

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİDROJEN SÜLFÜRÜN DAMAR VE DAMAR-DIŞI DÜZ
KASLARDAKİ GEVŞETİCİ ETKİSİNİN DİYABETİK
SIÇANLARDA İNCELENMESİ**

Ecz. Merve DENİZALTI

Farmakoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2010

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİDROJEN SÜLFÜRÜN DAMAR VE DAMAR-DIŞI DÜZ
KASLARDAKİ GEVŞETİCİ ETKİSİNİN DİYABETİK
SIÇANLARDA İNCELENMESİ**

Ecz. Merve DENİZALTI

Farmakoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İnci ŞAHİN-ERDEMLİ

ANKARA

2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmakoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU
(Gazi Üniversitesi)



Danışman: :Prof. Dr. İnci ŞAHİN ERDEMLİ
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: :Prof. Dr. Can PEKİNER
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: :Doç. Dr. Melih Ö. BABAOĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)

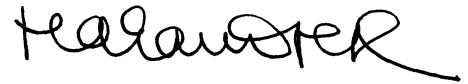


Üye: :Yrd. Doç. Dr. N.Tuğba KANDİLCİ
(Hacettepe Üniversitesi)



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, desteğini ve ilgisini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. İnci Şahin-Erdemli'ye,

Farmakoloji eğitimime katkıda bulunan tüm hocalarıma,

Hem bilimsel konulardaki yardımı hem de manevi desteği için sevgili hocam Dr. T. Emrah Bozkurt'a,

Beni hayata hazırlayan, sevgi ve desteklerini eksik etmeyen anne ve babama, her zaman yanımda olan kardeşime,

Çok teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 08D05301004)

ÖZET

Denizaltı M., Hidrojen sülfürün damar ve damar-dışı düz kaslardaki gevşetici etkisinin diyabetik sıçanlarda incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2010.

Hidrojen sülfür (H_2S) damar ve damar-dışı dokularda güçlü gevşetici etki gösteren endojen bir gazdır. Bu çalışmada sıçan anokoksigeus kası, torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde H_2S 'in gevşetici etkisi ve streptozotosin ile oluşturulan diyabetin (4 ve 12 hafta) bu gevşeme yanıtını ne şekilde değiştirdiği araştırılmıştır. Sıçan anokoksigeus kasında glibenklamid, tetraetilamonyum, ODQ, SQ-22536, KT-5720, H-7, L-NAME ve indometazin NaHS (10^{-4} M- 10^{-3} M) ile elde edilen gevşeme yanıtlarını etkilemedi. Torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde ise glibenklamid NaHS (10^{-4} M- 3×10^{-3} M) ile elde edilen gevşeme yanıtlarını inhibe etti. Bu bulgular H_2S 'in gevşetici etkisinde damar-dışı düz kaslarda sırasıyla potasyum kanalları, guanilat siklaz, adenilat siklaz, protein kinaz A, protein kinaz C, nitrik oksit ve siklooksijenaz ürünlerinin rol oynamadığını, damar düz kasında ise bu gevşetici etkiden ATP duyarlı potasyum kanallarının sorumlu olduğunu göstermektedir. Diyabetik sıçanlardan izole edilen anokoksigeus kasında NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtında bir değişiklik olmazken torasik aorta, mezenter arter ve pulmoner arterde artış olduğu gözlemlendi. İnsülin tedavisi, diyabetik sıçanlardan izole edilen damar preparatlarında NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtlarındaki artışı önledi. Diyabetik sıçanlardan izole edilen arterlerde asetilkolin ile elde edilen endotel kaynaklı gevşeme yanıtları da değişmedi. Sonuç olarak diyabette H_2S ile elde edilen gevşeme yanıtlarındaki artış vasküler komplikasyonlara karşı koruyucu bir mekanizma olabilir.

Anahtar kelimeler: Hidrojen sülfür, diyabet, gevşeme, anokoksigeus kası, damar düz kası

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje No: 08D05301004)

ABSTRACT

Denizalti, M., The investigation of the relaxant effect of hydrogen sulfide on vascular and non-vascular smooth muscles in diabetic rats, Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master of Science Thesis in Pharmacology, Ankara, 2010. Hydrogen sulfide (H_2S) is an endogenous gas which has potent relaxant effect in vascular and non-vascular smooth muscles. In the present study, the relaxant effect of H_2S in rat anococcygeus muscle, thoracic aorta, mesenteric and pulmonary arteries and the effect of streptozotocin-induced diabetes (4 and 12 weeks) on this relaxation response was investigated. Glibenclamide, tetraethylammonium, ODQ, SQ-22536, KT-5720, H-7, L-NAME and indomethacin did not affect NaHS-induced (10^{-4} M- 10^{-3} M) relaxation responses in rat anococcygeus muscle. However, glibenclamide inhibited NaHS-induced relaxation responses in thoracic aorta, mesenteric and pulmonary arteries. These findings show that potassium channels, guanylate cyclase, adenylate cyclase, protein kinase A, protein kinase C, nitric oxide and cyclooxygenase products are not involved in the relaxant effect of H_2S in non-vascular smooth muscles where ATP-sensitive potassium channels are responsible from this relaxant effect in vascular smooth muscle. NaHS-induced relaxation responses were not changed in anococcygeus muscle isolated from diabetic rats but were increased in thoracic aorta, mesenteric and pulmonary arteries. Insulin treatment prevented the potentiation of NaHS-induced relaxation responses in arteries isolated from diabetic rats. Also acetylcholine-induced endothelium-derived relaxation responses were not changed in the arteries isolated from diabetic rats. In conclusion, the potentiation of relaxant effect of H_2S in diabetic arteries may be a protective mechanism against the vascular complications of this disease.

Keywords: Hydrogen sulfide, diabetes, relaxation, anococcygeus muscle, vascular smooth muscle

Hacettepe University Scientific Research Foundation (Proje No: 08D05301004)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xi
TABLO	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. H ₂ S'in Genel Özellikleri	2
2.2. H ₂ S'in Fizyolojik ve Farmakolojik Etkileri	3
2.2.1. H ₂ S'in Santral Sinir Sistemi Üzerindeki Etkileri	3
2.2.2. H ₂ S'in Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri	4
2.2.3. H ₂ S'in Diğer Düz Kaslar Üzerindeki Etkileri	5
2.3. Diyabet ve H ₂ S	5
3. GEREÇ VE YÖNTEM	7
3.1. Deneysel Diyabetin Oluşturulması	7
3.2. Anokoksigeus Kasının Hazırlanması	7
3.3. Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arter Halkalarının Hazırlanması	8
3.4. Deney Protokolü	8
3.4.1. Sıçan Anokoksigeus Kasında H ₂ S'in Etkisi	9
3.4.2. Sıçan Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterinde H ₂ S'in Etkisi	9

3.4.3. Sıçan Anokoksigeus Kası ve Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterinde H ₂ S'in Oluşturduğu Gevşeme Üzerine Diyabetin Etkisi	10
3.5. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz	10
3.6. Deneylerde Kullanılan Solüsyonlar ve İlaçlar	11
4. BULGULAR	12
4.1. Sıçan Anokoksigeus Kasında Fenilefrin, Karbakol ve KCl (60 mM) ile Ön-kasılma Sonrası NaHS ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları	12
4.2. Sıçan Anokoksigeus Kasında Çeşitli İnhibitörler Varlığında Fenilefrin ile Ön-kasılma Sonrası NaHS ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları	13
4.3. Sıçan Torasik aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterinde Fenilefrin ile Ön-kasılma Sonrası NaHS ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları	14
4.4. Diyabetin Sıçan Anokoksigeus Kası ve Çeşitli Damar Dokularında NaHS ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları Üzerindeki Etkisi	16
4.4.1. Diyabetik Sıçanların Kan Şekeri Düzeyleri ve Ağırlıkları	16
4.4.2. Diyabetik Sıçanlardan (4 ve 12 hafta) İzole Edilen Anokoksigeus Kası, Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterde NaHS Yanıtları	17
4.4.3. Diyabetik Sıçanlardan (4 hafta) İzole Edilen Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterde Glibenklamidin NaHS Yanıtlarına Etkisi	23
4.5. Diyabetik Sıçanlardan (4 ve 12 hafta) İzole Edilen Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterde Asetilkolin Yanıtları	25

5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇ VE YORUM	34
KAYNAKLAR	35
EK	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

H ₂ S	Hidrojen sülfür
NaHS	Sodyum hidrojen sülfür
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
CO	Karbonmonoksit
CBS	Sistatyonin-β-sentaz
CSE	Sistatyonin-γ-liyaz
K _{ATP}	ATP-duyarlı potasyum kanalı
STZ	Streptozotosin
LPS	Lipopolisakkarit
sAMP	Siklik AMP
sGMP	Siklik GMP
TEA	Tetraetilamonyum
PAG	D,L-proparjilglisin
KCl	Potasyum klorür
DMSO	Dimetilsülfoksit
NOD	Non-obese diabetic (Obez olmayan diyabetik)

ŞEKİLLER

	Sayfa
4.1. Sıçan anokoksigeus kasında fenilefrin, karbakol ve KCl ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	12
4.2. Sıçan anokoksigeus kasında glibenklamid (10^{-5} M), TEA (10^{-3} M), ODQ (10^{-4} M), SQ-22536 (10^{-4} M), KT-5720 (10^{-6} M), H-7 (3×10^{-5} M), L-NAME+indometazin (10^{-4} M- 10^{-5} M) ile inkübasyon sonrası NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları	13
4.3.1. Sıçan torasik aortasında, glibenklamid (10^{-5} M) inkübasyonundan önce ve sonra NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	14
4.3.2. Sıçan mezenter arterinde glibenklamid (10^{-5} M) inkübasyonundan önce ve sonra NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	15
4.3.3. Sıçan pulmoner arterinde, glibenklamid (10^{-5} M) inkübasyonundan önce ve sonra NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	15
4.4.2.1. Kontrol grubu ve diyabetik (4 hafta) sıçanlardan izole edilen anokoksigeus kasında fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	18
4.4.2.2. Kontrol grubu, diyabetik (4 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) sıçanlardan izole edilen torasik aortada fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	18

4.4.2.3. Kontrol grubu, diyabetik (4 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) sıçanlardan izole edilen mezenter arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	19
4.4.2.4. Kontrol grubu, diyabetik (4 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) sıçanlardan izole edilen pulmoner arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	19
4.4.2.5. Kontrol grubu ve diyabetik (12 hafta) sıçanlardan izole edilen anokoksigeus kasında fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	20
4.4.2.6. Kontrol grubu, diyabetik (12 hafta) ve insülin tedavisi alan (12 hafta) sıçanlardan izole edilen torasik aortada fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	20
4.4.2.7. Kontrol grubu, diyabetik (12 hafta) ve insülin tedavisi alan (12 hafta) sıçanlardan izole edilen mezenter arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	21
4.4.2.8. Kontrol grubu, diyabetik (12 hafta) ve insülin tedavisi alan (12 hafta) sıçanlardan izole edilen pulmoner arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	21
4.4.2.9. 4 hafta diyabetik ve 12 hafta diyabetik sıçanlardan izole edilen torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları	22

4.4.3.1. Kontrol grubu ve diyabetik (4 hafta) sıçanlardan izole edilen torasik aortada glibeklamid (10^{-5} M) ile inkübasyon öncesi ve sonrası NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları	23
4.4.3.2. Kontrol grubu ve diyabetik (4 hafta) sıçanlardan izole edilen mezenter arterde glibeklamid (10^{-5} M) ile inkübasyon öncesi ve sonrası NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları	24
4.4.3.3. Kontrol grubu ve diyabetik (4 hafta) sıçanlardan izole edilen pulmoner arterde glibeklamid (10^{-5} M) ile inkübasyon öncesi ve sonrası NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları	24
4.5.1. Kontrol grubu, diyabetik (4 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) sıçanlardan izole edilen torasik aortada fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	25
4.5.2. Kontrol grubu, diyabetik (4 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) sıçanlardan izole edilen mezenter arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	26
4.5.3. Kontrol grubu, diyabetik (4 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) sıçanlardan izole edilen pulmoner arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	26
4.5.4. Kontrol grubu, diyabetik (12 hafta) ve insülin tedavisi alan (12 hafta) sıçanlardan izole edilen torasik aortada fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	27

- 4.5.5. Kontrol grubu, diyabetik (12 hafta) ve insülin tedavisi alan
(12 hafta) sıçanlardan izole edilen mezenter arterde fenilefrin ile
ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen
konsantrasyon-yanıt eğrileri 27
- 4.5.6. Kontrol grubu, diyabetik (12 hafta) ve insülin tedavisi alan
(12 hafta) sıçanlardan izole edilen pulmoner arterde fenilefrin ile
ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen
konsantrasyon-yanıt eğrileri 28

TABLO

Sayfa

4.4.1. Kontrol grubu, diyabetik (4 ve 12 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 ve 12 hafta) sıçanların kan şekeri düzeyleri ve ağırlıkları	16
--	----

1. GİRİŞ

Hidrojen sülfür (H_2S) çürük yumurta kokusu ile karakterize renksiz, toksik bir gazdır (1, 2). H_2S 'in insan ve diğer türlerin dokularında yüksek konsantrasyonda bulunduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (2-4). Özellikle beyin, kardiyovasküler sistem, böbrek ve karaciğerde yüksek miktarlarda üretildiği bildirilmiştir (5).

