirmektedirler. Aynı araştırmacılar çalışmalarında rat ovidukt epitelyumundaki NOS enzimlerini (123) inhibe ederek NO üretimi engellemişlerdir. Eğer oviduktun kas dokusunun gevşemesi için endojen bir NO sisteminin var olduğu düşünülürse, ovumun oviduktta transportunun artmasının, NO' nun sözü edilen gevşetici etkisinin ortadan kalkmasından dolayı oluştuğu ileri sürülebilir. Diğer bir deyişle, üretilemeyen NO nedeniyle ovidukt kasılımlarında bir azalma oluşmamakta, dolayısıyla transport hızında bir artış meydana gelmektedir. Bununla birlikte Ekerhovd ve ark (49) oviduktun kas dokusundaki gevşeme için endojen bir NO sistemi mevcut ise L-NAME uygulandığı zaman kontraktıl aktivitenin artmasının beklenmesi gerektiğini ifade etmektedirler. Sunulan çalışmada, kullanılan endojen NO donörünün kasılım şiddetinde artışa neden olması ve L-NAME sonrası uygulanan L-arjininin de kasılım şiddetindeki artışı devam ettirmesi, ovidukt kas dokusunun NO sentez aktivitesinin düşük olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca L-arjininin, NOS enzim aktivitesinin engellenmesine rağmen kasılım üzerindeki etkisini devam ettirmesi, kasılım şiddetindeki artışın, NO varlığından çok aynı zamanda bir amino asit olan L-arjininin (120) kendine özgü şekilde, doku için bir enerji kaynağı görevi üstlenmesinden kaynaklandığı hipotezi ile açıklanabilir. Bunun yanı sıra Moore ve Croxatto (124) ratlarda östradiol uygulamasının istmusun düz kas kontraksiyonlarının frekansını artırarak oviduktta transportun hızlandığını belirtmektedirler. Bu nedenle ovidukt kasılımlarının ovaryum tarafından üretilen progesteron, oksitosin ve östrojen (124, 125) yanında PGF_{2α} ve ET-1 (125-128) tarafından düzenlendiği, hormonal durumun bunda etkili olabileceği düşünülmektedir.

Erken diöstrüs grubunda ise istmus ve ampullanın longitudinal düz kas dokusunda L-NAME sonrası uygulanan L-arjininin, L-arjininin yalnız uygulanmasına göre kasılım şiddetini azalttığı görülmektedir (Şekil 3.1, 3.3, Çizelge 3.3). Sirküler düz kas dokularında ise L-NAME sonrası L-arjininin kasılım şiddetini değiştirmediği izlenmektedir (Şekil3.2, 3.4, Çizelge 3.3). Bunun nedeninin ise Ekerhovd ve ark (49)'

ın da ileri sürdüğü şekilde NO sentezinde NOS için bir substrat olan L-arjininin endojen doygunluğa ulaşarak etkisini gösterememesinden veya doku farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmada bazı dokularda deneysel olarak uygulanan 10^{-2} M dozundaki L-NAME' nin oluşturduğu inhibisyondan sonra 10^{-2} M dozundaki L-arjininin kasılımları tekrar başlattığı izlendi. Elde edilen tüm bulgular sığır oviduktunun kas dokusunun NOS aktivitesinin düşük olabileceğini dolayısıyla NO' nun oviduktun kontraktıl aktivitesinde etkili olmadığını gösterebilir.

Nitrik oksit üretimi sadece NOS enzim aktivitesinin inhibe edilmesiyle engellenmemekte ayrıca sGC için bazı inhibitörlerin kullanılmasıyla da engellenebilmektedir (66). Guanilat siklazın solubl izoformu α ve β alt birimlerinden oluşan heterodimerik hemoprotein grupları içermektedir (129). Bu hem grupları, nitrik oksit ve karbon monoksit gibi diffuz olabilen gazlara bağlanabilmektedir (130). Metilen mavisinin sGC inhibisyonu için kullanılabileceği bildirilmektedir (53, 66). Sunulan çalışmada, dokular MB ile inkübe edildikten sonra en etkili dozda L- arjinin (10^{-3} M) uygulanarak kasılım şiddetindeki değişimler izlendi. İstmus ve ampullanın longitudinal ve sirküler düz kas dokularının, erken diöstrüs, geç diöstrüs ve folliküler evre gruplarında MB sonrası en etkili dozda uygulanan L-arjininin, kasılım şiddetini L-arjininin yalnız uygulamasına göre değiştirmedeği veya azalttığı gözlemlendi (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, Çizelge 3.3). Bu gözlem L-arjininin kasılım mekanizmasının sGC' ye bağlı oluşabileceğini düşündürmektedir.

Langer ve ark (131) izole rat kardiomyositlerinde yaptıkları bir çalışmada NO (SNAP ve Spermin-NONO) donörlerinin doza bağımlı şekilde kontraktıl yanıtı arttırdığını bildirmektedirler. Çözülebilir guanilat siklazın ODQ (sGC inhibitörü) ile inhibisyonu sonrası NO donörlerinin pozitif kontraktıl etkilerinin inhibe olduğunu ifade etmektedirler. Araştırmacıların sGC inhibisyonu sonrası NO donörü kullanarak elde ettikleri bulgu, çalışmadaki bulgu ile uyumlu bulunmaktadır. Diğer taraftan 8-bromo-cGMP' nin NO donörleriyle karşılaştırıldığında hücre kontraktılitesini arttırdığını belirtmektedirler. Araştırmacılar, rat ventriküler kardiomyositlerinde yaptıkları bu çalışmada, NO donörlerinin pozitif kontraktıl etkisine guanilat α proteinleri ile sGC' nin etkileşimlerinin NO bağımlı stimülasyonunun aracılık ettiğini ifade etmektedirler.

