

17 β -Östradiolün Overioktomize Ratlarda Spontan Myometriyal Kasılımlar Üzerine Etkisi[#]

Özlem YILDIZ GÜLAY^{1*}, Aziz BÜLBÜL²

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye
²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

[#]Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu 07.VF.03 Proje numarası ile desteklenmiş ve aynı isimli tezden özetlenmiştir. Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (AKÜHEK-44-08/203).

*Corresponding author e-mail: oygulay@mehmetakif.edu.tr

ÖZ

Çalışma farklı doz ve sürelerde uygulanan 17 β -östradiolün ovaryumları çıkarılmış sıçanlarda spontan myometriyal kasılımlar üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Araştırmada 3-6 aylık ve ortalama 270 \pm 20 g ağırlığında, 72 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar, her grupta 18 sıçan bulunacak şekilde, kontrol (Ov) ve 3 deneme grubuna (östrojen) ayrılmıştır. Kontrol grubuna günlük olarak kas içi susam yağı enjeksiyonları yapılmış (0,2 ml), birinci deneme grubundaki sıçanlara günlük 25 μ g 17 β -östradiol, ikinci deneme grubundaki sıçanlara günlük 50 μ g 17 β -östradiol, ve üçüncü deneme grubundaki sıçanlara günlük 100 μ g 17 β -östradiol kas içi uygulanmıştır. Her grup kendi arasında 3 alt gruba ayrılarak 18, 90 ve 162. saatlerde 6'şar hayvan genel ötenazi yapılmıştır. Nitrik oksitin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla L-Arginin SNP ve L-NNA (Nitro-N-Arginin) uygulaması yapıldı. Alınan uterus örneklerinden elde edilen doku kesitlerinde cGMP-PK1 ekspresyonunu göstermek için immunohistokimyasal yöntemle boyandı. Uygulama sonrası östrojen verilen gruplarda spontan myometriyal kasılımların şiddeti, östrojenin dozuna ve süresine bağlı olarak arttı. Ayrıca, östrojenin L-arginin-NOS-NO-cGMP yolunun etkinliğini engellediği belirlendi. Östrojenin uterusunda bulunan longitudinal düz kaslarda cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine etkisinin bulunmadığı görüldü. Sonuç olarak östrojenin doza ve süreye bağımlı olarak uterus kasılımlarının şiddetini artırırken, L-Arginin-NOS-NO- cGMP-PK1 yolunun etkinliğini engellediği fakat bu engellenmenin cGMP-PK1 üzerinden olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: 17 β -östradiol, Myometriyum, cGMP'ye bağımlı protein kinaz, NOS.

Effects of 17 β -Estradiol on Spontaneous Myometrial Contractions in Ovariectomized Rats

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of injecting different doses and time intervals of 17 β -estradiol on spontaneous myometrial contractions of ovariectomized rats. Three to 6 months old 72 female Sprague Dawley rats, weighing 270 \pm 20 g, were used in the current study. The ovariectomized rats were randomly assigned to a control (Ov) and three experimental groups (17 β -estradiol injected) of 18 rats each. Rats in the Ov group received daily sesame oil (0.2 ml, IM), whereas each rat in the three experimental groups was treated with daily 25, 50 and 100 μ g estradiol (IM), respectively. Each group was further divided into 3 subgroups: 6 rats in each group were sacrificed by cervical dislocation at 18, 90 and 162 hr. In order to determine endogenous nitric oxide activity, the L-arginine solution was used. Sodium nitroprusside (SNP) was used for evaluation of the exogenous nitric oxide pathway. In addition, L-NNA (nitro-N-arginine) treatment was applied in order to determine the effect of endogenous NO at the receptor level. Immunohistochemical evaluation was performed to determine the cGMP-PK1 expression from the uterus samples. In the current study, estrogen treatment increased spontaneous myometrial contraction in a dose and time-dependent manner. Moreover, estrogen treatments inhibited L-arginine-NOS-NO-cGMP pathway. On the other hand, estrogen failed to have any effect on cGMP-PK1 expression in uterine longitudinal smooth muscles. Thus, 17 β -estradiol treatments increased the uterine smooth muscle cell contractions. The treatments also inhibited L-Arginine-NOS-NO-cGMP-PK1 pathway. However, our results indicated that 17 β -estradiol did not show its effect through cGMP-PK1.

Keywords: 17 β -estradiol, myometrium, cGMP-dependent protein kinase, NOS.

To cite this article: Gülay Yıldız Ö. Bülbül A. 17 β -Östradiolün Overioktomize Ratlarda Spontan Myometriyal Kasılımlar Üzerine Etkisi. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 374-384.

GİRİŞ

Östrojen hormonu myometriyal kasılmalar için gerekli olan kontraktıl proteinlerin, düzenleyici enzimlerin ve koneksin 43'ün sentezlenmesini arttırdığından, uterus düz kaslarında kasılmaları da şiddetlendirmektedir (Petrocelli ve Lye 1993; Weiss G 2000). Östrojen gebe ve gebe olmayan uterustaki oksitosin reseptörlerini ve β -adrenerjik ajanları artırarak membran kalsiyum kanalları üzerine de etki etmektedir (Richter, 2004). Östradiol uygulaması sonucunda bazal kasılma düzeylerinde değişiklik meydana gelmekte ve rat myometriyal dokuda oksitosin ve PGF2 β 'ya karşı duyarlılık artmaktadır (Vedernikov, 2003). Benzer bir şekilde, ovaryumları çıkartılmış (Ov) ratlarda östrojen tedavisinin PGF2 β mRNA düzeylerinde farklılık oluşturmadan PGF2 β 'ya karşı duyarlılıkta artışa sebep olduğu (Gordan ve ark. 2007), aynı zamanda folliküler dönemde uterustaki kasılım şiddetinin östrojene bağlı olarak arttığı ifade edilmektedir (Abramowicz ve Archer 1990; Oike ve ark. 1990).

