

İNEKLERDE SENKRONİZASYON SONRASI ve SIKLUS DÖNEMLERİ NİTRİK OKSİT SEVİYELERİ*

Hacı Ahmet Çelik¹@

Dursun Ali Dinç²

Nitric Oxide Concentration in Cows after Synchronisation and During Cycle Stages

Özet : Bu araştırmada; ineklerde senkronizasyon sonrasında ve siklusun dönemlerinde nitrik oksit (NO) seviyelerinde meydana gelen değişikliklerin ortaya konulması amaçlandı. Araştırma materyalini 40 baş Holstein ırkı inek oluşturdu. Normal ovaryum yapısına sahip hayvanlar tek doz PGF₂α ile senkronize edildi. Uygulama sonrasında östrüs belirtileri gösteren ve göstermeyen hayvanlardan uygulama öncesi ve sonrasında kan örnekleri alınarak NO ve progesteron analizleri yapıldı. Östrüse gelen hayvanlardan siklusun dönemlerinde kan örnekleri alınarak NO ölçümleri gerçekleştirildi. Senkronizasyon öncesinde daha yüksek NO seviyesine sahip olan hayvanlarda östrüs belirtilerinin oluşmadığı tespit edildi. Östrüs gösteren hayvanlarda senkronizasyon sonrasında NO seviyesinde meydana gelen azalmanın östrüs belirtileri göstermeyen hayvanlardan daha düşük olduğu görüldü. Senkronizasyon uygulaması sonrasında progesteron değerlerinde de azalma belirlendi. Nitrik oksit seviyesinin siklusun dönemlerinde farklı şekilde seyrettiği tespit edildi. Sonuç olarak, ineklerde, senkronizasyon uygulaması sonrasında, NO seviyesi yüksek olan hayvanlarda suböstrüs vakalarıyla karşılaşılacağı, siklusun dönemlerinde meydana gelen fizyolojik olayların NO seviyesini etkileyebileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnek, Nitrik Oksit, Senkronizasyon, Östrüs, Siklus Dönemleri

Summary : The aim of this study was to reveal the occurrence of nitric oxide (NO) concentration changes after synchronisation, cycle stages in cows. For this, the following were carried out respectively: Forty Holstein cows were used to study and estrous cycles were synchronised by using single dose PGF₂α in normal ovarial structure animals. Blood samples were taken from estrous positive and negative animals before and after synchronisation and analyzed for NO and progesterone. Blood samples were also taken from estrous positive animals during cycle stages and analyzed for NO. The response of synchronisation was negative in animals that had higher NO concentrations before synchronisation. Decrease of NO concentration after synchronisation was lower in estrous negative animals. The progesterone levels decreased in these animals. Different NO concentrations were determined in cycle stages. It was concluded that cases of subestrous in animals with higher NO could be observed and that the physiologic event that came into cycle stages could be effected by NO concentration in cows.

Key Words: Cow, Nitric Oxide, Synchronisation, Estrous, Cycle Stages

Giriş

İnsan, fare, rat ve tavşanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, serbest radikal bir gaz olan NO'nin diğer bir çok etkisinin yanı sıra, hayvanların üreme fonksiyonları üzerinde de önemli etkisinin olduğu ortaya konulmuştur. Molekül, üreme fonksiyonlarının fizyolojisi ve patolojisi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Nitrik oksit, üreme fonksiyonlarının yerine getirilmesinde hayati rol oynayan hormon ve nörotransmitter maddelerin etkilerinin ortaya çıkmasında önemli bir düzenleyici olarak fonksiyon gösterir (Rossmanith, ve ark., 1999; Dixit ve Parvizi, 2001).

Nitrik oksit ovaryumda çok sayıdaki intraovarian mediatörlerden biri olarak görev yapar (Yamauchi

ve ark., 1997; Jablonka-Shariff ve Olson, 1998; Roselli ve ark., 1998; Basini ve Tamanini, 2000; Basini ve Tamanini, 2001). Laboratuvar hayvanlarının ovaryumlarında belirlenen NO/NOS sistemi, follikülogenez, ovulasyon, oosit maturasyonu ve steroid sentezi gibi ovaryum fonksiyonlarının gerçekleşmesinde görev alır (Yamauchi ve ark., 1997; Dong ve ark., 1999; Jablonka-Shariff ve ark., 1999a; Ruultainen-Altman ve ark., 1996; Jablonka-Shariff ve Olson, 1997; Dong ve ark., 1999; Nemade, 2000).