H_2S 'in nitrik oksit (NO) ve karbonmonoksit (CO) gibi endojen olarak oluştuğu gösterilen gaz yapısında bir nörotransmitter olabileceği ileri sürülmektedir (6). Bu nedenle biyolojik aktivitesi birçok dokuda araştırılmıştır. H_2S oluşumunu sağlayan enzimler ve bu gazın fizyolojik konsantrasyondaki biyolojik etkileri ilk kez beyinde Abe ve Kimura (1996) tarafından ileri sürülmüştür (7). H_2S , L-sisteinden sistatyonin- β -sentaz (CBS) ve sistatyonin- γ -liyaz (CSE) enzimleri ile oluşmaktadır (6, 8). Kardiyovasküler sistemde H_2S 'in güçlü bir vazodilatör olduğu gösterilmiş ve damar düz kasında H_2S 'in gevşetici etkisinden ATP-duyarlı potasyum kanallarının (K_{ATP}) sorumlu olduğu bildirilmiştir (2, 9). H_2S 'in gevşetici etkisi damar-dışı düz kaslarda da incelenmiş ancak damar düz kasından farklı olarak damar-dışı düz kaslar üzerindeki etki mekanizması henüz aydınlatılamamıştır (3, 8, 10-12).

H_2S birçok patolojik durumda da önemli rol oynamaktadır. Örneğin spontan hipertansif sıçanlarda CSE gen ekspresyonu ve aktivitesinin yanı sıra H_2S plazma düzeyleri azalmaktadır (13). Septik ve endotoksik şokta, sıçanda arteriyel H_2S düzeyleri önemli ölçüde artmaktadır (14). Lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen inflamasyonda plazma H_2S konsantrasyonu, CSE gen ekspresyonu ve H_2S sentezi artmaktadır (15). Benzer şekilde diyabette endojen H_2S sentezinde rol oynayan enzimlerin ekspresyonu ve aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (16). Ancak diyabette H_2S 'in damar ve damar-dışı düz kaslar üzerindeki fonksiyonel etkisi bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında sıçan anokoksigeus kası, torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde H_2S 'in gevşetici etkisi ve streptozotosin (STZ) ile oluşturulan diyabetin (4 ve 12 hafta) bu gevşeme yanıtını ne şekilde değiştirdiği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. H₂S'in Genel Özellikleri

H₂S endojen olarak sistein metabolizması ile oluştuğu bilinen toksik bir gazdır (2). H₂S'in uygun fizyolojik koşullar altında (pH 7.4 sulu çözelti) yaklaşık 1/3'ü çözünmemiş, 2/3'ü çözünmüş halde H⁺ ve HS⁻ şeklinde bulunur (17). Plazma membranlarından geçebilir ve lipofilik çözücülerdeki çözünürlüğü sudakine göre beş kat fazladır (6). Atmosferde (~1µg/m³) (3), süt ürünleri, pişmiş et gibi gıda maddelerinde bulunmaktadır. H₂S'in yüksek konsantrasyonlarda sıçan, insan ve sığır beyinde (50-160 µM) (7, 17-19), sıçan (50 µM) (2) ve insan kanında (10-100 µM) (20), sıçan beyin homojenatlarında (60-150 µM;) (21) ve çeşitli damarlarda bulunduğu saptanmıştır (2, 21, 22).

H₂S'in toksik etkisinin ana sebebi mitokondriyal sitokrom c oksidaz inhibisyonudur. H₂S memeli mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun terminal enzimi olan sitokrom c oksidazı potent bir şekilde inhibe etmektedir (17, 23). H₂S bu etkisini enzimin hem demirine bağlanarak yapmaktadır. Böylece aerobik metabolizma inhibe olmakta ve ATP deplesyonu ile laktik asit birikimi olmaktadır. H₂S intoksikasyonunda solunum merkezinde hasar oluşmaktadır (17). Buna karşın insan tarafından algılanabilir düzeyi toksik düzeyden 400 kat daha düşük bir konsantrasyondur (6).

H₂S, memeli dokularında L-sisteinden pridoksal-5-fosfat (vitamin B6) bağımlı CBS ve CSE enzimleri tarafından oluşturulmaktadır. Bu enzimler, metioninin metabolik olarak sisteine dönüşmesi ile gerçekleşen transsülfürasyon yolunun son basamağını katalizler (6, 8, 24, 25). CSE ve CBS sisteini tiyosistein ve H₂S oluşturmak için substrat olarak kullanmaktadır (25, 26). Bazı dokularda H₂S oluşumu için iki enzim de gerekirken bazı dokularda sadece bir enzim yeterli olmaktadır. Buna bağlı olarak CBS ve CSE ekspresyonunun doku spesifik olduğu bildirilmiştir (6). CBS yüksek oranda beyinde, buna karşılık CSE periferik dokularda (karaciğer, böbrek, kan damarları) bulunmaktadır (5). Hipokampus ve serebellumda CBS

enziminin (7), ileum, portal ven ve torasik aortada CSE enziminin (8) eksprese olduğu gösterilmiştir. Beyin dokusunun değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda CBS ve CSE aktivitesi incelenmiş ve CBS aktivitesinin CSE aktivitesinden 30 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (27). Sıçan beyinde (hipokampus, serebellum, serebral korteks ve beyin sapı) CBS ekspresyonu Northern blot analizi ile tespit edilmiş fakat CSE mRNA'sı bulunamamıştır. CBS inhibisyonundan sonra H₂S üretimindeki azalma CBS'in beyindeki H₂S üretiminden sorumlu endojen enzim olduğunu kesin olarak göstermektedir (7). CBS ve CSE tarafından katalizlenen sistein metabolizmasının son ürünü olarak H₂S bu enzimlerin aktivitesi üzerinde negatif geri besleme etkisi göstermektedir. Yüksek H₂S düzeyi CSE aktivitesini inhibe etmektedir (6). Ayrıca elementel sülfürün enzimatik olmayan redüksiyonu da diğer bir H₂S endojen kaynağıdır (28).

2.2. H₂S'in Fizyolojik ve Farmakolojik Etkileri

2.2.1. H₂S'in Santral Sinir Sistemi Üzerindeki Etkileri

H₂S'in santral sinir sisteminde hipokampal uzun dönem potansiyalizasyonu arttırdığı ve bu etkisinde NMDA reseptörlerinin glutamata olan duyarlılığını arttırmasının rol oynadığı gösterilmiştir (6, 29). H₂S ile NMDA reseptörleri arasındaki etkileşime siklik AMP (sAMP) bağımlı protein kinaz yolağının aktivasyonu aracılık etmektedir. H₂S donorü sodyum hidrojen sülfür (NaHS) (1-100 µM), sıçan serebral ve serebellar nöronlarında, beyin nöronal ve glial hücrelerinde sAMP oluşumunu arttırmaktadır. NaHS'in sAMP oluşumunu arttırması sonucunda NMDA reseptörlerinin NMDA stimülasyonuna duyarlılığının arttığı oositlerde gösterilmiştir (30).

H₂S, sıçan beyin astrositlerinde yapılan primer hücre kültüründe hücre içi kalsiyumu arttırmaktadır (31). Astrositlerde nöronlardan farklı olarak H₂S oluşumu CSE enzimi tarafından gerçekleşir ve hücre içi kalsiyum üzerindeki etkileri sAMP ve protein kinaz A aracılı olarak meydana gelmektedir (32).

2.2.2. H₂S'in Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri

H₂S'in damar düz kasında güçlü gevşetici etki gösteren gaz yapılı bir nörotransmitter olabileceği ileri sürülmektedir (2, 9). H₂S, NO ve CO gibi mediyatörlere benzer şekilde gevşemeye neden olmaktadır. Vasküler dokularda NO tarafından indüklenen gevşeme yanıtı guanilat siklaz inhibitörü ODQ tarafından ortadan kaldırılmaktadır. Buna karşın H₂S tarafından indüklenen gevşeme yanıtının üzerinde bir etkisi yoktur (2, 33). H₂S, NO ve CO'dan farklı olarak vasküler dokularda siklik GMP (sGMP) yolağının aktivasyonundan bağımsız gevşetici etki göstermektedir (34). H₂S'in torasik aortada K_{ATP} kanallarını açarak damarları gevşettiği ve *in vivo* hipotansiyon oluşturduğu bildirilmiştir (2). Ayrıca çok düşük konsantrasyonda bu dokuda NO ile indüklenmiş düz kas gevşemesini arttırdığı da ileri sürülmektedir (8). H₂S'in düz kas gevşetici etkisi sıçan mezenter arterinde de K_{ATP} kanalları aracılığıyla meydana gelmektedir (9).

H₂S'in kardiyovasküler fonksiyonları düzenleyici etkileri bulunmaktadır. H₂S'in intravenöz olarak verilmesi kan basıncının 12-30 mmHg azalmasına neden olmaktadır. Bu etki pinasidil (K_{ATP} kanal aktivatörü) tarafından taklit edilmekte, glibenklamid (K_{ATP} kanal inhibitörü) tarafından antagonize edilmektedir (2). Spesifik olmayan potasyum kanal blokörü tetraetilamonyum (TEA) varlığında H₂S ile indüklenen gevşeme yanıtı inhibe olmaktadır. Ancak kalsiyum ile aktive olan potasyum (K_{ca}) kanal blokörleri karibdotoksin ve iberiotoksinin bu gevşeme yanıtı üzerinde bir etkisi yoktur (2). H₂S ile oluşan gevşeme yanıtları guanilat siklaz inhibitörü ODQ tarafından potansiyalize olmaktadır. H₂S ve ODQ' nun sinerjistik etkileşimi vazodilatör serbest radikaller oluşturmalarına bağlı olabilir. Endotelin harap edilmesi veya nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü L-NAME, aorta halkalarında H₂S tarafından indüklenen gevşeme yanıtını azaltmaktadır. Bu endotel bağımlı etki, H₂S stimülasyonu sonucu endotel kaynaklı gevşetici faktörün saliverilmesi ile açıklanabilir (2, 6). Endotel harabiyetinin sıçan aorta ve mezenter arter yatağında H₂S potensini azalttığı gösterilmiştir (9, 35). Aorta halkalarında H₂S'in gevşetici etkisinin kısmen düz kaslarla direkt etkileşimi sonucu ve

kısmen de endotel aracılığıyla gerçekleştiği ileri sürülmüştür (2, 35). Diğer taraftan torasik aortada H_2S 'in gevşetici etkisinde endotelin rolü olmadığını belirten çalışmalar da vardır (8).

2.2.3. H_2S 'in Diğer Düz Kaslar Üzerindeki Etkileri

H_2S 'in düz kas gevşetici etkisi kobay ileumu, sıçan vas deferensi, fare mide fundusu, kolon ve bronşlar gibi damar-dışı dokularda da gösterilmiştir. Ancak damar düz kasından farklı olarak bu dokularda H_2S 'in meydana getirdiği gevşetici etkiden potasyum kanallarının sorumlu olmadığı bildirilmektedir (3, 8, 10-12). Ayrıca fare bronş düz kası ve distal kolon düz kasında guanilat siklaz inhibitörü ODQ' nun gevşeme yanıtlarını etkilemediği gösterilmiştir (10, 12). H_2S 'in düz kas gevşetici etkisi sıçan uterusunda da gösterilmiştir (36).

Sıçan mesane detrusor kasında ise H_2S 'in konsantrasyona bağımlı kasılma yaptığı ve bu etkiyi kapsaisine duyarlı primer afferent sinirleri stimüle ederek gerçekleştirdiği öne sürülmüştür (4, 37).