Nitrik oksitin mide bağırsak (Bülbül ve ark. 2014) ve damar düz kaslarında (Eckman ve ark. 1994) kasılmaları baskılayıcı etkisinin bulunduğu bilinmektedir. Son zamanlarda östrojenin uterus kasılmaları üzerine etkilerinde nitrik oksidin de aracılık edebileceği üzerinde durulmaktadır. Ovaryum ve uterus dokusunda nitrik oksit oluşumundan sorumlu NOS enzimleri (iNOS, eNOS ve nNOS) çeşitli hayvan türlerinde gösterilmiştir (Kuenzli ve ark. 1998; Challis ve ark. 2000; Bülbül ve ark. 2013). İnsan myometriyumundaki iNOS mRNA'sına doğum öncesinde en yüksek düzeylerde rastlanırken, doğumda ise en düşük düzeylerde olduğu gösterilmiştir (Challis ve ark. 2000). Benzer şekilde uterus ve ovaryumda NOS enzim etkinlikleri menstürasyon siklusuna (Vedernikov ve ark. 2003), beslenme ve yaşa bağlı olarak değişmektedir (Bülbül ve ark. 2015a; 2015b). Ovaryumları çıkartılmış sıçanlarda nitrik oksit donörü L-Arginin uygulaması uterus kaslarında gevşemeye yol açarken, 10 gün süre ile 10 μ g/gün 17 β -östradiol verilen sıçanlarda L-Arginin uygulamasının uterus kasındaki kasılmalar üzerine gevşetici etkisi gözlenmemiştir. Aynı çalışmada SNP uygulamasının uterusta gevşemeye yol açtığı, fakat bu etkinin 10 gün boyunca 10 μ g dozunda 17 β -östradiol verilen sıçanlarda ortadan kalktığı gözlenmiştir (Bulbul ve ark. 2007a). Yine Ov sıçanlarda 10 gün boyunca 10 μ g dozunda verilen 17 β -östradiol uterustaki kasılmaların şiddetini arttırırken myometriyal kasılım sıklığını Ov grubuna göre azaltmıştır (Bulbul ve ark. 2007b). Bu bulgular 17 β -östradiolün NO üzerine olan etkisinin myometriyumdaki cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine olabileceğini düşündürmektedir. Daha

önceki çalışmalarda östrojen uygulamalarının uterus kasılmalarını arttırdığına (Vedernikov ve ark. 2003; Bulbul ve ark. 2007b) veya uterus kasılmalarını durdurduğuna dair bildirimler bulunmaktadır (Gordon ve ark. 2000). Ayrıca literatürlerde farklı doz ve süreye bağlı olarak 17 β -östradiolün uterus kasılmaları ve cGMP-PK1 üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada sıçanlarda 17 β -östradiolün doza ve süreye bağlı olarak uterus kasılmaları üzerine etkisinin belirlenmesi yanı sıra, bu etkilerin ortaya çıkmasında cGMP-PK1'in rolünün değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Araştırmada 3-6 aylık ve ortalama 270 \pm 20 gr ağırlığında, 72 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce sıçanlara genel anestezi (21,1 mg/kg ketamin ve 4,2 mg/kg ksilazin) altında ovariektomi uygulandı. Ovariektomiden 2 hafta sonra sıçanların genel muayeneleri yapılarak her grupta 18 sıçan bulunacak şekilde, kontrol (Ov) ve 3 deneme grubuna (östrojen) ayrıldı. Araştırmada kontrol ve östrojen gruplarındaki sıçanlara uygulanan prosedür Tablo 1'de verilmektedir.

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

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

İzole Organ Banyosu

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

ve izometrik düz kas hareketleri “force transducer” ve “acquisition system” yardımı ile bilgisayarda görüntülenerek kaydedildi.

Uterusta İzometrik Kasılımların Belirlenmesi

Dokulara uygulanan deney protokolü Tablo 2’de gösterilmektedir. Özetele organ banyosunun kadehlerine tespit edilen doku parçaları ortama alışmaları için 1 saat süreyle krebs çözeltisi içerisinde bekletildi. Öncelikle spontan kasılımların belirlenmesi için 45 dakikalık kasılım periyodu kaydedildi. Takiben Electric Field Stimulation (EFS) ile her iki doku için submaksimal kasılımın sağlandığı voltaj, frekans ve uyarı derinliği değerleri tespit edildi. Bunun için dokuya çeşitli düzeylerde elektrik akımı (10, 20, 30, 40 volt) farklı sürelerde (0,25, 0,5, 1 ms) ve sıklıkta (frekans) (2, 4, 8, 16, 32, 64 Hz) uygulandı (Oike ve ark. 1990). En şiddetli kasılımın meydana geldiği ortalama frekans değeri 32 Hz, uyarı derinliği 1 ms ve voltaj yüksekliği ise 20 volt olarak tespit edildi.

Endojen NO etkinliğinin belirlenmesi amacıyla EFS varlığında L-Arginin 1 μ M den 1 mM, eksojen NO yolunun değerlendirilmesi amacıyla SNP 10 nM den 0.1 mM dozlarında logaritmik olarak artırılarak her on dakikada bir izole organ banyosuna ilave edildi (Tablo 2). Endojen NO etkisinin enzimsel düzeyde etkisinin ortaya konulması için EFS varlığında 100 mmol/L L-NNA verildikten sonra L-Arginin 1mM dozunda izole organ banyosuna eklendi.

Myometriyumda cGMP-PK1’in İmmunohistokimyasal Boyanması

Alınan uterus örnekleri % 10 tamponlu formaldehit ile 24 saat tespit edildi. Tespitten sonra doku örneklerinin histolojik takipleri yapılarak parafin bloklara gömüldü. Bloklardan 4–5 μ ’luk kesitler alınarak immunhistokimyasal yöntemle boyandı (Misirlioglu ve ark. 2000). İmmunhistokimyasal yöntem olarak indirekt streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi kullanıldı. Buna göre: Asit-alkolle temizlenmiş ve poli-L-lizin ile kaplanmış olan lamalara 4-5 μ ’luk doku kesitleri alındı ve kesitler 60 °C’lik etüvde 1 saat bekletildi.

Preparatlar ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek, antijen retrieval için pH 6 olan Sitrata buffer içerisinde mikrodalga fırında 700 watt’da 3 kez 5’er dakika kaynatıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için distile suda hazırlanmış % 3’lük Hidrojen peroksit ile 10 dakika inkübe edildi. Anti rabbit poliklonal IgG primer antikor (1/500 dilüsyon) ile preparatlar nemli ortamı sağlayan bir kap içerisinde 37 oC’de 30 dakika inkübe edildi. Preparat biotinli sekonder antikor ile oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Enzim olarak Streptavidin-HRP ile preparatlar oda sıcaklığında

20 dakika inkübe edildi. DAB substrat-kromojen solüsyonunda 5 dakika tutularak, Harris Hematoksilin ile 30 saniye zıt boyama yapıldı. Alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı (Misirlioglu ve ark. 2000).

İmmunohistokimyasal Değerlendirme

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

Reaksiyonun olmaması = 0; <1= 1; %2-10= 2; %11-30= 3; %31-65= 4; % >65= 5

Reaksiyonun şiddeti ve dağılımından elde edilen skor değerleri toplanarak immunohistokimyasal boyama skor değeri elde edildi (Misirlioglu ve ark. 2000).