Ovaryum steroid sentezi, hipofiz gonadotropinleri tarafından düzenlenir. Nitrik oksit, hipofiz gonadotropinlerinin sentez ve salınımlarının kontrolündeki rolü ve intraovaryan etkisi ile ovaryum steroid sentezi sürecine katılır (Yamauchi ve ark., 1997; Dong ve ark., 1999; Dunnam ve ark., 1999).

Molekül, sitokrom P450 enzimini, bunun neticesinde aromatazi engelleyerek granuloza hücrelerindeki steroid sentezini azaltır (Kalra ve ark., 1998; Masuda ve ark., 2001). Nitrik oksit ile östrojen arasında ters bir ilişkinin varlığı bildirilmektedir. Nitrik oksit östrojen sentezini engellerken, östrojen NO sentezini doz veya etki süresine bağlı olarak uyarır (Al-Hijji ve ark., 2001; Dixit ve Parvizi, 2001). Nitekim kronik NO eksikliği oluşturulan farelerde kalıcı östrüs olduğu, bu etkinin seviyesi azalan NO'nin östrojen sentezini engelleyici etkisinin daha az görülmesi sonucu ortaya çıktığı bildirilmektedir (Dunnam ve ark., 1999; Barnes ve ark., 2001).

Nitrik oksit'in ovaryum steroid sentezine etkisi korpus luteum düzeyinde de görülür. Molekül progesteron sentezi üzerine zıt etkiye sahiptir (Dunnam ve ark., 1999). Luteal gelişme döneminde progesteron sentezini arttırırken, luteal regresyon döneminde progesteron sentezini azaltır (Dong ve ark., 1999). Molekül, progesteron sentezini luteal hücrelerde steroid hormonların sentezlenmesinde görev alan enzimlerde bulunan demir atomuna bağlanarak etkiler. Bu etkisi NOS inhibitörlerinin progesteron sentezini uymalarının tespiti ile ortaya konulmuştur (Boiti ve ark., 2002). İnek (Skarzynski ve ark., 2000) ve ratlarda (Motta ve ark., 2001) luteal regresyonun gerçekleştiği dönemde NO ile PGF2 α arasında pozitif bir ilişki belirlenmiştir. Ayrıca Gobbetti ve ark (1999) tarafından, tavşanlarda PGF2 α 'nın uyardığı luteolizisin NOS inhibitörleri tarafından engellendiği, luteolizisin tamamen NO tarafından düzenlendiği ileri sürülmektedir.

Jaroszewski ve Hansel (2000), NO'in sığırlarda luteal regresyonun başlamasında görev aldığını bildirmektedir. Araştırmacılar, ineklerde korpus luteum içine NOS inhibitörü ve NO enjekte ederek yaptıkları çalışmada; siklus ortası dönemde yapılan enjeksiyonların progesteron sentezlenmesi ve korpus luteum yaşam süresi üzerine etkisinin olmadığı, fakat siklus sonu dönemde yapılan enjeksiyonlar sonrasında NOS inhibitörü verilen hayvanların siklusunun 25 güne kadar uzadığı ortaya konulmuştur.

Nitrik oksit'in ineklerin üreme fonksiyonları üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmalar henüz yeterli seviyede değildir. Ancak yapılan ilk çalışmalarla diğer türlerde olduğu gibi inekler üzerinde de etkili olabileceği ortaya konulmuştur. Bu çalışmada, bahsedilen bilgiler ışığında ve nitrik oksitin ineklerdeki etkisi ile ilgili bilgilerin kısıtlı olmasından hareketle ineklerde senkronizasyon sonrasında ve siklusun dönemlerinde nitrik oksit seviyelerinde meydana gelen değişikliklerin ortaya konulması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Araştırmanın hayvan materyalini, yarı açık, serbest sistemde total karışık rasyonla grup beslemesi yapılan ve bir ömek şartlarda, özel bir işletmede barındırılan, 2,5-3 yaşlı ve Holstein ırkı 40 baş inek oluşturdu.

Araştırmada kullanılan hayvanların sağlıklı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla genel muayeneleri yapıldı. Muayene sonucunda sağlıklı olan hayvanlar çalışmaya dahil edildi.