2.3. Diyabet ve H_2S

Diyabet, pankreastaki β hücrelerinden insülin salgılanmasındaki yetersizlik veya dokunun insüline yanıt verebilirliğindeki bozulmaya bağlı olarak plazmadaki glukoz artışıyla karakterize bir hastalıktır. Diyabetik hastalarda birçok nörolojik, kardiyovasküler, gastrointestinal, ürolojik, oftalmolojik ve biyokimyasal komplikasyon gelişir (38). Mikro- ve makro-vasküler düz kas bozuklukları diyabetin yol açtığı en önemli klinik komplikasyonlardandır (39).

Diyabetik hayvan modeli oluşturmak için en yaygın kullanılan yöntem streptozotosin (STZ) veya alloxan enjeksiyonudur. STZ, intravenöz veya intraperitoneal olarak tek bir enjeksiyonla pankreas adacıkları beta hücrelerinde hasar oluşturan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. STZ direkt DNA kırılmalarına neden olarak beta hücrelerinde hasar oluşturmakta ve

dolayısıyla insülin salıverilmesini geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir (40). STZ enjeksiyonundan hemen sonra, insülin salıverilmesinin inhibisyonunu izleyen kısa süreli hiperglisemi ve ardından, hasarlı beta hücrelerinden insülin salıverilmesine bağlı olarak geçici hipoglisemi oluşur. Enjeksiyon sonrası 24 saatin sonunda geri dönüşümsüz kronik hiperglisemi tablosu ortaya çıkar (41).

Son yıllarda diyabette CSE/H₂S sisteminin patofizyolojisi araştırılmaktadır. H₂S'in CSE ve CBS ekspresyonu ile endojen olarak üretimi sıçan pankreas dokusunda gösterilmiştir. STZ enjeksiyonundan sonra sıçan pankreasında CSE mRNA ekspresyonu ve H₂S oluşumu anlamlı şekilde artmaktadır. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda endojen H₂S sentezinde rol oynayan enzimlerin ekspresyonu ve aktivitesinin artmış olduğu ve eş zamanlı insülin tedavisi ile bu artışın geri döndüğü bildirilmiştir (16). Diyabetik sıçanlarda CSE enzim inhibitörü D,L-propargilglisin (PAG) varlığında H₂S oluşumu azalmakta, plazma insülin düzeyleri artmaktadır (42).

K_{ATP} kanalları insülin salgılayan pankreatik β hücrelerinde bulunmaktadır. Pankreatik β hücreleri insülin sekresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Glukoz konsantrasyonundaki artış sırasıyla hücrede ATP birikimi, K_{ATP} kanal blokajı, plazma membran depolarizasyonu, ve içe yönelik Ca⁺² akışı sonucunda insülin sekresyonuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda ekzojen H₂S'in glukoz ile indüklenen insülin sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Buna karşın endojen H₂S'in PAG ile azalması bu etkiye zıt yönde bir etki göstermektedir. Endojen H₂S insülin sekresyonunu inhibe etmektedir. Glukozun ise H₂S oluşumunu azaltarak glukoz ile indüklenen insülin sekresyonuna katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (43).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneylerde 200-250 g ağırlığında Sprague-Dawley erkek albino sıçanlar kullanıldı. Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2005/68-5 ve 2008/28-3 no'lu izinler alındı.

3.1. Deneysel Diyabetin Oluşturulması

Sıçanlarda diyabet oluşturmak için ağırlık ve kan şekeri düzeyleri ölçüldü ve kuyruk veninden 0.1 M sitrat tamponu (pH 4.5) içinde çözölen STZ (35 mg/kg) çözeltisi uygulandı. Kontrol gruplarına da aynı yolla sitrat tamponu (çözöcö) enjekte edildi. Sıçanlara standart diyetin yanında enjeksiyonu takip eden ilk 24 saat içme suyu olarak %10'luk glukozlu su verildi. 72. saatin sonunda hayvanların kan şekeri düzeyleri tekrar ölçölerek kan glukoz konsantrasyonu 250 mg/dl'nin üzerinde olan hayvanlar diyabetik kabul edildi. Kan şekeri, kuyruk veninden alınacak kan örneklerinin glukofilm üzerine damlatılıp kan glukometresinde okunması yoluyla ölçöldü. Diyabet oluştuğö saptanan sıçanlar 4 ve 12 haftalık diyabetik olmak üzere iki gruba ayrıldı ve bunların birer alt-grubuna STZ enjeksiyonunu takiben 5. günde insölin tedavisi uygulandı. İnsölin tedavisi için hafif ketamin/ksilazin (90/10 mg/kg) anestezisi altında sıçanların abdomen bölgesinde deri altına insölin implantları (2 U/24 saat) yerleştirildi.

3.2. Anokoksigeus Kasının Hazırlanması

Sıçanlar kafalarına vurularak sersemletildikten sonra karotid arterleri kesildi ve kanatılarak öldüröldü. Anokoksigeus kası Gilllespie'nin (1972) tanımladığö yöntemeye göre izole edildi. Her iki anokoksigeus kası pelvik kavitenin tam ortasında üst koksigeal vertebradan başlayıp anüse birkaç milimetre uzaklıkta, kolonun önünde birleşmektedir. Buna göre kolon pelvise girdiğö yerden kesildi, pelvik parçö öne çekildi ve anokoksigeus kası görölüne kadar bağ dokusu temizlenerek kas izole edildi.

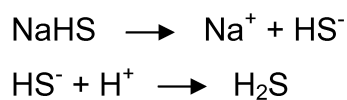
İzole edilen anokoksigeus kasının bir ucu organ askısına bağlandı ve organ askısı yardımı ile 37°C'de, %95 O₂ -%5 CO₂ karışımı ile gazlandırılan Krebs-Henseleit solüsyonu içeren 20 ml'lik organ banyosuna alındı. Anokoksigeus kasının serbest kalan ucu izometrik kuvvet transdüserine bağlandı ve 1 g bazal gerim uygulandı. Dokular deney protokolünden önce 1 saat boyunca 10'ar dakikalık aralıklarla yıkanarak dinlendirildi. Deneyler sırasında gerimdeki değişiklikler izometrik kuvvet transdüseri ile 'MAY 95-Transducer Data Acquisition System' (Commat) aracılığı ile bilgisayara kaydedildi.

3.3. Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arter Halkalarının Hazırlanması

Sıçanlar öldürüldükten sonra göğüs kafesi açılarak torasik aorta izole edildi. Orta hatta abdominal bölge üzerinden süperior mezenter artere ulaşıldı ve arterin ana dalı çıkarıldı. Daha sonra açılan göğüs kafesinden kalp ve akciğerler birlikte çıkarılarak çevre dokular temizlendi ve pulmoner arter izole edildi. İzole edilen arterler Krebs-Henseleit çözeltisi içerisine konuldu ve çevre bağ dokusu temizlendikten sonra 2-3 mm uzunluğunda kesilerek halkalar hazırlandı. Anokoksigeus da olduğu şekilde organ banyosuna alındı. Torasik aorta için 1.5 g, mezenter arter ve pulmoner arter için ise 1 g bazal gerim uygulandı.

3.4. Deney Protokolü

Deneylerde H₂S oluşturmak için H₂S donorü sodyum hidrojen sülfür (NaHS) kullanıldı. NaHS sulu çözeltide Na⁺ iyonu ve HS⁻ iyonuna ayrışmakta daha sonra HS⁻ H⁺ ile birleşerek H₂S oluşturmaktadır:



3.4.1. Sıçan Anokoksigeus Kasında H₂S'in Etkisi

Sıçan anokoksigeus kasında yapılan ön deneylerde fenilefrin (10^{-8} - 10^{-4} M) ile kasılma yanıtı alındı ve konsantrasyon-yanıt eğrisinden maksimum kasılmanın %60-80'inin 3×10^{-6} M fenilefrin ile elde edilebildiği saptandı. Daha sonra bu konsantrasyonda fenilefrin ile ön-kasılma oluşturulan preparatlarda NaHS (10^{-4} - 10^{-3} M)'in kümülatif olarak banyo ortamına eklenmesi ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtı alındı. Bir grup deneyde de karbakol (3×10^{-5} M) ve potasyum klorür (KCl) (60 mM) ile ön kasılma oluşturularak NaHS yanıtı incelendi.

Anokoksigeus kasında NaHS'e verilen gevşeme yanıtı üzerine çeşitli inhibitörlerin etkileri araştırıldı. Bu amaçla, K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid (10^{-5} M), spesifik olmayan potasyum kanal blokörü TEA (10^{-3} M), guanilat siklaz inhibitörü ODQ (10^{-4} M), adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 (10^{-4} M), protein kinaz A inhibitörü KT-5720 (10^{-6} M) ve protein kinaz C inhibitörü H-7 (3×10^{-5} M), NOS inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) ve siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5} M) kullanıldı. Her preparatta sadece bir inhibitörün etkisi incelendi ve dokular 30 dakika inkübe edilerek NaHS (10^{-4} - 10^{-3} M) yanıtı elde edildi.

3.4.2. Sıçan Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterinde H₂S'in Etkisi

Sıçan torasik aorta, mezenter arter ve pulmoner arterinde maksimum kasılmanın %60-80'inin elde edildiği 10^{-6} M fenilefrin ile ön-kasılma oluşturulduktan sonra NaHS (10^{-4} - 3×10^{-3} M)'in kümülatif olarak banyo ortamına eklenmesi ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtları alındı. Dokular K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid (10^{-5} M) ile 30 dakika inkübe edildi ve NaHS yanıtları incelendi.

3.4.3. Sıçan Anokoksigeus Kası ve Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterinde H₂S'in Oluşturduğu Gevşeme Üzerine Diyabetin Etkisi

Kontrol grubu, diyabetik (4 ve 12 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 ve 12 hafta) sıçanlardan izole edilen anokoksigeus kası fenilefrin (3×10^{-6} M) ile ön-kasılma oluşturulduktan sonra NaHS (10^{-4} - 10^{-3} M) ile elde edilen gevşeme yanıtı incelendi. Kontrol grubu, diyabetik (4 ve 12 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 ve 12 hafta) sıçanlardan izole edilen torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde de fenilefrin (10^{-6} M) ile ön-kasılma sonrasında NaHS (10^{-4} - 3×10^{-3} M) ile gevşeme yanıtları elde edildi. Ayrıca 4 hafta diyabetik sıçanlardan izole edilen arterler K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid (10^{-5} M) ile 30 dakika inkübe edildi ve NaHS yanıtları incelendi.

Bir grup deneyde de kontrol grubu, diyabetik (4 ve 12 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 ve 12 hafta) sıçanlardan izole edilen torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde fenilefrin (10^{-6} M) ile ön-kasılma sonrası asetilkolin (10^{-8} - 3×10^{-5} M) ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtları alındı.

3.5. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz

NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtları 10^{-4} M papaverin ile oluşturulan gevşemenin %'si olarak ifade edildi. Papaverin organ banyosuna NaHS ile maksimum gevşeme oluşturulduktan sonra eklendi. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak sunuldu. Deney gruplarından elde edilen yanıtların istatistiksel olarak anlamlılığını değerlendirmek için ANOVA/Newman-Keuls ve Student's *t* test kullanıldı. $P < 0.05$ ise ortalamalar arası fark anlamlı kabul edildi.

3.6. Deneylerde Kullanılan Solüsyonlar ve İlaçlar

Krebs-Henseleit solüsyonu (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 2.5; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; Glukoz, 11.6.