Sunulan çalışmada metöstrüs grubunda MB sonrası en etkili dozda uygulanan L-arjininin, kasılım şiddetini L-arjininin yalnız uygulamasına göre değiştirmedeği veya arttırdığı gözlemlendi (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, Çizelge 3.3). Bunun nedenin ise ovumun

oviduktan ayrılmadan önce NOS aktivitesinin ve ekspresyonunun azalabildiği ve bundan dolayı endotelin-1 (105) ve PGF_{2α} (108) gibi kontraktıl moleküllerin etkilerine izin vererek oviduktta bir motiliteye sebep olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sodyum nitro prusidin uterus ve ovaryum arterlerinde doza bağlı bir şekilde vazodilatasyona neden olduğu belirtilmektedir (132). Bunun yanı sıra eksojen NO donörü olan SNP' den üretilen NO' nun uterus kontraktılıtesinde önemli derecede gevşemeye neden olduğu bildirilmektedir (66). SNP' nin NO donörü olarak, yapılan çalışmalarda 1 µM - 10 µM (49), 10 nM - 0.1 mM (132) ve 10 nM - 10 µM (53) doz aralıklarında kullanıldığı bildirilmektedir. Sunulan çalışmada eksojen NO etkinliğinin belirlenmesi için istmus ile ampullanın longitudinal ve sirküler düz kas dokularında SNP' nin etkinliği araştırıldı. Yukarıda adı geçen çalışmalarda bildirilen değerlere uygun şekilde logaritmik olarak 10 nM - 0.1 mM dozlarında kullanıldı (Çizelge 2.3). Sodyum nitro prusidin istmusun longitudinal düz kas dokusunda metöstrüs ve folliküler evre gruplarında doza bağlı şekilde kasılım şiddetini azalttığı, erken diöstrüs grubunda fark oluşturmadığı ve geç diöstrüs grubunda arttırdığı bununla birlikte 10⁻⁴ M dozundaki SNP' nin toksik etki oluşturduğu görüldü (Şekil 3.5, Çizelge 3.3). İstmusun sirküler düz kasında SNP' nin artan dozlarının metöstrüs, erken diöstrüs ve folliküler evre gruplarında doza bağlı şekilde kasılım şiddetini azalttığı ve 10⁻⁴ M dozunun toksik etki oluşturduğu belirlendi (Şekil 3.6, Çizelge 3.3). Geç diöstrüs grubunda SNP' nin kasılım şiddetini rakamsal olarak azalttığı ancak istatistiksel olarak fark oluşturmadığı izlendi (Şekil 3.5, Çizelge 3.3).

Yine sunulan araştırmada ampullanın longitudinal düz kasında SNP' nin artan dozlarının (Şekil 3.7, Çizelge 3.3) metöstrüs ve folliküler evre gruplarında doza bağlı azalmaya neden olduğu izlendi. Erken diöstrüs grubunda SNP etkili olmazken geç diöstrüs grubunda SNP' nin 10⁻⁶ M dozuna kadar artış, sonraki dozlarında rakamsal olarak azalma görüldü. Ampullanın sirküler düz kasında SNP' nin artan dozlarının (Şekil 3.8, Çizelge 3.3) metöstrüs ve folliküler evre gruplarında kasılım şiddetini doza bağlı şekilde azalttığı, 10⁻⁴ M dozunun toksik etkili olduğu belirlendi. Erken diöstrüs ve geç diöstrüs gruplarında ise istatistiksel olarak fark oluşmadığı görüldü. Word ve Cornwell (133) SNP' nin 10⁻⁴ M dozundan daha düşük dozlarının oksitosin ile stimüle edilmiş uterus kontraktılıtesinin inhibisyonunda etkili olmadığını, buna ilaveten daha yüksek dozlarının ise toksik etkiden dolayı geri dönüşümsüz bir inhibisyona neden olduğunu ifade etmektedirler. Sunulan çalışma Word ve Cornwell (133)' in bulgularıyla uyumlu olmakla birlikte, gruplarda SNP' nin 10⁻⁴ M dozunun toksik etki oluşturması

nedeniyle SNP' nin uygulandığı dokuya ve dozuna göre farklı etkiler oluşturduğu ileri sürülebilir.

Uterus düz kasında yapılan bir çalışmada SNP' nin 10^{-7} ve 10^{-6} M dozlarının kasılım şiddetinde azalmaya, ancak 10^{-4} M dozunun 10^{-5} M dozuna göre kasılım şiddetinde artışa neden olduğunu ifade edilmektedir (49). Araştırmacıların bildirdiği gibi SNP' nin farklı dozlarda kasılım şiddetinde azalma ve artış göstermesi çalışmadaki bulgular ile uyumludur. Sunulan çalışmada SNP' nin bazı dozlarında gevşetip bazı dozlarında kasılımda artışın izlenmesi, SNP' nin bu paradoks etkisinin NO' nun kendisine değil de SNP' nin diğer etkilerine bağlı olabileceğini (49) düşündürmektedir.

Yapılan bir araştırmada (95) SNP' nin kasılımı arttırmadaki etkisinin prostaglandinlerin aracılığıyla olabileceği, bunun da NO' nun siklooksijenazları aktive ederek kontraktiletiyi arttırabileceği ileri sürülmektedir. Diğer taraftan, Yallampalli ve ark (66), SNP' nin gevşetici etkisinden önce bir gecikme periyodunun varlığından söz etmekle birlikte bunun da SNP' nin muhtemel metabolik aktivasyon gereksiniminden kaynaklandığını ifade etmektedirler. Uterusun, vasküler doku ile karşılaştırıldığında daha yüksek dozlarda SNP' ye gereksinim göstermesinin, bu nedenle, sözü edilen metabolik dönüşüm sisteminin uterus dokusunda daha az aktif olabileceğini belirtmektedirler (66). Çalışmada SNP' nin farklı dozlarında kasılım şiddetinde oluşturduğu artışı sonraki dozlarda azalmanın izlenmesi, Yallampalli ve ark (66)' ın bildirdiği şekilde SNP' nin etkisini göstermesi için gerekli olan gecikme periyodundan kaynaklandığını düşündürmektedir.

İstmus ve ampullanın longitudinal ve sirküler düz kas dokularına uygulanan SNP' nin kasılım şiddeti değiştirmemesi ve/veya azalmaya neden olması, NOS enzimlerini kullanmadan NO üretimini sağlayan SNP' nin oluşturduğu gevşetici etkinin, NO dışında SNP' nin kendi kimyasal özelliğinden kaynaklandığı düşündürmektedir. Bununla birlikte sığır oviduktunun SNP' ye karşı aşırı duyarlılık gösterdiği de ileri sürülebilir.