Materyali oluşturan hayvanlar senkronizasyon sonrası östrüs belirtileri gösteren (n=20), senkronizasyon sonrası östrüs belirtileri göstermeyen hayvanlar (n=20) şeklinde gruplara ayrıldı. Östrüs belirtileri gösteren hayvanlar (n=20) aynı zamanda ve siklus dönemi izlenen hayvanları oluşturdu.

İşletme kayıtlarına göre doğumu normal şekillenen, doğum sonrası 45-60. günlerde olup her hangi bir reproduktif sorun yaşamayan hayvanlar seçildi. Hayvanlara rektal ve ultrason muayenesi uygulandı. Ultrason muayenelerinde; 5-7.5 mHz probu olan, Linear array, Real Time B-mode (VetScanner 480, Pie Medical, The Netherlands) özelliklere sahip olan cihaz kullanıldı. Muayenelerde ovaryum üzerinde bulunan oluşumlar tespit edildi. Ovaryum üzerinde aktif korpus luteum bulunduran hayvanların siklusu normal kabul edildi. Siklik aktivite bulgusunun desteklenmesi amacıyla senkronizasyon öncesi alınan kan numunelerinde progesteron analizi yapıldı.

Ovaryumlarında aktif korpus luteum bulunduran hayvanlara senkronizasyon amacıyla tek doz (0.150 mg) PGF2 α (Dalmazin®-Vetaş), kas içi uygulandı. Östrüsler işletme personelinin gözlemi ve pedometre yöntemleri ile tespit edildi. Senkronizasyon sonrasında östrüs belirtileri gösteren ve göstermeyen hayvanlar çalışmaya dahil edildi. Bu hayvanlardan kan numuneleri alınarak nitrik oksit ölçümleri yapıldı.

Öncelikle tüm hayvanlardan tekniğine uygun olarak V.jugularisten, steril antikoagülanlı ve antikoagülanlı vakoitainerler kullanılarak 10 ml kan alındı. Alınan numunelerden progesteron analizi için plazma çıkarıldı. Bu amaçla antikoagülanlı tüplere alınan numuneler iki saat sonra 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısımda yer alan plazmalar mikropipet yardımıyla eppendorf tüplere aktarıldı ve analiz yapılmaya kadar -20°C'de donduruldu. Nitrik oksit ölçümü amacıyla numunelerden serum elde edildi. Serum çıkarmak için numunelerin alınmasından 30 dakika sonra tüpler çizildi. İki saat sonra 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında serum mikropipetle eppendorf tüplere aktararak analiz zamanına kadar

-20°C'de donduruldu.

Kan örnekleri, hayvanlardan, senkronizasyon öncesi ve sonrasında, östrüs (0.gün), metöstrüs (2-3.gün), erken diöstrüs (5-7.gün), siklus ortası dönem (10-11.gün) ve geç diöstrüs (17-18.gün) dönemlerinde alındı. Bu numunelerden yararlanılarak; senkronizasyona cevap veren ve vermeyen hayvanların nitrik oksit değerleri belirlendi. Ayrıca siklusun farklı dönemlerine ait nitrik oksit değerleri de tespit edildi.

Serum nitrik oksit seviyelerinin belirlenmesi Miranda ve ark (2001)'nin yöntemine göre gerçekleştirildi. Nitrik oksit seviyesinin belirlenmesinde Vanadium (III) klorid (VCl_3), Sülfanilamit (%2 w/v) ve NEDD (%0.1 w/v): N-(1-naphthyl)ethylenediamin dihidroklorid (NEDD)'den yararlanıldı. Testin prensibi, nitritin asidik ortamda primer bir aromatik aminle (sülfanilamit) diazotizasyonu ve N-(1-naphthyl) ethylenediamin (NEDD) ile renkli bir azo türevi oluşturması esasına dayanır (Griess reaksiyonu). Sonuçta oluşan bileşik 545-555 nm dalga boyundaki ışığı absorbe edebilen mor bir azo boyasıdır. Test yapılırken öncelikle kan serumundan alınan 100 µl örnek üzerine 100 µl VCl_3 eklendi. Bunların üzerine seri halde 50 µl sülfanilamit ve NEDD çözeltileri ilave edildi. İnkübasyona 37°C'de 30 dakika bırakıldıktan sonra kültür plağı okuyucusuna yerleştirilen örnekler 550 nm'de okundu.

İnek plazmalarında progesteron tayini için çift antikorlu mikrotitrasyon plak enzim immuno assay (EIA) yöntemi kullanıldı. Her seferinde plazma nu-

muneleri çift çalışıldı. Her deney serisinde deneyin hassasiyetinin kontrol edilmesi için düşük ve yüksek progesteron seviyesi için 2 kontrol plazması kullanıldı.