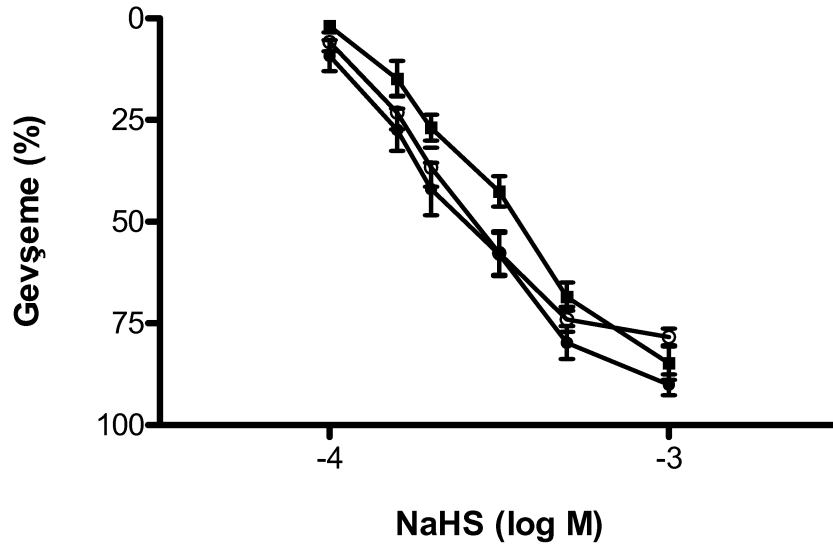
Deneylerde kullanılan ilaçlar sodium hidrojen sülfür, asetilkolin, fenilefrin hidroklorür, papaverin hidroklorür, karbakol, potasyum klorür, glibenklamid, tetraetilamonyum klorür, ODQ (1H-[1,2,4]oksadiazol[4,3-a]-kinoksalin-1-on), SQ-22536 (9-(Tetrahidro-2-furanil)-9H-pürin-6-amin), KT-5720 ((9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12- Hekzahidro – 10 – hidroksi – 9 -metil-1-okso-9,12-epoksi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirolo[3,4-i][1,6]benzodiazosin – 10 -karboksilik asit hekzil ester), H-7 dihidroklorür (1-(5-Isokinolinilsülfonil)-2-metilpiperazin dihidroklorür), L-NAME (N^W-Nitro-L-arjinin metil esteri), indometazin, streptozotosin Sigma (St. Louis, MO)'dan alınmıştır. İnsülin implantları Linshin (Kanada)'den alınmıştır.

Glibenklamid, ODQ ve KT-5720 dimetilsülfoksit (DMSO), tetraetilamonyum klorür, SQ-22536, H-7 dihidroklorür ve L-NAME ise distile su içerisinde çözülmüştür. İndometazin (1:1) oranında Na₂CO₃ ilavesiyle distile suda, streptozotosin ise sitrat tamponunda (20 mM sodyum sitrat + 0.1 mM sitrik asit) çözülmüştür. DMSO ve sitrat tamponu, kullanılan konsantrasyonlarda gevşeme yanıtlarını etkilememiştir.

4. BULGULAR

4.1. Sıçan Anokoksigeus Kasında Fenilefrin, Karbakol ve KCl (60 mM) ile Ön-kasılma Sonrası NaHS ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları

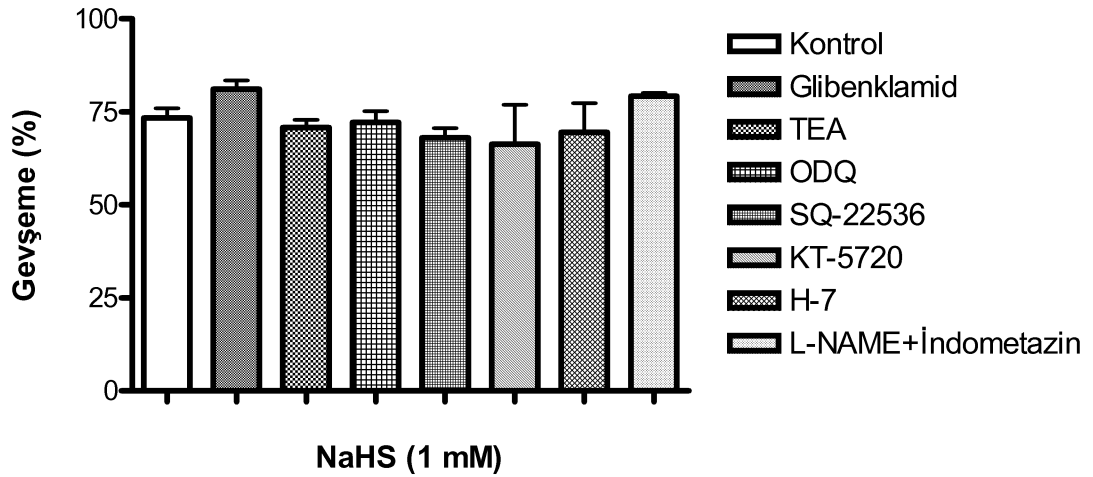
Sıçan anokoksigeus kasında, fenilefrin (3×10^{-6} M), karbakol (3×10^{-5} M) ve KCl (60 mM) ile ön-kasılma sonrası NaHS (10^{-4} - 10^{-3} M) ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtları alındı. Fenilefrin, karbakol ve KCl ile ön-kasılma sonrası elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Sıçan anokoksigeus kasında fenilefrin (○), karbakol (●) ve KCl (■) ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (n=6).

4.2. Sıçan Anokoksigeus Kasında Çeşitli İnhibitörler Varlığında Fenilefrin ile Ön-kasılma Sonrası NaHS ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları

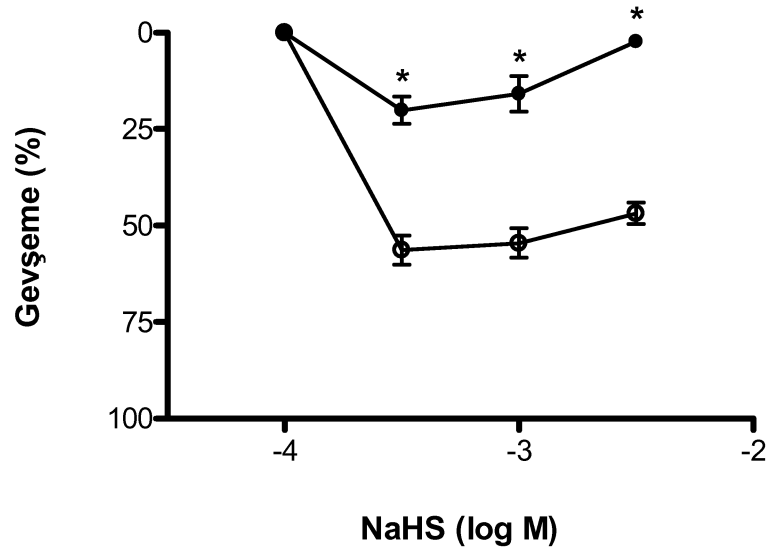
Sıçan anokoksigeus kasında K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid (10^{-5} M), spesifik olmayan potasyum kanal blokörü TEA (10^{-3} M), guanilat siklaz inhibitörü ODQ (10^{-4} M), adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536 (10^{-4} M), protein kinaz A inhibitörü KT-5720 (10^{-6} M), protein kinaz C inhibitörü H-7 (3×10^{-5} M), NOS inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) ve siklooksijenaz inhibitörü indometazinin (10^{-5} M) etkileri incelendi. Dokular bu inhibitörler varlığında 30 dakika inkübe edildikten sonra fenilefrin (3×10^{-6} M) ile ön-kasılma sonrası NaHS (10^{-4} - 10^{-3} M) ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtları alındı. Glibenklamid, TEA, ODQ, SQ-22536, KT-5720, H-7 ve L-NAME+indometazin varlığında NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtlarında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.2).



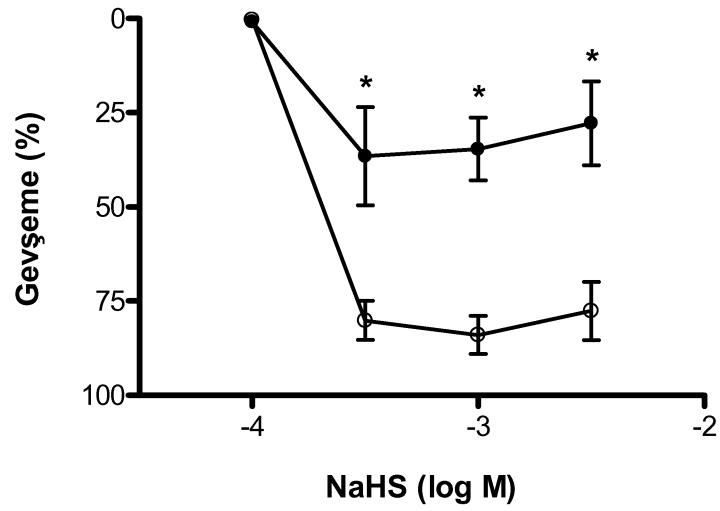
Şekil 4.2. Sıçan anokoksigeus kasında glibenklamid (10^{-5} M), TEA (10^{-3} M), ODQ (10^{-4} M), SQ-22536 (10^{-4} M), KT-5720 (10^{-6} M), H-7 (3×10^{-5} M), L-NAME+indometazin (10^{-4} M- 10^{-5} M) ile inkübasyon sonrası NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları (n=5-6).

4.3. Sıçan Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterinde Fenilefrin ile Ön-kasılma Sonrası NaHS ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları

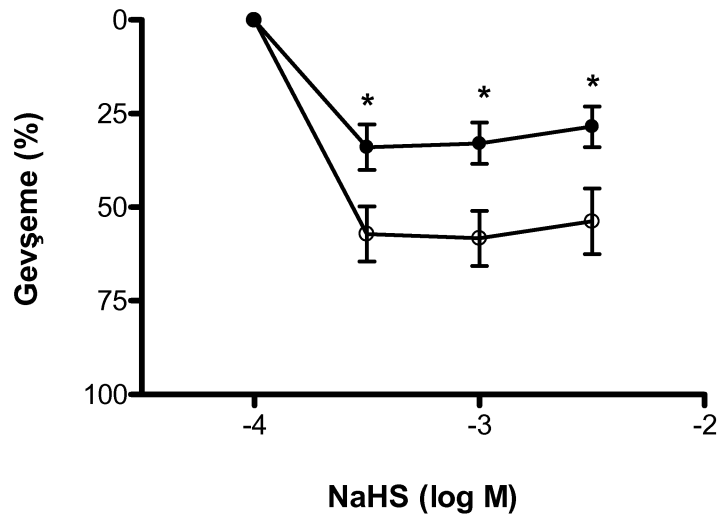
Sıçanların damar düz kas dokularında K_{ATP} kanal blokörü glibenklamidin NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerindeki etkisi incelendi. Sıçan torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterleri 30 dakika glibenklamid (10^{-5} M) ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında fenilefrin ön-kasılma sonrası NaHS (10^{-4} - 3×10^{-3} M) ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtları alındı. Torasik aorta, mezenter arter ve pulmoner arterde inkübasyon sonrası elde edilen NaHS yanıtlarında anlamlı bir azalma meydana geldi (Şekil 4.3.1, Şekil 4.3.2 ve Şekil 4.3.3).



Şekil 4.3.1. Sıçan torasik aortasında, glibenklamid (10^{-5} M) inkübasyonundan önce (○) ve sonra (●) NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P < 0.05$) (n=5-6).



Şekil 4.3.2. Sıçan mezenter arterinde glibenklamid (10^{-5} M) inkübasyonundan önce (○) ve sonra (●) NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (n=5-6).



Şekil 4.3.3. Sıçan pulmoner arterinde glibenklamid (10^{-5} M) inkübasyonundan önce (○) ve sonra (●) NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (n=5-6).

4.4. Diyabetin Sıçan Anokoksigeus Kası ve Çeşitli Damar Dokularında NaHS ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları Üzerindeki Etkisi

4.4.1. Diyabetik Sıçanların Kan Şekeri Düzeyleri ve Ağırlıkları

Kontrol grubu, diyabetik (4 ve 12 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 ve 12 hafta) sıçanların kan şekeri düzeyleri ve ağırlıkları ölçüldü. 4 ve 12 haftalık diyabetik sıçanlarda kan şekerleri kontrole göre anlamlı şekilde arttı ($P<0.05$). İnsülin tedavisi alan sıçanlarda ise bu artış gözlenmedi. Kontrol grubu ile 4 hafta diyabetik sıçanların ağırlıkları arasında anlamlı fark bulunmazken ($P>0.05$), 12 hafta diyabetik sıçanların ağırlıkları kontrole göre anlamlı derecede azaldı ($P<0.05$) (Tablo 4.4.1).

Tablo 4.4.1. Kontrol grubu, diyabetik (4 ve 12 hafta) ve insülin tedavisi alan sıçanların kan şekeri düzeyleri ve ağırlıkları

	Kan şekeri (mg/dl)	Ağırlık (g)
Kontrol (4 hafta)	102.33 ± 5.28	253.33 ± 12.56
Diyabetik (4 hafta)	419.82 ± 18.19 ^a	232.73 ± 10.54
İnsülin tedavisi (4 hafta)	79.20 ± 12.57 ^b	255.00 ± 19.79
Kontrol (12 hafta)	106.71 ± 7.59	311.66 ± 14.70
Diyabetik (12 hafta)	321.55 ± 5.98 ^a	261.66 ± 10.46 ^c
İnsülin tedavisi (12 hafta)	81.16 ± 22.28 ^b	308.57 ± 26.58

Bulgular ortalama ± standart hata olarak sunuldu (n = 5-7).