Aktarılan çalışmada immunohistokimyasal olarak eNOS aktivitesinin tüm gruplarda istmus ve ampullanın seroza, kas katmanı ve lamina propriasındaki kan damarları endotelinde ve epitelyumda (Şekil 3.9, 3.10), nNOS-ir' in istmus ve ampullanın epitel hücreleri ile seroza, muskuler katman ve lamina propriada bulunan sinir fibrillerinde pozitif boyama verdiği gözlemlendi. Diğer taraftan iNOS için kullanılan primer antikorun yapılan kontrol boyamaları neticesinde immünohistokimyasal yöntem için inek oviduktuna özgü olmadığı belirlendi. Ekerhovd ve ark (6) insan oviduktunda

iNOS immunreaktivitesinin kas tabakası, epitelyum, vaskuler endotelyum ve bağ dokuda izlediklerini bunun yanı sıra, düz kas hücrelerinde orta derecede, epitelyumda ve kan damarları duvarlarında zayıf reaksiyon verdiğini aktarmaktadırlar (7). Bryant ve ark (106) sıçan oviduktunda iNOS' un sadece epitel hücrelerle sınırlı kaldığını aktarmaktadırlar. Lapointe ve ark (72) sığır oviduktunda iNOS immunreaktivitesinin ampullanın epitelyum hücreleri ve kas tabakasında, sıklıkla gözlendiğini ancak istmusun lamina propriasında zayıf bir reaksiyon olduğunu, Ulbrich ve ark (72) ise lamina muskulariste belirgin nükleer boyanmanın gözlendiğini, stromanın ise iNOS proteinden yoksun olduğu belirtmektedirler. Sunulan çalışmada iNOS etkinliğinin izlenememesi, kullanılan antiserumunun kontrol boyamalarında inek oviduktuna spesifik olmamasının yanında bildirimlerde de görüldüğü üzere tür farklılıklarından veya kullanılan primer antiserumun düşük yoğunluktaki yetersiz antijenitesinden kaynaklanabilir.

İstmus ve ampullanın düz kas hücrelerinde eNOS etkinliğinin izlenmemesi, nNOS' un ise kas katmanında sadece sinir fibrillerinde pozitif boyama göstermesi oviduktun düz kas dokusunun NOS enzim etkinliğine sahip olmadığını ortaya koymaktadır. Dolayısıyla çalışmada elde edilen immünohistokimyasal bulgular izole organ banyosu bulgularını desteklemektedir. Diğer bir deyişle eNOS ve nNOS' un yerleşim yerlerine ait immünohistokimyasal bulgular, L-arjininin kasılım şiddetini NO' ya bağımlı olmadan arttırdığı ve NO' nun ovidukt düz kas dokusunda gevşetici bir etkisinin olmadığı hipotezini dolaylı olarak kanıtlamaktadır.

İnsan, sığır ve rat oviduktunda NOS enzim aktivitesinin varlığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (6, 29, 106). Gawronska ve ark (71) domuz oviduktunda östrüs siklusu boyunca NADPH-d aktivitesinin varlığını epitelyum, kas tabakası, sinir fibrilleri, kan damarları endotelyumunda izlediklerini bildirmektedirler. Ekerhovd ve ark (7) NADPH-d boyamasında epitelyum ve vaskuler endotelyumda güçlü, düz kas dokusunda zayıf reaksiyon gördüklerini belirtmektedirler. Ne var ki, NADPH-d boyaması NOS aktivitesi için sıklıkla kullanılan histokimyasal bir yöntem olmakla birlikte, bu boyamada gerçekleşen reaksiyon ancak diğer NADPH aktivitesi içeren enzimlerin yokluğunda NOS için spesifik kabul edilmektedir (134). Keza, pozitif olarak izlenebilen NADPH-d boyaması yine de endojen bir NO sistemi varlığını düşündürmektedir (7). Lapointe ve ark (72) eNOS' un sığırlarda istmusun epitelyum hücrelerinde, lamina propria ve serozadaki kan damarları endotelyumunda ayrıca ampulla ve istmik-ampullar birleşme yerindeki hücre tiplerinin hepsinde gözlendiğini

bildirmektedirler. Ulbrich ve ark (16) sığır oviduktunda immunreaktif eNOS proteinini kan damarlarının endotelial hücrelerinde ve lamina muskularisteki küçük kan damarlarının endotelinde izlediklerini aktarmaktadırlar. Sunulan çalışmada eNOS-ir' in istmus ve ampullada tüm gruplarda seroza, kas katmanı ve lamina propriadaki kan damarları endotelinde pozitif sonuç verdiği, epitel tabakanın lumene bakan yüzünde lokalize olduğu izlenirken, elde edilen bulguların diğer araştırmacıların (7, 16, 71, 72, 107) bulgularıyla uyumlu olduğu gözlemlendi.

Memelilerde siliar epitelyal hücreler respiratorik kanal, reproduktif kanalın bir kısmı ve merkezi sinir sisteminin ventriküllerinde yer almaktadırlar. Bu silyumlar, siliar hareket ve elektrolit transport mekanizmaları yoluyla mukus klerensi ve hareketi (135), ovumun transportu (136) ile serebrospinal sıvı (137) oluşumlarına katkıda bulunmaktadır. Silyumdaki hareket, mikrotübüldeki dyneinin (mikrotubul kasılığını, uzamasını, hareket etmesini sağlayan ATPaz aktivitesine sahip protein) yardımıyla ATP' nin hidrolizi ile gerçekleşmektedir (138). Siklik AMP ve cGMP seviyeleri, dynein ile oluşan ATPaz aktivitesini arttırmaktadır (139). Solunum sisteminde epitelyumdaki siliar hücrelerde L-arjininin NO-cGMP yoluyla siliar hareket frekansını arttırdığı (140, 141) bununla birlikte NO' nun siliar hareketlerin devamlılığı için gerekliliği olduğu aktarılmaktadır (142). Sunulan çalışmada, eNOS-ir' in epitel tabakanın lumene bakan yüzünde yer yer lokalize olması NO' nun oviduktun siliar aktivitesinde etkili olabileceğini akla getirmektedir. Diğer taraftan, Zhan ve ark (142) western blot analizi kullanarak ratlarda yaptıkları çalışmada siliar hücreler içeren testis ve ovidukt dokularında sGC $\alpha 1$ dominant iken, akciğer ve trakea dokularında sGC $\beta 1$ ' in dominant olarak belirlendiğini aktarmaktadırlar. İmmunohistokimyasal olarak da eNOS boyamasının siliar hücreler içeren tüm dokularda pozitif sonuç verdiğini belirtmektedirler (142). Bununla birlikte aynı araştırmacılar oviduktun kas tabakasındaki damarlarda ve siliar epitelyumda pozitif eNOS boyaması izlenirken non-siliar epitelyumda eNOS boyamasının izlenmediğini ifade etmektedirler. Zhan ve ark (142) kültüre edilmiş siliar epitelyum hücrelerinde L-arjininin NO üretimini NOS yoluyla arttırdığını, siliar epitel hücreler tarafından üretilen NO' nun siliar motilitenin düzenlenmesinde rolü olduğunu ve bunun silia içeren bütün dokularda meydana geldiğini belirtmektedirler. Sunulan çalışmada epitelyumun luminal yüzünde izlenen pozitif eNOS immunreaktivitesi, sığır oviduktunda eNOS kaynaklı üretilen NO' nun, muhtemelen cGMP bağımlı olarak, siliar aktivitenin düzenlenmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Sunulan çalışmada nNOS immunreaktivitesi tüm gruplarda istmus ve ampullada epitelyum tabakasındaki hücrelerde izlendi (Şekil 3.15, 3.16). Endotelial NOS boyanmasından farklı olarak nNOS' un, epitel hücrenin bazal kısmından apeksine kadar pozitif boyama gösterdiği belirlendi. Diğer bir deyişle, epitel tabakadaki immunreaktif nNOS proteininin, epitel hücrenin lamina propria ile ilişkili olduğu noktadan oviduktal lumene kadar hücrede aktif olduğu gözlemlendi. Ekerhovd ve ark (7) ise insan oviduktunun istmus kısmında nNOS izoformunu immunohistokimyasal olarak tespit edemediklerini belirtmektedirler. Bunun nedeninin tür farklılığının yanında kullanılan immunohistokimyasal yöntem, primer antikorların duyarlılıkları ve NOS aktivitesinin seksüel siklus dönemine göre değişebilmesinden kaynakladığı düşünülmektedir. Diğer taraftan aynı araştırmacılar (7) oviduktun parasempatik, sempatik ve viseral sinirlerle innerve edilmesinden dolayı nNOS' u tamamen tubal fonksiyonların düzenlenmesinin dışında tutulmaması gerektiğini belirtmektedirler. Lapointe ve ark (72) sığır oviduktunda istmus ve ampullada nNOS proteinini immunohistokimyasal olarak epitel tabakada, lamina propria ve düz kas katmanında izlediklerini ifade etmektedirler. Sunulan çalışmada elde edilen bulgular Lapointe ve ark (72)' in bulgularıyla uyumlu bulunmaktadır.