Hayvanların senkronizasyon öncesi ve sonrası değerleri ile östrüs belirtileri gösteren ve göstermeyen hayvanların değerlerinin karşılaştırılmasında 'Student t testin'den, siklusun fazlarındaki NO değerleri arasındaki farklılıkların kontrolünde Tukey testinden faydalanıldı. (SPSS 10.0 for windows, Illinois, USA).

Bulgular

Tablo 1'de senkronizasyon sonrası östrüs belirtileri gösteren ve göstermeyen hayvanların, tablo 2'de ise siklus dönemleri takip edilen hayvanların NO ve progesteron değerleri verilmiştir.

Araştırmada, ovaryumlarında aktif bir korpus luteum bulunan 40 baş hayvanda senkronizasyon uygulaması öncesi ($11.93 \pm 5.25 \mu\text{mol/L}$) ve sonrası ($8.07 \pm 4.51 \mu\text{mol/L}$) NO değerlerinde azalma belirlendi ($p:0.0006$). Senkronizasyon sonrasında östrüs belirtileri göstermeyen hayvanların uygulama öncesindeki NO değerleri, östrüs belirtileri gösteren hayvanların uygulama öncesindeki değerlerinden daha yüksek düzeyde tespit edildi. Nitrik oksit düzeyinde oluşan azalma östrüs belirtileri tespit edilemeyen hayvanlarda daha yüksek düzeyde gerçekleşti. Bunun sonucunda uygulama öncesi NO düzeyleri farklı olan grupların uygulama sonrasındaki NO değerleri benzer düzeyde gözlemlendi. Senkronizasyon uygulamasının hayvanların progesteron

Tablo 1. Senkronizasyon öncesi ve sonrasındaki nitrik oksit ($\mu\text{mol/L}$) ve progesteron (ng/ml) seviyeleri.

	Normal Hayvanlar					
	Östrüs Belirtileri Oluşmayan (n=20)		P	Östrüs Belirtileri Oluşan (n=20)		P
	Senkronizasyon öncesi	Senkronizasyon sonrası		Senkronizasyon öncesi	Senkronizasyon sonrası	
Nitrik Oksit	15.74±3.3 ^a (9.05-22.05)	7.28±5.0 ^b (0.61-19.34)	0.0000	8.79±3.3 ^b (1.12-15.46)	8.12±3.8 ^b (2.80-13.94)	0.58
Progesteron	2.36±1.1 ^a (1.00-4.80)	0.36±0.2 ^b (0.10-1.34)	0.0000	2.20±0.8 ^a (1.00-3.57)	0.38±0.1 ^b (0.16-0.64)	0.0000

Farklı harfler istatistiksel olarak $p<0.05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

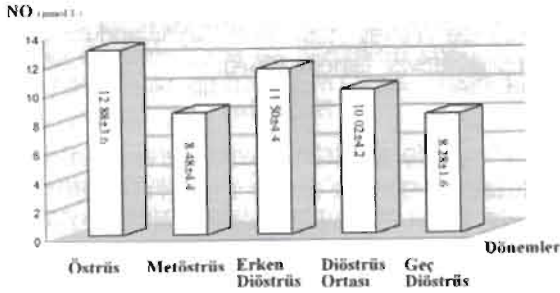
Tablo 2. Siklusun dönemlerindeki nitrik oksit ($\mu\text{mol/L}$) seviyeleri (n=20).

	Östrüs	Metöstrüs	Erken diöstrüs	Diöstrüs ortası	Geç diöstrüs	P
Nitrik Oksit	12.88±3.6 ^a (6.85-19.34)	8.48±4.4 ^b (0.44-17.82)	11.50±4.4 ^a (5.00-22.34)	10.02±4.2 ^a (2.80-19.84)	8.28±1.6 ^b (5.33-11.07)	0.001

Farklı harfler istatistiksel olarak $p<0.05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

değerlerinde de azalmaya neden olduğu belirlendi (Tablo 1).

Normal siklik aktiviteye sahip hayvanlarda siklusun farklı dönemlerindeki NO seviyeleri değerlendirildiğinde, siklusun östrüs dönemindeki NO değerlerinin, metöstrüs ve geç diöstrüs dönemindeki NO (p:0.0016 ve p:0.0000) değerlerinden önemli oranda yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 2, Şekil 1).