Bu çalışmada istatistiksel analizler için ‘SPSS 13.0 istatistik paket programı’ kullanıldı. İzole organ banyosu değerlendirmelerinde gruplar arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde, dokularda cGMP’ye bağımlı PKG değerlendirilmesinde ve immunohistokimyasal değerlendirme sonucu elde edilen verilerin önem gösterip göstermediğinin belirlenmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi, farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için ise Tukey testi yapıldı.

BULGULAR

Spontan kasılımların şiddeti ve frekansı

Gruplarda 18, 90 ve 162. saat sonunda spontan myometriyal kasılımların şiddeti ve sıklığı Tablo 3’ de gösterilmiştir. Spontan myometriyal kasılımların şiddetinin 18. saatte 50 ve 100 μ g 17 β -östradiol gruplarında, 90 ve 162 saatlerde ise tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre arttığı görüldü ($p < 0,001$). Spontan myometriyal kasılımların frekansının ise tüm saat ve uygulama gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı görüldü ($p < 0,001$).

Gruplarda L-Arginin Uygulamasının Kasılım Şiddetine Etkisi

Gruplarda 18., 90. ve 162. saatlerde uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-Arginin (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) ve NNA (10^{-3} M) + L-Arginin (10^{-3} M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılımlara ait doz-cevap eğrisi Grafik 1’de gösterilmektedir. Buna göre L-arginin 18 ve 90 saatlerde Kontrol ve 25 μ g 17 β -östradiol gruplarında dozuna bağımlı olarak kasılım şiddetini azaltırken ($p < 0,05$); aynı saatlerde 50 μ g 17 β -östradiol ve 100 μ g 17 β -östradiol gruplarında, 162.

saatte ise üç deneme grubunda da istatistiksel olarak gevşetici etki oluşturmadı. Aynı zamanda 18 ve 90. saatlerde kontrol ve 25 µg 17β-östradiol grubunda NNA uygulamasının L-Argininin (10⁻³ M) etkisini ortadan kaldırdığı görüldü.

Gruplarda SNP uygulamasının kasılım şiddetine etkisi

Gruplarda 18., 90. ve 162. saatlerde uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasımlara ait doz-cevap eğrisi Grafik 2'de gösterilmektedir. Buna göre kontrol grubunda 18, 90 ve 162'inci saatlerde SNP'nin en düşük iki dozu (10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M) etkili olmazken, diğer dozlarında doza bağımlı olarak gevşeme şekillendiği saptandı. Benzer etki östrojen uygulanan tüm gruplarda 18 saat sonunda belirlenirken, 90 saatte sadece 25 µg 17β-östradiol grubunda SNP'nin en yüksek dozu olan 10⁻⁵ M düzeyinde görüldü. 162. saat sonunda 17β-östradiol verilen grupların hiç birisinde SNP'nin gevşemeye yol açmadığı gözlemlendi.

Östrojenin Doza ve Süreye Bağlı Olarak cGMP-PK1 Dağılımına Etkisi

Gruplarda 18., 90. ve 162'nci saat sonunda cGMP-PK1 immunreaksiyonunun boyama skorları Tablo 3'de gösterilmektedir. Uterustaki sirküler kaslarda 18'inci saatte cGMP-PKG boyama skoru değeri 25 ve 100 17β-östradiol gruplarında Ov grubuna göre yüksek bulundu. Sirküler kaslarda 18'inci saatteki en düşük cGMP-PK1 boyama skor değeri 50 µg 17β-östradiol grubunda gözlemlendi (Resim 1). 90. saatte ise, cGMP-PK1 boyama skor değeri bakımından kontrol ile 50 ve 100 µg 17β-östradiol grupları arasında fark görülmezken 25 µg 17β-östradiol grubunun 50 ve 100 µg 17β-östradiol gruplarına göre azaldığı belirlendi (Resim 2). Myometriumda sirküler kas hücrelerinde 162'nci saat sonunda cGMP-PK1 dağılımında gruplar arasında istatistiki bir fark saptanmadı. Benzer şekilde uterustaki longitudinal kaslarda doza ve şiddete bağlı olarak cGMP-PK1 dağılımında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Tablo 1: Araştırma prosedürü

Table 1: Research procedure

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

Tablo 2: Yöntem içerisinde dokulara uygulanan araştırma protokolü

Table 2: The research protocol applied to the tissues

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

Tablo 3: Gruplarda 18, 90 ve 162. saat sonunda spontan myometriyal kasılmaların şiddeti ve sıklığı
Table 3: The severity and frequency of spontaneous myometrial contractions at 18, 90, and 162 hours in groups

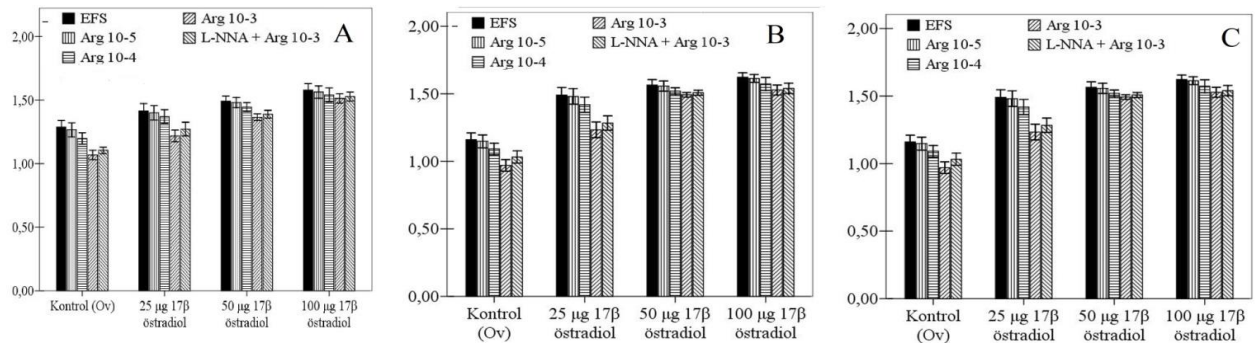
	Kontrol (OV)	25 µg 17β-östradiol	50 µg 17β-östradiol	100 µg 17β-östradiol	P
Kasılım şiddeti (g)					
18. saat	0,95±0,04 ^c	1,06±0,04 ^{bc}	1,18±0,03 ^{ab}	1,26±0,03 ^a	0,000*
90. saat	0,87±0,04 ^c	1,02±0,04 ^b	1,28±0,04 ^a	1,32±0,05 ^a	0,000*
162. saat	0,82±0,04 ^c	1,16±0,05 ^b	1,45±0,05 ^a	1,48±0,04 ^a	0,000*
Kasılım sıklığı (adet/dk)					
18. saat	1,71±0,08 ^a	1,50±0,03 ^b	1,36±0,03 ^{bc}	1,28±0,05 ^c	0,000*
90. saat	1,66±0,07 ^a	1,36±0,04 ^b	1,21±0,04 ^{bc}	1,07±0,06 ^c	0,000*
162. saat	1,79±0,07 ^a	1,13±0,04 ^b	0,98±0,06 ^b	0,77±0,04 ^c	0,000*