Aktarılan çalışmada kullanılan nNOS primer antikorunun, epitel hücrelerin sadece lumene bakan yüzünü değil hücrenin tamamını boyadığı dikkati çekmektedir. Bilindiği gibi ovidukt mukozası silindirik, bazal, sekretör ve siliar hücreleri içeren tek katlı epitelyumdan oluşmaktadır. Sekretör hücrelerin istmusta daha fazla iken, siliar hücrelerin ampullada daha yoğun olduğu belirtilmektedir (143). İstmusta elde edilen pozitif nNOS-ir' in ampullaya göre daha yoğun olduğu ve belirgin şekilde izlendiği görüldü. Bu durumda sunulan çalışmada, istmustaki sekretör hücrelerin ampullaya göre nNOS' a daha fazla affinite gösterdiği ve dolayısıyla sekretör aktivitenin NO tarafından düzenlenebileceği düşünülmektedir. Buna ilaveten hem eNOS' un hem de nNOS' un istmus ile ampullanın epitel tabakasındaki lokalizasyonları ve epitelyumun ovidukt lumeni ile sürekli şekilde bağlantılı olduğu düşünülürse NO' nun üretildikten sonra ovidukt lumenine salındığı (16) ve intratubal sıvının üretimini düzenleyen bir role de sahip olduğu ileri sürülebilir.

Epitel tabakada eNOS-ir' in, istmus ve ampullada gruplara göre metöstrüs grubunda şiddetli, folliküler evre grubunda orta ve diğer gruplarda zayıf derecede olduğu gözlemlendi (Şekil 3.11, 3.12, Çizelge 3.4). Gawronska ve ark (71) domuz oviduktunda epitelyumdaki aktivitenin östrüste en düşük seviyede olduğunu

belirtmektedirler. Chatterjee ve ark (107) ratlarda en fazla eNOS pozitif boyanmanın proöstrüs ve östrüs dönemlerinde olduğunu, Bryant ve ark (106) östrüs siklusunun dönemlerine göre herhangi bir farklılık gözlemediklerini bildirmektedirler. Ulbrich ve ark (16) sığırlarda siklusun 18. gününde (proöstrüs) epitel tabakada bulunan sekretör epitel hücrelerdeki supranükleer boyanmanın görülebildiğini belirtmektedirler. Sunulan çalışma bulgularıyla araştırmacıların bulguları arasında oluşan farklılıklar, elde edilen sonuçların öncelikle türe özgü olarak da farklı olabileceğini (16) akla getirmektedir. Diğer taraftan Ulbrich ve ark (16)'ın aktardıkları şekilde eNOS-ir' in proöstrüs döneminde daha belirgin olduğu bildiri sunulan çalışmada folliküler evre grubunda izlenen orta derecedeki boyanma şiddeti ile uyumlu bulunmaktadır.

Tüm gruplarda eNOS yönünden istmus ve ampullada gerçekleştirilen immünohistokimyasal boyamalar sırasında epitelyumda immunfloresans yanıt veren nokta şeklinde yapılar dikkati çekti (Şekil 3.14). Bu yapıların, preparatların sadece sekonder antiserum ile boyanmasından sonra da immunfloresans yanıt verdiği izlendi. Çalışmada elde edilen bu gözlem, kullanılan primer ve sekonder antiserumların kimyasal özellikleri ve uygulanma yöntemleri yanında inek ovidukt dokusunun kendiliğinden immunfloresans yanıt verdiğini kanıtlamaktadır. Bunun yanı sıra inek ovidukt dokusunun otoimmunofloresans özelliğinin aktarıldığı bu gözlemi bildiren bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Epitel tabakada nNOS-ir' in metöstrüs ve folliküler evre gruplarında istmusta şiddetli ampullada ise orta derece reaksiyon verdiği gözlemlendi (Şekil 3.15, 3.16, Çizelge 3.5). Bunun yanı sıra sinir fibrillerinin sıklıkla metöstrüs ve folliküler evre gruplarında pozitif boyama gösterdiği izlendi (Şekil 3.17, 3.18, Çizelge 3.6, 3.7). Lapointe ve ark (72) sığır oviduktunda nNOS ekspresyonunun periovulatör dönemde daha fazla izlendiğini belirtmekle birlikte sunulan çalışmada elde edilen bulguyla araştırmacıların bulgularının uyumlu olduğu belirlendi.

Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu analizinde eNOS, nNOS ve iNOS izoformları bütün gruplarda belirlendi (Şekil 3.20). Western Blot analizinde nNOS için herhangi bir bulguya rastlanılmazken, Lapointe ve ark (72)'ın bildirdiği şekilde eNOS ve iNOS proteinlerinin ipsilateral ve kontralateral olarak varlığı belirlendi (Şekil 3.21). Ekerhovd ve ark (7) nNOS proteinini Western Blot ve immünohistokimyasal yöntemle tespit edemediklerini, Gawronska ve ark (71) immünohistokimyasal olarak tespit ettikleri iNOS proteinini Western Blot yönteminde belirleyemediklerini bildirmektedirler. Bu farklılığın primer antiserumlar ile proteinler

arasındaki düşük antijeniteden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir. Western blot ve RT-PCR analizlerinde istmustaki ekspresyonun ampulladan şiddetli olduğu, tespit edilen NOS izoformlarının mestöstrüs ve folliküler evre gruplarında daha fazla sinyal verdiği izlendi. Buna ilaveten bu iki yöntemle tespit edilebilen NOS izoformlarının inek oviduktundaki ekspresyonları ortaya konulmakla birlikte elde edilen bulguların immünohistokimyasal bulguları desteklediği belirlendi.

5. SONUÇ

Sunulan çalışmada, farklı seksüel siklus dönemlerindeki ineklerde L-arjinin-SNP / NOS / NO / sGC yolunun spontan ovidukt kasılmaları üzerine etkisi *in vitro* olarak belirlenirken, NOS enzimlerinin varlığı ve ovidukt dokusundaki dağılımları immünohistokimya, RT-PCR ve Western blot yöntemleriyle ortaya konuldu. Sonuç olarak, ineklerde spontan ovidukt kasılmaları üzerine NO' nun *in vitro* olarak bir etkisinin olmadığı, bunun nedeninin NOS enzim etkinliğinden kaynaklanmadığı, aynı zamanda hormonal durumun NOS enzim etkinliğini değiştirebileceği, NOS / NO sisteminin oviduktun kasılım mekanizmasında değil sekretörük ve siliar aktivitelerinde rol oynayabileceği kanısına varıldı.

6. KAYNAKLAR

1. Dinç D.A. (1988) İnfertil ineklerde oviduct lezyonları üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
2. Wollenhaupt K., Tomek W., Brussow K.P., et al. (2002) Effects of ovarian steroids and epidermal growth factor (EGF) on expression and bioactivation of specific regulators of transcription and translation in oviductal tissue in pigs. *Reproduction* **123**, 87-96.
3. Hermoso M., Barrera N., Morales B., Pérez S., Villalón M. (2001) Platelet activating factor increases ciliary activity in the hamster oviduct through epithelial production of prostaglandin E2. *Pflugers Arch* **442** 336-45.
4. Wijayagunawardane M.P.B., Miyamoto A. (2004) Tumor necrosis factor α system in the bovine oviduct: a possible mechanism for embryo transport. *J Reprod Dev* **50**, 57-62.
5. Wijayagunawardane M.P.B., Kodithuwakku S.P., Yamamoto D., Miyamoto A. (2005) Vascular endothelial growth factor system in the cow oviduct: a possible involvement in the regulation of the oviductal motility and embryo transport. *Mol Reprod Dev* **72**, 511-20.
6. Ekerhovd E., Brännström M., Alexandersson M., Norström A. (1997) Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube. *Human Reprod* **12**, 301-05.
7. Ekerhovd E., Brännström M., Weijdegård B., Norström A. (1999) Localization of nitric oxide synthase and effects of nitric oxide donors on the human Fallopian tube. *Mol Human Reprod* **5**, 1040-47.
8. Perez Martinez S., Viggiano M., Franchi A.M., et al. (2000) Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovum transport and oviductal smooth muscle activity in the rat oviduct. *J Reprod Fertil* **118**, 111-17.
9. Xie Q., Cho, H.J., Calaycay J., et al. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**, 225-28.
10. Ignarro L.J., Buga G.M., Wei L.H., et al. (2001) Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *PNAS* **98**, 4202-08.
11. Billiar T.R., Curran R.D., Stuehr D.J., Ferrari F.K., Simmons R.L. (1989) Evidence that activation of Kupffer cells results in production of L-arginine

- metabolites that release cell-associated iron and inhibit hepatocyte protein synthesis *Surgery* **106**, 364-72.
12. Shukovski L., Tsafiriri A. (1994) The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinol* **135**, 2287–90.
 13. Jablonka-Shariff A., Basuray R., Olson L.M. (1999) Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *J Soc Gynecol Invest* **6**, 95–101.
 14. Sengoku K., Takuma N., Horikawa M., et al. (2001) Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development and trophoblast outgrowth *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, **58**, 262–68.
 15. Maul H., Longo M., Saade G.R., Garfield R.E. (2003) Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharma Des* **9**, 359–80.
 16. Ulbrich S.E., Rehfeld S., Bauersachs S. et al. (2006) Region-specific expression of nitric oxide synthase in the bovine oviduct during the oestrous cycle and *in vitro*. *J Endocrinol* **188**, 205-13.
 17. Deveci H. (2005) Üreme Organlarının Anatomisi (7 th ed). In: Alaçam E. (Ed) *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*, Medisan Yayınevi, Ankara.
 18. Priedkalns J., Leiser R. (1998) Female reproductive system (5th ed). In: Dellmann, H.D., Eurell J.A. (Eds), *Textbook of Veterinary Histology*, Lippincott Williams & Wilkins, USA.
 19. <http://img232.imageshack.us/i/figure5wp5.jpg/?a=V&ci=0&rt=2> Erişim tarihi: 13.11.2009
 20. Guyton A.C. (1996) *Textbook Of Medical Physiology* (1 st ed). Saunders Company, Missisipi.
 21. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. (1993) *Harper'in Biyokimyası* (Birinci ed). Çevirenler: Menteş G., Ersöz B., Barış Kitabevi, İstanbul.
 22. Anggard E.E. (1992) Endogenous and exogenous nitrates. *Acta Anaesthesiol Scandinavica Suppl* **36**, 7-10.
 23. Ulbrich S.E., Ketler A., Einspanier R. (2003) Expression and localisation of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in the bovine oviduct *in vivo* and *in vitro*. *J Stero Biochem Mol Biol* **84**, 279-89.
 24. Ortiz M.E., Villalón M., Croxatto H.B. (1979) Ovum transport and fertility following postovulatory treatment with estradiol in rats. *Biol Reprod* **21**, 1163-67.