^a4 ve 12 hafta kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır, $P<0.05$

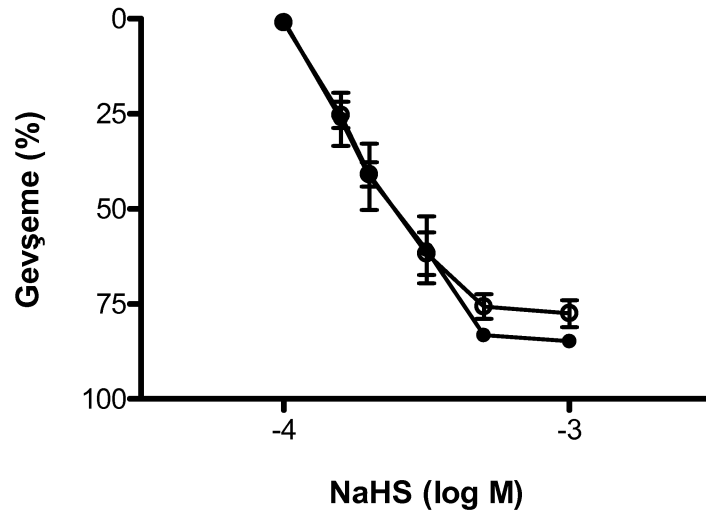
^b4 ve 12 hafta diyabetik gruptan istatistiksel olarak farklıdır, $P<0.05$

^c12 hafta kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır, $P<0.05$

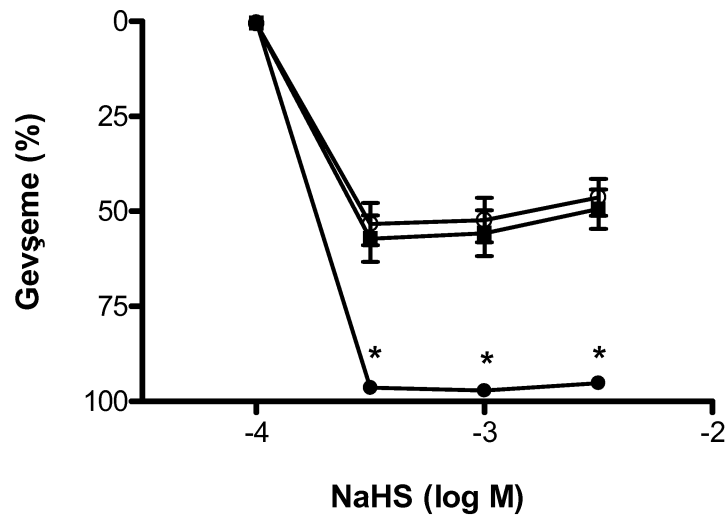
4.4.2. Diyabetik Sıçanlardan (4 ve 12 hafta) İzole Edilen Anokoksigeus Kası, Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterde NaHS Yanıtları

STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların damar-dışı düz kas ve damar dokularında fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtları incelendi. Diyabetik sıçanlardan (4 ve 12 hafta) izole edilen anokoksigeus kasında NaHS (10^{-4} - 10^{-3} M) ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişiklik olmadı (Şekil 4.4.2.1 ve Şekil 4.4.2.5). Ancak torasik aorta, mezenter ve pulmoner arter preparatlarında NaHS (10^{-4} - 3×10^{-3} M)'e verilen gevşeme yanıtlarında anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 4.4.2.2, Şekil 4.4.2.3, Şekil 4.4.2.4, Şekil 4.4.2.6, 4.4.2.7 ve Şekil 4.4.2.8). İnsülin tedavisi, diyabetik sıçanlardan (4 ve 12 hafta) izole edilen damar preparatlarında NaHS (10^{-4} - 3×10^{-3} M) ile elde edilen gevşeme yanıtlarında meydana gelen artışı önledi (Şekil 4.4.2.2, Şekil 4.4.2.3, Şekil 4.4.2.4, Şekil 4.4.2.6, 4.4.2.7 ve Şekil 4.4.2.8).

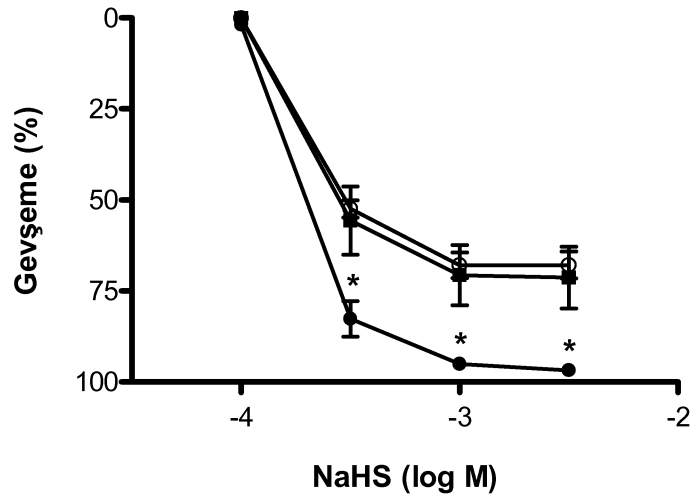
Damarlardaki NaHS yanıtına 4 haftalık diyabetin etkisi 12 haftalık diyabetin etkisi ile karşılaştırılarak da değerlendirildi. 12 hafta diyabetik sıçanlardan izole edilen torasik aortada, mezenter ve pulmoner arterde NaHS (10^{-4} - 3×10^{-3} M) gevşeme yanıtlarındaki artış 4 hafta diyabetik sıçanlarda elde edilenden anlamlı olarak daha az bulundu (Şekil 4.4.2.9).



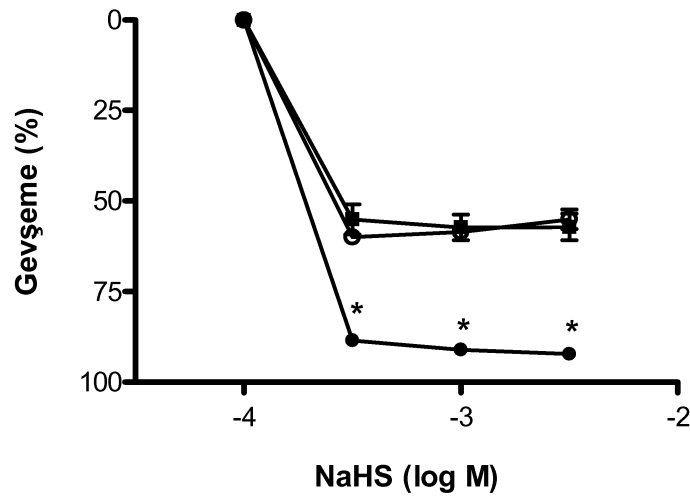
Şekil 4.4.2.1. Kontrol grubu (○) ve diyabetik (4 hafta) (●) sıçanlardan izole edilen anokoksigeus kasında fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (n=5-6).



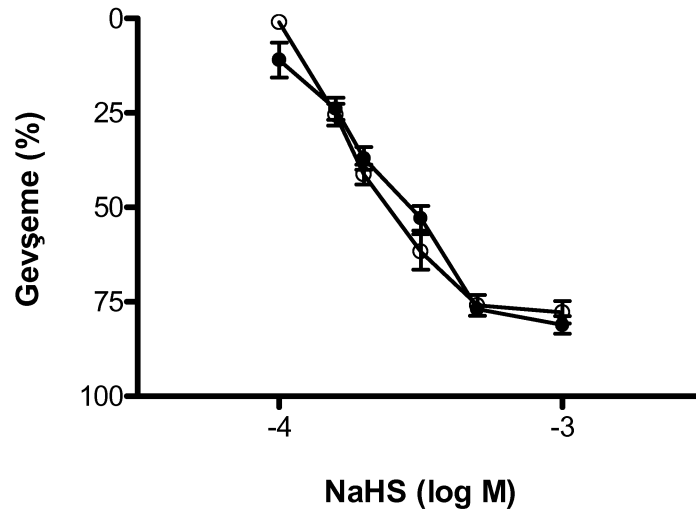
Şekil 4.4.2.2. Kontrol grubu (○), diyabetik (4 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen torasik aortada fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P < 0.05$) (n=6-7).



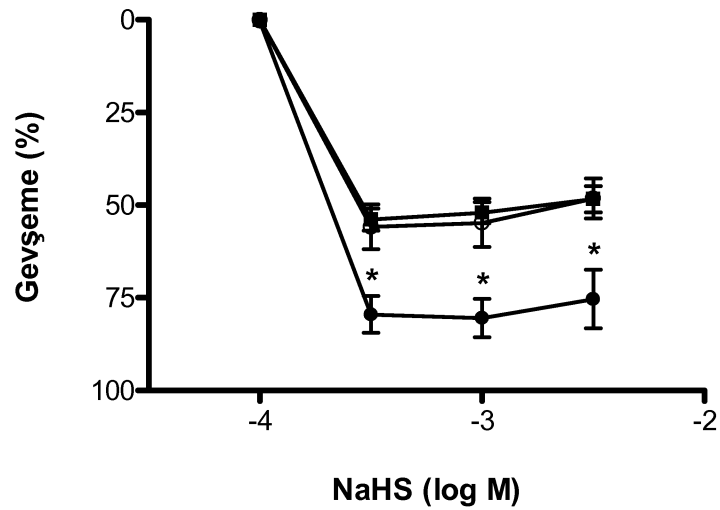
Şekil 4.4.2.3. Kontrol grubu (○), diyabetik (4 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen mezenter arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (n=5-7).



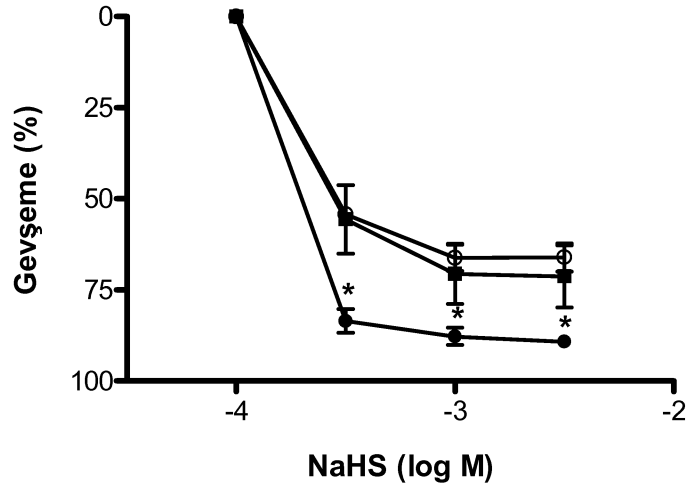
Şekil 4.4.2.4. Kontrol grubu (○), diyabetik (4 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen pulmoner arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (n=5-6).



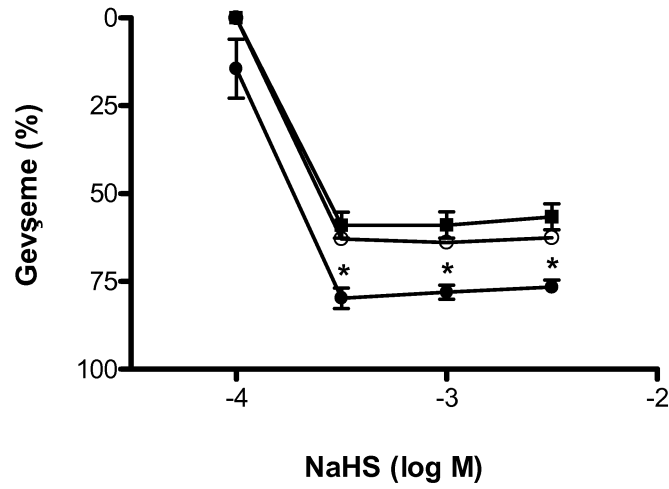
Şekil 4.4.2.5. Kontrol grubu (○) ve diyabetik (12 hafta) (●) sıçanlardan izole edilen anokoksigeus kasında fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (n=5-7).