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

Tablo 4: Gruplarda 18'inci saatte uterus sirküler ve longitudinal kaslarında cGMP-PK1 boyama skor değeri
Table 4: cGMP-PK1 staining scores of uterine circular and longitudinal muscles at 18th hour in groups

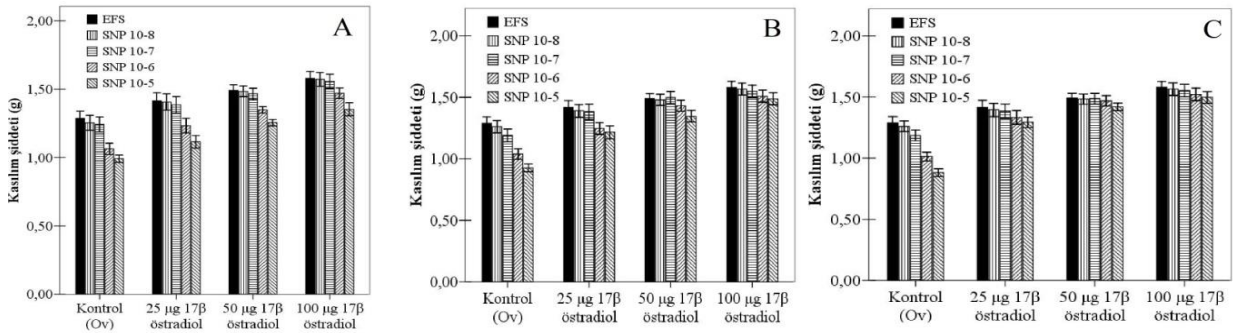
	Kontrol (OV)	25 µg 17β-östradiol	50 µg 17β-östradiol	100 µg 17β-östradiol	P
Sirküler kas					
18. saat	6.50±0.12 ^b	7.41±0.08 ^a	5.25±0.55 ^c	7.75±0.11 ^a	0.00*
90. saat	5.33±1.16 ^{ab}	3.50±0.22 ^b	6.83±0.45 ^a	7.00±0.00 ^a	0.00*
162. saat	7.08±0.08	5.00±1.34	6.66±0.47	5.50±0.56	0.21
Longitudinal					
18. saat	7.33±0.10 ^a	7.41±0.08 ^a	7.00±0.44 ^a	7.75±0.11 ^a	0.21
90. saat	6.58±0.53	6.75±0.11	7.33±0.27	6.50±0.00	0.24
162. saat	7.08±0.08	6.00±0.89	7.25±0.11	6.16±0.73	0.34

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



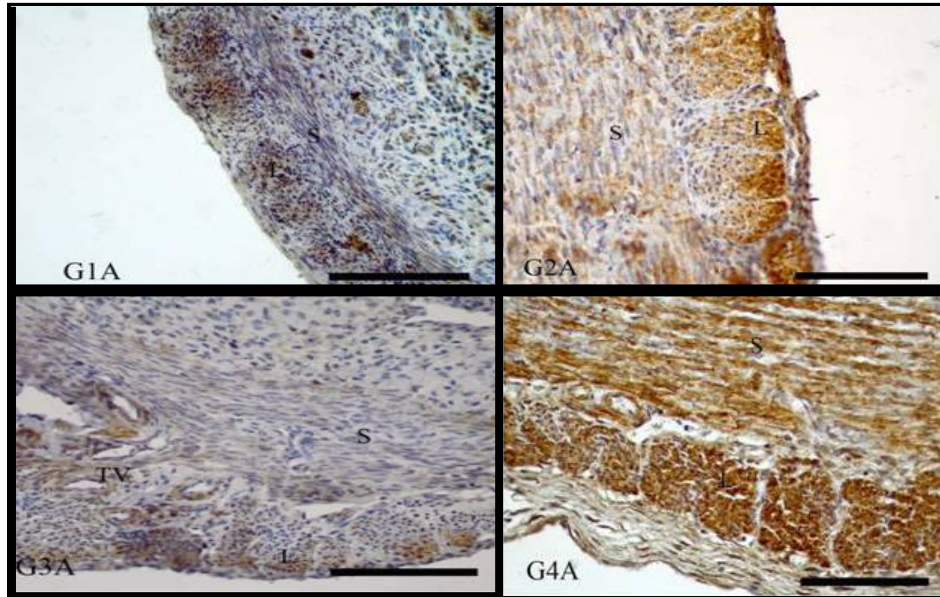
Grafik 1: Gruplarda 18. (A), 90. (B) ve 162. (C) saatlerde uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 10⁻³ M) ve NNA (10⁻³ M) + L-Arginin (10⁻³ M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılmalara ait amplitüt değerleri ve doz-cevab eğrisi

Graph 1: Amplitude and the dose-response curves of the electrical stimulation for L- arginine (10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 10⁻³ M) and NNA (10⁻³ M) + L-Arginine (10⁻³ M) treatments on the uterine smooth muscles at 18 (A), 90 (B) and 162 (C) hours.



Grafik 2: Gruplarda 18. (A), 90. (B) ve 162. (C) saatlerde uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP'nin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M ve 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılmalara ait amplitüt değerleri ve doz-cevab eğrisi

Graph 2: Amplitude and the dose-response curves of the electrical stimulation for SNP'nin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M ve 10^{-5} M) treatments on the uterine smooth muscles at 18 (A), 90 (B) and 162 (C) hours



Resim 1. Kontrol (G1A) ve deneme gruplarında (25 µg 17β-östradiol, G2A; 50 µg 17β-östradiol, G3A ve 100 µg 17β-östradiol G4A) 18'inci saatte uterus sirküler (S) ve longitudinal (L) kaslarında cGMP-PK1 dağılımı, bar= 100µm

Figure 1. The cGMP-PK1 distribution in uterus circular (S) and longitudinal (L) muscles at 18th hour in the control (G1A) and experimental groups (25 µg 17β-östradiol, G2A, 50 µg 17β-östradiol, G3A and 100 µg 17β-östradiol G4A), bar = 100µm.