25. Fuentealba B., Nieto M., Croxatto H. (1988) Progesteron abbreviates the nuclear retention of oestrogen receptor in the rat oviduct and counteracts oestrogen action on ovum transport. *Biol Reprod* **38**, 63-9.
26. Hermoso M., Saez J.C., Villalón M. (1997) Identification of gap junctions in the oviduct and regulation of connexins during development and by sexual hormones. *European J Cell Biol* **74**, 1-9.
27. Lindblom B., Hamberger L., Wiquist N. (1978) Differentiated contractile effects of prostaglandins E and F on the isolated circular and longitudinal smooth muscle of the human oviduct. *Fertil Steril* **30**, 553-59.
28. Kotwica G., Kurowicka B., Franczak A., et al. (2003) The concentrations of catecholamines and oxytocin receptors in the oviduct and its contractile activity in cows during the estrous cycle. *Theriogenology* **60**, 953-64.
29. Rosselli M., Dubey R.K., Rosselli M.A., et al. (1996) Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Mol Hum Reprod* **2**, 607-12.
30. Stuehr D.J., Cho H.J., Kwon N.S., Wiese M.F., Nathan C.F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7773-77.
31. Knowles R.G. (1997) Nitric oxide biochemistry. *Biochem Soc* **25**, 895-901.
32. Stuehr D.J. (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 217-30.
33. McDonald L.J., Murad F. (1996) Nitric oxide and cyclic GMP signalling. *Proc Soc Exp Biol Med* **211**, 1-6.
34. Norman J.E., Cameron I.T. (1996) Nitric oxide in the human uterus. *Rev Reprod* **1**, 61-8.
35. Ralston S.H. (1997) Nitric oxide and bone: What a gas! *Br J Rheuma* **36**, 831-38.
36. Förstermann U., Schmidt H.H.W., Pollock J.S., et al. (1991) Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* **42**, 1849-57.
37. Förstermann U., Boissel J.P., Kleinert H. (1998) Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* **12**, 773-90.
38. Bredt D.S., Snyder S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci US A* **87**, 682-85.

39. Moncada S., Palmer R.M., Higgs. E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-42.
40. Weiner C.R., Lizasoain I., Baylis S.A. et al. (1994) Induction of calcium dependent nitric oxide synthase by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5212-16.
41. Nathan C., Xie Q.W. (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* **269**, 13725-28.
42. Morris S.M., Billiar T.R. (1994) New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* **266**, E829-39.
43. Siddhanta U., Wu C., Abu-Soud H.M., Zhang J., Ghosh D.K., Stuehr D.J. (1996) Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *J Biol Chem* **271**, 7309-12.
44. Cho H.J., Xie Q., Calaycay J., et al. (1992) Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* **176**, 599-604.
45. Dawson V.L., Dawson T.M. (1996) Nitric oxide in neuronal degeneration. *Proc Soc Exp Biol Med* **211**, 33-40.
46. Rosselli M., Keller P.J., Dubey R.K. (1998) Role of nitric oxide in biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reprod Update* **4**, 3-24.
47. Stamler J.S. (1994) Redox signalling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* **78**, 931-36.
48. Berdeaux A. (1993) Nitric oxide: an ubiquitous messenger. *Fundam Clin Pharmacol* **7**, 401-11.
49. Ekerhovd E., Weijdegård B., Brännström M., Norström A. (1999b) Nitric oxide-mediated effects myometrial contractility at term during prelabor and labor. *Obstet & Gynecol* **93**, 987-94.
50. Ochoa J.B., Udekwu O.A., Billiar T.R. et al. (1991) Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* **214**, 612-26.
51. Havel J.M., Marlietta M.A. (1994) Nitric oxide synthase assays. *Methods Enzymol* **233**, 250-58.
52. Burnett A.L., Ricker D.D., Chamness S.L. et al. (1995) Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biol Reprod* **52**, 1-7.
53. Bulbul, A., Yağcı, A., Altunbaş, K., Sevimli, A., et al. (2007) The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. *Therigenology* **68**, 1156-68.

54. Dawson T.M.M., Bredt D.S., Fotuhi M., et al. (1991) Nitric oxide synthase and neural NADPH Diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 797-801.
55. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analy Biochem* **126**, 131–38.
56. Çelik H.A. (2003) İneklerde nitrik oksitin bazı reproduktif olaylar üzerine etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
57. Cameron I.T., Campbell S. (1998) Nitric oxide in the endometrium. *Hum Reprod* **4**, 565-69.
58. Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., et al. (1992) S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 444-48.
59. Kato K., Kitada S., Chun A., Wein A.J., Levin, R.M. (1989) In vitro intravesical instillation of anticholinergic, antispasmodic and calcium blocking agents (rabbit whole bladder model). *J Urology* **141**, 1471–75.
60. Karadeniz A. (2005) Bazı alfa-1 adrenerjik antagonistlerin rat sidik kesesi trigon düz kas üzerine etkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
61. Lavelle J.P., Apodaca G., Meyers S.A., Ruiz W.G., Zeidel M.L. (1998) Disruption of guinea pig urinary bladder permeability barrier in noninfectious cystitis. *Am J Physiol* **274**, F205–14.
62. Longhurst P.A., Uvelius B. (2001) Pharmacological techniques for the *in vitro* study of the urinary bladder. *J Pharmacol Toxicol Methods* **45**, 91-108.
63. Graves S., Dretchen K.L., Kruger G.O. (1978). Dantrolone sodium: Effects on smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **47**, 29-35.
64. Wüst M., Averbek B., Reif S., Brater M., Ravens U. (2002) Different responses to drugs against overactive bladder in detrusor muscle of pig, guinea pig and mouse. *Eur J Pharmacol* **454**, 59-69.
65. Izumi, H., Yallampalli C., Garfield R.E. (1993) Gestational changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle. *Am J Obstet Gynecol* **169**, 1327–37.