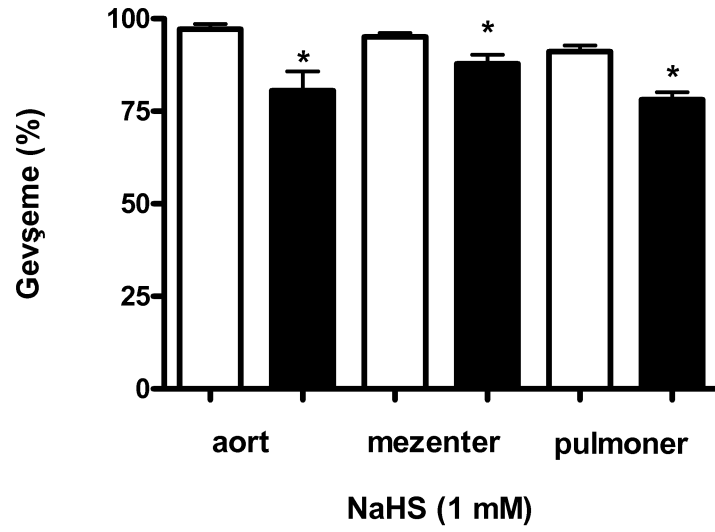
Şekil 4.4.2.6. Kontrol grubu (○), diyabetik (12 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (12 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen torasik aortada fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (n=5).



Şekil 4.4.2.7. Kontrol grubu (○), diyabetik (12 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (12 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen mezenter arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (n=5-6).



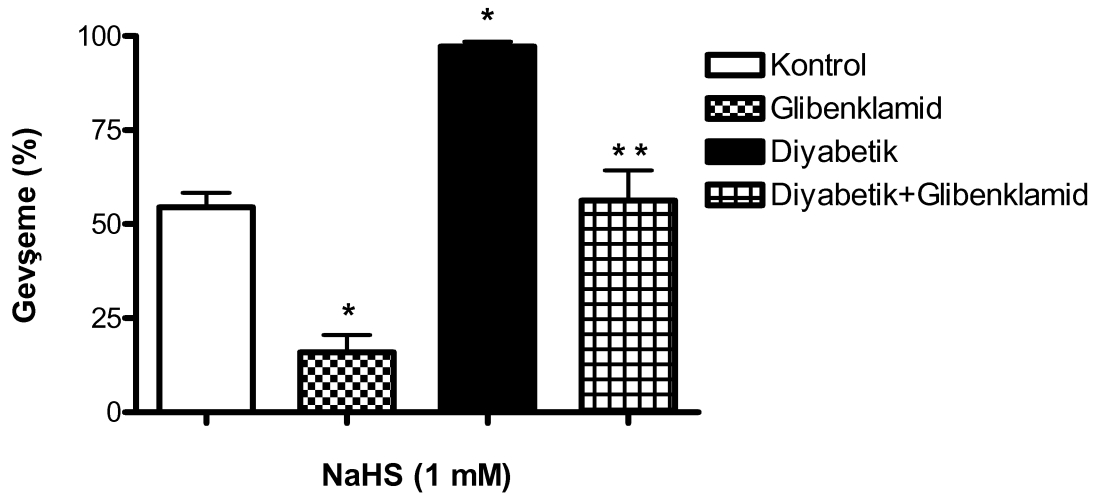
Şekil 4.4.2.8. Kontrol grubu (○), diyabetik (12 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (12 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen pulmoner arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (n=5-6).



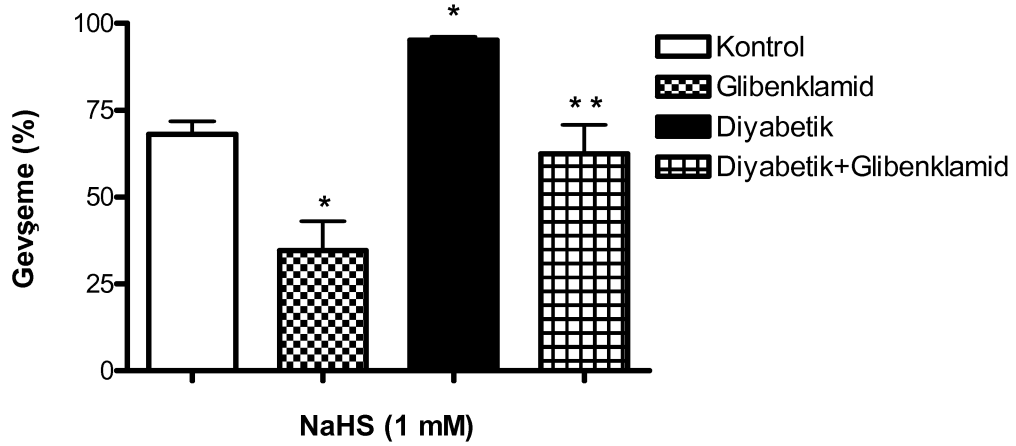
Şekil 4.4.2.9. 4 hafta diyabetik (□) ve 12 hafta diyabetik (■) sıçanlardan izole edilen torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (n=5-7).

4.4.3. Diyabetik Sıçanlardan (4 hafta) İzole Edilen Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterde Glibenklamidin NaHS Yanıtlarına Etkisi

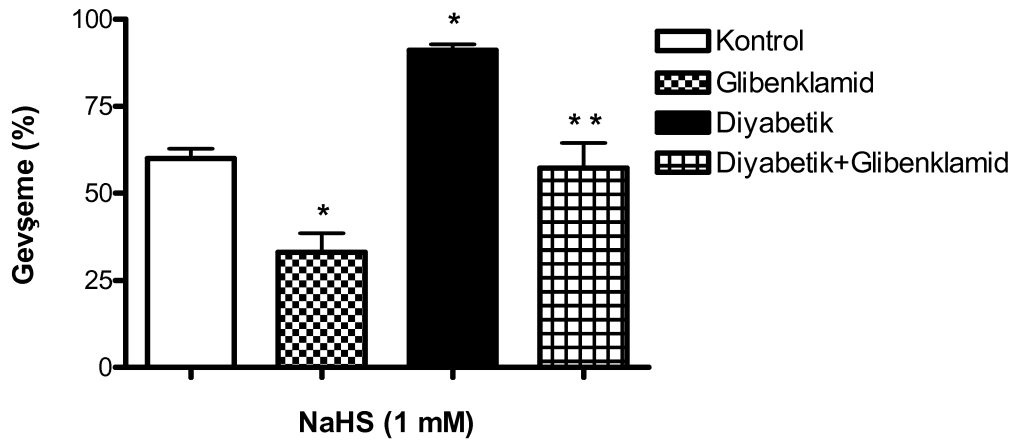
Diyabetik sıçanlardan (4 hafta) izole edilen torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterler glibenklamid (10^{-5} M) ile 30 dakika inkübe edildikten sonra fenilefrin ön-kasılmasının ardından NaHS (10^{-4} - 3×10^{-3} M) ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtları alındı. Torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde inkübasyon sonrası elde edilen NaHS yanıtları anlamlı olarak azaldı (Şekil 4.4.3.1, Şekil 4.4.3.2 ve Şekil 4.4.3.3).



Şekil 4.4.3.1. Kontrol grubu ve diyabetik (4 hafta) sıçanlardan izole edilen torasik aortada glibenklamid (10^{-5} M) ile inkübasyon öncesi ve sonrası NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P < 0.05$) (** diyabetik gruptan anlamlı olarak farklı, $P < 0.05$) (n=5-7).



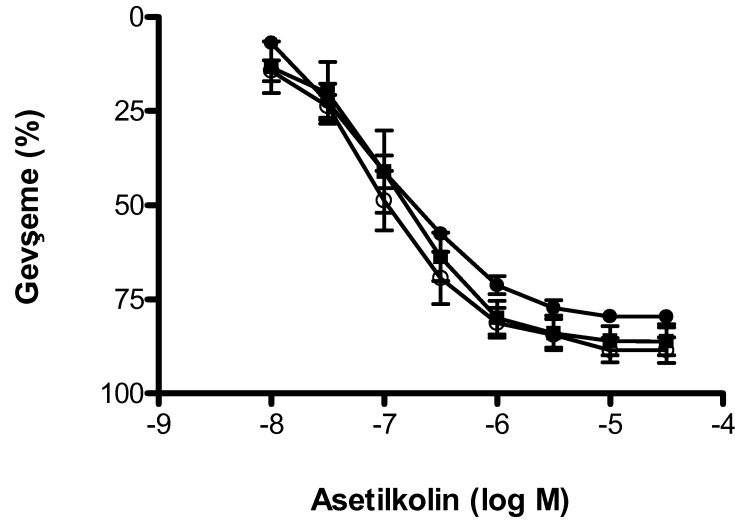
Şekil 4.4.3.2. Kontrol grubu ve diyabetik (4 hafta) sıçanlardan izole edilen mezenter arterde glibeklamid (10^{-5} M) ile inkübasyon öncesi ve sonrası NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (** diyabetik gruptan anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (n=6-7).



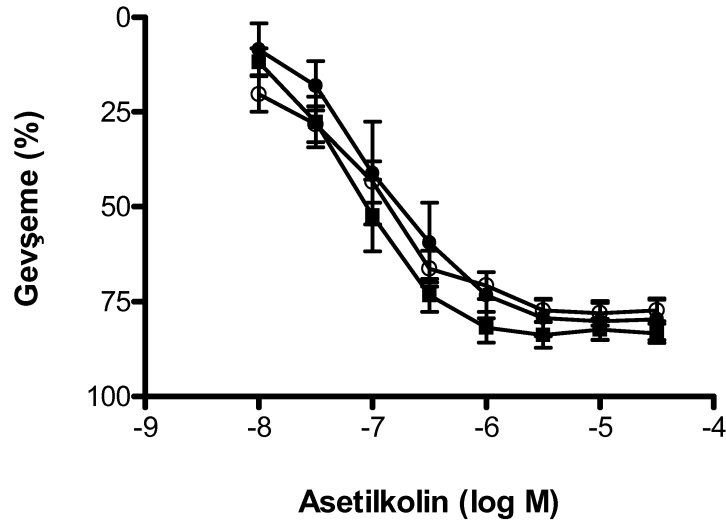
Şekil 4.4.3.3. Kontrol grubu ve diyabetik (4 hafta) sıçanlardan izole edilen pulmoner arterde glibeklamid (10^{-5} M) ile inkübasyon öncesi ve sonrası NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları (* kontrolden anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (** diyabetik gruptan anlamlı olarak farklı, $P<0.05$) (n=6-7).

4.5. Diyabetik Sıçanlardan (4 hafta ve 12 hafta) İzole Edilen Torasik Aorta, Mezenter ve Pulmoner Arterde Asetilkolin Yanıtları

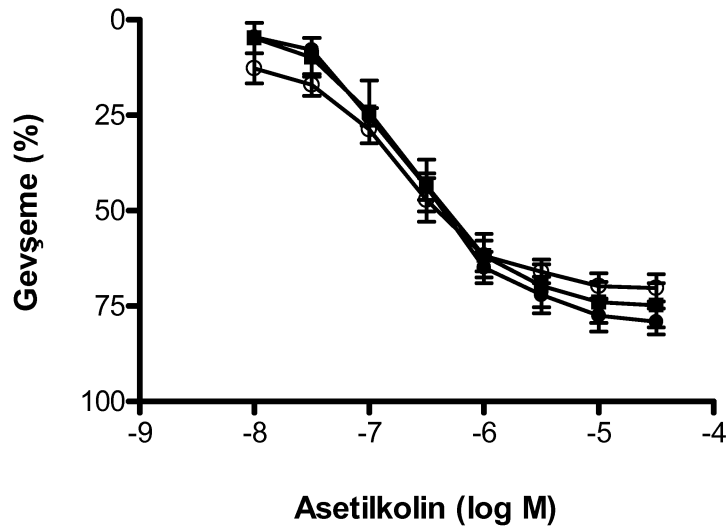
Diyabette oluşabilecek endotel hasarını kontrol etmek amacıyla diyabetik (4 ve 12 hafta) ve insülin tedavisi alan (4 ve 12 hafta) sıçanlardan izole edilen torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin (10^{-8} - 3×10^{-5} M) ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtı alındı. Diyabetik ve insülin tedavisi alan sıçanlardan izole edilen damar preparatlarında asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişiklik meydana gelmedi (Şekil 4.5.1, Şekil 4.5.2, Şekil 4.5.3, Şekil 4.5.4, Şekil 4.5.5, Şekil 4.5.6).