Şekil 1. Nitrik oksit'in siklusun dönemlerine göre seyri

Tartışma ve Sonuç

Araştırmada kullanılan hayvanlarda luteolizis sonrasında NO seviyelerinde önemli değişikliklerin meydana geldiği gözlemlendi. Korpus luteumun yapısal ve fonksiyonel gerilemesi olarak ifade edilen luteolizis olayı karmaşık ve çok sayıda faktörü içine alan bir süreçtir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla bu süreçte bilinen diğer bir çok faktörün yanında NO'nin de etkili olduğu ortaya konulmuştur. Nitrik oksit, korpus luteumun luteal dönemin değişik evrelerinde farklı şekilde etkiler. Molekül erken luteal dönemde korpus luteumun gelişmesini desteklerken, siklus sonunda luteal gerilemeye neden olur (Estevez ve ark., 1999; Gobbetti ve ark., 1999; Jaroszewski ve Hansel, 2000; Vega ve ark., 2000). Gobbetti ve ark (1999), PGF_{2α}'nın uyardığı luteolizis'in NOS inhibitörlerince engellenebileceğini bildirmektedir. Olson ve ark (1996), Estevez ve ark (1999) ile Friden ve ark (2000)'na göre de NO, luteal fazın sonunda, yapısal ve fonksiyonel luteolizise katılır ve bu dönemde NO ile PGF_{2α} arasında pozitif bir ilişki vardır. Motta ve ark (1999), PGF_{2α}'nın ratlarda siklus ortasında ovaryum NOS aktivitesinde artmaya neden olduğunu bildirmektedirler. Dong ve ark (1999) ise NO'nin siklus sonu dönemde prostaglandinin oluşturduğu progesteron azalmasını tersine çevirdiğini ifade etmektedirler. Jaroszewski ve Hansel (2000), NO'nin siğirlerde luteal regresyonun başlamasında görev aldığını belirtmektedir. Araştırmacılar göre siğirlerde luteal gerileme esnasında NO üretiminin engellenmesi, korpus luteumun yaşam süresini uzatmaktadır. Sunulan bu çalışmada da araştırmacıların ileri sürdükleri gibi ineklerde dışarıdan PGF_{2α}

verilerek sağlanan luteolizis esnasında PGF_{2α} ile NO arasında bir ilişkinin olduğu görüldü. Buna göre, PGF_{2α} uygulaması sonrasında hayvanların NO değerlerinde önemli oranda azalma tespit edildi. Jaroszewski ve Hansel (2000), Friden ve ark (2000) ile Basini ve Tamanini (2001) tarafından NO ile PGF_{2α} arasında, luteolizis esnasında ters bir etkileşim olduğu bildirilmektedir. Araştırmacılar göre NO, PGF_{2α} sentezini uyarak salınımını artırırken, PGF_{2α} NO sentezini engelleyerek miktarını azaltmaktadır. Çalışmada NO seviyesinde belirlenen azalma dışarıdan verilen PGF_{2α}'nın bu molekülün sentezini azaltıcı etkisi sonucunda ortaya çıkmış olabilir.

Araştırmada ayrıca senkronizasyon uygulamasına verilen cevapla, hayvanların uygulama öncesinde sahip oldukları NO değerleri arasında bir ilişkinin bulunduğu belirlendi. Uygulama sonrasında östrüs belirtileri göstermeyen hayvanların başlangıçtaki NO değerlerinin, östrüs belirtileri gösteren hayvanlara göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Senkronizasyon öncesi dönemde daha yüksek NO konsantrasyonuna maruz kalan hayvanların, PGF_{2α} uygulaması sonrasında NO ve progesteron seviyesinde azalma meydana gelmesine rağmen, östrüs göstermedikleri görüldü. Progesteron seviyeleri (tablo 1) bu hayvanların östrüste olabileceklerini akla getirmektedir. Ancak hayvanlarda östrüsün dış klinik belirtileri tespit edilememiştir. Östrüs göstermeyen hayvanların progesteron değerleri östrüs gösteren hayvanlarla benzer bulunmasına rağmen östrüse gelmemeleri östrojene bağlanabilir. Bu hayvanların uygulama öncesinde maruz kaldıkları yüksek NO seviyesi, östrüsün oluşmasında etkili olan östrojen seviyesinin yeterli düzeye ulaşmasını engellemiş olabilir. Nitekim NO'nin östrojen sentezini engellediği bildirilmektedir (Jablonka-Shariff ve Olson, 1998; Kalra ve ark., 1998; Masuda ve ark., 2001). Hayvanlardan östrüs gösteren ve göstermeyenlerin NO seviyelerinde uygulama öncesinde önemli fark olmasına rağmen uygulama sonrasında bu farkın ortadan kalktığı tespit edildi. Bu nedenle hayvanların senkronizasyon uygulamasına verecekleri cevabın uygulama öncesinde sahip oldukları NO seviyesi ile ilişkili olduğu kanısına varıldı.