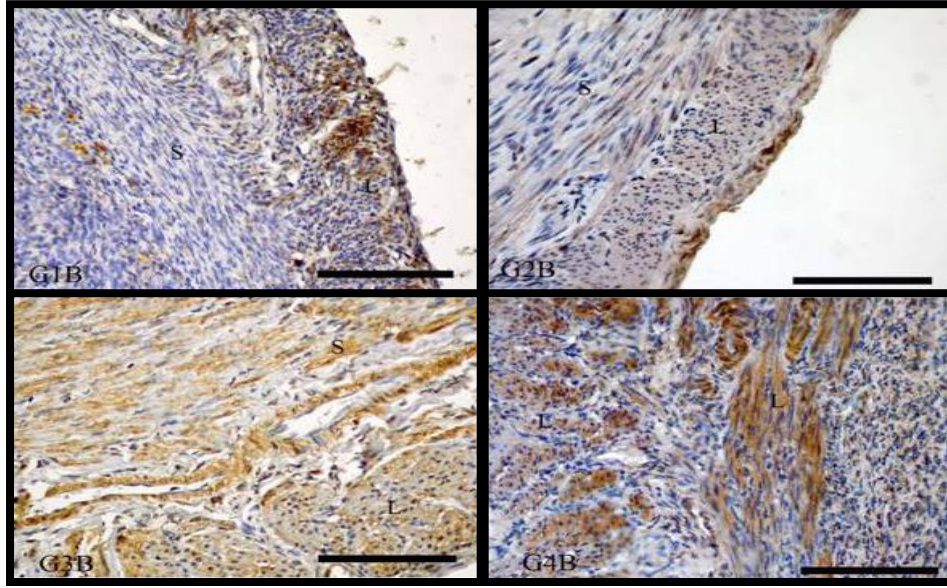
TARTIŞMA

Araştırmada ovaryum steroidlerinden 17β-östradiol'ün doza ve süreye bağlı olarak ratlarda spontan myometrial kasılmalar üzerine olan etkisi incelendi. Myometriyal kasılmalar birçok faktör tarafından düzenlendiği için diğer düz kaslardan farklıdır. Myometriyal kasılmaların etkinliği otonom sinir sisteminin yanı sıra bazı otokoidler özellikle de yerel ve cinsiyet hormonları tarafından düzenlenmektedir (Gart 2001). Ovaryumdan

salgılanan steroid yapıdaki hormonların uterus kasılmaları üzerine doğrudan etkileri bulunmaktadır. Östrus siklusu ve gebelik gibi fizyolojik olaylarda ovaryum steroidlerinin yoğunluğu ve myometriyal kasılmaların özelliği değişmektedir (Weiss 2000). Östrojenlerin myometriyal kasılmaları artırıcı etkisi bilinmektedir (Abramowicz ve Archer 1990; Oike ve ark. 1990; Vedernikov ve ark. 2003; Bulbul 2007b). Bu çalışmada spontan myometriyal kasılmaların şiddetinin 18.saatte 50 ve 100 µg 17β-östradiol

gruplarında, 90 ve 162 saatlerde ise tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür ($p<0.001$). Bu bağlamda östrojenlerin

kasılım üzerine etkisinin uygulanan dozuna ve süreye göre değiştiği belirlendi.



Resim 2: Kontrol (G1B) ve deneme gruplarında (25 µg 17β-östradiol, G2B; 50 µg 17β-östradiol, G3B ve 100 µg 17β-östradiol G4B) 90'inci saatte uterus sirküler (S) ve longitudinal (L) kaslarında cGMP-PK1 dağılımı, bar= 100µm

Figure 2. The cGMP-PK1 distribution in uterine circular (S) and longitudinal (L) muscles at 90th hour in the control (G1A) and experimental groups (25 µg 17β-estradiol, G2A, 50 µg 17β-estradiol, G3A and 100 µg 17β-estradiol G4A), bar = 100µm.

Bu araştırmada deneme gruplarında spontan myometriyal kasılım sıklığının kontrol grubuna göre önemli oranda azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$). Myometriyumdaki kasılım sıklığı uygulamanın yapıldığı tüm süreler boyunca (18, 90 ve 162. saatler) en yüksek olarak kontrol grubunda bulundu. Kasılım sıklığı 162. saatte en düşük olarak 100 µg 17β-östradiol grubunda görülürken, 18 ve 90. saatlerde 50 ve 100 µg 17β-östradiol gruplarında kasılım sıklıkları arasında fark görülmedi. Bu sonuçlara benzer olarak menopoz sonrası kadınlarda ve Ov ratlarda yapılan çalışmada uterustaki kasılım sıklığının arttığı bildirilmektedir (Vedernikov ve ark. 2003). Ayrıca, sıçanlarda 10 µg/gün 17β-östradiol uygulaması myometriyal kasılım sıklığını Ov grubuna göre azaltmıştır (Bulbul ve ark. 2007b). Araştırmacılar bu artışı Ov ratlarda artan spontan kasılım etkinliğinin ovaryum steroidlerinin genomik ve genomik olmayan baskılayıcı etkilerinin uzaklaştırılmasının myometriyal hücrelerin zarlarının elektriksel kararsızlığa neden olması sonucu olabileceğini bildirmektedirler. Buna ilaveten östrojenlerin düz kaslarda hücre dışına K⁺ çıkışını uyararak hücreyi

hiperpolarize edebildiği, bu sayede spontan kasımların oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir (Harder ve Coulson, 1997).