66. Yallampalli C., Garfield R.E., Byam-Smith M. (1993) Nitric Oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinol* **133**, 1899-1902.
67. Ignarro L.J., Harrison R.G., Wood K.S., Kadowitz P.J. (1986) Dissimilarities between methylene blue and cyanide on relaxation and cyclic GMP formation in endothelium-intact pulmonary artery caused by nitrogen oxide-containing vasodilators and acetylcholine. *J Pharmacol Exp Ther* **36**, 30-36.
68. Al-Hijji J., Larsson B., Batra S. (2000) Nitric Oxide Synthase in the Rabbit Uterus and Vagina: Hormonal Regulation and Functional Significance. *Biol Reprod* **62**, 1387-92.
69. Wittwer C.T., Herrmann M.G. (1999) Rapid thermal cycling and pcr kinetics (*1st ed*). In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. (Eds) *PCR applications: protocols for functional genomics*. Academic Press.
70. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350–54.
71. Gawronska B., Bodek G., Ziecik A.J. (2000) Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase (NOS) in different regions of porcine oviduct during the estrous cycle. *J Histochem Cytochem* **48**, 867-75.
72. Lapointe J., Roy M., St-Pierre I., et al. (2006) Hormonal and Spatial Regulation of Nitric Oxide Synthases (NOS) (Neuronal NOS, Inducible NOS, and Endothelial NOS) in the Oviducts. *Endocrinol* **147**, 5600-10.
73. Van Voorhis B.J., Dunn M.S., Snyder G.D. Weiner C.P. (1994) Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinol* **135**, 1799-1806.
74. Park J.K., Kim J.U., Lee S.O., et al. (2002) Nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in the regulation of rabbit clitoral cavernosum tone. *Soc Exp Biol Med* **227**, 1022-30.
75. Rodeberg D.A., Chaet M.S., Bass R.C., Arkovitz M.S., Garcia V.F. (1995) Nitric oxide: An overview. *Am J Surgery* **170** 292-303.
76. Fujino A., Nakaya S., Wakatsuki T., et al. (1991) Effects of nitroglycerin on ATP-induced Ca^{++} -mobilization, Ca^{++} -activated K channels and contraction of cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Therap* **256**, 371-377.

77. Stark M.E., Szurszewski J.H. (1992) Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* **103**, 1928-49.
78. Galle J., Wanner C. (1996) Impact of nitric oxide on renal hemodynamics and glomerular function: Modulation by atherogenic lipoproteins. *Kidney Blood Press Res* **19**, 2-15.
79. McCann S.M., Kimura M., Karanth S., Yu W.H., Rettori V. (1997) Nitric oxide controls the hypothalamic-pituitary response to cytokines. *Neuroimmunol* **4**, 98-106.
80. Jaroszewski J.J., Skarzynski D.J., Okuda K. (2001) Nitric oxide as a local regulator in the mammalian ovary. In: Miyamoto H., Manabe N. (Eds) *Reproductive Biotechnology: Reproductive Biotechnology Update and Its Related Physiology*. Elsevier, Tokyo.
81. Yamauchi J., Miyazaki T., Iwasaki S., et al. (1997) Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinol* **138**, 3630-37.
82. Dong Y.L., Gangula P.R.R., Fong L., Yallampalli C. (1999) Nitric oxide reverses prostaglandin-inhibition in ovarian progesterone secretion in rats. *Hum Reprod* **14**, 27-32.
83. Al-Hijji J., Larsson J., Batra S. (2001) Effect of ovarian steroids on nitric oxide synthase in the rat uterus, cervix and vagina. *Life Science* **69**, 1133-42.
84. Mitsube K., Mikuni M., Matousek M., Branstrom M. (1999) Effects of nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on luteinizing hormone-induced ovulation in the ex-vivo perfused rat ovary. *Hum Reprod* **14**, 2537-43.
85. Van Voorhis B.J., Moore K., Strijbos P.J.L.M., et al. (1995) Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. *J Clin Invest* **96**, 2719-26.
86. Olson L.M., Jones-Burton C.M., Jablonka-Shariff A. (1996) Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinol* **137**, 3531-39.
87. Bonello N., McKie K., Melinda J., et al. (1996) Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 β -enhanced ovulation rate, steroid hormones and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod* **54**, 436-45.
88. Vega M., Devoto L. (1997) Autocrine/paracrine regulation of normal human corpus luteum development. *Semin Reprod Endocrinol* **15**, 353-62.

89. Jaroszewski J.J., Hansel W., Gawronska B., Okuda K., Skarzynski D.J. (2000) The role of nitric oxide (NO) in the bovine corpus luteum (CL) function: *in vivo* and *in vitro* studies. *Int. Conf. on the Female Reproductive Tract*, 34, Frauenchiemsee, Germany.
90. Skarzynski D.J., Okuda K. (2000) Different actions of noradrenaline and nitric oxide on the output of prostaglandins and progesterone in cultured bovine luteal cells. *Prostaglandins other Lipid Mediat* **60**, 35-47.
91. Motta A.B., Franchi A.M., Gimeno M.F. (1997) Role of nitric oxide on uterine and ovarian prostaglandin synthesis during luteolysis in the rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **56**, 265-69.
92. Telfer J.F., Lyall F., Norman J.E. et al. (1995) Identification of nitric oxide synthase in human uterus. *Hum Reprod* **10**, 19-23.
93. Mara Suburo A., Chaud M., Franchi A., et al. (1995) Distribution of neuronal and non-neuronal NADPH diaphorases and nitric oxide synthases in rat uterine horns under different hormonal conditions. *Biol Reprod* **52**, 631-37.
94. Buhimschi I., Yallampalli C., Dong Y., et al. (1995) Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **172**, 1577-84.
95. Salvemini, D., Misko, T.P., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G., Needleman, P. (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7240-44.
96. Nelson S.H., Steinsland O.S. Wang Y. Yallampalli C., Dong Y.L., Sanchez J.M. (2000) Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res* **87**, 406-11.
97. Van Buren G.A., Yang D., Clark E.C. (1992) Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol* **167**, 828-33.
98. Yallampalli C., Dong Y.L., Gangula P.R., Fong L. (1998) Role and regulation of nitric oxide in the uterus during pregnancy and parturition. *J Soc Gynecol Invest* **5**, 58-67.
99. Ledingham M.A., Thomson A.J., Young A., Macara LM., Greer IA., Norman JE. (2000) Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod* **6**, 1041-48.