Siklusları senkronize edilen hayvanlarda uygulama sonrasında progesteron seviyelerinde azalma gözlemlendi. Azalma östrüs gösteren ve göstermeyen hayvanların tümünde belirlendi. Östrüs göstermeyen ve gösteren hayvanların progesteron değerleri uygulama öncesi ve sonrasında benzer şekilde idi. Progesteron değerleri arasında fark olmamasına rağmen senkronizasyon uygulamasına

verilen cevabın farklı olmasının NO değerlerindeki farklılıktan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Siklusun östrüs dönemindeki NO değerleri diğer dönemlerden daha yüksek seviyede tespit edildi. Jablonka-Shariff ve ark (1999a) tarafından siklusun folliküler evresinde follikül çap gelişmesiyle paralel olarak kan dolaşımındaki nitrit/nitrat seviyesinde artış olduğu bildirilmektedir. Ayrıca östrojenin NO üretilmesini arttırdığı ileri sürülmektedir (Al-Hijji ve ark., 2001; Dixit ve Parvizi, 2001). Çalışmada hayvanlar östrüs döneminde iken (östrojen seviyesi yüksek) NO seviyesinin daha yüksek düzeyde belirlenmesi araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Bu nedenle östrojenin NO sentezini artırıcı etkisinin ineklerde de bulunduğu, östrüs döneminde NO seviyesinin daha yüksek olmasının nedeninin östrojen seviyesinin yüksek olmasından ileri geldiği söylenebilir.

Araştırmada, östrüs döneminden sonra metöstrüs döneminde NO seviyesinde azalma meydana geldiği belirlendi. Nitrik oksit seviyesinde metöstrüs döneminde ortaya çıkan bu azalma, hayvanların östrojen seviyesinde meydana gelen değişikliğe bağlı olabilir. Canlılarda östrojen hormonunun başlıca kaynağı gelişmiş folliküllerdir (graaf follikülü). Bu folliküllerin ovule olmasıyla birlikte östrojen seviyesi azalır. İneklerde ovulasyon metöstrüs döneminde gerçekleşir ve buna bağlı olarak dolaşımdaki östrojen seviyesi düşer. Bu dönemde östrojen seviyesinde meydana gelen azalma NO sentezlenmesini artırıcı etkinin ortadan kalkmasına yol açacaktır. Bu nedenle, östrojen seviyesinin daha düşük olduğu metöstrüs dönemindeki NO seviyesi, östrojenin daha yüksek olduğu östrüs evresine göre daha düşük seviyelerde belirlenecektir.

Metöstrüs döneminden sonra NO seviyesinde bir artış olduğu gözlemlendi. Korpus luteumun şekillenmeye başladığı dönem olan bu aşamada NO'nin rol oynadığı bildirilmektedir (Gobbetti ve ark., 1999). Estevez ve ark (1999) ve Motta ve ark (2001) tarafından korpus luteumun NO'ye duyarlılığının siklusun günlerinin ilerlemesiyle birlikte arttığı, molekülün erken ve orta luteal dönemde korpus luteumun şekillenmesinde görev aldığı bildirilmektedir. Motta ve ark (2001), NO'nin bu dönemde hem glutasyonu hem de progesteron sentezini arttırdığını ifade etmektedirler. Kalra ve ark (1998) da luteinleşen ovaryumlarda NO'nin 6-14 katı daha fazla sentezlendiğini ifade etmektedir. Çalışmada korpus luteumun şekillenmeye başladığı dönem olan erken luteal fazda NO seviyesinde belirlenen yükselme molekülün ineklerde de korpus luteumun şekillenmesinde görev aldığını akla getirmektedir. Nitrik oksit'in prostaglandinlerin

sentezini arttırdığı belirtilmektedir (Yallampalli ve ark., 1998; Basini ve Tamanini, 2001). Molekül bu etkiyle erken luteal dönemde PGE₂ seviyesini artırarak korpus luteumun gelişmesinde destekleyici rol oynar. Bunun yanı sıra prostaglandinlerin ise NO sentezini azalttığı da ileri sürülmektedir (Basini ve Tamanini, 2001). Bu bilgilerden hareketle, erken luteal dönemde seviyesi yükselen NO'nin daha fazla PGE₂ salınımına neden olarak PGE₂'nin olumsuz etkisi sonucunda kendi salınımının azalmasına yol açtığı ileri sürülebilir.