Nitrik oksit endojen olarak L-Argininden NOS enzimleri aracılığı ile oluşmaktadır (Bredt ve Snyder 1990; Forstermann ve ark. 1991). Bir NO prekürsörü olan L-Arginin uygulamasının, insan (Challis ve ark. 2000) ve sıçanda (Bulbul ve ark. 2007) NO sentezini artırdığı ve myometriyal kasımları baskıladığı belirtilmiştir. Fizyolojik koşullarda sıçan serumundaki L-Arginin yoğunluğu yaklaşık 0,2 – 3 mM civarındadır (Langrehr ve ark. 1992). İn vitro ortamdaki düz kasların kasılım etkinliği ise L-Argininin yaklaşık 0.01–1mM yoğunluğunda tamamen ortadan kalkmaktadır (Yallampali ve ark. 1992). Bu araştırmada L-Arginin 0.01 – 1mM yoğunluğunda kullanılmıştır. Gebe insan ve sıçan uterusunda (Izumi ve ark. 1993) ve gebe olmayan insan uterusunda (Hoffmann ve ark. 2003) L-Argininin doza bağımlı olarak kasılım şiddetini azalttığı bildirilmektedir. L-arginin gevşetici etkisinin uterusta doğum anında azaldığı, doğum sonrası 2. günde ise tamamen ortadan

kalktığı ifade edilmektedir (Yallampali ve ark. 1993). Ovaryumları çıkartılmış sıçanlarda L-Arginin uygulaması uterus kaslarında gevşemeye yol açarken, L-Arginin uygulaması 10 gün süre ile 10 µg/gün 17β-östradiol verilen sıçanlarda uterus kası üzerine aynı etkiye yol açmamıştır (Izumi ve ark. 1990). Önceki çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da Ov grubunda L-Argininin doza bağlı olarak uterus kasılım şiddetini azalttığı (p<0.05), 50 ve 100 µg 17β-östradiol gruplarında ise L-argininin dozlarının etkili olmadığı belirlendi. Düşük dozda östrojen uygulanan 25 µg 17β-östradiol grubunda ise L-Argininin gevşetici etkisi 18 ve 90. saatlerde gözlenirken, gevşetici etkinin 162. saatte kaybolduğu görüldü. Yine gruplarda 18, 90. ve 162. saatlerde 10–3 M dozundaki L-Argininin uygulamasının kasılımın % inhibisyonu üzerine etkisi Ov grubunda arterken, bu etki yüksek dozda 17β-östradiol uygulaması (50 ve 100 µg 17β-östradiol) ile azaldı. Ayrıca, 162. saatte L-argininin kasımları azaltıcı etkisi tüm östrojen uygulanan gruplarda baskılanmıştır. Araştırma bulgusu, L-Argininin uterusu oluşturduğu kasılım şiddetini azaltıcı etkisini, östrojenin doza ve süreye bağlı olarak engellediğini düşündürmektedir.

Gebe rat (Yallampali ve ark. 1993), ve gebe olmayan insan uterusunda (Hoffmann ve ark. 2003) yapılan çalışmalarda ekzojen NO kaynaklarından biri olan SNP'nin spontan kasımları tamamen bloke ettiği bildirilmektedir. Benzer şekilde gebelikte SNP'nin spontan myometriyum kasımlarını tamamen ortadan kaldırdığı, fakat KCl ile uyarılmış kasımlarda etkisi olmadığı ifade etmektedir (Lederman ve Rosso, 2004). Oksitosinle uyarılmış uterus kasımları üzerine SNP'nin 10-4 M ve daha düşük dozlarının etkili olmadığı, daha yüksek dozlarının ise toksik etki göstererek dönüşümsüz inhibisyon oluşturduğunu bildirilmektedir (Ann Word ve ark. 1998). Ayrıca SNP uygulamasının Ov sıçanlarda uterusu gevşemeye yol açtığı, fakat bu etkinin 10 gün boyunca 10 µg dozunda 17β-östradiol verilen sıçanlarda ortadan kalktığı gözlenmiştir (Bulbul ve ark. 2007). Yaptığımız bu çalışmada, Ov grubunda 10⁻⁸-10⁻⁵ M aralığında uygulanan SNP'nin doza bağımlı olarak kasılım şiddetini engellediği, 17β-östradiol verilen gruplarda ise dozun ve sürenin artması ile birlikte SNP'nin etkisinin olmadığı görüldü. Argininin gruplardaki etkisine benzer olarak, SNP'nin östrojen gruplarında kasılım şiddetini azaltmaması, 17β-östradiolün SNP'nin uterusu oluşturduğu gevşeme etkisini engellediğini düşündürmektedir. Sodyum nitroprussid uygulamasının uterus düz kasında görülen kasılımın % inhibisyonu üzerine etkisi 17β-östradiolün uygulanma dozuna ve süresine göre değişiklik göstermiştir. Tüm sürelerde en yüksek 17β-östradiol uygulanan grupta SNP'nin kasılımın %

inhibisyonu üzerine etkisi minimum olarak gözlenirken, Ov grubunda % inhibisyon en yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Genel olarak 17β-östradiol uygulaması SNP'nin etkisini baskılamak, 18. saatte en düşük 17β-östradiol uygulanan grup ile Ov grubu arasında benzer bir inhibisyona rastlanmıştır. Bulgularımız SNP'nin uterusu oluşturduğu % kasılım inhibisyonunun östrojenin dozuna ve uygulama süresine bağımlı olduğunu düşündürmektedir.

Bir siklik nükleotid ikincil haberci olan cGMP vücudumuzdaki bir çok dokuda çok farklı olayların oluşmasında rol oynamaktadır. Bu olaylardan bir tanesi de düz kaslarda NO etkisiyle gevşeme sağlamasıdır. Uterusta NO sentezlendiği belirtilmiştir (Buhimschi ve ark. 1995). Nanomolar düzeydeki NO konsantrasyonları guanilil siklazı aktifleyerek cGMP düzeylerini artırmaktadır. Nitrik oksit-cGMP yolunun aktiflenmesi ise bir çok düz kas tipinde gevşemeyle sonuçlanmaktadır. Nitrik oksit-cGMP yolu bu etkisini cGMP-PK1 üzerinden miyozin fosfataz aktivitesini artırarak (Surks ve ark. 1999) veya sitoplazmik Ca²⁺ miktarını azaltarak gerçekleştirmektedir (Cornwell ve ark. 2001). Düz kas gevşemesi kalsiyum regülasyonu ve iyon transportundan sorumlu olan substratların fosforlanması neticesinde oluşmaktadır (Lincoln ve Cornwell 1993). İnsanda NO-cGMP yolunun varlığı uterus düz kaslarında da tespit edilmiştir ve gebelikte oluşabilecek uterus kasılmalarını azaltmak için de farmakolojik olarak kullanılmaktadır (Buhimschi ve ark. 1995). Östrojen enjekte edilen ratlarda cGMP'nin yüksek PK1 düzeylerinde uterus kasında gevşemeye yol açtığından (Word ve Cornwell 1998), NO-cGMP yolunun uterus kasılabilirliğini kontrol etmede önemli olabileceği düşünülmektedir (Cornwell ve ark. 2001).