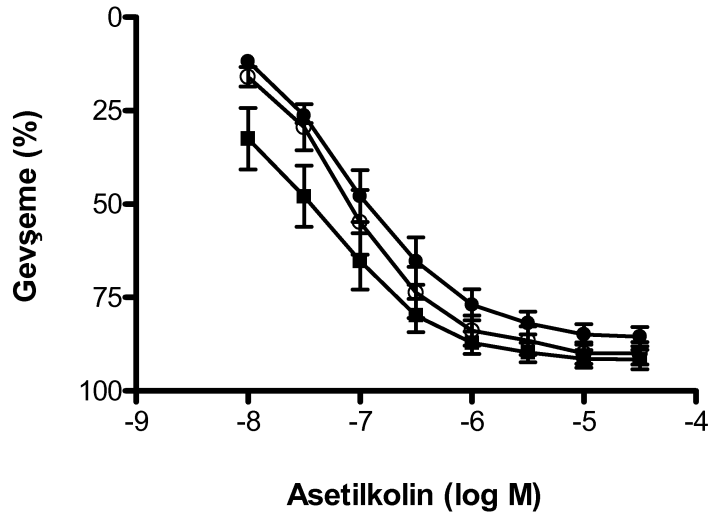
Şekil 4.5.1. Kontrol grubu (○), diyabetik (4 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen torasik aortada fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (n=6-7).



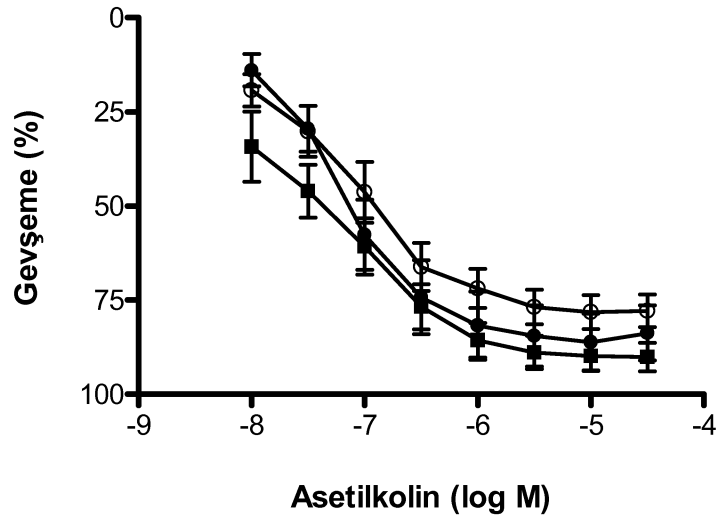
Şekil 4.5.2. Kontrol grubu (○), diyabetik (4 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen mezenter arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (n=5-7).



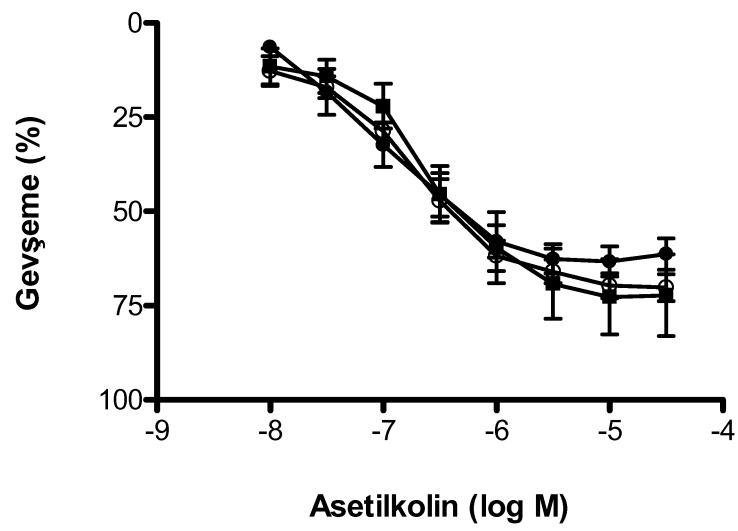
Şekil 4.5.3. Kontrol grubu (○), diyabetik (4 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (4 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen pulmoner arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (n=5-6).



Şekil 4.5.4. Kontrol grubu (○), diyabetik (12 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (12 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen torasik aortada fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (n=5).



Şekil 4.5.5. Kontrol grubu (○), diyabetik (12 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (12 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen mezenter arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (n=5-6).



Şekil 4.5.6. Kontrol grubu (○), diyabetik (12 hafta) (●) ve insülin tedavisi alan (12 hafta) (■) sıçanlardan izole edilen pulmoner arterde fenilefrin ile ön-kasılma sonrası asetilkolin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri (n=5-6).

5. TARTIŞMA

H₂S, memeli dokularında endojen olarak L-sisteinden pridoksal-5-fosfat bağımlı enzimler CSE ve CBS aracılığı ile oluşan bir gazdır (K8). CBS yüksek oranda santral sinir sisteminde CSE ise çoğunlukla vasküler sistemde eksprese olmaktadır (5). H₂S'in damar ve damar-dışı düz kaslarda güçlü gevşetici etki gösteren gaz yapısında bir nörotransmitter olabileceği ileri sürülmektedir. Vasküler sistemde H₂S'in K_{ATP} kanallarını açarak damarları gevşettiği ve *in vivo* hipotansiyon oluşturduğu bildirilmiştir (2, 9). H₂S'in düz kas gevşetici etkisi damar-dışı birçok dokuda da gösterilmiştir. Ancak damar düz kasından farklı olarak damar-dışı dokularda H₂S'in meydana getirdiği gevşetici etkiden potasyum kanallarının sorumlu olmadığı bildirilmektedir (3, 8, 10-12).

Çalışmamızda ilk olarak farklı kasılma ajanlarının NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine bir etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla sıçan anokoksigeus kasında, fenilefrin, karbakol ve KCl (60 mM) ile ön-kasılma sonrası NaHS ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtları değerlendirildi. Bianca ve ark.'nın bir çalışmasında insan korpus kavernosumunda fenilefrin ve KCl (80 mM) ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtları incelenmiş ve KCl ön-kasılması sonrasında fenilefrin ön-kasılmasına göre NaHS gevşeme yanıtlarında anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir (44). Zhao ve ark.'nın bir çalışmasında da farklı konsantrasyonlarda KCl ile ön-kasılma sonrası gevşeme yanıtları değerlendirilmiş ve yüksek konsantrasyonda (100 mM) KCl ile ön-kasılma sonrası alınan gevşeme yanıtlarının düşük konsantrasyona (20 mM) göre azaldığı bildirilmiştir (2). Çalışmamızda ise fenilefrin, karbakol ve KCl ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yapılan diğer çalışmaların aksine bulgularımız H₂S'in gevşetici etkisi üzerinde farklı kasılma ajanlarının etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

H₂S'in damar-dışı düz kaslardaki gevşetici etki mekanizmasını incelemek için birçok çalışma yapılmıştır. H₂S'in düz kas gevşetici etkisi kobay ileumu, sıçan vas deferens ve uterusu, fare mide fundusu, kolon ve bronşlar gibi birçok damar-dışı dokuda gösterilmiştir (3, 8, 10-12). H₂S'in damar-dışı düz kaslar üzerindeki etki mekanizması henüz aydınlatılamamış ancak bu gevşetici etkiden potasyum kanallarının sorumlu olmadığı gösterilmiştir (3, 8, 10-12, 36). Fare bronş ve distal kolon düz kasında guanilat siklaz inhibitörü ODQ'nun gevşeme yanıtlarını etkilemediği gösterilmiştir (10, 12). Kobay ileumunda da L-NAME ve indometazin inkübasyonu gevşeme yanıtlarını değiştirmemiştir (3). Fare mide fundusunda yapılan bir başka çalışmada ise H₂S yanıtları ODQ+SQ-22536 ve L-NAME'den etkilenmemiştir (11). Ancak insan korpus kavernosumunda NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtının yüksek konsantrasyonda L-NAME ile azaldığı gösterilmiştir (44). Çalışmamızda H₂S'in damar-dışı düz kaslardaki etkilerini incelemek için sıçan anokoksigeus kasında NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine çeşitli inhibitörlerin etkileri araştırıldı. Bu amaçla, K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid, spesifik olmayan potasyum kanal blokörü TEA, guanilat siklaz inhibitörü ODQ, adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536, protein kinaz A inhibitörü KT-5720 ve protein kinaz C inhibitörü H-7, NOS inhibitörü L-NAME ve siklooksijenaz inhibitörü indometazin kullanıldı. NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtlarını glibenklamid, TEA, ODQ, SQ-22536, KT-5720, H-7 ve L-NAME+indometazin etkilemedi. Bu inhibitörlerin NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtlarını değiştirmemesi H₂S'in gevşetici etki mekanizmasında sırasıyla potasyum kanalları, guanilat siklaz, adenilat siklaz, protein kinaz A, protein kinaz C, nitrik oksit ve siklooksijenazın rolünün bulunmadığını göstermektedir.

NO ve CO gibi endojen bir mediyatör olduğu düşünülen H₂S, bu iki maddeden farklı olarak vasküler dokularda sGMP yolunun aktivasyonundan bağımsız olarak gevşetici etki göstermektedir (34). Zhao ve ark. ise guanilat siklaz inhibitörü ODQ'nun NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtlarını potansiyalize ettiğini göstermiştir. Bu çalışma H₂S'in gevşetici etkisinde sGMP yolağının rolü olmadığını desteklemektedir. Aynı çalışmada

siklooksijenaz inhibitörü indometazin ve adenilat siklaz inhibitörü SQ-22536'nın H₂S gevşemesi üzerinde bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bu bulgu prostasiklin ve sAMP'nin de H₂S'in gevşetici etkisinde rolü olmadığını düşündürmektedir (2). H₂S'in vasküler dokularda K_{ATP} kanallarını açarak gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir (2, 9). Çalışmamızda sıçan torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterinde K_{ATP} kanal blokörü glibenklamidin NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerindeki etkisi incelendi. Sıçan torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterinde glibenklamid inkübasyonundan sonra fenilefrin ile ön-kasılma sonrası NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtlarında azalma meydana geldi. Bu bulgu damar düz kasında H₂S'in gevşetici etkisinden K_{ATP} kanallarının sorumlu olduğunu gösteren çalışmaları (2, 9) desteklemektedir.

H₂S'in fizyolojik rolü henüz açıklanamamış olmasına rağmen birçok patolojik durumla ilişkisi ileri sürülmektedir. Spontan hipertansif sıçanlarda CSE gen ekspresyonu, aktivitesi ve H₂S plazma düzeylerinin azaldığı (13), sıçanlarda oluşturulan septik, endotoksik ve hemorajik şokta ise plazma H₂S düzeylerinin önemli ölçüde arttığı (14, 45) gösterilmiştir. Ayrıca LPS ile indüklenen inflamasyonda plazma H₂S konsantrasyonu, CSE gen ekspresyonu ve H₂S sentezinin arttığı (15) da bildirilmiştir. Karragen ile indüklenen pençe ödeminde CSE enzim aktivitesi artmakta bu enzim inhibitörü ile tedavi sonrasında ise oluşan inflamasyon anlamlı derecede azalmaktadır (46). Bir başka çalışmada CSE geni silinmiş farelerin mezenter arterinde endojen H₂S oluşumundaki azalmaya bağlı olarak H₂S'e karşı duyarlılığın artması gevşeme yanıtlarında potansiyalizasyona neden olmaktadır (47). Deneysel diyabette ise pankreasta endojen H₂S sentezinde rol oynayan enzimlerin ekspresyonu ve H₂S oluşumunun arttığı ve eş zamanlı insülin tedavisi ile bu artışın geri döndüğü gösterilmiştir (16). H₂S'in diyabetle ilişkisini inceleyen diğer bir çalışmada da genetik diyabet modeli olan NOD (non-obese diabetic,) farelerde endojen H₂S düzeyleri incelenmiştir. NOD farelerde plazma H₂S düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca NOD farelerden izole edilen aortada eksojen H₂S ile elde edilen gevşeme yanıtları da incelenmiş ve gevşeme yanıtlarının potansiyalize

olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan aorta homojenatlarında endojen H_2S üretiminin azaldığı gösterilmiştir (48).