100. Ekerhovd E., Brännström M., Mattsby-Baltzer I., Norström A. (2002) 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* **186**, 745-50.
101. Calka J. (2002) Nitric oxide synthase in the preoptic, supraoptic and tuberal nuclei of the porcine hypothalamus-distribution and colocalization with DBH, LHRH and estrogen receptor. Dissertations and Monographs, Warmia and Mazury University, Olsztyn, Poland.
102. Mani S.K., Allen J.M.C., Rettori V., McCann S.M. (1994) Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6468- 72.
103. McCann S.M., Haens G., Mastronardi C. et al (2003) The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. *Curr Pharm Des* **9**, 381-90.
104. Rosselli M., Imthurn B., Macas E., Keller P.J. (1994) Endothelin production by bovine oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* **101**, 27-30.
105. Rosselli M., Imthurn B., Macas E., Keller P.J., Dubey R.K. (1994) Endogenous nitric oxide modulates endothelin 1 induced contraction of bovine oviduct. *Biochem Biophysical Res Commun* **201**, 143-48.
106. Bryant C.E., Tomlinson A., Mitchell J.A., Thiemermann C., Willoughby D.A. (1995) Nitric oxide synthase in the rat fallopian tube is regulated during the oestrous cycle. *J Endocrinol* **146** 149–57.
107. Chatterjee S., Gangula P.R., Dong Y.L., Yallampalli C. (1996) Immunocytochemical localisation of nitric oxide synthase-III in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle. *Histochem J* **28**, 715–23.
108. Perez Martinez, S., Franchi, A.M., Viggiano, J.M., Herrero, B., Gimeno, M.A.F. (1998) Effect of prostaglandin F_{2α} (PF_{2α}) on oviductal nitric oxide synthase (NOS) activity: possible role of endogenous NO on PF_{2α} –induced contractions in rat oviduct. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **56**, 155-166.
109. Majewski M., Sienkiewicz W., Kaleczyc J, Mayer B., Czaja K., Lakomy M. (1995) The distribution and co-localization of immunoreactivity to nitric oxide synthase, vasoactive intestinal polypeptide and substance P within nerve fibres supplying bovine and porcine female genital organs. *Cell & Tissue Res* **281**, 445-64.

110. Ireland J.J., Murphee R.L., Coulson P.B. (1980) Accuracy of predicting stages of Bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci* **63**, 155-60.
111. Uçar M., Yılmaz O., Özenç E., Kahraman A. (2008) Anadolu nehir mandalarında foliküler dinamikler. III. Veteriner Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 23-26 Ekim, Antalya.
112. Miranda K.M., Espey M.G., Wink A.D. (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* **5**, 62-71.
113. Lee G., Luna H.T. (1968) *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology* (3 rd ed). McGraw-Hill Book Company, New York, USA.
114. Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytic Biochem* **162**, 156-59.
115. Sambrook J., Frisch E., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
116. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-85.
117. Bülbül A., Çelik H.A., Şireli M., Avcı G., Civelek T. (2008) Blood nitric oxide and ovarian steroids levels during the cycle stages in Brown Swiss cows. *Ankara Univ Vet Fak Derg* **55**, 155-59.
118. Jablonka-Shariff A., Olson L.M. (1998) The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock out Mouse oocytes. *Endocrinol* **139**, 2944-54.
119. Jablonka-Shariff A., Olson L.M. (1997) Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinol* **138**, 460-68.
120. Moncada S., Higgs E.A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**, 2002-12.
121. Braam B. (1999) Renal endothelial and macula densa NOS: Integrated response to changes in extracellular fluid volume. *Am J Physiol* **276**, 1551-61.

122. Franchi A., Chaud M., Rettori V., et al. (1994) Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 539-43.
123. Perez Martinez S., Franchi A.M., Suburo A. (1997) There are several isoforms of nitric oxide synthase (NOS) on rat oviduct. *Biocell* **21**, 215-23.
124. Moore G.D., Croxatto H.B. (1988) Effects of delayed transfer and treatment with oestrogen on the transport of microspheres by the rat oviduct. *J Reprod Fertil* **83**, 795-802.
125. Wijayagunawardane M, Miyamoto A, Cerbito W, Acosta T, Takagi M., Sato K. (1998) Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology* **49** 607–18.
126. Blair W.D., Beck L.R. (1977) *In vivo* effects of prostaglandin F_{2α} and E₂ on contractility and diameter of the rabbit oviduct using intraluminal transducers. *Biol Reprod* **16**, 122-27.
127. Sakamoto M., Sakamoto S., Kubota T., Aso T., Azuma H. (2001) Localization and role of endothelin-1 and endothelin receptors in the human Fallopian tube. *Mol Human Reprod* **7**, 1057-63.
128. Reinhart K.C., Dubey R.K., Cometti B., Keller P.J., Rosselli M. (2003) Differential effects of natural and environmental estrogens on endothelin synthesis in bovine oviduct cells. *Biol Reprod* **68**, 1430-36.
129. Liu Y., Ruoho A.E., Rao V.D., Hurley J.H. (1997) Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13414-19.
130. Wedel B.J., Garbers D.L. (2001) The guanylate family at Y2K. *Annu Rev Physiol* **63**, 215-33.
131. Langer M., Lüttecke D., Schlüter K.D. (2003) Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship. *Pflügers Archiv Europ J Physiol* **447**, 289-97.
132. Barszczewska B., Jaroszewski J.J. (2004) The influence on nitric oxide on the contractile activity of the isolated porcine ovarian and uterine arteries. *Polish J Vet Sci* **7**, 83-90.
133. Word R.A., Cornwell T.L. (1998) Regulation of cGMP-induced relaxation and cGMP-dependent protein kinase in rat myometrium during pregnancy. *Am Physiol Soc* **274**, 748–56.

134. Tracey W.R., Nakane M., Pollock J.S., et al. (1993) Nitric oxide synthases in neuronal cells, macrophages and endothelium are NADPH diaphorases, but represent only a fraction of total cellular NADPH diaphorase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **195**, 1035-40.
135. Houtmeyers E., Gosselink R., Gayan-Ramirez G., Decramer M. (1999) Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J* **13**, 1177-88.
136. Talbot P., Geiske C., Knoll M. (1999) Oocyte pickup by the mamalian oviduct. *Mol Biol Cell* **10**, 5-8.
137. Scott D.E., Dudley G.K., Knigge K.M. (1974) The ventricle system in the neuroendocrine mechanisms. II. In vitro monoamine transport by ependyma of the median eminence. *Cell Tissue Res* **154**, 1-16.
138. Murad F. (1994) Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cGMP signal transduction system. *Adv Pharmacol* **26**, 19-33.
139. Walczak C.E., Nelson D.L. (1994) Regulation of dynein-driven motility in cilia and flagella. *Cell Motil Cytoskel* **27**, 101-7.
140. Zhan X.H., Li D.C., Johns R.A. (1999a) L-arginine stimulates airway ciliary beat frequency via the nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway. *Am J Resp Crit Care* **159**, A285 Suppl.
141. Zhan X.H., Li D.C., Johns R.A. (1999b) Immunohistochemical evidence for the NO cGMP signaling pathway in respiratory ciliated epithelia of rat. *J Histochem Cytochem* **47**, 1369-74.
142. Zhan X.H., Li D.C., Johns R.A. (2003) Expression of endothelial nitric oxide synthase in ciliated epithelia of rats. *Histochem Soci* **51**, 81-87.
143. Hunter R.F.H. (1988) *The Fallopian tubes*. Springer Verlag, New York, NY, USA.