Bu çalışmada Ov sıçanların endometriyumdaki sirküler ve longitudinal kas hücrelerinde zayıf bir cGMP-PK1 ekspresyonu belirlendi. Özellikle endometriyumun longitudinal kaslarında çeşitli doz ve sürelerde uygulanan 17β-östradiol hormonunun cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine etkisi minimum olarak bulundu. Siküler kaslarda ise 18'inci ve 90'uncu saatlerde cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine 17β-östradiolün doza bağımsız bir etkisi görüldü. Bu etki 162'nci saatte tamamen ortadan kalktı. Yukarıda açıklandığı gibi NO tarafından uyarılan myometriyal gevşemenin başka düz kas hücrelerinde olduğu gibi guanilil siklaz ve cGMP üzerinden olduğu düşünülse de (Yallampali ve ark. 1994; Buhimschi ve ark. 1995), değişik çalışmalarda NO'nun uterusu gevşemeyi uyurabilmesi için cGMP ve PK1'nin gerekli olmadığını belirtilmektedir (Kuenzli ve ark. 1998; Buxton ve ark. 2001). Kobay uterus düz kaslarında yapılan çalışmada NO'in guanilil siklazı inhibe eden metilen

mavisi uygulamasına rağmen uterus kaslarında gevşemeye yol açtığı belirtilmiştir (Buxton ve ark. 2001). Buna ilaveten uterus düz kasında herhangi bir gevşeme oluşturabilmek için yüksek düzeylerde (10 µM) cGMP analoglarına ihtiyaç duyulmaktadır (Buxton 2004). Maymun ve insan myometriyumunda NO tarafından oluşturulan uterus gevşemesinin cGMP analogları tarafından oluşturulmadığı, guanilil siklaz-cGMP dışındaki bir yolla gerçekleştiği gözlenmiştir (Kuenzli ve ark. 1998; Buxton ve ark. 2001). Bu çalışmalar NO'nin uterus gevşemesi sağlayabilmesi için cGMP-PK1 artışına ihtiyaç duymadığını, iyon kanalları yoluyla bu etkisini gösterebileceğini düşündürmektedir. Araştırma bulgusunda uterusunda bulunan sirküler ve longitudinal kaslarda 17β-östradiolün tüm dozlarının ve sürelerinin cGMP-PK1 dağılımı üzerine etkisinin düşük olduğu gözlenmiştir.

Siklik GMP'nin NO tarafından gerçekleştirilen bütün olaylarda rol almadığı düşüncesi son yıllarda önem kazanmıştır. Buhimschi ve arkadaşları (2000), sıçan uterusunda gebelikle birlikte NO miktarının artmasına rağmen cGMP düzeylerinde önemli bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada gebe olmayan sıçanlarda uzun süreli östrojen uygulaması uterusdaki NO miktarının artmasına cGMP düzeyinin ise azalmasına sebep olduğu belirtilmiştir. Daha önceki çalışmalar sıçan uterusunda NO'nin uterus kasılmalarını durdurduğunu ve NO seviyelerindeki artışın da cGMP yapımını artırdığını bildirilmektedir (Yallampali ve ark. 1994; Buhimschi ve ark. 1995). Bununla birlikte myometriyumdaki NO etkisinin guanilil siklazdan bağımsız olarak şekillenebilir (Buhimschi ve ark. 2000). Weiner ve arkadaşları (1994) kobaylarda gebeliğin guanilil siklaz seviyesini azalttığını bildirmiştir. Buhimchi ve arkadaşları (2000) da prepübertal sıçanlarda östrojenin guanilil siklazın uterusdaki oluşumunu baskılayabileceğini bildirmişler ve uterusunda cGMP düzeylerindeki değişimlerle NO aktivitesi arasında paralellik kurmanın veya NO aktivitesindeki değişimlerle cGMP düzeylerini bağdaştırmanın yanlış sonuçlar verebileceği kanısına varmışlardır.

Damar düz kasları ile yapılan çalışmalarda damar düz kaslarından elde edilen preparatların, cGMP oluşumu bloklandığı halde, NO uygulaması neticesinde gevşediği görülmüştür (Eckman ve ark. 1994). Bu tür olgular renal arterlerde (Trottier ve ark. 1998), serebral mikrosirkülasyonunda (Pinilla ve ark. 1998) ve nöronal hücre iyon kanallarında da (Ahern ve ark. 1999) rapor edilmiştir. Bu bağlamda myometriyumda NO tarafından gerçekleştirilen gevşemede kalsiyum tarafından aktiflenen potasyum kanallarının (KCa) rol alabileceği önerilmiştir (Mazzone ve ark. 2003). Bu teori KCa kanallarını bloke eden akrep toksinlerinin NO

tarafından oluşturulan gevşemeyi engellemesi ile desteklenmiştir (Buxton ve ark. 2001). Dolayısı ile kalsiyum tarafından aktiflenen potasyum kanallarının KCa kanalları NO'nin myometriyumdaki etkisine aracılık eden faktörlerden olabileceği görülmektedir.

Sonuç olarak; 17β-östradiolün uterus kasılım etkinliğini azaltan L-arginin-NOS-NO yolunun etkinliğini baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca östrojenin uterusunda bulunan longitudinal düz kaslarda cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine etkisinin bulunmadığı dolayısı ile myometriyumdaki NO etkisinin cGMP-PK1'den bağımsız olarak şekillenebileceği kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Yardımlarından dolayı Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ ve Dr. Özlem ÖZDEN AKKAYA'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Abramowicz JS, Archer DF.** Uterine endometrial peristalsis: a trans-vaginal ultrasound study. *Fertil Steril.* 1990; 54: 451-454.
- Ahern GP, Hsu SF, Jackson MB.** Direct actions of nitric oxide on rat neurohypophysial KCa channels. *J Physiol (Lond).* 1999; 520: 165-176.
- Ann Word R, Cornwell LT.** Regulation of cGMP-induced relaxation and cGMP-dependent protein kinase in rat myometrium during pregnancy, *Am J Physiol.* 1998; 43: C748-C756.
- Bredt DS, Snyder SH.** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc Nat Acad Sci USA.* 1990; 87: 682-685.
- Buhimschi IA, Yallampali C, Buhimschi CS, Saade GR, Garfield RE.** Distinct regulation of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production by steroid hormones in the rat uterus. *Mol Human Reprod.* 2000; 6: 404-414.
- Buhimschi IA, Yallampali C, Dong YL, Garfield RE.** Involvement of a nitric-oxide guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172: 1577-1584.
- Bulbul A, Altunbas K, Sevimli A, Celik HA.** The effects of ovarian steroids on myometrial contractions in ovariectomized rats. *Rev Med Vet.* 2007; 158: 556-561.