Nitrik oksit damar direncini azaltarak kan akışını artırıcı etki yapma özelliğine sahiptir. Hayvanlarda luteal dönemde ovaryum kan akışında artma meydana geldiği bilinmektedir (Jaroszewski ve ark. 2003). Korpus luteumun şekillendiği dönemde NO'nin seviyesindeki artış molekülün damar genişletici etkisiyle korpus luteumun şekillenmesi ve fonksiyonunun devamı için gerekli olan kan desteğinin sağlanmasına yol açacaktır. Sunulan çalışmada ovaryum damarlarında direnç azalması ve kan akışı artışının olduğu kabul edilen dönemde NO seviyesinde artma meydana geldiğinin belirlenmesi belirtilen fizyolojik süreçle uyusmaktadır.

Siklus ortası dönemde NO seviyesinde önemli bir değişiklik belirlenemedi. Korpus luteumun gelişiminin tamamlandığı bu dönemde NO seviyesi erken luteal dönemdeki konsantrasyonla benzer bulundu. Bu iki dönemde NO seviyeleri arasında belirlenen fark istatistikî açıdan önemli olmamasına rağmen siklus ortası dönemde NO seviyesinin azalma eğilimi gösterdiği tespit edildi. Korpus luteumun yapısal ve fonksiyonel olarak gerileyebilmesi için PGF_{2α} seviyesinde artma meydana gelmesi gereklidir. Nitrik oksit'in erken luteal dönem ve siklus ortası dönemdeki yüksek seviyesi PGF_{2α}'nın daha fazla salınmasına neden olarak luteolizisin başlamasına yol açabilir. Jaroszewski ve Hansel (2000) tarafından NO'nin sığırlarda otokrin/parakrin etki göstererek luteal gerilemenin başlamasında görev aldığı bildirilmektedir. Yazarlara göre luteal gerileme döneminde NOS enzimlerinin baskılanması luteolizisi geciktirerek siklusun uzamasına neden olmaktadır.

Nitrik oksit seviyesinde siklus ortası dönemin sonlarında başlayan azalmanın siklus sonu dönemde de devam ettiği gözlemlendi. Bu azalma sonucunda siklus sonu dönemdeki NO seviyesinin metöstrüs dönemindeki NO seviyesiyle benzer düzeyde olduğu belirlendi. Bu bulgulardan hareketle korpus luteumun gerilemeye başlamasından önce NO seviyesinde bir azalmanın başladığı, gerilemenin başlayıp hızlandığı dönemde NO'teki azalmanın devam ederek siklustaki en düşük düzeyine indiği söylenebilir. Bu azalmadan

aynı dönemde PGF 2α 'nın seviyesinde meydana gelen artış sorumlu olabilir.

Sonuç olarak, ineklerde, senkronizasyon uygulaması sonrasında, NO seviyesi yüksek olan hayvanlarda suböstrüs vakalarıyla karşılaşılacağı, siklus dönemlerinde meydana gelen fizyolojik olayların NO seviyesini etkileyebileceği kanısına varıldı.

Kaynaklar

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, 1133-1142.

Barnes, M.J., Laponowski, K., Rafols, J.A., Lawson, D.M., Dunbar, J.C. (2001) GnRH and gonadotropin releases is decreased in chronic nitric oxide deficiency. *Exp. Biol. Med.*, 226, 7, 701-706.

Basini, G., Tamanini, C. (2000) Selenium stimulates estradiol production in bovine granulosa cells: possible involvement of nitric oxide. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 18, 1-17.

Basini, G., Tamanini, C. (2001) Interrelationship between nitric oxide and prostaglandin in bovine granulosa cell. *Prostaglandin & other Lipid Mediators*, 66, 179-202.

Boiti, C., Zampini, D., Guelfi, G., Paolucci, P., Zerani, M., Gobetti, A. (2002) Expression patterns of endothelial and inducible nitric oxide synthase isoforms in corpora lutea of pseudopregnant rabbits at different luteal stages. *J. Endocrinol.*, 173, 2, 285-296.