Çalışmamızda diyabetin damar-dışı ve damar düz kaslarında H_2S ile indüklenen gevşeme yanıtlarına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla kontrol, diyabetik (4 ve 12 hafta) ve insülin tedavili (4 ve 12 hafta) sıçanlardan izole edilen anokoksigeus kası, torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde H_2S donörü NaHS ile gevşeme yanıtları değerlendirildi. Anokoksigeus kasında NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişiklik olmazken torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde bu yanıtların potansiyalize olduğu gözlemlendi. İnsülin tedavisinin damarlarda meydana gelen bu potansiyalizasyonu önlediği gösterilmiştir. K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid de diyabetik sıçanlardan izole edilen torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde artmış olan NaHS gevşeme yanıtlarını inhibe etti. Çalışmamızda STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlardan izole edilen damarlarda H_2S 'in artmış olan gevşetici etkisi NOD farelerden izole edilen aortada gevşeme yanıtlarında görülen artışı desteklemektedir. Gevşeme yanıtlarındaki artış, diyabetin vasküler komplikasyonlarına karşı koruyucu bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. H_2S 'in gevşeme oluşturarak ve damar düz kaslarında proliferasyonu azaltarak koruyucu etki gösterdiği daha önceki çalışmalarda ileri sürülmüştür (2, 35). Diyabette H_2S 'in artan gevşetici etkisi endojen mediyatörlere karşı bozulmuş olan gevşeme yanıtını kompanse etmek ve artmış olan vasküler tonusu azaltmak için ortaya çıkmış olabilir. H_2S 'in artan gevşeme yanıtı 4 ve 12 hafta diyabetik sıçanlardan izole edilen damar preparatlarında birbirinden farklıdır. 4 hafta diyabette torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde potansiyalize olan yanıt 12 hafta diyabette azalmaktadır. Bu nedenle damarlarda H_2S ile indüklenen gevşeme yanıtında zamana bağlı bir adaptasyon geliştiği düşünülebilir.

Endotel harabiyetinin sıçan aorta ve mezenter arter yatağında H_2S potensini azalttığı gösterilmiştir (9, 35). Diğer taraftan endotelin H_2S 'in gevşetici etkisinde rolü olmadığını torasik aortada gösteren çalışma da vardır (8). Çeşitli patofizyolojilerde endotel fonksiyonlarını incelemek için endotel-bağımlı gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi sıklıkla kullanılan bir

yöntemdir. Farklı diyabet modellerinde normal, bozulmuş ya da artmış endotel-bağımlı yanıtlar gibi birbiri ile çelişen çalışmalar bildirilmiştir (35). Bu çalışmada STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlardan izole edilen torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişiklik olmamıştır. Dolayısıyla diyabette artan H_2S yanıtının endotel fonksiyonlarındaki değişikliklere bağlı olmadığı ileri sürülebilir.

6. SONUÇ VE YORUM

Bu çalışmada sıçan anokoksigeus kasında ve çeşitli damarlarda H_2S 'in düz kas gevşetici etki mekanizması incelenmiştir. Bulgularımız sıçan anokoksigeus kasında H_2S 'in gevşetici etki mekanizmasını aydınlatmakta yetersiz kalmaktadır. Ancak bu gevşetici etkiden potasyum kanalları, guanilat siklaz, adenilat siklaz, protein kinaz A, protein kinaz C, nitrik oksit ve siklooksijenazın sorumlu olmadığı düşünülmektedir. Torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde ise H_2S 'in gevşetici etkisinden K_{ATP} kanallarının sorumlu olduğu literatürle uyumlu olarak gösterilmiştir.

Çalışmamızın bir bölümünde de anokoksigeus kası ve damar düz kaslarında H_2S 'in oluşturduğu gevşeme yanıtlarına diyabetin etkisi incelenmiştir. Diyabetik sıçanlardan izole edilen anokoksigeus kasında H_2S 'in gevşetici etkisinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Torasik aorta, mezenter ve pulmoner arterde ise H_2S 'in gevşetici etkisinde artış meydana gelmektedir. İnsülin tedavisi ile bu artış engellenmektedir. Ayrıca diyabette H_2S 'in gevşetici etkisi K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid ile inhibe olmaktadır. Diyabette damarlarda H_2S 'e karşı gevşeme yanıtının artması, diyabette görülen vasküler komplikasyonlara karşı koruyucu bir mekanizma olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Chahl, L.A. (2004) Hydrogen sulphide: an endogenous stimulant of capsaicin-sensitive primary afferent neurons? *Br J Pharmacol*, 142, 1-2.
2. Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y. and Wang, R. (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*, 20, 6008-6016.
3. Teague, B., Asiedu, S. and Moore, P.K. (2002) The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol*, 137, 139-145.
4. Patacchini, R., Santicioli, P., Giuliani, S. and Maggi, C.A. (2004) Hydrogen sulfide (H₂S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol*, 142, 31-34.
5. Doeller, J.E., Isbell, T.S., Benavides, G., Koenitzer, J., Patel, H., Patel, R.P., Lancaster, J.R., Jr., Darley-Usmar, V.M. and Kraus, D.W. (2005) Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Anal Biochem*, 341, 40-51.
6. Wang, R. (2002) Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J*, 16, 1792-1798.
7. Abe, K. and Kimura, H. (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*, 16, 1066-1071.
8. Hosoki, R., Matsuki, N. and Kimura, H. (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 237, 527-531.
9. Cheng, Y., Ndisang, J.F., Tang, G., Cao, K. and Wang, R. (2004) Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287, H2316-2323.
10. Kubo, S., Doe, I., Kurokawa, Y. and Kawabata, A. (2007) Hydrogen sulfide causes relaxation in mouse bronchial smooth muscle. *J Pharmacol Sci*, 104, 392-396.

11. Dhaese, I. and Lefebvre, R.A. (2009) Myosin light chain phosphatase activation is involved in the hydrogen sulfide-induced relaxation in mouse gastric fundus. *Eur J Pharmacol*, 606, 180-186.
12. Dhaese, I., Van Colen, I. and Lefebvre, R.A. (2009) Mechanisms of action of hydrogen sulfide in relaxation of mouse distal colonic smooth muscle. *Eur J Pharmacol*,
13. Yan, H., Du, J. and Tang, C. (2004) The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 313, 22-27.
14. Hui, Y., Du, J., Tang, C., Bin, G. and Jiang, H. (2003) Changes in arterial hydrogen sulfide (H₂S) content during septic shock and endotoxin shock in rats. *J Infect*, 47, 155-160.
15. Li, L., Bhatia, M., Zhu, Y.Z., Zhu, Y.C., Ramnath, R.D., Wang, Z.J., Anuar, F.B., Whiteman, M., Salto-Tellez, M. and Moore, P.K. (2005) Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J*, 19, 1196-1198.
16. Yusuf, M., Kwong Huat, B.T., Hsu, A., Whiteman, M., Bhatia, M. and Moore, P.K. (2005) Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 333, 1146-1152.
17. Beauchamp, R.O., Jr., Bus, J.S., Popp, J.A., Boreiko, C.J. and Andjelkovich, D.A. (1984) A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol*, 13, 25-97.
18. Savage, J.C. and Gould, D.H. (1990) Determination of sulfide in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 526, 540-545.
19. Goodwin, L.R., Francom, D., Dieken, F.P., Taylor, J.D., Warenycia, M.W., Reiffenstein, R.J. and Dowling, G. (1989) Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J Anal Toxicol*, 13, 105-109.
20. Richardson, C.J., Magee, E.A. and Cummings, J.H. (2000) A new method for the determination of sulphide in gastrointestinal contents and

whole blood by microdistillation and ion chromatography. *Clin Chim Acta*, 293, 115-125.

21. Warenycia, M.W., Steele, J.A., Karpinski, E. and Reiffenstein, R.J. (1989) Hydrogen sulfide in combination with taurine or cysteic acid reversibly abolishes sodium currents in neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, 10, 191-199.

22. Wang, R. (2003) The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal*, 5, 493-501.

23. Reiffenstein, R.J., Hulbert, W.C. and Roth, S.H. (1992) Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 32, 109-134.

24. Finkelstein, J.D. and Martin, J.J. (1984) Inactivation of betaine-homocysteine methyltransferase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun*, 118, 14-19.

25. Moore, P.K., Bhatia, M. and Moolchhala, S. (2003) Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends Pharmacol Sci*, 24, 609-611.

26. Stipanuk, M.H. and Beck, P.W. (1982) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J*, 206, 267-277.

27. Awata, S., Nakayama, K., Suzuki, I., Sugahara, K. and Kodama, H. (1995) Changes in cystathionine gamma-lyase in various regions of rat brain during development. *Biochem Mol Biol Int*, 35, 1331-1338.

28. Searcy, D.G. and Lee, S.H. (1998) Sulfur reduction by human erythrocytes. *J Exp Zool*, 282, 310-322.

29. Kimura, H. (2002) Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Mol Neurobiol*, 26, 13-19.

30. Kimura, H. (2000) Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 267, 129-133.

31. Nagai, Y., Tsugane, M., Oka, J. and Kimura, H. (2004) Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J*, 18, 557-559.

32. Lee, S.W., Hu, Y.S., Hu, L.F., Lu, Q., Dawe, G.S., Moore, P.K., Wong, P.T. and Bian, J.S. (2006) Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells. *Glia*, 54, 116-124.
33. Lowicka, E. and Beltowski, J. (2007) Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep*, 59, 4-24.
34. Bhatia, M. (2005) Hydrogen sulfide as a vasodilator. *IUBMB Life*, 57, 603-606.
35. Zhao, W. and Wang, R. (2002) H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H474-480.
36. Hayden, L.J., Franklin, K.J., Roth, S.H. and Moore, G.J. (1989) Inhibition of oxytocin-induced but not angiotensin-induced rat uterine contractions following exposure to sodium sulfide. *Life Sci*, 45, 2557-2560.
37. Patacchini, R., Santicoli, P., Giuliani, S. and Maggi, C.A. (2005) Pharmacological investigation of hydrogen sulfide (H₂S) contractile activity in rat detrusor muscle. *Eur J Pharmacol*, 509, 171-177.
38. Ozturk, Y., Altan, V.M. and Yildizoglu-Ari, N. (1996) Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev*, 48, 69-112.
39. De Vriese, A.S., Verbeuren, T.J., Van de Voorde, J., Lameire, N.H. and Vanhoutte, P.M. (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*, 130, 963-974.
40. Bolzan, A.D. and Bianchi, M.S. (2002) Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res*, 512, 121-134.
41. Agarwal, M.K. (1980) Streptozotocin: mechanisms of action: proceedings of a workshop held on 21 June 1980, Washington, DC. *FEBS Lett*, 120, 1-3.
42. Yang, G., Yang, W., Wu, L. and Wang, R. (2007) H₂S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. *J Biol Chem*, 282, 16567-16576.
43. Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L. and Wang, R. (2005) Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J Physiol*, 569, 519-531.

44. d'Emmanuele di Villa Bianca, R., Sorrentino, R., Maffia, P., Mirone, V., Imbimbo, C., Fusco, F., De Palma, R., Ignarro, L.J. and Cirino, G. (2009) Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 4513-4518.
45. Mok, Y.Y., Atan, M.S., Yoke Ping, C., Zhong Jing, W., Bhatia, M., Moomchala, S. and Moore, P.K. (2004) Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *Br J Pharmacol*, 143, 881-889.
46. Bhatia, M., Sidhapuriwala, J., Moomchala, S.M. and Moore, P.K. (2005) Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacol*, 145, 141-144.
47. Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A.K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S.H. and Wang, R. (2008) H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*, 322, 587-590.
48. Brancaleone, V., Roviezzo, F., Vellecco, V., De Gruttola, L., Bucci, M. and Cirino, G. (2008) Biosynthesis of H₂S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Pharmacol*, 155, 673-680.

EK

BU TEZ ÇALIŞMASI İLE İLGİLİ BİLDİRİLER

1.Denizalti M., Bozkurt T.E., Erdemli-Sahin I., Abacıoglu N. The relaxant effect of hydrogen sulfide is enhanced in aorta but not in anococcygeus muscle isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. The Federation of European Pharmacological Societies (EPHAR) 2008 Congress, Manchester, UK, 13-17 July, 2008.

2. Denizaltı M., Bozkurt T.E., Erdemli-Şahin İ., Abacıoğlu N. Hidrojen sülfürün düz kas gevşetici etkisinin streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlardan izole edilen damarlarda incelenmesi. Türk Farmakoloji Derneği, 20. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7 Kasım, Manavgat-Antalya, 2009.