- Bülbül A, Bülbül T, Özdemir V, Akosman MS, Ulutaş E, Yılmaz O.** Biphasic effect of nitric oxide on development of ovarian primordial and primary follicles in laying quail. *European Poultry Science*. 2015a; 79-90.
- Bülbül A, Bülbül T, Sevimli A, Yılmaz O.** The effect of dietary supplementation of nitric oxide donor and inhibitor on nNOS expression in and motility of the small intestine of broilers. *Biotechnic & Histochemistry*. 2013; 88(5): 258-266.
- Bulbul A, Yagci A, Altunbas K, Sevimli A, Celik HA, Karadeniz A, Akdağ E.** The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. *Theriogenology*. 2007; 68: 1156-1168.
- Bülbül T, Akosman MS, Yılmaz O, Ulutaş E, Bülbül A.** Supplementary dietary nitric oxide donor (sodium nitroprusside) or inhibitor (NG-nitro-L-arginine methyl ester) depressed growth performance and ovarian primordial and primary follicles in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in a dose-dependent manner. *British Poultry Science*. 2015b; 56(1): 113-120.
- Bülbül T, Özdemir V, Bülbül A, Ulutaş E.** The effect of dietary L-arginine intake on the level of antibody titer, the relative organ weight and colon motility in broilers. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2014; 17(1): 1800-1805., Doi: 10.2478/pjvs-2014-0015.
- Buxton IL.** Regulation of Uterine Function: a Biochemical Conundrum in the Regulation of Smooth Muscle Relaxation. *Mol. Pharmacol*. 2004; 65: 1051-1059.
- Buxton IL, Kaiser RA, Malmquist NA, Tichenor S.** NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP. *Br J Pharmacol*. 2001; 134: 206-214.
- Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ.** Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. 2000; 21: 514-550.
- Cornwell TL, Li J, Sellak H, Miller RT, Word RA.** Reorganization of myofilament proteins and decreased cGMP-dependent protein kinase in the human uterus during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2001; 86: 3981-3988.
- Eckman DM, Weinert JS, Buxton IL, Keef KD.** Cyclic GMP independent relaxation and hyperpolarization with acetylcholine in guinea pig coronary artery. *Br J Pharmacol*. 1994; 111: 1053-1060.
- Forstermann U, Schmidt HHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F.** Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*. 1991; 42: 1849-1857.
- Gart P.** *Human Pharmacology*, ed: Taylor & Francis, New York. 2001; Pp: 107-109.
- Gordan PL, Jenkins SL, Wentworth RA, Nathanielsz PW.** Effect of in vivo estradiol administration to bilaterally ovariectomized rats on in vitro myometrial responsiveness to prostaglandin F₂alpha and oxytocin. *Biol Repr*. 1977; 57: 597-601.
- Gordon AM, Homsher E, Regnier M.** Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*. 2000; 80:853-924.
- Harder DR, Coulson PB.** Estrogen receptors and effect of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. *J Cell Physiol*. 1979; 100: 375-382.
- Hoffmann P, Stanke-Labesque F, Fanchin R, Dilai N, Pons JC, Ayoubi JM.** Effects of L-arginine and sodium nitroprusside on the spontaneous contractility of human non-pregnant uterus. *Hum Reprod*. 2003; 18: 148-151.
- Izumi H, Ichihara J, Uchiumi Y, Shirakawa K.** Gestational changes in mechanical properties of skinned muscle tissues of human myometrium. *Am J Obstet Gynecol*. 1990; 163: 638-647.
- Izumi H, Yallampalli C, Garfield RE.** Gestational changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle, *Am J Obstet Gynecol*. 1993; 169: 1327-1337.
- Kuenzli KA, Buxton IL, Bradley ME.** Nitric oxide regulation of monkey myometrial contractility. *Br J Pharmacol*. 1998; 124: 63-68.
- Langrehr JM, Dull KE, Ochoa JB, Billiar TR, Ildstad ST, Schraut WH, Simmons RL, Hoffman RA.** Evidence that nitric oxide production by in vivo allosensitized cells inhibits the development of allospecific CTL. *Transplantation*. 1992; 53: 632-640.
- Lederman SA, Rosso P.** Steroid hormone changes in pregnant rats. www.taxtexts.com/SteroidPaper.PDF. 2004; 1-17.

- Lincoln TM, Cornwell TL. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J*. 1993; 7: 328-338.
- Mazzone JN, Kaiser RA, Buxton IL.** Calcium-activated potassium channel expression in human myometrium: effect of pregnancy. *Proc West Pharmacol Soc*. 2002; 45: 184-186.
- Misirlioglu D, Nak D, Sevimli A, Nak Y, Ozyigit MO, Akkoc A, Cangul IT.** Steroid receptor expression and HER-2/neu (c-erbB-2) oncoprotein in the uterus of cats with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2006; 53: 225-229.
- Oike K, Ishihara K, Kikuchi S.** A study on the endometrial movement and serum hormonal level in connection with uterine contraction, *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*. 1990; 42: 86-92.
- Petrocelli T, Lye SJ.** Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinol*. 1993; 133: 284-290.
- Pinilla L, Gonzalez D, Tena-Sempere M, Aguilar E.** Nitric oxide (NO) stimulates gonadotropin secretion in vitro through a calcium-dependent, cGMP independent mechanism. *Neuroendocrinology*. 1998; 68: 180-186.
- Richter ON, Kubler K, Schmolling J, Kupka M, Reinsberg J, Ulrich U, van der Ven H, Wardelmann E, van der Ven K.** Oxytocin receptor gene expression of estrogen-stimulated human myometrium in extracorporeally perfused non-pregnant uteri. *Mol Hum Reprod*. 2004; 10: 339-346.
- Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME.** Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I β . *Science*. 1999; 286: 1583-1587.
- Trottier G, Triggle CR, O'Neill SK, Loutzenhiser R.** Cyclic GMP-dependent and cyclic GMP-independent actions of nitric oxide on the renal afferent arteriole. *Br J Pharmacol*. 1998; 125: 563-569.
- Vedernikov YP, Hartke JR, Long MA.** Sex hormone effects in non-pregnant rat and human myometrium. *European J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003; 108: 59-66.
- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S.** Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 5212-5216.
- Weiss G.** Endocrinology of parturition, *J Clin Endocrinol Metabol*. 2000; 12: 4421-4425.
- Word RA, Cornwell TL.** Regulation of cGMP-induced relaxation and cGMP-dependent protein kinase in rat myometrium during pregnancy. *Am J Physiol*. 1998; 274: 748-756.
- Yallampali C, Garfield RE, Byam-Smith M.** Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinol*. 1993; 133: 1899-1902.
- Yallampali C, Izumi H, Byam-Smith M, Garfield RE.** An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1994; 170: 175-185.