Dixit, V.D., Parvizi, N. (2001) Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, 65, 1-16.

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, 1, 27-32.

Dunnam, R.C., Hill, M.J., Lawson, D.M. Dunbar, J.C. (1999) Ovarian hormone secretory response to gonadotropins and nitric oxide following chronic nitric oxide deficiency in the rat. *Biol. Reprod.*, 60, 959-963.

Estevez, A., Motta, A.B., De Gimeno, M.F. (1999) Role of nitric oxide in the synthesis of prostaglandin F 2 alpha and progesterone during luteolysis in the rat. *Medicina*, 59, 463-5.

Gobetti, A., Boiti, C., Canali, C., Zerani, M. (1999) Nitric oxide synthase acutely regulates progesterone production by in vitro cultured rabbit corpora lutea. *J. Endocrinol.*, 160, 2, 275-83.

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. *Endocrinology*, 138, 460-468.

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. *Endocrinology*, 139, 6, 2944-2954.

Jablonka-Shariff, A., Ravi, S., Belton, A.N., Murph, L.L. Olson, L.M. (1999) Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biol. Reprod.*, 61, 171-177.

Jaroszewski, J.J., Hansel, W. (2000) Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span of the bovine corpus luteum. *Exp. Biol. Med.*, 224, 50-55.

Jaroszewski, J.J., Skarzynski, D.J., Blair, R.M., Hansel, W. (2003) Influence of nitric oxide on the secretory function of the bovine corpus luteum: dependence on cell composition and cell to cell communication. *Exp Biol Med*, 228, 741-748.

Kalra, P.S., Edwards, T.G., Xu, B., Jain, M., Kalra, S.P. (1998) The anti-gonadotropic effect of cytokines: the role of neuropeptides. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 15, 5, 321-332.

Masuda, M., Kubota, T., Aso, T. (2001) Effects of nitric oxide on steroidogenesis in porcine granulosa cells during different stages of follicular development. *Eur. J. Endocrinol.*, 144, 3, 303-308.

Miranda, M.K., Hespey, M.G., Wink, A.D. (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrite and nitrate. *Nitric Oxide*, 5, 1, 62-71.

Motta, A.B., Estevez, A., De Gimeno, M.F. (1999) The involvement of nitric oxide in corpus luteum regression in the rat: feedback mechanism between prostaglandin F 2α and nitric oxide. *Mol. Hum. Reprod.*, 5, 11, 1011-1016.

Motta, A.B., Estevez, A., Tognetti, T., Gimeno, M.A.F., Franchi, A.M. (2001) Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. *Mol. Hum. Reprod.*, 7, 1, 43-47.

Nemade, R.V. (2000) The disruption of the blood follicle barrier in ovarian cyst development: regulation by nitric oxide. Dissertation, in the Graduate Program in Molecular and Developmental Biology of the College of Medicine, Boston University.

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. *Endocrinology*, 137, 3531-3539.

Rosselli, M., Keller, P.J., Dubey, R.K. (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum. Reprod.*, 4, 1, 3-24.

Rossmann, W.G., Hoffmeister, U., Wolfarth, S., Kleine, B., McLean, M., Jacobs, R.A. Grossman, A.B. (1999) Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Mol. Hum. Reprod.*, 5, 5, 487-494.

Ruutinen-Altman, K., Ando, M., Resnick, C.E., Adashi, E.Y., Ben-Sholma, I., Kol, S. (1996) Glucose transporters in the rat ovary: gene expression, cellular localization and hormonal regulation. *J. Soc. Gynecol. Invest.*, 3, 2, 177A.

Skarzynski, D.J., Kobayashi, S., Okuda, K. (2000) Influence of nitric oxide and noradrenaline on prostaglandin F 2α -induced oxytocin secretion and intracellular calcium mobilization in cultured bovine luteal cells. *Biol. Reprod.*, 63, 1000-1005.

Vega, M., Urrutia, L., Inigues, G., Gabier, F., Devoto, L., Johanson, M.C. (2000) Nitric oxide induced apoptosis in the human corpus luteum in vitro. *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 8, 681-687.

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, 2, 58-67.

Yamauchi, J., Miyazaki, T., Iwasaki, S., Kishi, I., Kuroshima, M., Tei, C., Yoshimura, Y. (1997) Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology*, 138, 9, 3630-3637.